



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

Facultad de Química Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

**“Efecto del consumo de bebidas funcionales (infusiones)
utilizadas en México como alternativa para el control de obesidad
y sus complicaciones”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

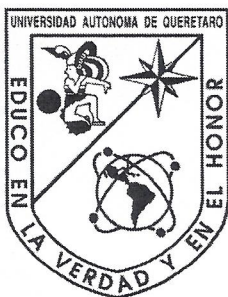
PRESENTA

M. en C. Claudia Ivette Gamboa Gómez

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Santiago de Querétaro, Qro., 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

Facultad de Química Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

“Efecto del consumo de bebidas funcionales (infusiones) utilizadas en México como alternativa para el control de obesidad y sus complicaciones”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

M. en C. Claudia Ivette Gamboa Gómez

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Secretario

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Suplente

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández

Director de la Facultad de Química

Dr. Irineo Torres Pacheco

Director de Investigación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por facilitar el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por dirigir este trabajo.

A los integrantes del comité por su asesoría y apoyo

A CONACYT por la beca otorgada

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A Dios que me dio los dones requeridos para este éxito profesional.

A mi esposo Bogar Vallejo Martínez, por su gran amor y apoyo incondicional en toda esta travesía. Te amo.

A mi papá que sin su consejo no estaría donde estoy.

A mi mamita, por todo su amor y apoyo.

A mis hermanos Víctor Hugo, Viviana, Monserrat y Cesar, porque cada uno forma parte de mi inspiración y motivación.

A cada uno de mis sobrinos porque su amor y cariño me hacen apreciar las cosas importantes de la vida.

A todas aquellas personas que intervinieron de alguna forma en mi formación académica porque de cada uno aprendí lo que quiero y no quiero ser.

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación y de corregir errores”.

Robert Oppenheimer

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad multifactorial que se asocia a enfermedades como la diabetes e hipertensión. Diferentes anomalías metabólicas en órganos tales como el hígado, tejido adiposo y riñón son causadas por la obesidad. Ciertas bebidas, como el té verde, pueden atenuar estos cambios. Sin embargo, para la población mexicana, el consumo de éste es poco común y existen otras fuentes de alimentos importantes con capacidades nutraceuticas, como la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), la albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) y el fruto de toronja (*Citrus paradisi*). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de bebidas funcionales (infusiones) como alternativa para el control de la obesidad y de sus complicaciones en un modelo animal inducido por dieta. Se evaluó el contenido de fenoles totales, flavonoides y antocianinas monoméricas en las tres infusiones. Los resultados mostraron que la infusión de *O. sanctum* presenta las concentraciones más altas de estos compuestos seguido de *H. sabdariffa*. Se realizó un perfil fenólico de las infusiones mediante HPLC, los compuestos más abundantes encontrados para *C. paradisi*, *O. sanctum* e *H. sabdariffa* fueron rutina, ácido vainillínico y ácido cumárico respectivamente. En los ensayos de capacidad antioxidante (oxidación de LDL, DPPH y ABTS), las infusiones *O. sanctum* e *H. sabdariffa* dieron el mejor valor. Para los estudios *in vivo*, se usaron ratas Sprague-Dawley, las cuales se alimentaron con una dieta, alta en grasas saturadas y fructosa, durante 9 meses. El tratamiento con las infusiones (1 %) comenzó al inicio del quinto mes. Como parte de la acción antiobesogénica de las infusiones se evaluó la absorción de lípidos en el intestino donde *O. sanctum* tuvo el mejor resultado. Además, se determinó el almacenamiento de triglicéridos (TG) en tejido adiposo, donde *H. sabdariffa* dio el mejor resultado, reflejándose en una mejora de la hipertrofia de los adipocitos. Así mismo, se evaluó el contenido de TG en suero y tejido hepático encontrándose una disminución en TG para todos los tratamientos. Las infusiones disminuyeron significativamente el nivel de ARNm de dos genes lipogénicos, SREBP1c y FAS, e incrementaron la expresión hepática de PPAR α y de CPT1a, los cuales están involucrados en la absorción mitocondrial de ácidos grasos y su oxidación. Con respecto a las complicaciones de la obesidad, como la presión arterial y arterioesclerosis, el consumo de infusiones reguló la hipertensión, siendo mejor el efecto de *O. sanctum*. El análisis histopatológico mostró una mejoría en la hialinización de las arteriolas renales y menores concentraciones de triglicéridos en ratas tratadas con *H. sabdariffa* y *O. sanctum*, además de una menor expresión de los genes REN y ANG involucrados en el sistema renina-angiotensina-aldosterona renal. El consumo de las infusiones mejoraron marcadores de estrés oxidativo tanto en riñón como en hígado, disminuyendo peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, especialmente en las ratas tratadas con la infusión de *O. sanctum*. Adicionalmente, la terapia con estas infusiones mejoraron el sistema antioxidante endógeno en el hígado determinado por el aumento de la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). El consumo de las infusiones mejoraron las complicaciones originadas por la obesidad, por lo que pueden ser consideradas como una alternativa natural para dicha enfermedad.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease that is often associated with diabetes, cardiovascular and hypertension. A number of metabolic abnormalities in organs such as liver, kidney and adipose tissue are caused by obesity, increasing the risk to chronic diseases. There are reports that certain beverages, such as green tea, can modulate these alterations. Unfortunately, the consumption of this beverage by the Mexican population is not very common; nevertheless, there are other important sources for infusions with nutraceutical potential such as grapefruit (*Citrus paradisi*), roselle flowers (*Hibiscus sabdariffa*), and basil (*Ocimum sanctum* L.). The aim of this work was to evaluate the effect of functional beverages (infusions) used in Mexico as auxiliary alternative in the control of obesity and its complications in a model of diet-induced obesity. Total phenolic, flavonoid, and monomeric anthocyanin contents were evaluated. The results showed that *O. sanctum* infusion had the highest concentrations. HPLC analysis showed that rutin, vanillic, and coumaric acids were the most abundant polyphenols from *C. paradisi*, *O. sanctum*, and *H. sabdariffa* infusions, respectively. LDL oxidation inhibition, ABTS, and DPPH assays were used in order to evaluate the antioxidant capacity, being *O. sanctum* and *H. sabdariffa* infusions with highest antioxidant capacity. Male Sprague-Dawley rats were fed with high saturated fat diet and fructose for nine months; infusion treatment (1 %) was administered at beginning of the fifth month. *C. paradisi* and *O. sanctum* infusions suppressed adipose and hepatic tissue fat accumulation, development of hyperlipidemia, and hyperglycemia, while improving insulin resistance. *H. sabdariffa* and *O. sanctum* infusions treatment significantly down-regulated the mRNA level of two hepatic lipogenesis genes: *sterol regulatory element binding protein 1c* (*SREBP1c*) and *fatty acid synthase* (*FAS*), whereas they up-regulated the hepatic expression of *peroxisome proliferator activated receptor alpha* (*PPAR α*) as well as hepatic and muscle expression of *carnitine palmitoyl-transferase 1a* (*CPT1a*), promoting mitochondrial fatty acid uptake and oxidation. Our results suggest that the anti-obesity effect of *C. paradisi* and *O. sanctum* infusions are related to the down-regulation of genes involved in lipogenesis. In addition, the anti-obesity mechanism of OS infusion is also related with the increase in lipid β -oxidation in liver and muscle. The results obtained for obesity complications such as blood pressure (BP) and nephrosclerosis showed that *H. sabdariffa*, *C. paradisi*, and *O. sanctum* infusions decreased BP by 25 % compared with obese control. Treated groups reduced renal triglycerides (30 % for *H. sabdariffa*, 38 % for *O. sanctum*, and 13 % for *C. paradisi* infusions). Histopathology analysis showed an improvement in hyalinization in renal arterioles in rats treated with *H. sabdariffa* and *O. sanctum* infusions. Plant infusions decreased renal TBARS and protein oxidation, as well as, diminished renal renin-angiotensin system activation through down-regulation of renin (REN) and angiotensinogen (ANG) genes, especially for rats treated with *O. sanctum* infusion. Additionally, therapy with these infusions enhanced the antioxidant status in the liver observed by the increased activity of glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT) enzymes. In conclusion, the consumption of these plant infusions is a feasible adjuvant treatment for obesity and its complications such as hyperlipidemia, hypertension and arteriolar nephrosclerosis.

ÍNDICE

	No. de página
1. Introducción	12
2. Antecedentes	3
2.1. Obesidad	3
2.2. Homeostasis energética	4
2.3. Tejido adiposo	5
2.3.1. Componentes celulares del tejido adiposo	5
2.3.2. Función endócrina del tejido adiposo	6
2.3.3. Distribución del tejido adiposo	6
2.4. Lipotoxicidad	7
2.5. Hígado	9
2.6. Genética de la obesidad	10
2.7. Complicaciones asociadas a la obesidad	14
2.7.1. Resistencia a la insulina y diabetes tipo II	14
2.7.2. Aterosclerosis, arterioesclerosis y presión arterial	15
2.7.2.1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona	18
2.7.3. Estrés oxidativo	20
2.7.3.1. Daño a lípidos	20
2.7.3.2. Daño a proteínas	21
2.7.3.3. Sistema de defensa antioxidante	22
2.8. Modelo animal de obesidad	23
2.9. Bebidas funcionales como alternativa contra la obesidad	25
2.10. Infusiones y obesidad	26
2.11. Materiales vegetales para la preparación de Infusiones	27
2.11.1. Flor de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	27
2.11.2. Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)	29
2.11.3. Albahaca morada (<i>Ocimum sanctum</i> L.)	30
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general	33
6. Objetivos particulares	33
7. Materiales y métodos	34
7.1. Materiales	34

7.1.1. Material de prueba	34
7.1.2. Material biológico	34
7.2. Métodos	34
7.2.1. Preparación de infusiones	34
7.2.2. Medición de parámetros de color de las infusiones	35
7.2.3. Cuantificación de fenoles totales	35
7.2.4. Determinación de flavonoides totales	36
7.2.5. Determinación de antocianinas monómericas	36
7.2.6. Identificación y cuantificación por HPLC de los ácidos fenólicos y flavonoides	37
7.2.7. Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-MS-TOF	37
7.2.8. Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de las infusiones	38
7.2.8.1. Evaluación del efecto antioxidante sobre la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)	38
7.2.8.2. Determinación de la capacidad antioxidante por método ABTS	40
7.2.8.3. Determinación de la capacidad antioxidante por método DPPH	41
7.2.9. Evaluación del efecto de la ingesta sobre obesidad y sus complicaciones de infusiones	41
7.2.9.1. Animales	41
7.2.9.2. Dieta	41
7.2.9.3. Cuantificación de triglicéridos en heces fecales	43
7.2.9.4. Evaluación del perfil lipídico	43
7.2.9.5. Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo	43
7.2.9.6. Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos	44
7.2.9.7. Cuantificación de lípidos en hígado	44
7.2.9.8. Evaluación microscópica del grado de esteatosis por histopatología	44
7.2.9.9. Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADN a partir de tejido de hígado tejido hepático o hígado	44
7.2.9.10. PCR en tiempo real	45
7.2.9.11. Alteraciones fisiológicas relacionadas con obesidad	46

7.2.9.11.1. Evaluación de resistencia a la insulina	46
7.2.9.11.2. Evaluación de la presión arterial en un modelo de obesidad inducido por dieta	47
7.2.9.11.3. Evaluación de lesiones ateroscleróticas	47
7.2.9.11.4. Evaluación de arterioesclerosis en riñón	47
7.2.9.11.5. Cuantificación de lípidos en riñón	48
7.2.9.11.6. Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADN a partir de tejido de riñón	48
7.2.9.11.7. PCR en tiempo real	48
7.2.9.11.8. Evaluación del efecto del consumo de infusiones sobre el estrés oxidativo en tejido de hígado y riñón	49
7.2.9.11.8.1. Determinación de proteínas oxidadas	49
7.2.9.11.8.2. Peroxidación lipídica en la fracción post mitocondrial (PMS) de tejido de hígado y riñón	30
7.2.9.11.8.3. Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado	51
7.2.9.11.8.4. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en hígado	52
7.2.9.11.8.5. Determinación del factor glutatión peroxidasa (GPx) en hígado	52
7.3. Análisis estadístico	53
8. Resultados y discusiones	54
8.1. Determinación de color en infusiones	54
8.2. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas monoméricas	56
8.3. Identificación y cuantificación de compuestos en infusiones	60
8.4. Evaluación de la capacidad antioxidante de infusiones	67
8.5. Efecto de las infusiones sobre el metabolismo de lípidos en ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa	71
8.5.1. Peso corporal	71

8.5.2. Evaluación de lípidos en heces	73
8.5.3. Perfil lipídico en ratas obesas	75
8.5.4. Concentración de triglicéridos y grado de hiperplasia en tejido adiposo	77
8.5.5. Concentración de triglicéridos y grado de esteatosis en hígado	80
8.5.6. Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en tejidos de hígado de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa	83
8.6. Efecto del consumo de infusiones sobre enfermedades crónico degenerativas relacionadas con la obesidad	87
8.6.1. Resistencia a la insulina	87
8.6.2. Presión arterial, aterosclerosis y arterioloesclerosis	89
8.6.2.1. Contenido de lípidos en riñón y expresión de genes involucrados en el sistema renina-angiotensina-aldosterona	96
8.6.3. Marcadores de estrés oxidativo en riñón e hígado	100
9. Conclusiones	105
10. Referencias	106

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		No. de página
1	Grupos experimentales.	42
2	Oligonucleótidos usados para en análisis de PCR en tiempo real en muestras a partir de tejido de hígado	46
3	Oligonucleótidos usados para en análisis de PCR en tiempo real en muestras a partir de tejido de riñón.	49
4	Parámetros de color de las infusiones.	54
5	Contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y antocianinas monoméricas.	57
6	Cuantificación de algunos ácidos fenólicos y flavonoides de infusiones.	62
7	Composición química de infusiones por el análisis de HPLC-MS-TOF.	65
8	Capacidad antioxidante de las diferentes infusiones utilizando las técnicas de oxidación de LDL, DPPH y ABTS.	68
9	Correlaciones de Pairwise para compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de las infusiones.	70
10	Peso de los diferentes tejidos adiposos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	72
11	Perfil de lípidos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	76
12	Metabolitos en suero y valores de HOMA de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	88
13	Lípidos en riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	96
14	Marcadores de estrés oxidativo en riñón de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	100
15	Marcadores de estrés oxidativo en hígado de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		No. de página
1	Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México.	3
2	Descripción de la principal ruta metabólica inducidas por SREBP-1c en hígado.	12
3	Mecanismos transcripcional mediados por la activación de PPAR α y su respuesta biológica.	14
4	Regulación de la presión arterial: el sistema renina-angiotensina-aldosterona renal	19
5	Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno.	22
6	Consumo calórico diario proveniente de bebidas en adolescentes y adultos, por grupo de edad en 2006 en México.	25
7	Flor de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).	29
8	Toronja (<i>Citrus paradisi</i>).	30
9	Albahaca morada (<i>Ocimum sanctum</i> L.).	31
10	Cromatogramas representativos de las infusiones de (A) <i>Hibiscus sabdariffa</i> , (B) <i>Citrus paradisi</i> . y (C) <i>Ocimum sanctum</i> L.	63
11	Peso corporal de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	71
12	Triglicéridos en heces fecales de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , <i>Citrus paradisi</i> y <i>Ocimum sactum</i> L.	74
13	Concentración de triglicéridos en tejido adiposo abdominal de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	77
14	Volumen de adipocitos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa, tratadas con infusiones.	79
15	Concentración de triglicéridos en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	82
16	Identificación de esteatosis en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa	83

17	saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Cuantificación de mRNA de SREBP1 y FAS en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	84
18	Cuantificación de mRNA de PPAR α y CPT1a en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	86
19	Presión arterial (sistólica y diastólica) de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	91
20	Aorta de ratas sanas y obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa.	92
21	Arteriolas de riñón de ratas sanas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	94
22	Parámetros de hipertrofia de arteriolas de riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa, y tratadas con infusiones.	95
23	Cuantificación de mRNA de ANG y REN en riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.	99

1. Introducción

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial compleja influida por factores genéticos, fisiológicos, metabólicos, celulares moleculares, sociales y culturales, y que se caracteriza por el aumento del tejido adiposo. Ésta enfermedad se acompaña de una serie de alteraciones metabólicas en órganos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Dichas alteraciones generan síndrome metabólico, el cual se asocia con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como enfermedades cardiovasculares, renales, entre otras. Por esta razón, la obesidad ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como un problema grave de salud pública, donde su incidencia y prevalencia, sobre todo en nuestro país ha alcanzado cifras de 60 a 70 % en adultos (OMS, 2010).

En países como México, la alta prevalencia de obesidad y sus complicaciones está directamente relacionada con el consumo elevado de calorías provenientes de los alimentos y bebidas, principalmente las refrescantes (Rivera y col., 2008). Se han establecido recomendaciones para satisfacer la mayor cantidad posible de las necesidades diarias de líquidos a través del agua y otras bebidas con bajo contenido energético, como las infusiones, cuyo consumo ha aumentado en los últimos años debido a su aporte importante de agua, pero principalmente, por el efecto positivo a la salud, relacionado con su contenido de fitoquímicos y micronutrientes. Dichos beneficios han permitido incluir a este tipo de productos dentro de las bebidas funcionales, las cuales contienen componentes clasificados como nutrientes o no nutrientes, con efecto sobre una o varias funciones del organismo, adicional al valor nutricional que pudieran tener. La actividad biológica de las infusiones se asocian principalmente a la acción antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolémica y de vasodilatación de sus componentes, como los polifenoles (Tipoe, y col., 2007). Así mismo, se ha comprobado que el consumo de ciertas infusiones puede ejercer efectos anti-obesogénicos, mediante diferentes mecanismos (McKay y Blumberg, 2006).

Materiales vegetales como hojas, flores y frutos, han sido utilizados para la preparación de infusiones. Uno de los materiales vegetales más comúnmente usados en México, es la flor de jamaica. Sin embargo, el uso de otros materiales vegetales que contienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos y actividad biológica, han sido recomendados para la preparación de este tipo de bebidas, entre éstos, se encuentran la albahaca morada y la toronja (Kelm y col., 2000; Wu y col., 2007). Aunado a esto, el consumo de estos dos materiales vegetales por parte de la población mexicana se ha incrementado de manera significativa en los últimos años (Beltran-Morales y col., 2010).

Es por todo esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de bebidas funcionales (infusiones) utilizadas en México como alternativa para el control de obesidad y sus complicaciones en ratas obesas inducidas por dieta alta en grasa saturada y fructosa.

2. Antecedentes

2.1. Obesidad

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial compleja influida por factores genéticos, fisiológicos, metabólicos, celulares moleculares, sociales y culturales, y que se caracteriza por el aumento del tejido adiposo (Chavarria-Aciniega, 2002). La obesidad debe diferenciarse del sobrepeso. Este último es cuando el peso corporal excede al peso de referencia del individuo en relación a su estatura (Van y Voghy, 1984).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012 reportó que en nuestro país la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es del 73 % para las mujeres y 69.4 % para los hombres.

Actualmente, México se encuentra en un proceso de transición donde la población presenta un aumento inusitado de sobrepeso y obesidad que afecta a todas las edades, a las zonas urbanas y rurales, y a las diferentes regiones del país. El tiempo excesivo de las actividades sedentarias y la falta de ejercicio regular, sugieren una importante contribución al aumento de la prevalencia de obesidad y enfermedades crónicas observado en México en los últimos años (Figura 1) (ENSANUT, 2012).

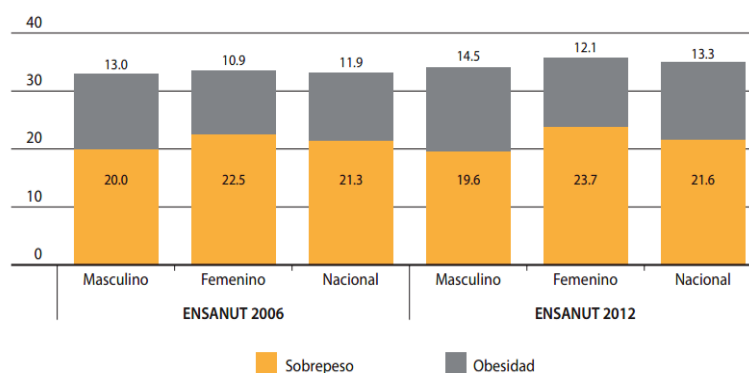


Figura 1. Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México (ENSANUT, 2012).

La obesidad predispone a riesgo de alteraciones metabólicas y fisiológicas en órganos como el hígado, riñón, músculo esquelético y tejido adiposo, generando hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión e hígado graso (Pickup, 2004). Estas alteraciones conforman al síndrome metabólico y se asocian con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Haoneng y Lingli, 2010).

2.2. Homeostasis energética

Homeostasis se define como el estado de equilibrio dinámico o el conjunto de mecanismos por los que todos los seres vivos tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno y por tanto de la composición bioquímica de los líquidos y tejidos celulares, para mantener la vida, siendo la base de la fisiología (McEwen y Wingfield, 2007).

El equilibrio entre la energía ingerida a través de los alimentos y la energía gastada por el metabolismo celular da como resultado el buen funcionamiento del organismo. Los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, son los tres macronutrientes que usualmente proveen de energía calórica a las células. Dependiendo de las funciones del tejido, la célula hace uso específico de cada uno de estos macronutrientes. Así, desde el punto de vista energético, la principal fuente de energía es la glucosa y su forma polimérica de almacenaje, el glucógeno; de modo tal que los organismos tienen mecanismos homeostáticos para mantener estables los niveles sanguíneos de glucosa. Es claro que el balance energético se preserva a partir de la ingesta de alimentos, la cual se controla a dos niveles: uno opera a corto plazo, determinando las reservas de carbohidratos del organismo e impulsando a la búsqueda de calorías cuando las reservas de glucógeno o los niveles de glucosa descienden; el otro opera a largo plazo y está más relacionado con la utilización de los depósitos grasos del tejido adiposo, promoviendo la ingesta de alimentos a mediano y largo plazo (Fragoso-Iñiguez y Coello-Coutiño, 2008).

2.3. Tejido adiposo

Los adipocitos son los encargados de almacenar la energía en forma de triglicéridos en gotas lipídicas. Cuando se necesita energía, los triglicéridos son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes salen del adipocito, siendo transportados hasta otros tejidos donde son utilizados (Guilherme y col., 2008).

El tejido adiposo controla el metabolismo lipídico a través de señales endócrinas, parácrinas y autócrinas, que le permiten regular el metabolismo tanto en adipocitos como en otros tipos celulares como el sistema nervioso central, hígado, músculo y páncreas (Kim y Moustaid-Moussa, 2000). Por otra parte, tras el descubrimiento de la leptina en 1990 (Zhang y col., 1994) se empezó a considerar el tejido adiposo como un verdadero órgano endócrino. Hoy en día, se conoce que dicho tejido secreta, además de leptina, una gran variedad de hormonas y citocinas con actividad biológica, genéricamente conocidas como adipoquinas (Kershaw y Flier, 2004). Estas moléculas actúan regulando el metabolismo energético en otros tejidos como el hígado y músculo, y además, presentan funciones específicas en procesos como inmunidad, inflamación y reproducción (Guilherme y col., 2008).

2.3.1. Componentes celulares del tejido adiposo.

El tejido adiposo es muy heterogéneo tanto a nivel de composición celular como a su localización anatómica. Está compuesto por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno donde también residen células madre mesenquimales, pre-adipocitos, terminales nerviosas, células sanguíneas y tejido vascular, que en conjunto se denomina fracción de estroma vascular (SVF, por sus siglas en inglés) (Frayn y col., 2003). Ambos componentes, adipocitos maduros y SVF, son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo.

Los adipocitos son las células más abundantes dentro del tejido adiposo, constituyendo el 25% del número total de células. Son esféricas, de tamaño muy variable, que oscila entre los 20 y 200 μm de diámetro. Estas células acumulan energía en forma de triglicéridos, diacilglicerol, fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol, los cuales son almacenados en el interior de orgánulos altamente especializados llamados gotas lipídicas (Frayn y col., 2003). El tejido adiposo también contiene macrófagos y otros componentes celulares. Los macrófagos derivan de monocitos circulantes y su número varía directamente con la adiposidad, correspondiendo al 5-10% de las células del tejido adiposo en condiciones normales y hasta casi un 60% en sujetos obesos (Hirai y col., 2010).

2.3.2. Función endócrina del tejido adiposo.

El tejido adiposo secreta una gran variedad de moléculas que poseen actividad biológica, conocidas en su conjunto como adipoquinas. Estas hormonas participan en una gran variedad de funciones fisiológicas como son: regulación de la homeostasis energética y vascular, regulación del metabolismo lipídico, control del apetito, sensibilidad a insulina, angiogénesis e inmunidad (Ronti y col., 2006). Debido a que estos factores participan en una gran variedad de procesos, se requiere un control estricto de su secreción, ya que la modificación de la concentración de adipoquinas en el plasma causa importantes alteraciones en la homeostasis energética corporal. De hecho, dicha secreción se encuentra alterada en la obesidad, la diabetes mellitus de tipo II y el síndrome metabólico (Maury y Brichard, 2010).

2.3.3. Distribución del tejido adiposo

El tejido adiposo se distribuye en distintos depósitos corporales, diferenciándose dos tipos, el tejido adiposo visceral (VAT, por sus siglas en inglés) y el subcutáneo (SAT, por sus siglas en inglés). El primero engloba el tejido adiposo omental, mesentérico, retroperitoneal, así como el perigonadal (Wajchenberg, 2000). El tejido subcutáneo se localiza debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo (Shi y col., 2009).

El tejido adiposo muestra marcadas diferencias morfológicas y funcionales en relación a su distribución corporal. Así, el VAT, además de una mayor actividad metabólica (i.e. transferencia y liberación de ácidos grasos), muestra una menor sensibilidad a insulina que el SAT (Adams, 1997; Wajchenberg, 2000; Wajchenberg y col., 2002). Ambos tenidos también difieren por su la capacidad proliferativa y de diferenciación de sus pre-adipocitos (mayor en SAT), así como en la tasa de apoptosis (mayor en VAT) (Tchkonia y col., 2005). Finalmente, ambos muestran perfiles de expresión y secreción de adipoquinas particulares, incluyendo una mayor producción de adiponectina en SAT (Fain y col., 2003) y de marcadores pro inflamatorios (IL-6 y TNF- α) en VAT (Fain y col., 2003; Vohl y col., 2004).

Se ha demostrado que SAT presenta una menor infiltración de macrófagos, siendo estas diferencias interdepósito aún mayores en la obesidad (Harman-Boehm y col., 2007; O'Rourke y col., 2009). En este contexto, los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento indican que la obesidad visceral está altamente asociada con un mayor riesgo metabólico (i.e. resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, enfermedad cardiovascular) (Wajchenberg y col., 2002; Snijder y col., 2003; Hamdy y col., 2006).

2.4. Lipotoxicidad

La obesidad se caracteriza por contener un aumento de triglicéridos en el tejido adiposo. La excesiva liberación de ácidos grasos provenientes de este órgano, causa una alteración denominada lipotoxicidad. Existen suficientes antecedentes que respaldan este mecanismo como el principal mediador de resistencia a la insulina y la muerte celular en la obesidad (Briaud y col., 2001; Robertson y col., 2004).

El metabolismo intracelular de ácidos grasos puede seguir tres rutas: β -oxidación, formación de glicerolípidos y formación de esfingolípidos. De tal manera que, el destino final de los ácidos grasos dependerá de su composición y de las demandas energéticas de la célula (Summers, 2006). En la obesidad, el ingreso continuo de ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo hipertrófico y de la síntesis endógena en los tejidos (principalmente hígado) estimula su acumulación y la producción de intermediarios metabólicamente activos que alteran las funciones normales de la célula (Feldstein y col., 2004; Summers, 2006).

El hígado cumple funciones importantes en el metabolismo de los lípidos, incluyendo la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), cuya formación está directamente relacionada con la disponibilidad de ácidos grasos. Estos son transportados al hígado unidos a albúmina, y son captados por los hepatocitos para ser utilizados en la síntesis de los triglicéridos, los cuales son posteriormente combinados con apoproteínas, formando así partículas de lipoproteínas que son secretadas a la circulación (Salomón y Martinís, 2005). Cuando se tiene un exceso de lípidos, la secreción de triglicéridos incrementa, pero también tienden a almacenarse, generándose esteatosis. La esteatosis es una característica de la obesidad, generando un ambiente inflamatorio sistémico que promueve el desarrollo de lipotoxicidad y apoptosis de las células del parénquima y la subsiguiente producción de colágeno por las células estelares (Angulo, 2005; Feldstein y col., 2005). De este modo, el proceso de lipotoxicidad estimula la progresión de la esteatosis a cirrosis y fibrosis hepática.

El consumo crónico de una dieta alta en energía incrementa la producción de insulina y la lipogénesis hepática. El aumento en el contenido de colesterol hepático reduce la captura de lipoproteínas mediada por el LDLr (receptor de LDL), incrementando la concentración de LDL circulante y el riesgo de lesiones aterogénicas. El aumento de las lipoproteínas incrementa la captura de lípidos por el tejido adiposo, produciendo adipocitos hipertróficos y secundariamente, obesidad.

Los adipocitos hipertróficos desarrollan resistencia a la insulina ocasionando aumento en la liberación de ácidos grasos libres, leptina y TNF α , los cuales incrementan el daño hepático mediado por lípidos, generando lipotoxicidad. De esta manera, la interacción entre el hígado y el tejido adiposo se ha denominado eje adipo-hepático, donde la alteración funcional de alguno de estos órganos en la obesidad, afecta la función del otro, generando un círculo que altera dicho eje (Angulo, 2005; Feldstein y col., 2005).

2.5. Hígado

Las alteraciones en la función hepática en la obesidad afecta la actividad metabólica del resto de los tejidos, debido a que éste regula numerosos aspectos del metabolismo energético en el organismo. Entre otros, el hígado mantiene la concentración circulante de glucosa dentro de un rango estrecho a corto y largo plazo, provee continuamente a los tejidos periféricos de ácidos grasos y colesterol a través de la producción y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), recibe el colesterol excedente del organismo por medio del transporte reverso del colesterol, mediado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lo elimina a través de la bilis (Postic y col., 2004).

La mayor parte de las actividades metabólicas del hígado son controladas principalmente a nivel hormonal por la insulina y el glucagón. Ambas hormonas circulan en relación directa al consumo de alimento, la producción de una, reprime a la otra; sin embargo, los efectos netos en el metabolismo resultan de la concentración relativa de una hormona respecto a la otra, denominada relación insulina/glucagón (Díaz-Muñoz y col., 2000).

La señalización inducida por estas hormonas produce efectos a corto y largo plazo en la velocidad de las rutas metabólicas en el hígado. A corto plazo, involucra cambios en el estado de fosforilación de las enzimas metabólicas, modificando su actividad, mientras que a largo plazo, involucra cambios en la velocidad de transcripción y traducción de los componentes de las vías metabólicas, los cuales pueden ir desde horas hasta días (Tovar y Torres, 2003).

2.6. Genética de la obesidad

En la obesidad intervienen varios genes que, en combinación con el medio ambiente, dan lugar a la aparición de la obesidad. Entre los genes implicados en la etiología de la obesidad se encuentran genes metabólicos, los cuales codifican para péptidos que controlan las señales de hambre y saciedad, genes reguladores del gasto energético y genes reguladores del crecimiento y diferenciación de los adipocitos (Horton y col., 2002).

Entre los reguladores transcripcionales relacionados con la obesidad se encuentra el receptor perteneciente a la familia de factores de transcripción proteínas de unión a elementos de respuesta de esteroides (SREBP) que controlan la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Horton y col., 2002).

Los receptores SREBPs se expresan en la mayor parte de los tejidos, aunque su contenido es mayor en el hígado, tejido adiposo, riñón e intestino. Los SREBPs se sintetizan como precursores inactivos anclados a la membrana del retículo endoplásmico y su activación depende del procesamiento proteolítico mediado por dos proteasas (S1P y S2P) que liberan el extremo N terminal que constituye el factor de transcripción activo. SREBP viaja al núcleo donde se une al sitio de respuesta a esteroides (SER, por sus siglas en inglés) en la región promotora de los genes blanco; posteriormente, reclutan factores de transcripción generales como el factor nuclear Y (NFY) para activar la transcripción (Brown y col., 1997).

La sobreexpresión de SREBP-1 en hígado de ratones transgénicos incrementa la transcripción de las enzimas lipogénicas, esto produce una acumulación masiva de triglicéridos en el hígado, generando hepatomegalia, esteatosis e hipertrigliceridemia (Shimano y col., 2000). SREBP-1 reprime la transcripción del sustrato del receptor de insulina 2 (ISR2), interfiriendo con la señalización de la insulina e induciendo resistencia de los tejidos a su acción (Ide y col., 2004). La ingesta de alimentos con alto contenido de energía incrementa la producción de insulina activando a SREBP-1 en el hígado.

SREBP-1 estimula la síntesis de ácidos grasos y su esterificación en triglicéridos para ser enviados a la circulación en las VLDL y almacenarse en el tejido adiposo, aumentando el peso corporal (Kolehmainen y col., 2001). Distintos estudios han demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados hepáticos son preferencialmente esterificados a triglicéridos para su almacenaje y exportación en las VLDL, disminuyendo la cantidad de ácidos grasos que ingresan a la mitocondria para su oxidación. De tal manera que, al regular la síntesis de enzimas como la estearil Coenzima A, SREBP-1 no solo regula la síntesis de lípidos en el hígado, sino también determina el destino metabólico. SREBP1c induce genes imprescindibles para la síntesis, elongación y desaturación de ácidos grasos (Moon y col., 2001), así como para su incorporación a la síntesis de fosfolípidos (Edwards y col., 2000) y triglicéridos como la glicerol-3-fosfato acil-transferasa (Ericsson y col., 1997) (Figura 2).

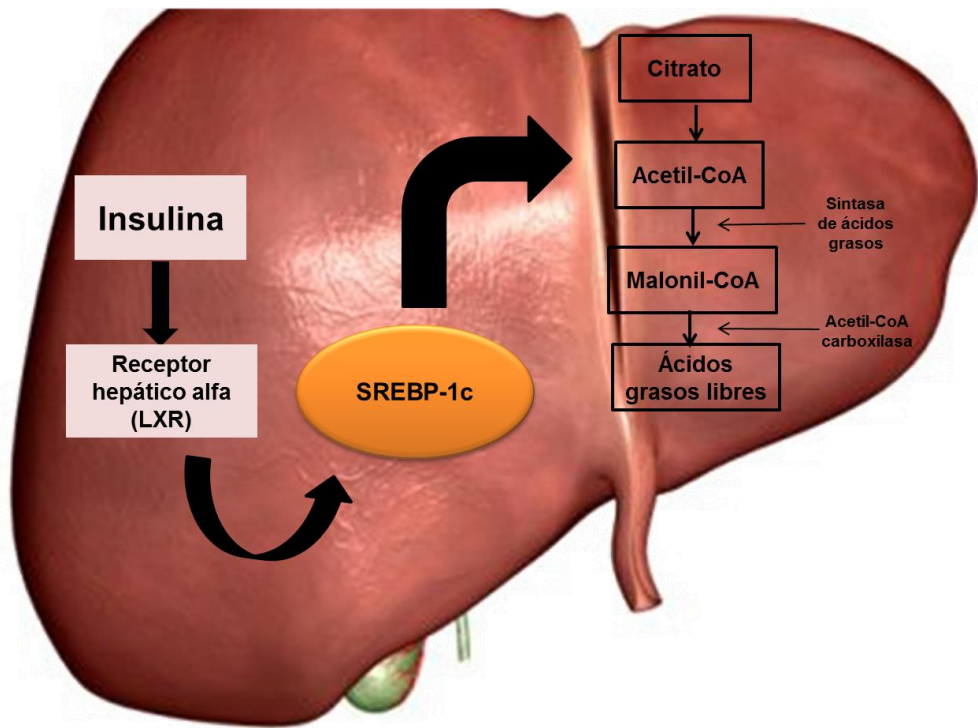


Figura 2. Descripción de la principal ruta metabólica regulada por SREBP-1c en hígado (Vernia-Miralles, 2007).

Otros receptores nucleares importantes en obesidad son la familia de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPARs, por sus siglas en inglés), los cuales son factores de transcripción y se han descrito tres isoformas diferentes (α , β y γ). Estos receptores nucleares se activan por medio de moléculas estructuralmente diversas que se denominan proliferadores peroxisomales. Los activadores pueden ser moléculas endógenas (ácidos grasos, esteroides) o xenobióticos (sustancias hipolipemiantes como los fibratos) (Yessoufou y Wahli, 2010).

Los receptores PPARs se expresan en diferentes tejidos donde van a desempeñar funciones muy importantes en el control del metabolismo energético. El PPAR α se localizan fundamentalmente en tejidos con gran actividad metabólica como el hígado, músculo, riñón, corazón, células endoteliales, músculo liso, macrófagos y células espumosas (Yessoufou y Wahli, 2010).

Dentro de los efectos de la activación de PPAR α , el más importante es la reducción de los valores plasmáticos de triglicéridos. Esta acción es mediada por la activación de PPAR α en el hígado, es consecuencia tanto de los efectos sobre la síntesis, como sobre el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. En el primer caso, la activación de PPAR α hepático reduce la síntesis de VLDL como consecuencia de un incremento en el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos. Esta degradación de los ácidos grasos libres, uno de los sustratos necesarios para la síntesis de las VLDL, aparece como resultado de la modificación de la expresión de genes diana de PPAR α implicados en su recaptación y su destino intracelular (Gervois y col., 2000). Entre éstos se encuentran transportadores de membrana, como la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (Motojima y col., 1998) que aumentan la recaptación hepática de ácidos grasos tras la activación de PPAR α .

Además, los agonistas PPAR α también estimulan la conversión de los ácidos grasos en sus derivados acil CoA, en un proceso catalizado por la acil-CoA sintetasa, evitando la salida de ácidos grasos de las células para posteriormente estimular su degradación en las mitocondrias y los peroxisomas, por procesos de β -oxidación (Mascaró y col., 1998).

La mitocondria es el orgánulo intracelular que más contribuye a la β -oxidación de los ácidos grasos, generando energía en forma de ATP gracias a la fosforilación oxidativa. El primer paso que conduce a la beta-oxidación mitocondrial implica la participación de un sistema de transporte facilitado de ácidos grasos hacia el interior de este orgánulo. Este sistema está integrado por varias enzimas, en una de las cuales, la carnitina-palmitoil transferasa I (CPT-1), se ha descrito la presencia de un PPAR en su transcripción (Mascaró y col., 1998). Además, PPAR α también regula la transcripción de diversos genes implicados directamente en el proceso de β -oxidación mitocondrial, como es el caso de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena intermedia (MCAD) (Neve y col., 2001).

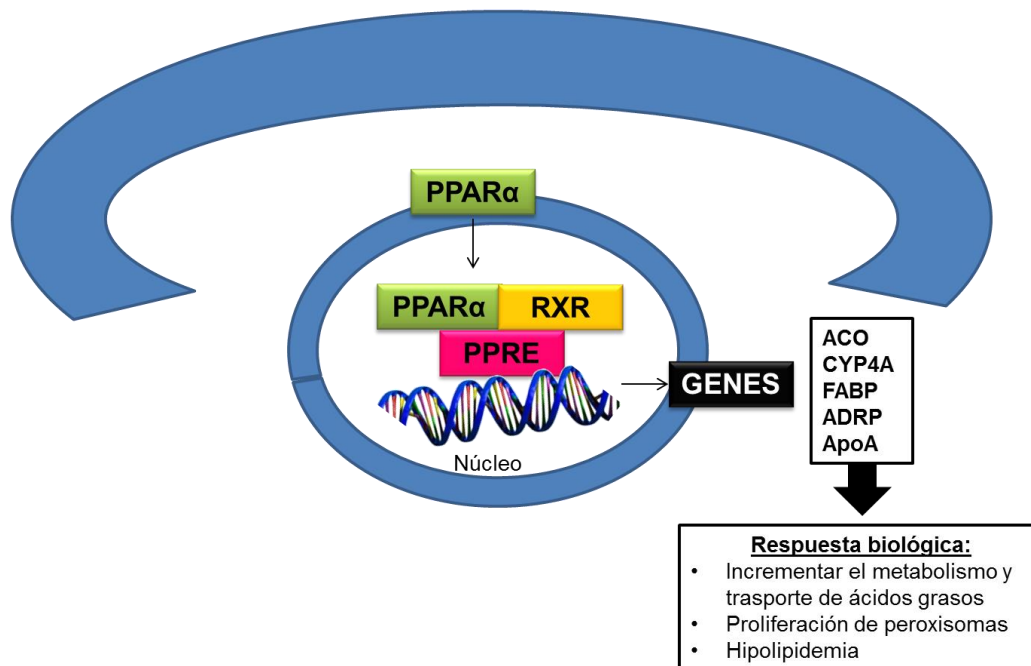


Figura 3. Mecanismos transcripcional mediados por la activación de PPAR α y genes blancos, así como la respuesta biológica producida.

2.7. Complicaciones asociadas a la obesidad

2.7.1. Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

La resistencia a la insulina se caracteriza como un estado en el que los efectos biológicos de esta hormona son menores de los esperados, principalmente respecto a la utilización de glucosa y síntesis de glucógeno por el músculo esquelético, la supresión de la producción endógena de glucosa, especialmente por el hígado (Dinneen y col., 1992), o en la activación de la lipólisis en el tejido adiposo.

La insulina desencadena diversas respuestas metabólicas pleiotrópicas, uniéndose y activando un receptor específico de la membrana plasmática, con actividad tirosina-quinasa. Los sustratos de este receptor, principalmente las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés), son fosforilados en sus residuos de tirosina de forma que servirán como anclaje a

proteínas adaptadoras que activarán distintas rutas de señalización, tales como estimulación del transporte de glucosa y síntesis de glucógeno, activación de la lipogénesis (síntesis de triglicéridos) y síntesis de proteínas e inhibición de la lipólisis. Además, la insulina también aumenta la captación de ácidos grasos desde lipoproteínas circulantes, estimulando la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo; así mismo, favorece la diferenciación de pre adipocitos a adipocitos maduros (Saltiel y Ronald, 2001).

La expansión del tejido adiposo, especialmente a nivel visceral, produce una liberación de citoquinas inflamatorias, como TNF α e IL-6, que afectan negativamente la señalización de insulina (Rajala y Scherer, 2003). TNF α actúa disminuyendo la lipogénesis y aumentando la lipólisis adipocitaria, lo cual podría considerarse un mecanismo de retroalimentación para evitar el excesivo acumulo de energía aunque finalmente provoca un aumento en los ácidos grasos libres.

2.7.2. Ateroesclerosis, arterioloesclerosis y presión arterial.

Obesidad, aterosclerosis y arterioloesclerosis son procesos multifactoriales entre los que existen numerosos puentes de unión que explican, en parte, la mayor morbimortalidad cardiovascular del obeso. Esta relación esta principalmente dada por la coexistencia de factores como dislipidemia, hipertensión, resistencia a la acción de la insulina y diabetes (Zugasti y Basilio, 2005).

En la obesidad el número de macrófagos en tejido adiposo aumenta debido a una mayor infiltración de este tipo celular desde los vasos sanguíneos (Xu y col., 2003), asociándose con un aumento de la secreción de factores inflamatorios (Riordan y col., 2009), como TNF- α , IL-6, amiloide sérico A (SAA), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) o el inhibidor del activador del plasminogeno-1 (PAI-1), entre otros (Shoelson y col., 2007).

El aumento en la producción de estas moléculas desencadena efectos locales a nivel del endotelio que aumentan la producción de moléculas de adhesión (VCAM e ICAM) y modifican la permeabilidad vascular, dando lugar a la formación de la placa aterosclerótica (Shoelson y col., 2007; Surmi, 2008).

Dentro de la ateroescclerosis, para el riñón existe un término conocido como arteriosclerosis hialina o también llamada arterioloescclerosis. En las arterias interlobulillares y en las arcuatas, además de las lesiones hialinas puede observarse un engrosamiento fibroso de la íntima, hipertrofia de las células musculares lisas y reduplicación de la lámina elástica interna. En relación con los cambios vasculares, pueden observarse alteraciones isquémicas en los glomérulos (retracción del ovillo, esclerosis segmentaria y focal) y, en algunas zonas, lesiones de fibrosis intersticial y atrofia tubular (Caetano y col., 1999).

El flujo plasmático renal es bajo y hay isquemia glomerular. En las fases iniciales se produce una intensa vasoconstricción de la arteriola aferente que impide que la presión intraglomerular se modifique. Con el tiempo, este proceso conduce a un daño irreversible de los vasos pre-glomerulares y a la pérdida gradual de masa renal por isquemia glomerular. Cuando la pérdida de la masa renal comienza a ser crítica, las arteriolas pre glomerulares se dilatan, aumenta la presión en el ovillo capilar y se produce una hipertrofia funcional de las nefronas que todavía permanecen intactas (Luke, 1999).

Algunos autores han postulado que las alteraciones estructurales renales como la arterioesclerosis podrían preceder a la hipertensión y que la arterioloescclerosis sería un proceso intrínseco de la microvasculatura renal que se traduciría primariamente en una excesiva vasoconstricción pre-glomerular. Un flujo plasmático renal crónicamente deficitario conduciría a largo plazo a la hipertensión y la insuficiencia renal (Marín y col., 2002).

La hipertensión es una situación caracterizada por el incremento de la resistencia periférica vascular total, que trae aparejado el aumento de la tensión arterial por encima de 140 mm de Hg de sistólica y 90 mm de Hg de diastólica. Pueden diferenciarse dos tipos de hipertensión: la hipertensión esencial (el 90 % de los casos) y la hipertensión secundaria (10 % de los casos). La presión sanguínea, la fuerza que la sangre ejerce en todas direcciones de un área determinada, es la base para mantener un movimiento estable de la sangre desde el corazón a través del organismo, y de regreso al corazón. Dado que los fluidos se mueven desde un área de alta presión hacia un área de presión menor, las presiones deben diferir en los distintos puntos del sistema circulatorio. En cualquier vaso sanguíneo del organismo, la presión depende de la cantidad de sangre que contiene y del tamaño del vaso. Los sistemas de control que regulan todas las funciones del organismo son dos: el sistema endocrino y el sistema nervioso autónomo (Mancia y col., 2007).

Se conoce como enfermedad hipertensiva al síndrome constituido por los signos y síntomas derivados de esa situación, con repercusión especial sobre algunos sectores denominados órganos blanco (sistema nervioso central, corazón, riñones y sistema vascular periférico) (Quiroga, 2010).

El mecanismo exacto por el cual la obesidad causa hipertensión se desconoce, porque la obesidad asociada a hipertensión es un proceso complejo y multifactorial. Sin embargo, algunos estudios han reportado que la obesidad contribuye a la hipertensión por mecanismos tales como: efectos renales debido al aumento de aldosterona por mayor actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (López y col., 2004); aumento del tono vascular, producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs), altos niveles circulantes de ácidos grasos libres y depósitos de lípidos alrededor o dentro de los tejidos no adiposos y órganos, así como aterosclerosis y arterioloesclerosis, retención de sodio y H₂O, expansión de volumen (Chung y col., 2010), resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, aumento de la actividad adrenérgica, alteración de la función

endotelial, a través de moléculas como leptina y adiponectina y factores genéticos (López y col., 2004).

2.7.2.1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona cumple una función fundamental en el mantenimiento de la presión arterial y del volumen extracelular. Además, este sistema es el mediador clave del daño a órganos diana, eventos cardiovasculares y progresión de la enfermedad renal (Wein y col., 2008).

El sistema renina-angiotensina local está presente en forma generalizada en varios órganos y ejerce numerosas acciones locales. Los componentes principales del sistema son angiotensinógeno, renina, enzima convertidora de angiotensina (ECA) y varias angiotensinas, la más importante es la angiotensina II. La función principal del sistema renina-angiotensina-aldosterona es mantener la perfusión de los tejidos, en especial en casos de hipovolemia (Wein y col., 2008).

La cascada básica consiste en la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I a través de la acción de renina (Wein y col., 2008), la cual es liberada por células yuxtaglomerulares pero también por otros tejidos (Brewster y col., 2004). Este es el paso limitante de todo el sistema y en consecuencia, el control de la secreción de renina regula su actividad. Después la ECA actúa sobre la angiotensina I para producir la angiotensina II, que ejerce una amplia variedad de acciones inmediatas y tardías sobre el sistema vascular y los riñones, además estimula la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal (Wein y col., 2008), al activarse los receptores de la angiotensina (Brewster y col., 2004).

La obesidad se asocia a un aumento de los niveles de aldosterona y alteración de la de la relación angiotensina II- aldosterona, con mayor actividad del RAAS, aumentando la cantidad corporal de sodio y agua y, por tanto, favoreciendo el aumento de la presión arterial en obesos.

Las concentraciones de renina disminuyen progresivamente con la obesidad, e inversamente, las concentraciones de aldosterona en obesos son mayores que en no obesos (López y col., 2004). Por otro parte, es de destacar que todos los componentes del RAAS se presentan en el riñón y que este sistema opera independientemente de los factores que regulan la RAS de plasma (Navar, 2004).

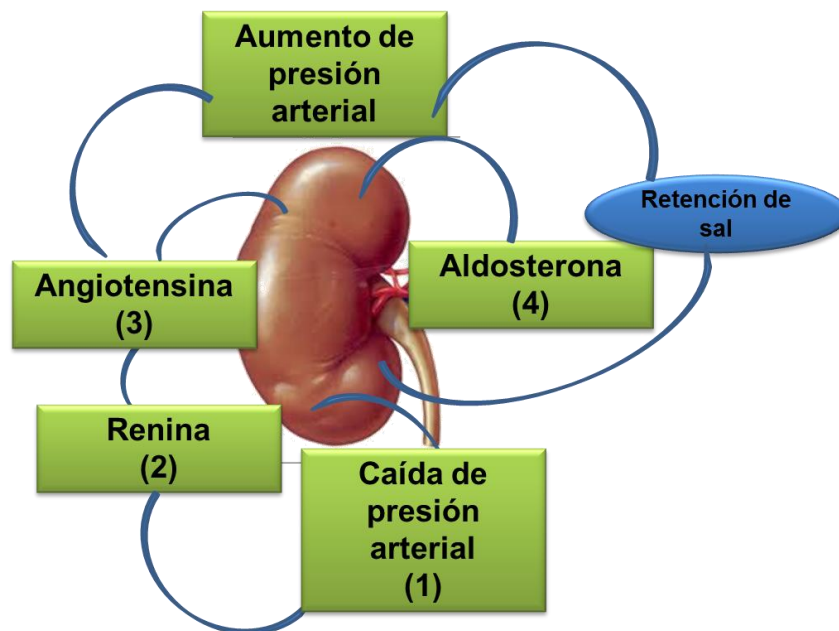


Figura 4. Regulación de la presión arterial: el sistema renina-angiotensina-aldosterona renal. Cuando disminuye la presión arterial (1) se libera renina (una enzima renal). La renina (2) a su vez activa la angiotensina (3), una hormona que contrae las paredes musculares de las arterias pequeñas (arteriolas) y, en consecuencia, aumenta la presión arterial. La angiotensina también estimula la secreción de la hormona aldosterona de la glándula suprarrenal (4), provoca la retención de sal (sodio) en los riñones y la eliminación de potasio. Como el sodio retiene agua, se expande el volumen de sangre y aumenta la presión arterial.

2.7.3. Estrés oxidativo

En la obesidad existe un incremento del estado oxidativo debido a la acumulación de grasa. La producción de EROs se incrementa selectivamente en el tejido adiposo, acompañado por un aumento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, disminuyendo los sistemas de defensa antioxidante endógenos (Furukawa y col., 2004).

Las especies reactivas de oxígeno se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2), que primero produce el radical superóxido (O_2^-), producido por la reducción de un electrón de oxígeno por algunas oxidasas, incluyendo NADPH oxidasa; así mismo, el radical superóxido puede ser generado por la cadena mitocondrial durante el transporte de electrones en el curso de la fosforilación oxidativa.

El radical perhidroxilo generado por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual si no degrada por la catalasa o glutatión peroxidasa en presencia de metales de transición, puede finalmente conducir a la producción de radicales hidroxilo ($\cdot OH$), muy reactivos (Vilar-Rojas, 1996). Los niveles excesivamente altos de radicales libres causan daño a las proteínas celulares, los lípidos de membrana y ácidos nucleicos, causando eventualmente la muerte celular (Maritim y col., 2003).

2.7.3.1. Daño a lípidos

La oxidación de los lípidos de la membrana celular provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, así como la de los organelos celulares. Los ácidos grasos polinsaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres.

Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen, después de esta reacción aunque el hidroxilo original sea inactivado, se forma un radical lipídico que después de un re-arreglo molecular, puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo. Éste a su vez, puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido (R-OOH) y, en presencia de varios complejos metálicos, puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos, al radical hidroxilo, provocando con ello un fenómeno de expansión del daño (Saran y col., 1990).

De tal manera que las EROs son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción (Bayr, 2005).

Las EROs tienen una vida media muy corta y son difíciles de medir directamente. En su lugar, lo que se puede medir son varios productos de los daños producidos por el estrés oxidativo, tales como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las TBARS se forman como un subproducto de la peroxidación lipídica (Pryor, 1991).

2.7.3.2. Daño a proteínas

En proteínas y carbohidratos, los radicales libres pueden inducir la fragmentación de cisteína, de los enlaces disulfuro, enlaces peptídicos y de aminoácidos aromáticos, lo que conlleva a una alteración en su estructura y función. Así mismo, diversas reacciones de oxidación o radicales como el radical hidroxilo pueden convertir algunos residuos de aminoácidos y causarles modificaciones, algunas de las alteraciones conformacionales provocadas por radicales libres están relacionadas con la pérdida de la actividad catalítica de enzimas. La gran mayoría de los daños ocasionados por los radicales libres a estas

biomoléculas pueden ser los causantes de ciertas enfermedades y sus complicaciones (Beckman, 1994).

2.7.3.3. Sistema de defensa antioxidante

El organismo puede sobrevivir al daño generado por altas concentraciones de radicales libres, debido a que tiene un eficiente sistema de defensa antioxidante. Este sistema de defensa antioxidante está conformado por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Khan y col., 2010).

Dentro del sistema de defensa antioxidante endógeno existen enzimas antioxidantes con diferentes funciones en cada línea de defensa. Estas enzimas son la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (Figura 5).

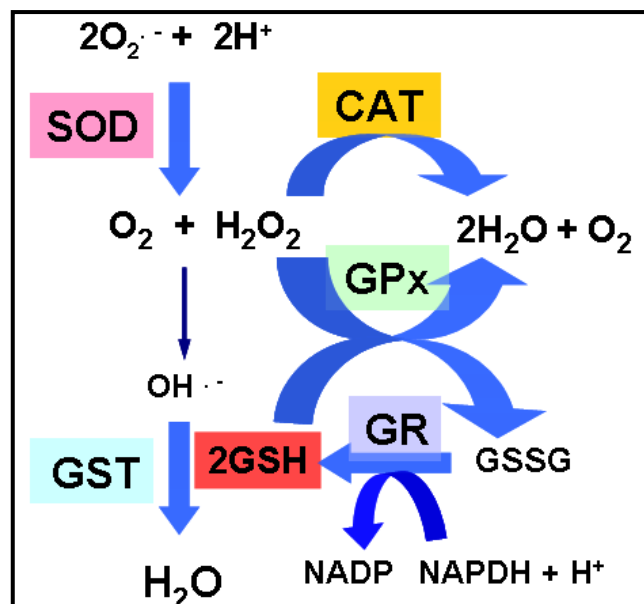


Figura 5. Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno (Modificado de Willcox y col., 2004). SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GST: glutatión-S-transferasa, GSH: glutatión reducido, GSSH: glutatión oxidado, OH^{\cdot} : radical hidroxilo, NADP: nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato.

La enzima CAT cataliza la disociación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno molecular y agua. Esta enzima se localiza principalmente en el peroxisoma de las células. Su mayor actividad se ha observado en el hígado y los eritrocitos aunque también se encuentra en menor concentración en otros tejidos (Khan y col., 2010).

La enzima SOD constituye la primera línea de defensa antioxidante y cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Willcox y col., 2004), el cual puede ser removido por las enzimas CAT y GPx. (Khan y col., 2010). La enzima GPx cataliza la oxidación de glutatión a expensas del H_2O_2 u otro hidroperóxido (ROOH) (Khan y col., 2010). La actividad de esta enzima depende de una constante disponibilidad de glutatión reducido (GSH). La relación entre glutatión reducido y oxidado (GSSG) se mantiene alta en condiciones normales debido a la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR). Este ciclo de oxidación-reducción del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo.

Por otro lado, el GSH es un cofactor de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), la cual cataliza una reacción de biotransformación de fase II, para la eliminación de xenobióticos. Esta reacción de conjugación consiste en adicionar glutatión a través de su grupo sulfhidrilo, a un xenobiótico (Khan y col., 2010).

Dichos mecanismos de defensa antioxidante se ven severamente afectados en la obesidad, ya que disminuyen sus niveles tanto en suero como en órganos (Furukawa y col., 2004).

2.8. Modelo animal de obesidad

Debido al importante papel que juega la dieta en el desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico en humanos, los modelos de obesidad resultan de fundamental importancia para el estudio de esta patología y sus consecuencias metabólicas.

Las ratas y ratones son los modelos más utilizados para generar obesidad inducida por la dieta debido a que pueden desarrollar obesidad y algunos otros factores asociados con el síndrome metabólico en relativamente poco tiempo (Kim y col., 2004; Gauthier y col.,2006). Las dietas más utilizadas para inducir obesidad y/o síndrome metabólico son dietas altas en grasa, dietas altas en grasa saturada y colesterol y dietas altas en hidratos de carbono simples. Cada tratamiento dietario genera una respuesta diferente en el tipo y grado de las alteraciones metabólicas.

Las dietas altas en grasa contienen de un 30 a 60 % de la energía total de la dieta proveniente de la grasa y se utilizan para inducir obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Ramírez y col., 1990; Kim y col., 2004). La mayoría de los roedores desarrollan obesidad e hiperlipidemia con una dieta alta en grasa, sin embargo, la respuesta puede variar dependiendo de la cepa y género del roedor y el tipo de grasa utilizada en la dieta. Las dietas altas en grasa saturada y colesterol se utilizan para inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis (Ueshima y col., 2004).

Las dietas altas en hidratos de carbono simples se utilizan para inducir hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. Estudios básicos y epidemiológicos han demostrado que el consumo de monosacáridos como la fructosa y los disacáridos como la sacarosa (fructosa+glucosa) se asocian con el aumento del peso corporal, elevación de triglicéridos circulantes y desarrollo de resistencia a la insulina, en humanos (Kleiner, 2006). A diferencia de los humanos, los roedores no presentan un aumento de peso significativo con una dieta alta en fructosa o sacarosa, sin embargo estas dietas incrementan la producción de triglicéridos y glucosa por el hígado, induciendo hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina (Olefsky, 1980; Saekow y Ascencio y col., 2004; Park y col., 2006).

2.9. Bebidas funcionales como alternativa contra la obesidad

En países como México, se ha determinado que el 21 % de las calorías que consumen los adolescentes y los adultos provienen de las bebidas, particularmente de los refrescos, bebidas azucaradas, jugos, leche entera y alcohol. Estas calorías que aportan los líquidos se suman a las calorías provenientes de los alimentos de la dieta y contribuyen al consumo excesivo de energía, que está relacionado con la aparición de sobrepeso, obesidad y diabetes como se muestra en la Figura 6. En base a lo anterior se han establecido recomendaciones para el consumo de bebidas, las cuales son lineamientos para satisfacer la mayor cantidad posible de las necesidades diarias de líquidos a través del agua y otras bebidas, con bajo contenido energético, para promover un buen estado nutricional (Rivera y col., 2008).

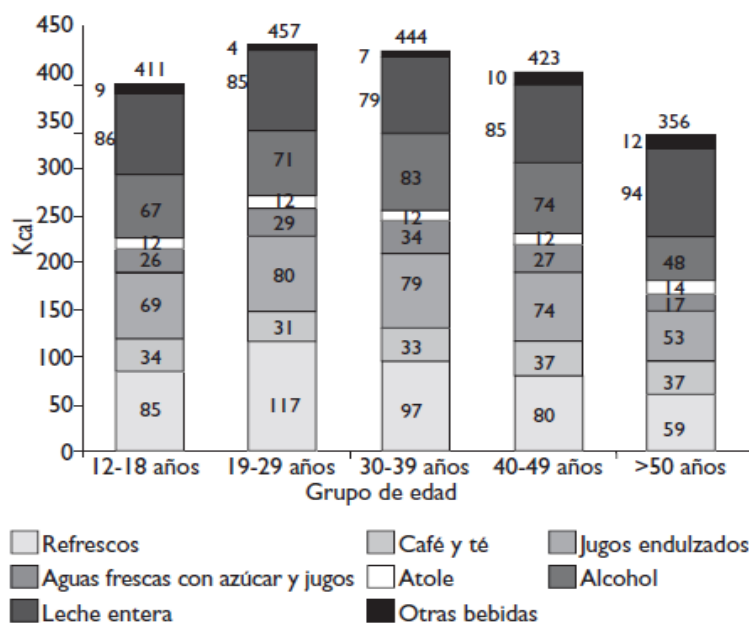


Figura 6. Consumo calórico diario proveniente de bebidas en adolescentes y adultos, por grupo de edad en 2006 en México (Rivera y col., 2008).

Dentro de estas recomendaciones se encuentran las infusiones, cuyo consumo ha aumentado en los últimos años, debido a su aporte importante de agua, pero principalmente, por el efecto positivo a la salud que tienen sus fitoquímicos y micronutrientes. Dichos beneficios han permitido incluir a este tipo de productos dentro de las bebidas funcionales.

En base a estas propiedades, las bebidas funcionales han generado el mayor número de nuevos productos en la clasificación de bebidas a nivel mundial, pero además, es una de las áreas de mayor crecimiento en la industria de alimentos y bebidas (Rivera y col., 2008).

2.10. Infusiones y obesidad.

Una infusión es una bebida obtenida de las hojas secas, flores y/o frutos, a las cuales se les vierte o se los introduce en agua a punto de hervir. Los principales compuestos con actividad biológica presentes en estas bebidas son los polifenoles, los cuales son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por grupos hidroxilos (Apak y col., 2007). Los polifenoles se consideran constituyentes importantes en la dieta del humano ya que su consumo provee efectos positivos a la salud.

Estudios previos han demostrado que los polifenoles presentes en infusiones como en el té verde, pueden ayudar a evitar o disminuir alteraciones en el metabolismo de lípidos, causados por enfermedades como la obesidad (Meydani y Hasan, 2010). Entre algunos de los mecanismos reportados para polifenoles de té verde y su efecto antiobesogénico se incluyen la supresión de la diferenciación y proliferación de los adipocitos, la inhibición de la absorción de grasa desde el intestino, así como la disminución de absorción de lípidos, triglicéridos en plasma, ácidos grasos libres, colesterol, glucosa, insulina y leptina, aumentando la β -oxidación y la termogénesis tanto en cultivos celulares como modelos de obesidad (Wolfram, 2005; Hursel y Westerterp-Plantenga, 2010).

Los efectos antiobesogénicos de té verde y los polifenoles provenientes de éste han sido uno de los más estudiados hasta el momento. Sin embargo, para la población mexicana, el consumo de té verde es aún poco común, ya que el mayor porcentaje de la población prefiere infusiones de materiales vegetales locales. Algunos de estos materiales han demostrado ser ricos en compuestos fenólicos, los cuales pueden ser extraídos en una infusión y presentar efectos similares a los encontrados en té verde.

2.11. Materiales vegetales para la preparación de Infusiones

2.11.1. Flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

Hibiscus sabdariffa es una planta herbácea anual, sus flores son de color rojo en la base y más pálido en los extremos, contienen un cáliz carnoso y generalmente de un color rojo más intenso. Los cálices son lo más destacable de la planta (Figura 9). Se cosechan en el momento en que alcanzan un tono rojo oscuro (SAGARPA-ASERCA, 1999).

Estudios realizados sobre extractos acuosos (no infusión) de flor de jamaica han demostrado que presentan un efecto antiobesogénico; Alarcón y colaboradores (2007) evaluaron ratones obesos inducidos con glutamato monosódico, y reportaron que dos dosis diarias por 60 días de un extracto acuoso (no infusión) de *H. sabdariffa* (60 mg/kg) inhibe la ganancia de peso corporal comparado con un control obeso sin tratamiento. Los mecanismos por los cuales *H. sabdariffa* reduce la ganancia de peso incluyen una disminución en la absorción de glucosa, inhibición de la lipasa gástrica y pancreática, la estimulación de la termogénesis, la inhibición de la formación de gotas de lípidos en adipocitos sin afectar la función del tejido adiposo, la inhibición de la sintasa de ácidos grasos y la inhibición de la diferenciación de los adipocitos (Kim y col., 2003).

En relación a algunas complicaciones de la obesidad, los efectos que se han evidenciado en experimentos realizados con el extracto acuoso de los cálices de jamaica son numerosos. Uno de los más conocidos es el efecto hipotensor, atribuido a su acción vaso-relajante (Odigie y col., 2003; Herrera-Arellano y col., 2004). De igual manera, se le atribuyen efectos diuréticos, estimulación de la perístasis intestinal, reducción de los niveles de colesterol; acción astringente, digestiva, emoliente y sedativa (Tsai y col., 2002). Chen y colaboradores (2003) reportaron que un extracto de flor de jamaica al 1 % administrado por 10 semanas, disminuyó el desarrollo de aterosclerosis en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol (1.3 %) y manteca de puerco (3 %). Así mismo, concluyeron que el mecanismo relacionado con este efecto pudiera ser debido a la inhibición de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL).

En un estudio realizado con 65 pacientes hipertensos de entre 30 y 70 años de edad, Herrera-Arellano y colaboradores (2004) reportaron una disminución de la presión sanguínea, atribuido al efecto producido por el consumo de 240 mL al día de infusión de flor de jamaica al 1 % durante 6 semanas. Por su parte, Mozaffari-Khosravi y colaboradores (2009), reportan que este mismo efecto benéfico sobre la presión sanguínea se ve reflejado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, cuyo consumo de dos tazas diarias de 240 mL de infusión de flor de jamaica al 1.4 % reduce la presión arterial en pacientes hipertensos diabéticos.

En la composición química de la flor de jamaica, Peng y colaboradores (2010) reportan algunas antocianinas como delfinidina-glucósido, sambubiósido y cianinidina-3-sambubiósido. Así mismo, los autores reportan la quercetina 3-glucósido, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico, kaempferol-3-glucósido, entre otros.



Figura 7. Flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

2.11.2. Toronja (*Citrus paradisi*)

La toronja (*Citrus paradisi*) o pomelo, como es conocido en Sudamérica, pertenece a la familia de las Rutáceas (Rutaceae). La toronja es un fruto hesperidio globoso o apenas piriforme, de hasta 15 cm de diámetro. Este fruto está recubierto de una cáscara gruesa, carnosa, despegada del endocarpo, de color amarillo o rosáceo, con glándulas oleosas pequeñas, rugosas y muy aromáticas. *C. paradisi* tiene de 11 a 14 carpelos, firmes, muy jugosos, dulces o ácidos según la variedad, separados por paredes membranosas de característico sabor amargo que contienen pulpa de color que va del amarillo pálido al rojo muy intenso. Las semillas son escasas, de hasta 1.25 cm de largo, normalmente poliembriónicas, lisas, elípticas o apicadas, blancas por dentro (Figura 8).

C. paradisi se ha utilizado como coadyuvante en la reducción de peso. Se ha demostrado que tiene efectos benéficos al reducir los triglicéridos sanguíneos, además de inhibir la adipogénesis en adipocitos subcutáneos de ratas. Se ha propuesto que el consumo de la fruta fresca antes de ingerir cualquier otro alimento tiene un efecto en la pérdida de peso corporal, además de mejorar la resistencia a la insulina en humanos (Fujioka y col., 2006; Owira y Ojewole, 2009; Haze y col., 2010).

Los principales compuestos flavonoides con actividad biológica encontrados en *Citrus paradisi* son la naringina y hesperidina (Del Río y Ortuño, 1994; Ortuño y col., 1995). La naringina exhibe una capacidad antioxidante contra la oxidación lipídica (Francis y col., 1989), mientras que la hesperidina, mejora la permeabilidad vascular incrementando la resistencia capilar y muestra propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Gabor, 1988; Emim y col., 1994). La Hesperidina es un potente antioxidante y ha demostrado *in vitro* actividad anticancerígena (Fujiki y col., 1986; Berkarda y col., 1988).

Otros componentes reportados son el ácido ascórbico, málico, oxálico y el cítrico, entre otros (Fujioka y col., 2006; Owira y Ojewole, 2009; Haze y col., 2010).



Figura 8. Toronja (*Citrus paradisi*).

2.11.3. Albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.)

La albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) pertenece a la familia Lamiaceae; es una hierba aromática, pubescente de hasta 70 cm de altura (Figura 9). Se utiliza tanto de forma culinaria como ornamental (Morales y col., 1996; Tada y col., 1996).

La albahaca se considera una planta con propiedades hipolipidémicas (Suanarunsawat y col., 2010). En experimentos *in vitro* realizados en adipocitos de rata se demostró que el extracto acuoso de esta planta inhibe la lipólisis a través del mecanismo mediado por el sistema de la adenilato ciclasa (Deras y col., 1988). *In vivo*, un extracto acuoso de la planta, por decocción de hojas secas al 10 %, produjo un efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y resistentes a la insulina por dexametasona (Crespo y col., 1988; González y col., 1988).

Dentro de los compuestos con actividad biológica encontrados en la albahaca morada están los polifenoles (Juliani y Simons, 2002), principalmente el ácido cafeíco, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, luteolina y el kaempferol, entre otros (Jayasigne y col., 2003).



Figura 9. Albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.).

En base a estos estudios es posible evaluar efecto sobre obesidad que pudieran presentar las infusiones preparadas a partir de los materiales antes mencionados, ayudando a reducir las complicaciones causadas por dicha enfermedad. Sin embargo la mayoría de estos estudios se han realizado con diferentes extractos de estos materiales vegetales y no se ha determinado el efecto que tienen sus infusiones sobre enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con obesidad.

3. Justificación

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en obesidad, con una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 73 % para las mujeres y 69.4 % para los hombres, incrementado a su vez, la aparición de enfermedades crónicas degenerativas asociadas a la obesidad como es la hipertensión, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2.

La alta prevalencia de obesidad y sus complicaciones está directamente relacionada con el consumo de elevadas cantidades de calorías provenientes de los alimentos y bebidas, principalmente las refrescantes. Se han establecido recomendaciones para satisfacer la mayor cantidad posible de las necesidades diarias de líquidos a través del agua y otras bebidas con bajo contenido energético, como las infusiones, cuyo consumo ha aumentado en los últimos años debido a su aporte importante de agua, pero principalmente, por el efecto positivo a la salud, relacionado con sus fitoquímicos y micronutrientes. Dichos beneficios han permitido incluir a este tipo de productos dentro de las bebidas funcionales, las cuales contienen componentes nutrientes o no nutrientes, con efecto sobre una o varias funciones del organismo, adicional al de su valor nutricional.

Se ha reportado que varias hierbas y flores tienen propiedades antiobesogénicas, anti-inflamatorias y antioxidantes; sin embargo estos beneficios han sido poco estudiados en la forma en cómo se consume por la población, siendo una de estas las infusiones. Las infusiones se consideran bebidas económicas y de fácil acceso a toda la población, considerándose una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos.

Por todo esto, se hace énfasis en el estudio de compuestos nutraceuticos de origen vegetal para combatir enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con la obesidad y la aterosclerosis, proponiendo analizar infusiones de diferentes plantas utilizadas en nuestro país como alternativa auxiliar en el control de estas patologías.

4. Hipótesis

Las infusiones de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), toronja (*Citrus paradisi*) y albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) debido a su contenido de compuestos bioactivos presentan una actividad antiobesogénica y antioxidante, las cuales mejoran las complicaciones asociadas a la obesidad.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la ingesta de bebidas funcionales (infusiones) como alternativa para el control de obesidad y sus complicaciones en un modelo de obesidad inducido por dieta.

6. Objetivos particulares

1. Caracterizar parcialmente las infusiones mediante la evaluación del contenido e identificación de polifenoles, así como determinar su capacidad antioxidante *in vitro*.
2. Determinar el efecto antiobesogénico de las infusiones en estudio.
3. Evaluar el efecto del consumo de infusiones sobre el metabolismo de lípidos en ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa.
4. Evaluar el efecto del consumo de infusiones sobre complicaciones de la obesidad como resistencia a la insulina, hipertensión y alteraciones hepáticas y renales.

7. Materiales y métodos

7.1. Materiales

7.1.1. Material de prueba

Las plántulas de albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) se obtuvieron de la empresa “Floraplant S.A de C.V.” la cuales fueron sembradas a cielo abierto en el invernadero del área de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) se obtuvo de Santo Domingo en el estado de Guerrero y la toronja (*Citrus paradisi*) de Apatzingán, Michoacán; ambas de agricultores locales dedicados al cultivo y comercialización de dichos productos.

7.1.2. Material biológico

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de ocho semanas de edad, con un peso promedio de 260 ± 20 g. Los animales se adquirieron en el bioterio de Rismart S.A. de C.V.

7.2. Métodos

7.2.1. Preparación de las infusiones

La flor de jamaica se sometió a un secado bajo el sol a condiciones ambientales por los mismos productores de este material. Para la albahaca morada y la toronja se llevó a cabo un secado a 50 °C en estufa, de 4 a 6 horas. La toronja se cortó previamente de manera transversal para ampliar la superficie de secado.

Los tres materiales vegetales se sometieron a una molienda a un tamaño de partícula aproximado de 1-1.5 mm de acuerdo al tamaño reportado para la industria de té comercial.

Para la preparación de infusiones (1 %) se agregó 1 g de material seco a 100mL de agua recién hervida. Posteriormente, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se filtró con filtros desechables comerciales (Brew Rite E.U.A.) y se dejó enfriar.

7.2.2. Medición de parámetros de color de las infusiones

Las mediciones de color se realizaron en un colorímetro Minolta, CR-200 (Atlanta, Georgia, Software: Spectral Magic versión 1.01) (Solomon y col., 2006).

El color se determinó según la Comisión Internacional L'Éclairage (CIE) y fueron expresados como L^* , a^* , b^* , C y h. L mide la luminosidad en rango de 0 igual a negro hasta 100 igual a blanco; a^* puede tener valores positivos (rojo) o negativos (verde); b^* valores positivos (amarillo) y negativos (azul) (McGuire, 1992). Estos últimos se usaron para calcular de los parámetros de correlación de intensidad (chroma, C) y correlación de tonalidad cromática (hue, h).

7.2.3. Cuantificación de fenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales se usó el método de Folin-Ciocalteu (1927), descrito por Singleton y colaboradores (1999). Dicha técnica cuantifica la concentración total de grupos hidroxílicos fenólicos presentes en la muestra que se está analizando. Este método se basa en una reacción óxido-reducción obteniendo una coloración azul. Se tomaron alícuotas de 20 μ L de cada una de las infusiones, colocándose en un vial de vidrio, aforando a un volumen a 250 μ L con agua destilada, se adicionaron 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agitó en vórtex por 5 min, posteriormente se agregaron 625 μ L de Na_2CO_3 al 20 % y se dejó reposar dos horas en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se tomó la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μ g), expresándose como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco.

7.2.4. Determinación de flavonoides totales

50 µL de cada una de las infusiones se adicionaron a 180 µL de agua destilada y posteriormente, se agregaron 20 µL de la solución 2-aminoetildifenilborato al 1 %, inmediatamente se leyó en un espectrofotómetro a 404 nm. Los resultados se interpolaron en una curva de catequina, expresándose como mg eq. de catequina/g de peso seco.

7.2.5. Determinación de antocianinas monómericas

Para la cuantificación de la concentración de antocianinas en las diferentes infusiones se utilizó el método de pH diferencial. La forma oxonium de la antocianina predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en esta reacción y permite una rápida y exacta medida de la antocianina total, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes. La metodología fue descrita por Guisti (2001). Se utilizaron dos sistemas tampón: cloruro de potasio (KCl) 0.025 M a pH 1 y acetato de sodio (CH₃COONa) 0.4 M a pH 4.5. A 200 µL de infusión se le añadieron 7 mL de la solución tampón correspondiente. Se dejó reposar un par de minutos y se midió la absorbancia a 510 nm y 700 nm en un espectrofotómetro. El cálculo de la absorbancia final se realizó a partir de la siguiente ecuación:

$$A = (A_{max} - A_{700nm})_{pH\ 1} - (A_{max} - A_{700nm})_{pH\ 4.5}$$

Donde A_{max} es la lectura del pico más alto a pH 1 y pH 4.5 y A_{700nm} es la lectura a 700 nm, tanto para pH 1 como para pH 4.5. Para calcular la concentración en la muestra original se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/g de peso seco)} = (A * FD * \text{peso molecular} * 1000) / (\epsilon * l)$$

Dónde: A = Absorbancia total, ϵ = Coeficiente de extinción molar, FD = Factor de dilución, PM = peso molecular de la antocianina más común en las infusiones cianidina -3-glucósido (PM=449.20 g/mol).

7.2.6. Identificación y cuantificación por HPLC de los ácidos fenólicos y flavonoides

Ácidos fenólicos y otros compuestos fenólicos simples fueron identificados y cuantificados mediante la metodología descrita por Rocha-Guzmán y colaboradores (2012) mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución con un sistema de HPLC con inyección automática (Agilent HP 1100 Systems, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA). Se utilizó columna de fase reversa Zorbax octadecilsilano (150 x 4.6 mm, ODS-C18). El equipo se operó a 25°C con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil utilizada fue el solvente A: ácido acético/ agua (2: 98 v/v) y el solvente B: ácido acético-acetonitrilo-agua (2:30:68 v/v).

Durante el análisis, el gradiente programado fue 90 % A y 10 % B al tiempo cero; A= 0 % a tiempo = 30 minutos. El volumen de inyección de la infusión fue de 20 µL.

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante la comparación con el tiempo de retención de los estándares comerciales inyectados de manera independiente. La cuantificación, se hizo mediante curvas de calibración de los mismos. Los estándares usados fueron: ácido gálico, ácido vainillínico, ácido clorogénico, ácido cafeíco, ácido elágico, ácido rosmarínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, catequina, epicatequina, epicatequina galato, rutina, quercetina, kaempferol, naringina, hesperidina y umbeliferon.

7.2.7. Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-MS-TOF

Con el fin de ampliar la información del perfil de compuestos químicos de las infusiones se realizó una identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS-TOF. Se utilizó un sistema de HPLC-DAD-UV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con una columna Zorbax SB-AQ 4,6 mm DI x 150 mm, 3.5 micras columna inversa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con un flujo de 1.0 mL/min y 20 L de volumen de inyección. Las fases móviles utilizadas para la

elución fueron (A) acetonitrilo de grado HPLC 98 % y 2 % de ácido acético (Sigma, St. Louis, MO) y (B) acetonitrilo de grado HPLC 30 %, agua de grado HPLC 68 % y 2 % ácido acético. El gradiente lineal utilizado para el análisis y la identificación fue el siguiente: 0 min, 10 % de B, incrementando el porcentaje de B hasta llegar a 100 % después de 30 min. Esta última concentración se mantuvo durante los siguientes 5 min. Se obtuvieron cromatogramas a 280 nm y se integraron con el Software de HP- Agilent (ChemStation para LC Derechos de Autor Agilent Technologies, 1990-2003). La identificación de los picos obtenidos partir de las infusiones se comparó con reportes previos. La identificación de los compuestos fenólicos de las infusiones se confirmó por HPLC-MS-TOF (Modelo Agilent G1969A 1100 de Santa Clara, CA). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que las descritas para el análisis por HPLC - DAD- UV. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando la fuente de electrospray en modo positivo (ESI +) bajo las siguientes condiciones: rango de m/z , 50-10.000 gas nitrógeno; temperatura del gas 350 °C, el secado de flujo de gas 13 L/min, la presión del nebulizador 35 psi, tensión capilar 3000 V, y la tensión fragmento se obtuvo a 225 V. Los iones obtenidos se analizaron con el software 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Se obtuvo el espectro de masas de cada ion para confirmar la presencia de las diferentes formas de iones de flavonoides y/o fragmentos correspondientes previamente reportados en la literatura.

7.2.8. Evaluación de capacidad antioxidante *in vitro* de las infusiones

7.2.8.1. Evaluación del efecto antioxidante sobre la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL)

Para la valoración de la actividad antioxidante de las infusiones, se utilizó un sistema *in vitro* en el cual se oxidan las LDL en presencia y ausencia de las infusiones.

Los aldehídos como el malondialdehído (MDA), resultantes de los procesos oxidativos en los compuestos lipídicos, se evaluaron mediante una técnica espectrofotométrica. Se usó como reactivo el ácido tiobarbitúrico, donde los resultados se expresaron como un número que representa al conjunto de sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) o bien, como el porcentaje de inhibición de la oxidación al añadir la muestra con propiedades antioxidantes.

El método utilizado para la evaluación del efecto antioxidante sobre la oxidación de la LDL fue descrito por Loy y colaboradores (2002). Se utilizaron 5 mL de reactivo precipitante, por cada 50 mL de suero de humano sano, con el fin de precipitar y obtener la fracción de LDL. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 450 *g* por 10 minutos. En el precipitado es donde se encuentra la fracción que se analizó.

Una vez que se recuperó la fracción de LDL, se realizaron diluciones con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, con el fin de distribuir y almacenar las lipoproteínas de baja densidad hasta su posterior análisis. Por cada gramo de LDL precipitada se adicionaron 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4.

Para el ensayo se colocaron 200 μ L de LDL y se adicionaron diferentes concentraciones de las infusiones para determinar la concentración inhibitoria media. Se continuó con la adición de una solución de CuSO_4 (25 mM); después en cada tubo se completó el volumen a 1 mL utilizando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron por tres horas a una temperatura de 37 °C. Una vez cumplido este período, se agregaron a cada tubo 2 mL de solución ácido tricloroacético (15 %) y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0.37 %) y HCl (25 mM).

Los tubos se colocaron a baño María en ebullición por 20 minutos. Concluido este tiempo los tubos se colocaron en hielo con el fin de detener la reacción. Después se agregaron a cada tubo 2.5 a 3 mL de *n*-Butanol (grado reactivo) para después centrifugar a 350 *g* por 10 minutos.

Los compuestos TBARS se leyeron a una absorbancia de 532 nm. Se utilizó catequina como estándar. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y los resultados se expresaron en mg de proteína por decilitro (dL).

Para la determinación del porcentaje de inhibición de acuerdo a cada concentración de la muestra se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

Dónde A denota absorbancia a 532nm

7.2.8.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

La actividad antioxidante se determinó utilizando la metodología ABTS desarrollada por Re y colaboradores (1999).

La formación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se realizó con la reacción de persulfato de potasio (2.45 mM) con ABTS (2,2´azinobis(-3 etilbensotiazolin-6-ácido sulfónico)) (7 mM). Se colocaron 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g del reactivo y se adicionó agua destilada (5 mL). La mezcla se agitó y se dejó reposando 16 horas en oscuridad y a temperatura ambiente.

Una vez formado el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (\pm 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se colocaron 980 μL de del radical ABTS y se mezcló con 20 μL de las infusiones a diferentes concentraciones con el fin de evaluar la concentración inhibitoria media (IC_{50}). La mezcla se dejó reposar por 7 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente, se tomó la lectura correspondiente a 754 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la formación del radical.

Para el cálculo de IC₅₀ se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de reducción de la oxidación, empleando catequina como estándar.

7.2.8.3. Determinación de la capacidad antioxidante por método DPPH

Este método, desarrollado por Brand-Williams y colaboradores (1995) se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. Se preparó una solución 0.1 mM de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en metanol, 1 mL de esta solución se adicionó a las infusiones a diferentes concentraciones a un volumen de 50 µL. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, se leyó la absorbancia de la mezcla a 517 nm.

La actividad para secuestrar radicales de las infusiones se determinó en base a la disminución de los valores de absorbancia, y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la formación del radical DPPH. Para el cálculo de IC₅₀ se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de reducción de la oxidación, empleando catequina como estándar.

7.2.9. Evaluación del efecto de la ingesta de infusiones sobre la obesidad y sus complicaciones

7.2.9.1. Animales

Los animales se mantuvieron en un lugar con periodos de luz y oscuridad de 12 horas a lo largo de la fase experimental con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

7.2.9.2. Dieta

El contenido calórico de la dieta empleada con el fin de incrementar el peso corporal e inducir obesidad en los animales fue 434.7 kilocalorías por 100 g de alimento. De este contenido calórico el 14.13 % corresponde a contenido de proteínas, 45 % carbohidratos y 40 % lípidos de los cuales el 38 % son saturados,

45 % monoinsaturados y 17 % poliinsaturados. La dieta fue preparada con un 70 % de alimento base, 16 % de manteca de cerdo y 17 % de fructosa.

El alimento base (croqueta comercial para rata marca nu3lab 22-5) se molió y posteriormente se mezcló con cada uno de los ingredientes anteriormente descritos. Los animales se clasificaron en cinco grupos (n= 7): control sano, control obeso, tratamiento con infusión de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), tratamiento con infusión de albahaca (*Ocimum sanctum* L.) y tratamiento con infusión de toronja (*Citrus paradisi*) (Cuadro 1). Al grupo control sano se alimentó con una dieta estándar (Alimento nu3lab 22-5), la cual contiene un porcentaje de proteína de 22 %, grasa de 5 % y fibra de 6 %, de la misma manera, se molió para proveer a todos los animales de las mismas condiciones de alimentación. Al resto de los grupos se alimentaron con una dieta alta en grasa y fructosa.

Cuadro 1. Grupos experimentales.

Grupo	Dieta
Control sano	Dieta estándar ¹
Control obeso	Dieta alta en grasa y fructosa ²
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Dieta alta en grasa y fructosa ²
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Dieta alta en grasa y fructosa ²
<i>Citrus paradisi</i>	Dieta alta en grasa y fructosa ²

¹Dieta estándar (proteína de 22 %, grasa de 5 % y fibra de 6 %), ²Dieta alta en grasa y fructosa (14.13 % proteínas, 45 % carbohidratos y 40 % lípidos).

El experimento se dividió en dos etapas: la primera fue para inducción de obesidad (5 meses) donde sólo se dio alimento alto en grasa y fructosa (excepto control sano). En la segunda etapa, de tratamiento, se continuó con la dieta alta en grasa y fructosa en conjunto con la infusión correspondiente a cada grupo. A los controles se les administro agua en lugar de infusión.

El consumo de alimento, de agua o infusión se realizó diariamente. Cada quince días se registró el peso corporal durante todo el estudio. Un día antes del sacrificio se recolectaron las heces. Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de éter etílico y se obtuvieron muestras de hígado, tejido adiposo y riñones, una parte se congeló con nitrógeno líquido y otra en formaldehído (4 %).

7.2.9.3. Cuantificación de triglicéridos en heces fecales

La cuantificación de triglicéridos en heces fecales se realizó por el método de Folch y colaboradores (1957). Las heces fecales de 24 horas se sometieron a un secado a 50 °C y una molienda. Posteriormente, se realizó una extracción total de lípidos con una mezcla cloroformo:metanol (2:1) y se realizó una homogenización y una filtración. El filtrado contiene los lípidos, así como, sustancias no lipídicas. Éstas últimas se eliminaron por la adición de un quinto del volumen del extracto con agua o adición de sales minerales obteniéndose un sistema bifásico. La fase superior se desechó y la fase inferior contiene esencialmente el total de lípidos. Con el extracto final se procedió a realizar una cuantificación de triglicéridos por el método enzimático (Randox Laboratories Ltd.) leyendo su absorbancia en el espectrofotómetro a 546 nm.

7.2.9.4. Evaluación de Perfil lipídico

Se determinó la concentración de triglicéridos, colesterol y lipoproteína de baja densidad (HDL, por sus siglas en inglés) en suero. El análisis se realizó utilizando kits enzimáticos (Randox Laboratories Ltd. Crumlin, Reino Unido).

7.2.9.5. Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo

Para la cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo visceral se utilizó el método de Folch y colaboradores (1957). El tejido adiposo fue congelado en nitrógeno, posteriormente se pulverizó y posteriormente se aplicó la misma metodología que en la sección 7.2.9.3.

7.2.9.6. Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos

Se realizó la recolección de tejido adiposo visceral o abdominal, epididimal y perirrenal, de cada uno de los animales y se registró el peso total. En el tejido visceral abdominal se evaluó la hipertrofia de adipocitos. Éste fue dividido en dos fracciones: una se colocó en una solución de formalina al 4 % para su evaluación histopatológica utilizando la tinción de H&E. Se hicieron lavados con una solución amortiguadora de formalina al 10 % por un día y se procesaron para histología. Los tejidos fueron fijados en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un grosor de 5 µm por sección, se tiñeron con H&E para el examen microscópico.

7.2.9.7. Cuantificación de lípidos en hígado

Los lípidos totales en hígado se cuantificaron por el método de Folch y colaboradores (1957). El tejido previamente congelado con nitrógeno líquido se pulverizó, posteriormente se realizó la misma metodología que en la sección 7.2.9.3.

7.2.9.8. Evaluación microscópica del grado de esteatosis por histopatología

El hígado se colocó en una solución de formalina al 4 % para su evaluación histopatológica utilizando la tinción de H&E. Se hicieron lavados con una solución amortiguadora de formalina al 10 % por un día y fueron procesados para histología. Los tejidos se fijaron en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un grosor de 5 µm por sección, y se tiñeron con H&E para el examen microscópico.

7.2.9.9. Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADN a partir de tejido de hígado

El ARN total de tejido hepático y músculo se obtuvo usando un sistema de aislamiento de ARN total (Promega, Madison, MI). La concentración y la pureza se midieron con un NanoDrop ND-1000 instrument (Thermo Scientific, Wilmington, D.C., E.UU.). La integridad se verificó por medio de electroforesis en un gel de

agarosa al 1 % teñido con SYBR® Gold Gel Nucleic Acid Stain (Invitrogen) bajo la luz ultravioleta.

La síntesis de ADNc se realizó utilizando 2 g de ARN total y 1 µL de oligo dT (15 bases, 0,25 M) en un volumen de 18 µL ajustado con agua libre de RNasa, a 70 °C durante 5 minutos, seguido de incubación en hielo. La síntesis se realizó mediante la adición a cada muestra: 8 µL de M-MLV reacción 5X, 1 µL de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 µL (200 U) de M-MLV RT (Promega, Madison, WI), y agua libre de RNasa, hasta obtener un volumen final de 40 µL. Las muestras se incubaron a 37 °C durante una hora, luego se suspendió la reacción por calentamiento a 55 °C durante 15 minutos.

7.2.9.10. PCR en tiempo real

El análisis del contenido de mRNA se realizó por PCR en tiempo real usando LightCycler1 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó un rango dinámico de concentración de RNA para cada gen para conocer la concentración óptima de RNA en la reacción. Para todos los genes se utilizó una dilución 1:10 del ADNc obtenido.

La reacción se llevó a cabo usando SYBR Green I de Roche usando 3 µL de los ADNc, 0.5 mM de los oligonucleótidos correspondientes (Cuadro 2). Paralelamente a las muestras se corrieron reacciones sin RNA como control. Las muestras se corrieron por triplicado. En la curva de amplificación se determinó el ciclo de corte (Ct). Los resultados se evaluaron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural en cada reacción: superóxido dismutasa 2 mitocondrial (SOD) y ciclina A (CYCA) como genes de referencia. Los resultados se expresan como veces de diferencia en expresión con respecto al control obeso.

Cuadro 2. Oligonucleótidos usados para en análisis de PCR en tiempo real en muestras a partir de tejido de hígado.

Gen	NCBI ID	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
SREBP-1c	AF286470	GCCACAATGCCATTGAGA	CAGGTCCTTGAGCTCCACAATC
FAS	NM_017332	GGACATGGTCACAGACGATGAC	GTCGAACTTGGACAGATCCTTCA
PPARα	NM_013196	TGGAGTCCACGCATGTGAAG	CGCCAGCTTTAGCCGAATAG
CPT1	NM_031559.2	CCCATATCCAGGCAGCGAGA	AGCCAGACCTTGAAGTACCG
SOD	NM_017051.2	TGGACAACCTGAGCCCTAA	GACCCAAAGTCACGCTTGATA
CYCA	XM_345810	AGCACTGGGGAGAAAGGATT	AGCCACTCAGTCTTGCCAGT

SREBP-1c= proteínas de unión a elementos de respuesta de esteroides, FAS= Sintasa de ácidos grasos, PPAR α = receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa CPT1= carnitina palmitoil transferasa I SOD= superóxido dismutasa 2 mitocondrial, CYCA= ciclina A.

7.2.9.11. Alteraciones fisiológicas relacionadas con la obesidad

7.2.9.11.1. Evaluación de resistencia a la insulina

Se determinó la concentración de glucosa en suero utilizando un kit enzimático (Randox Laboratories Ltd. Crumlin, Reino Unido). Los niveles de insulina en suero se midieron usando un kit de Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de insulina de rata (Millipore, EE.UU.). Después, se calculó el índice de resistencia a la insulina con la evaluación del modelo de homeostasis (HOMA, por sus siglas en inglés) usando los valores de la insulina y la glucosa en condiciones de ayuno:

$$\text{HOMA} = \text{insulina en ayunas (mU / mL)} \times [\text{glucosa en ayunas (mmol / L)} / 22,5]$$

7.2.9.11.2. Evaluación de presión arterial en un modelo de obesidad inducido por dieta

Antes del sacrificio se realizaron mediciones de presión arterial de las ratas, mediante el equipo LE 5007 Automática Blood pressure computer (Panlab instrument, Barcelona, España). El equipo permite obtener parámetros fisiológicos en ratas como presión sistólica, presión diastólica y pulso pletismográfico. El sistema se adapta a una caja de acrílico que tiene el electrodo especial para tomar el pulso pletismográfico que se coloca en la cola del animal, y mide la presión arterial, obteniéndose oscilaciones del pulso sanguíneo. Cada señal, luego de amplificarse y filtrarse, pasa de un convertidor analógico a uno digital, y de aquí a una computadora, cuya programación permite presentar, procesar y almacenar los datos, todo con ayuda del programa SeDa Com 32.

7.2.9.11.3. Evaluación de lesiones ateroscleróticas

Se realizó la extracción de la aorta de cada uno de los animales y éstas se cortaron de manera longitudinal y transversal, luego se colocaron en una solución de formalina al 4 %. A partir de aquí, se realizó la tinción con H&E. Se hicieron lavados con una solución amortiguadora de formalina al 10 % por un día y se procesaron para histología. Los tejidos se fijaron en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un grosor de 5 μm por sección, y se tiñeron con H&E para el examen microscópico.

7.2.9.11.4. Evaluación de arterioesclerosis en riñón

Se realizó la extracción de riñones de cada uno de los animales y éstos fueron cortados de manera longitudinal. Posteriormente, se colocaron en una solución de formalina al 4 %. A partir de aquí, se realizó la tinción con H&E. Se hicieron lavados con un buffer de formalina al 10 % por un día y fueron procesados para histología. Los tejidos fueron fijados en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un grosor de 5 μm por sección, y fueron teñidos con H&E para el

examen microscópico. La evaluación se enfocó en la búsqueda de aterosclerosis hialina en arteriolas de riñón.

7.2.9.11.5. Cuantificación de lípidos en riñón

Los lípidos totales en riñón se cuantificaron por el método de Folch y colaboradores (1957). El tejido previamente congelado con nitrógeno líquido se pulverizó, posteriormente, se realizó la misma metodología que en la sección 7.2.9.3.

7.2.9.11.6. Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADNc a partir de tejido de riñón

El ARN total de riñón se obtuvo con la metodología descrita en la sección 7.2.9.9.

7.2.9.11.7. PCR en tiempo real

El análisis del contenido de mRNA se realizó por PCR en tiempo real usando LightCycler1 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, se realizó un rango dinámico de concentración de RNA para cada gen para conocer la concentración óptima de RNA en la reacción. Para todos los genes se utilizó una dilución 1:10 del ADNc obtenido.

La reacción se llevó a cabo usando SYBR Green I de Roche usando 3 µl de los ADNc, 0.5 mM de los oligonucleótidos correspondientes (Cuadro 3). Paralelamente a las muestras, se corrieron reacciones sin RNA como control. Las muestras se corrieron por triplicado. En la curva de amplificación se determinó el ciclo de corte (Ct). Los resultados se evaluaron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001). Los valores obtenidos se normalizaron dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural en cada reacción: superóxido dismutasa 2 mitocondrial (SOD) como gen de referencia. Los resultados se expresan como veces de diferencia en expresión con el control obeso.

Cuadro 3. Oligonucleótidos usados para en análisis de PCR en tiempo real en muestras a partir de tejido de riñón.

Gen	NCBI ID	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
ANG	NM_134432.2	GGGACCGCGTATACATCCAC	CGCAGGGTCTTTCATCCAC
REN	NM_012642.4	AGGCAGTGACCCTCAACA	CCTGGCTACAGTTCACAACGTA
SOD	NM_017051.2	TGGACAACCTGAGCCCTAA	GACCCAAAGTCACGCTTGATA

ANG= angiotensinógeno, REN= renina, SOD= Superóxido dismutasa

7.2.9.11.8. Evaluación del efecto del consumo de infusiones sobre el estrés oxidativo en tejido de hígado y riñón

7.2.9.11.8.1. Determinación de proteínas oxidadas

Para la obtención de proteína total de hígado y riñón, se homogenizaron los tejidos por separado con 500 µL de solución amortiguadora de extracción, esta mezcla se mantuvo en agitación durante 45 minutos a 4 °C. Después, se centrifugó a 10000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante obtenido se colectó y a éste se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

Para evaluar el efecto de las infusiones sobre la oxidación de proteínas se utilizó una técnica en donde se realiza la determinación de los restos de carbonilo de proteína oxidada, dicha metodología fue descrita por Lenz y colaboradores (1989). Este método está basado en la reacción de los restos de carbonilo de las proteínas con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH, por sus siglas en inglés), formándose así un derivado que se cuantifica midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 375 nm.

Al extracto de proteína total se le añadieron 200 μ L de DNPH 10 mM en HCl 2 M y se incubó por una hora a 37 °C. Después se agregaron 325 μ L de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) frío al 50 % para la precipitación de las proteínas, y se incubó a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5000 x *g* por 10 minutos recuperando el precipitado y continuando con cuatro lavados de 1 mL con etanol-acetato de etilo (1:1) esto con el fin de eliminar los excesos de DNPH que no reaccionaron con los restos carbonilo. El complejo proteína-DNPH formado se re-suspendió en 1 mL de guanidina (6 M), se agitó e incubó a 37 °C por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 12000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 562 nm.

A partir de la absorbancia obtenida, se calculó la concentración de restos de carbonilo empleando la ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($\epsilon = 22.000$ M/cm). Los resultados se expresaron como nmol de restos de carbonilo/mg de proteína total.

7.2.9.11.8.2. Peroxidación lipídica en la fracción post-mitocondrial (PMS) de tejido de hígado y riñón.

La medición de peroxidación lipídica se evaluó mediante el método descrito por Wrighty y colaboradores (1981), para lo cual se realizó una extracción de la fracción mitocondrial de un homogenado de tejido empleando solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) con KCl al 1.17 %. Se pesaron 100 mg de tejido y se les adicionó 200 μ L de empleando solución amortiguadora de fosfatos, se trituro el tejido y se centrifugó a 800 x *g* por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante, desechando el precipitado la cual contiene fracción nuclear; el sobrenadante se centrifugó nuevamente por 10500 x *g* por 20 minutos, esto para obtener en el sobrenadante la fracción post-mitocondrial (PMS).

El volumen de reacción fue de 1000 μL , el cual consistió de 850 μL de la solución que contiene la PMS y 150 μL de buffer de fosfatos (sin KCl); después, se agregaron 1000 μL de TCA (10 %) y 1000 μL de TBA. Esta mezcla se sometió a ebullición en baño maría por 20 minutos para formar el complejo MDA-TBA. Finalmente, se agregaron 2500 μL de butanol y se tomó la lectura 532 nm. El análisis de resultados se llevó a cabo usando el coeficiente de extinción 1.56×10^5 M/cm.

7.2.9.11.8.3. Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado

La actividad de la enzima GST se determinó en la fracción citosólica del hígado. Se pesaron 0.5 g de hígado, se homogenizó con 2 mL de solución amortiguadora de tris-sacarosa utilizando un politrón y se centrifugó a $8,750 \times g$ durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a $100000 \times g$ durante 60 minutos a 4 °C. Después se recuperó el sobrenadante (citosol) y se almacenó a -70 °C para su análisis posterior, por medio de la técnica de Habig y colaboradores (1974).

El extracto citosólico obtenido se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos 1 M pH 6.5 (1:30). Posteriormente, se colocaron en cada pozo de la microplaca 50 μL del citosol, después se le adicionaron 100 μL de solución amortiguadora de GSH y finalmente 150 μL de una solución de cloro-dinitro-benceno (CDNB); el producto de esta reacción se midió cada 20 segundos durante 2 minutos a 340 nm en un lector de ELISA (Turnable Versamax, CA, E.U.A). Se cuantificó la concentración de proteínas totales mediante el kit de proteínas BCA- (Pierce, E.U.A), empleando una curva estándar de albúmina.

La actividad enzimática se expresó como nmol/min mg proteína, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/ min mg prot} = \frac{\text{abs min 2} - \text{abs min 1}}{(0.0096) \text{ (mg proteína)}}$$

Dónde: abs min 2= absorbancia a 340 nm en el minuto 2, abs min 1= absorbancia a 340 nm en el minuto 1, mg proteína= miligramos de proteína total en la fracción citosólica y 0.0096= coeficiente de extinción de CDNB en $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

7.2.9.11.8.4. Determinación de la actividad de la catalasa (CAT) en hígado

La actividad de CAT se midió en la fracción citosólica del hígado (sección 7.2.9.11.8.3.) de acuerdo a metodología descrita por (1984). Se prepararon soluciones de peróxido de hidrógeno para el ensayo correspondientes con molaridades de 10 mM y 20 mM; para esto se diluyeron 20 μL de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a 1000 μL con solución amortiguadora de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7) y la concentración se comprobó a 240 nm con la siguiente fórmula:

$$H_2O_2 \text{ (mM)} = \frac{A_{240}}{0.0436}$$

Después, se realizó la curva estándar, preparando una serie de soluciones de peróxido de hidrógeno 10 mM: 0, 125, 250, 500 y 750 μL llevando a un volumen final de 1000 μL con solución de trabajo.

Para llevar a cabo la reacción de catalasa, se preparó una dilución de los homogenados citosólicos preparados previamente (1:50) para un volumen total de 500 μL (la dilución se realizó en solución amortiguadora de trabajo). La muestra se colocó en una celda de cuarzo y se le adicionaron 500 μL del peróxido de hidrógeno 20 mM. A los 3 segundos éstas se leyeron a 240 nm, y después en intervalos de 5 segundos por punto total de 30 segundos y 7 lecturas de cinética.

7.2.9.11.8.5. Determinación del factor glutatión peroxidasa (GPx) en hígado

La actividad de GPx se midió por el método de Plagia y Valentine (1976). El método se basa en la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado

(GSSG) catalizado por GPx, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y NADPH. Para la determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos 100 μ L de solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8, 50 μ L de la mezcla de GSH/GR, 50 μ L de muestra con la dilución apropiada (cuya absorbancia inicial se encuentre entre 0.8 y 1.2 y las pendientes sean negativas) y 50 μ L NADPH 1.5 mM. Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 μ L de hidroperóxido de cumeno 3 mM. La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm a 25 °C con una frecuencia de mediciones tal que permita 8 lecturas en un tiempo de reacción de 2 minutos en un lector de microplacas Vers Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, E.U.A.). La lectura debe realizarse antes de 10 seg transcurridos a partir de la adición del hidroperóxido de cumeno. La actividad de GPX (unidades/mL) se calculó, adaptando los cálculos de mg de proteína con la cantidad de mL de muestra, usando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol} / \text{mg min} = (\text{pendiente de muestra} - \text{pendiente del blanco de reacción}) / (6.22 / \text{mg de proteína})$$

Dónde: 6.22 es el coeficiente de absortividad molar de NADPH (nM/cm).

Una unidad se define como los nmoles de NADPH gastado u oxidado en un minuto por miligramo de proteína.

7.3. Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm error estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. La comparación entre todos los tratamientos se realizaron con la prueba de Tukey con la ayuda del paquete estadístico JMP 5.0.1.

8. Resultados y discusiones

8.1. Determinación de color en infusiones

El color es uno de los principales parámetros cualitativos de los alimentos y su importancia radica precisamente porque representa el primer factor organoléptico que percibe el consumidor (Bruhn, 2007). En el reino vegetal, el color está dado por la presencia de tres grupos de compuestos principales: clorofilas, flavonoides y antocianinas. Casi todos los compuestos fenólicos muestran una fuerte absorción en la región ultravioleta, pero las antocianinas son el único grupo significativo de compuestos fenólicos que es visible (Brouillard y col., 1997).

Se midió en las tres infusiones los parámetros de color mediante las coordenadas L, a*, b*, h° y C. Los resultados mostraron ser significativamente diferentes entre sí (Cuadro 4), debido a las características particulares de los materiales con los cuales fueron preparadas las infusiones, ya que son frutos, flores y hojas, y aunque las condiciones de proceso son similares en todas, el tipo de pigmentos que pudieran ser extraídos en la infusión varían de acuerdo a la naturaleza de la cada material afectando de manera directa el color.

Cuadro 4. Parámetros de color de las infusiones.

	L*	a*	b*	C*	h°
<i>H. sabdariffa</i>	15.0±0.02 ^c	17.3±0.01 ^a	6.98±0.03 ^c	18.7±0.02 ^a	21.8±0.09 ^d
<i>C. paradisi</i>	28.3±0.04 ^a	0.41±0.02 ^d	9.41±0.025 ^a	9.42±0.02 ^b	87.4±0.16 ^b
<i>O. sanctum</i>	8.76±0.03 ^d	2.87±0.06 ^c	-0.84±0.05 ^d	2.99±0.07 ^d	343±0.78 ^a

Los datos se expresan como la media ± EE (n=3). Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa P≤0.05 con la prueba de Tukey.

En cuanto al parámetro de luminosidad, la infusión de *C. paradisi* obtuvo los valores mayores, seguida de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* (Cuadro 4). Estos valores pueden ser atribuidos a la diversidad de compuestos presentes en las infusiones. Por ejemplo, para *H. sabdariffa* y *O. sanctum* se ha reportado que son materiales vegetales ricos en antocianinas (James y col., 1999); previos estudios han reportado que estos compuestos son las responsables de impartir colores con menor luminosidad como son el rojo, morado y azul (Lansky y Newman, 2007).

En el parámetro denominado a^* los valores más altos los obtuvo la infusión de *H. sabdariffa*, lo que indica una tendencia a los tonos rojos, característicos de esta flor. Galicia-Flores y col. (2008) analizaron los cálices de *H. sabdariffa* y bebidas elaboradas con estas flores, obteniendo valores de a^* de 13.8 para los cálices y 30.3 para las bebidas. Aunque los valores reportados por estos autores en bebidas de *H. sabdariffa* son superiores al obtenido en este ensayo para infusiones del mismo material vegetal, se sigue observando la misma tendencia hacia tonos rojos, el cual puede variar en tonalidad debido a diferencias en la preparación de la muestra.

La infusión de *C. paradisi* presentó el valor más bajo de a^* (0.41) comparado con el resto de las infusiones, indicando tonalidades que tienden a colores verdes. Esto se confirmó con el valor b^* , ya que la infusión de *C. paradisi* fue la que presentó el valor más alto, lo que indica una tendencia hacia tonos amarillos. Por otra parte, la infusión de *O. sanctum* mostró un valor negativo para b^* relacionado con una tendencia hacia el tono azul (Cuadro 4).

Los valores h^0 representan el ángulo de matiz, el cual se emplea como sinónimo de color (Tinte-Cromo). Esto no excluye que, además, pueda referirse a la variable de oscuridad y/o claridad producida por las relaciones acromáticas generando diferencias de valor sin perder su origen de color (rojo, rosado-azul, celeste). En este parámetro, la infusión de *O. sanctum* dio el valor más elevado, seguido de la infusión de *C. paradisi*, mientras que el valor más bajo corresponde a la infusión de *H. sabdariffa*.

Otro parámetro evaluado fue el croma que corresponde al grado de saturación o pureza del color obteniendo en orden descendente infusión de *H. sabdariffa*, *C. paradisi* y *O. sanctum* mostrando diferencias significativas entre las infusiones ($P \leq 0.05$).

Analizando los resultados obtenidos la infusión de *H. sabdariffa* presenta un color más puro y la de *O. sanctum* representa el color menos puro. Esto se debe a que la saturación en un color se refiere al grado de pureza que tiene éste, es decir, que no existen en su composición ningún tipo de acromáticos, que pueda variar su capacidad de reflexión, (luz se refleja en las superficies materiales reflectares formando un ángulo idéntico al del rayo incidente). Cuando el tono es completo y no está mezclado con un acromático, éste presenta su máxima saturación o pureza. Cuando se combina con un acromático, o con su complementario, sufre una neutralización o pérdida de saturación. Por lo tanto, la cromaticidad de una muestra es la diferencia que existe entre un color y un gris de su misma luminosidad y claridad, que corresponden a la saturación del color percibido.

8.2. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas monoméricas

Una de las razones por las cuales el consumo de infusiones se ha incrementado alrededor del mundo es debido a su contenido de fitoquímicos con beneficios para la salud conocidos como polifenoles. Estos compuestos son considerados los principales compuestos bioactivos con potencial terapéutico.

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de compuestos fenólicos se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y antocianinas monoméricas.

	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
Polifenoles totales¹	17.0 ± 0.03 ^b	16.9 ± 0.13 ^b	69.1 ± 0.14 ^a
Flavonoides totales²	10.0 ± 0.27 ^b	7.8 ± 0.22 ^c	95.6 ± 0.46 ^a
Antocianinas³	3.4 ± 0.01 ^b	ND	4.0 ± 0.01 ^a

Los datos se expresan como la media ± EE (n=3). Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey.¹ Los resultados son expresados en mg eq. de ác. gálico/ g de muestra seca. ²Los resultados son expresados en mg eq. de catequina/ g de muestra seca.³ Los resultados son expresados en mg de eq. de cianidina -3-glucósido/ g de muestra seca.

Se obtuvo una mayor concentración de compuestos fenólicos en la infusión de *O. sanctum* L., seguida por las infusiones de *H. sabdariffa* y *C. paradisi*.

Juliani y Simons (2002) reportaron una concentración de polifenoles totales en extracto metanólico de albahaca morada entre 81.7-126.2 mg eq. de ácido gálico/g de muestra seca, la cual es una concentración mayor que la encontrada en infusiones. Esto está relacionado con la polaridad del solvente, puesto que el metanol es menos polar que el agua, y al entrar en contacto con el material vegetal, degrada con mayor facilidad las paredes celulares permitiendo que se libere los compuestos fenólicos contenidos en la célula vegetal (Lapornik y col., 2005). Sin embargo, en la industria alimenticia el uso de metanol como solvente no es muy recomendado, prefiriendo utilizar otros solventes como el agua, ya que la extracción se considera eficaz (Lapornik y col., 2005). Aunado a esto, la infusión tal como se analizó en este estudio es la forma común en como ingiere la población esta bebida.

En el caso de *H. sabdariffa*, Sáyago-Ayerdi y colaboradores (2007) reportaron en extracto acuoso una concentración de polifenoles totales de 21.7 mg eq. de ácido gálico/ g de materia seca, el cual es un valor cercano a la concentración reportada en este trabajo para infusión de este mismo material. Ésta variación entre concentraciones se puede deber al genotipo de material vegetal utilizado o a las condiciones de extracción (Scalzo y col., 2005), lo cual se debe considerar para la estandarización de un proceso o para el análisis de resultados en evaluaciones posteriores.

El contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos de harinas liofilizadas obtenidas a partir de algunos cítricos incluida *C. paradisi* oscila alrededor de 51.1 mg eq. de ácido gálico/g (Rincón y col., 2005). En la infusión de *C. paradisi* evaluada en este estudio el contenido fue de 16.9 mg eq. de ácido gálico/g de muestra seca. La concentración es menor, lo que puede atribuirse al proceso de secado, ya que estos autores liofilizaron las muestras y en nuestro caso se secó utilizando una temperatura de 50 °C. Debido al proceso se pueden perder algunos compuestos y se sabe que los polifenoles son termo sensibles. Se decidió utilizar éste proceso de secado con el fin de simular las condiciones que se utilizan en industria para procesar material vegetal destinado a la elaboración de infusiones. Aunado a esto, en las harinas se llevó a cabo una extracción con metanol mientras que en las infusiones, el método de extracción es con agua, lo cual por la polaridad del solvente afecta la extracción total de estos compuestos.

En los resultados de flavonoides expresados en µg equivalentes de catequina/g de material seco, la infusión de *O. sanctum* fue la que dio la mayor concentración seguida por *H. sabdariffa* y *C. paradisi*. El contenido de flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos no flavonoides están relacionados con el contenido de fenoles totales. Sin embargo, un mayor contenido de fenoles totales no necesariamente determina un mayor contenido de flavonoides (Bedascarruasbure y col., 2004). En nuestro caso, los resultados obtenidos con las infusiones si se obtuvo una correlación ($r^2= 0.99$), lo que era de esperarse puesto

que las infusiones que obtuvieron mayor concentración de polifenoles totales fueron aquellas que obtuvieron mayor concentración en flavonoides.

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Por ejemplo, Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Wrolstad, y col., 2004).

De las infusiones analizadas, *H. sabadariffa* y *O. sanctum* fueron las que mostraron mayor contenido de antocianinas (Cuadro 5), siendo la infusión de *H. sabadariffa* la que sobresalió en contenido de estos compuestos con una concentración de 4mg eq. de cianidina -3-glucósido/g de material seco. Se ha reportado que uno de los principales compuestos con actividad biológica presentes en este material son las antocianinas, específicamente cianidina y delfina, las cuales otorgan el color característico de esta flor (Garzón, 2008).

En un estudio previo, Galicia-Flores y col., (2008) analizaron el contenido de antocianinas en cálices de *H. sabadariffa* mediante una extracción acuosa y temperaturas de ebullición por tiempos de 15 y 60 minutos, y sus resultados mostraron un rendimiento más bajo de los reportados en este trabajo. Esto puede atribuirse a que entre los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas se encuentran la temperatura al igual que el pH, entre otros. Además, se aplicaron tiempos cortos de ebullición al momento de preparar las infusiones evitando de esta manera la degradación de los compuestos en comparación con otro tipo de extracción en los cuales se utilizan temperaturas elevadas por tiempos prolongados.

La albahaca morada se considera una fuente potencial de antocianinas, que son las responsables del color púrpura de esta planta. Mediante la técnica de HPLC, Phippen y Simon (1998) identificaron catorce diferentes antocianinas en *O. sanctum* en extracto metanólico acidificado (0.1% HCl), once de las cuales fueron cianidinas, siendo la cianidina-3-di-p-coumarin glucósido-5- glucósido, como el mayor componente.

En el análisis de la concentración de antocianinas en la infusión de *O. sanctum* dio una concentración de 3.4 mg eq. de cianidina -3-glucósido/g de material seco. Simon y colaboradores (1999) reportaron valores de concentración mucho menores de antocianinas en las hojas de *O. sanctum* que las reportada para infusión, siendo de 0.188 mg/g de material seco. Las diferencias pueden ser explicadas por diversos factores como: el tamaño de la partícula (1-1.5 mm), lo que permite una mayor superficie de contacto, y permite mejorar la extracción. Adicionalmente, se conocen diferentes variedades de *O. sanctum*, factor que puede influir en la síntesis de estos pigmentos.

8.3. Identificación y cuantificación de compuestos en infusiones

Los ácidos fenólicos y flavonoides que pueden contener algunas infusiones herbales varían de acuerdo a la naturaleza del material que se está usando para la preparación de esta bebida. En la primer etapa de identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se utilizaron ocho ácidos fenólicos puros y nueve flavonoides; algunos de estos compuestos se han reportados previamente en los materiales vegetales usados para preparar las infusiones. Aunque, la mayor parte de esta información se ha obtenido a partir de extracciones con solventes, como metanol, el metanol y la acetona. También, a partir de extractos acuosos (no infusiones) (Javanmardi y col., 2002; Wu y col., 2007; Mourtzinis y col., 2008).

La cuantificación de compuestos fenólicos en las diferentes infusiones se muestra en el Cuadro 6. Para la infusión de *H. sabdariffa* el compuesto mayoritario fue el ácido cumárico (4.29 mg/100 g). Este mismo compuesto ha sido reportado por autores como Mourtzinou y colaboradores (2008) en extracto al 1 % de HCl-metanol, y es considerado uno de los compuestos fenólicos con actividad biológica más relevante en este material vegetal.

El ácido vanilínico fue el compuesto mayoritario encontrado en la infusión de *O. sanctum* (153.31 mg/100 g). Javanmardi y colaboradores (2002), identificaron al ácido vanilínico en un extracto metanólico obtenido a partir de flores de *O. sanctum*, lo cual indica que este compuesto puede extraerse no sólo en extracto metanólico sino también en infusiones. Itoh y colaboradores (2009) reportaron un efecto antiinflamatorio y hepatoprotector del ácido vanilínico en ratones con daño al hígado inducido con concanavalina A. De tal manera que, la infusión de *O. sanctum* podría presentar un efecto similar atribuido a su concentración de ác. vanilínico.

Los cromatogramas representativos de algunos ácidos fenólicos y flavonoides se presentan en la Figura 10, donde los compuestos más abundantes para la infusión de *H. sabdariffa* fueron ácido rosmarínico, hesperidina y ácido cumárico. Para *C. paradisi* fueron ácido cumárico, naringina y rutina, y para *O. sanctum* fueron ácido elágico, ácido vanilínico y ácido cafeico.

Para *C. paradisi*, el principal compuesto identificado y cuantificado fue rutina (169 mg/100 g). Este compuesto se ha detectado en extracto etanólico a partir de diferentes partes de la fruta en un extracto de etanol (Wu y col., 2007). Sin embargo, se cuantificó una mayor concentración de este flavonoide en este trabajo, lo que sugiere que la preparación de infusión permite una mejor extracción.

Cuadro 6. Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides de infusiones.

	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum L.</i>
Ácido cafeíco	1.37 ± 0.03	16 ± 0.04	5.94 ± 0.13
Ácido clorogénico	1.10 ± 0.46	ND	ND
Naringina	2.33 ± 0.29	17 ± 0.17	ND
Rutina	2.61 ± 0.31	169 ± 0.15	ND
Ácido vanilínico	1.38 ± 0.15	ND	153.31 ± 0.05
Ácido cumárico	4.29 ± 0.07	ND	ND
Quercetina	1.82 ± 0.13	ND	ND
Ácido elágico	ND	ND	4.72 ± 1.10
Ácido rosmarínico	1.90 ± 0.99	ND	ND
Hesperidina	2.78 ± 0.76	ND	ND

Los resultados se expresan en mg/100 g de muestra seca. Los datos se expresan como la media ± EE de tres repeticiones. ND= debajo del límite de detección.

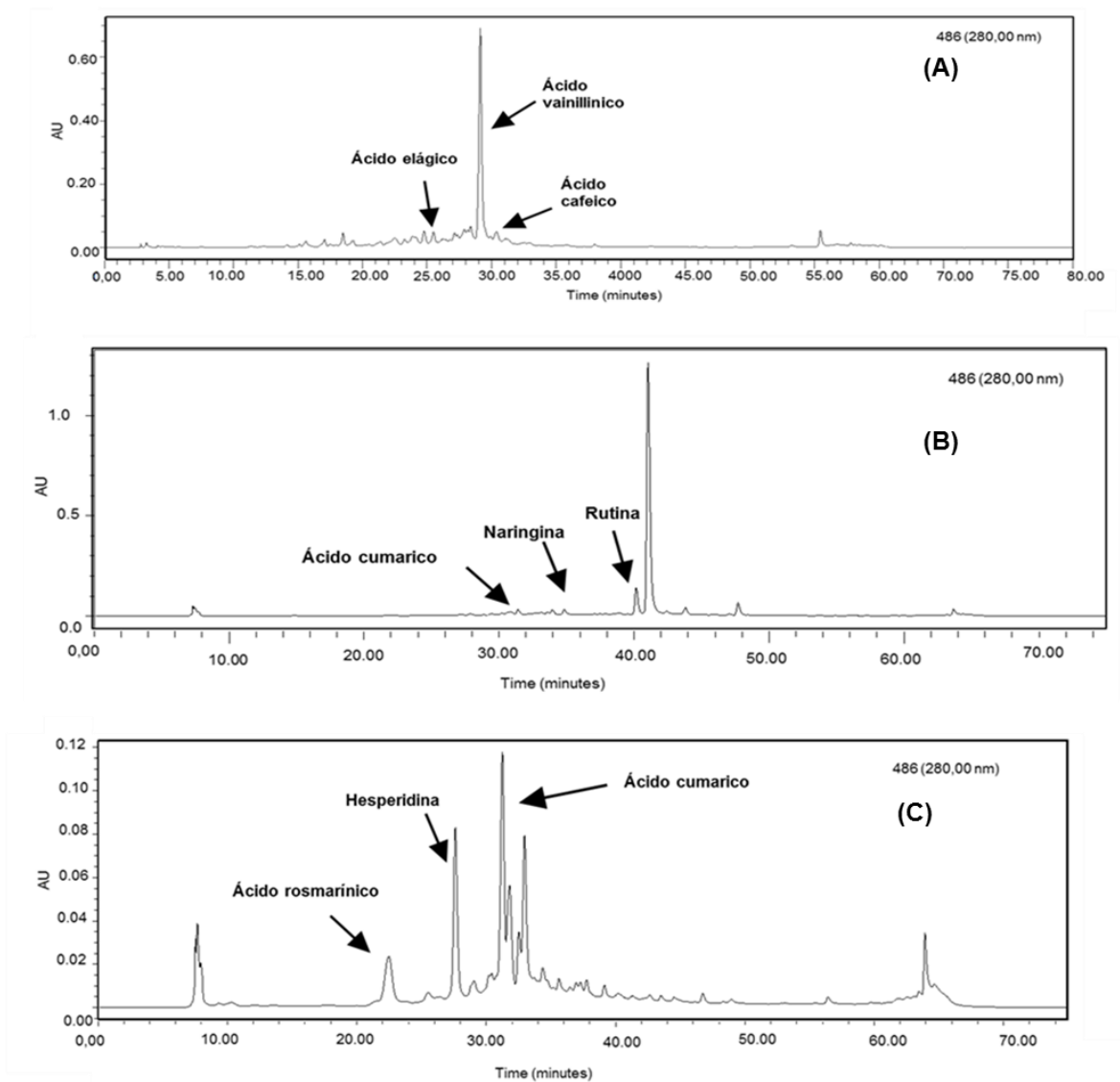


Figura 10. Cromatogramas representativos de las infusiones de *Hibiscus sabdariffa* (A), *Citrus paradisi* (B) y *Ocimum sanctum* L. (C).

Con el fin de ampliar la información relacionada con la identificación de compuestos con actividad biológica se incluyó un análisis de masas y los resultados se muestran en el Cuadro 7. Se puede observar que en la infusión de *O. sanctum* se identificó la mayor cantidad de compuestos previamente reportados para este material como el ácido rosmarínico y el kaempferol (Javanmardi y col., 2002).

En el caso de las otras dos infusiones, el análisis de masas reveló la presencia de compuestos que no se identificaron previamente por HPLC como el ácido ferúlico para *H. sabdariffa* y la narirutina para *C. paradisi*.

El perfil de compuestos puede darnos información acerca de la composición de las infusiones lo cual podría estar relacionado con la actividad biológica de estas bebidas.

Cuadro 7. Composición química de infusiones por el análisis de HPLC-MS-TOF.

Tiempo de retención	λ max	[M + H]	Fragmentos	Estructura propuesta	<i>H. sabadariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
4.73	236,283	291		Catequina	✓		
4.92	241,280			Catequina			✓
5.50	245, 320	355	163	Ácido clorogénico			✓
6.51	246, 293, 327	378	195	Derivado del ác. ferúlico			✓
6.59	235, 292, 324	163	145	Ácido cafeíco	✓		
9.43	239, 294, 325	459	301, 163	Derivado del ác. cafeíco	✓		
12.15	238, 295, 327	163	145	Derivado del ácido cafeíco			✓
16.87	254, 354	506	303, 287	Derivado de quercetina	✓		
19.41	242. 297, 328	643	560, 459, 399, 301, 163	Derivado de ác. cafeíco			✓
20.02	257, 355	464	303, 287	Derivado de quercetina	✓		
20.85	258, 356	434	303, 287	Derivado de quercetina			
22.13	257, 297, 351	577	287, 273	Derivado de luteolina			✓
22.71	264, 343	581	287	Derivado de kaempferol	✓		
23.74	272, 354	344	303, 287	Derivado de quercetina	✓		

24.62	264, 335	433	447, 271, 257	Derivado de apigenina		✓
24.91	235, 287, 317	595	617, 289	Derivado de ác.cumárico		✓
25.16	265, 346	287		Derivado de kaempferol		✓
25.41	263, 347	287		Derivado kaempferol		✓
25.69	282, 334	281	619, 603, 273	Narirutina	✓	
25.76	239, 245, 206	355	759, 459, 399, 304, 163	Derivado de ác. Clorogénico		✓
26.63	243, 253, 298	355	459, 163	Ác. clorogénico		✓
26.91	283, 332	581	619, 603, 273	Naringina	✓	
27.13	239, 291, 329	360	467, 345, 273	Derivado de ác. rosmarínico		✓
28.13	238, 293, 338	360	569, 511, 345, 273	Derivado de ác. rosmarínico		✓

8.4. Evaluación de capacidad antioxidante *in vitro* de las infusiones

Los métodos para determinar capacidad antioxidante se basan en comprobar que un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, el cual es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, por lo que esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto (Frankel y Meyer, 2000). La concentración inhibitoria media (IC_{50}) es una herramienta importante para valorar la capacidad antioxidante, ya que establece la concentración de una sustancia (infusiones) que es necesaria y efectiva para la obtención de un 50 % de un máximo efecto de inhibición del radical que está provocando el daño. De manera que valores menores en la IC_{50} reflejarían una mayor capacidad antioxidante de la muestra.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) se componen mayoritariamente de colesterol esterificado (42 %), fosfolípidos (22 %) y en menor medida de colesterol libre y triglicéridos (Mathews y Van Holde, 1998). Las LDL se modifican oxidándose mínimamente y produce ácidos grasos poliinsaturados (dialdehído malónico e hidroxinoneal), lo que las hacen más electronegativa al reaccionar con las lisinas de la apo B100, y oxiesteroles (colesterol esterificado). Estos últimos son tóxicos sobre las células del endotelio, desarrollando un papel importante en el proceso aterosclerótico (Berliner y Heineckel, 1996).

La evaluación de la actividad antioxidante de las infusiones se realizó mediante la inhibición de la oxidación de las LDL donde se midió la inhibición de la formación de subproductos de la oxidación de lípidos (malondialdehído) por parte de las infusiones. En el Cuadro 8 se muestran los resultados de IC_{50} de las tres infusiones estudiadas así como del estándar utilizado (catequina).

El análisis *in vitro* utilizando esta técnica genera información sobre el efecto antioxidante de compuestos no sólo lipofílicos si no también hidrofílicos, ya que la oxidación comienza en primera estancia en las proteínas apo B de las LDL.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante de las diferentes infusiones utilizando las técnicas de oxidación de LDL, DPPH y ABTS.

(IC ₅₀)	<i>H. sabadariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>	Catequina
Oxidación LDL	4.38 ± 0.06 ^b	52.1 ± 0.51 ^a	1.60 ± 0.10 ^e	9.71 ± 0.08 ^c
DPPH•	90.62 ± 0.40 ^c	454.6 ± 1.11 ^a	115.2 ± 0.69 ^b	31.16 ± 0.68 ^d
ABTS+	24.69 ± 0.04 ^a	19.16 ± 0.01 ^b	13.30 ± 0.03 ^d	7.38 ± 0.05 ^e

Los datos son representados como la media ± EE. Letras diferentes por renglones indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de las infusiones utilizando los métodos de inhibición de la oxidación de LDL, DPPH y ABTS.

En el análisis de resultados de la IC₅₀ para LDL oxidada, la infusión de *O. sanctum* mostró el menor valor, siendo más bajo incluso que el estándar (catequina). Éste mismo comportamiento se ve reflejado, pero en menor magnitud, para la infusión de *H. sabadariffa*. Esto puede deberse a que los compuestos que están presentes en las infusiones podrían actuar de forma sinérgica, ya que como reportar algunos autores la capacidad antioxidante total de una muestra está determinada por interacciones sinérgicas entre los diferentes compuestos, y no solamente por el método de acción específico de cada uno de ellos (Frankel y Meyer, 2000; Sánchez, 2002; Aruoma, 2003).

Con el método de ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el ensayo de DPPH sólo puede disolverse en medio orgánico (Anolovich y col., 2002).

En el caso del método DPPH, presenta una desventaja comparado con el ensayo ABTS, que es la inaccesibilidad del DPPH estérico, es decir las moléculas pequeñas pueden tener una mejor oportunidad de acceder a los radicales dando valores más altos para la capacidad antioxidante.

Roginsky y Lissi (2005) analizaron las diferencias entre los ensayos ABTS y DPPH encontrando que este último no reacciona con flavonoides carentes de grupos hidroxilos en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo. De manera que, los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente de radical u antioxidante (Prior y col., 2005).

En los resultados de la concentración inhibitoria media por el método de DPPH (Cuadro 8) la infusión de *C. paradisi* fue la que mostró el valor mayor para IC₅₀. Debido a que el método de DPPH es más selectivo, favoreciendo a los antioxidantes capaces de ser solubles en solventes orgánicos, principalmente en alcohol, de tal manera que podemos sugerir que en las diferentes infusiones donde se obtuvo valores superiores de IC₅₀ sus compuestos minoritarios son aquellos solubles en solventes orgánicos, tal es el caso de la infusión de *C. paradisi*.

Algunos de los compuestos presentes en las infusiones como son los flavonoides y las antocianinas son de carácter hidrofílico y éstas pueden influir en los resultados obtenidos por la técnica de ABTS. En el Cuadro 8 se observa que *O. sanctum* presentó la mayor capacidad antioxidante, seguido de *C. paradisi*. A pesar de que esta última infusión contiene menor cantidad de antocianinas y flavonoides totales, presenta altas concentraciones de ciertos compuestos como el ácido caféico, naringina y rutina (Cuadro 6), los cuales podrían influir en esta capacidad antioxidante.

En las evaluaciones de capacidad antioxidante se obtuvieron variaciones entre infusiones que pueden ser de hasta un 10 % o más. Por lo tanto los compuestos presentes aunque no son comparables en contenido ni en funcionalidad, están actuando de diferentes formas, proporcionando a todas las infusiones analizadas la capacidad de estabilizar radicales libres como los aquí mencionados.

Otro de los puntos de controversia al medir capacidad antioxidante de un material es la posible relación que se tiene entre esta propiedad y la concentración de compuestos bioactivos. En el Cuadro 9 se muestra las correlaciones realizadas para compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres diferentes metodologías (LDL oxidada, ABTS, y DPPH), aplicadas a las infusiones. Se encontró que la técnica de ABTS es la que presenta los valores más altos de dicha correlación, tanto para fenoles totales, como para las antocianinas, taninos y flavonoides, ($r^2 > 0.66$) (Cuadro 9)

En el caso de la oxidación de LDL y DPPH se puede observar que las correlaciones más importantes se presentaron con la concentración de flavonoides. Los resultados obtenidos en el ensayo de la oxidación de LDL también se asociaron con la concentración de polifenoles totales. Okawa y col. (2001) mencionan que la mayor capacidad no siempre está en relación a la concentración de compuestos fenólicos, de manera que en la capacidad de secuestrar radicales libres, no importa el contenido de compuestos fenólicos, sino más bien, la posición del grupo hidroxilo de los fenoles presentes en la solución.

Cuadro 9. Correlaciones de Pairwise para compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de las infusiones.

	ABTS	DPPH	LDLox
Polifenoles totales	0.9809	0.2086	0.7732
Flavonoides	0.8468	0.6617	0.9851
Taninos	0.6699	0.4851	0.0489
Antocianinas	0.7296	0.3976	0.1403

8.5. Efecto de las infusiones sobre el metabolismo de lípidos en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa.

8.5.1. Peso corporal

En la Figura 11 se presentan los resultados del peso corporal de las ratas desde el inicio del experimento. Se puede observar que el control obeso ganó más peso corporal que el control sano (28 %). En el caso de los grupos tratados con las infusiones, únicamente el grupo que consumió la infusión de *H. sabdariffa*, presentó menor ganancia de peso corporal (10 %) comparado con el control obeso. Los grupos de *C. paradisi* y *O. sanctum* no hubo diferencia estadística significativa contra el control obeso.

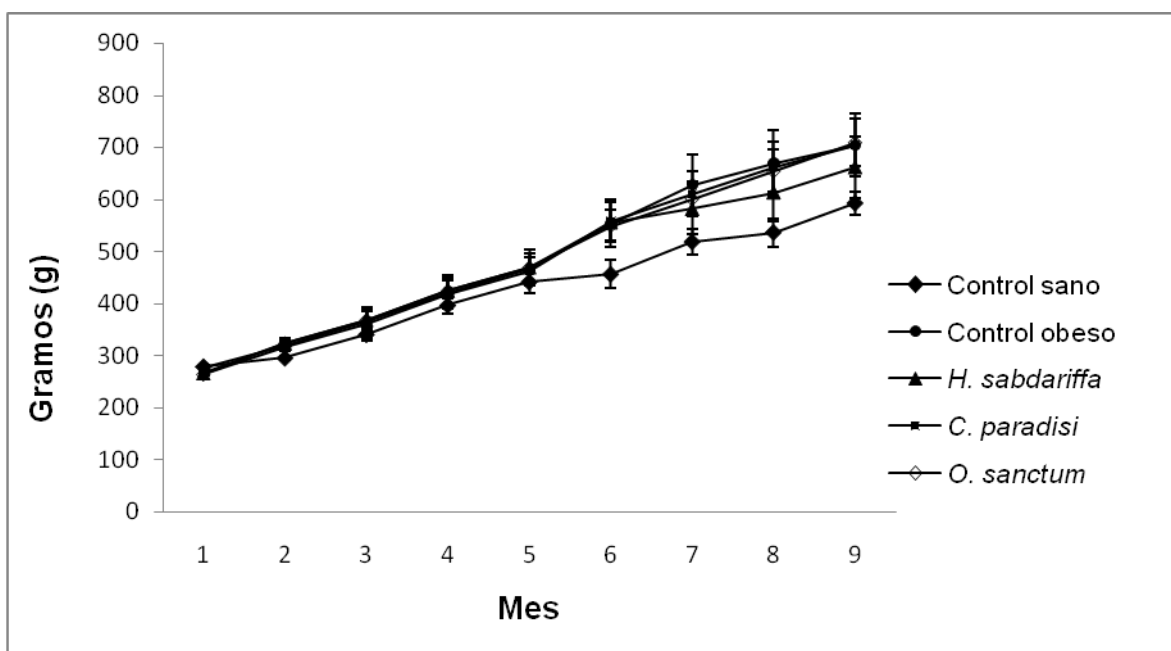


Figura 11. Peso corporal de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Los datos se presentan como la media \pm EE.

Así mismo, se llevó acabo la cuantificación de los diferentes tipos de tejido adiposo, donde los resultados muestran una tendencia similar a los resultados de peso corporal (Cuadro 10). El control obeso gano más peso de tejido adiposo comparado con el control sano (72 %). En el caso de los grupos tratados con las infusiones, el grupo que consumió la infusión de *H. sabadriffa* redujo el aumento del peso total del tejido adiposo en un 24 %, seguido del grupo tratado con infusión de *O. sanctum*, el cual solo disminuyó un 13 % comparado con el control obeso.

En el caso del grupo de ratas obesas que consumieron la infusión de *C. paradisi* no se observó una reducción del peso total del tejido adiposo.

Cuadro 10. Peso de los diferentes tejidos adiposos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Tejidos adiposo abdominal (g)	Tejido adiposo (visceral, renal, testicular) (g)	Total (g)
Control sano	4.44 ± 0.3 ^b	14.71 ± 0.83 ^c	19.16 ± 0.98 ^d
Control obeso	17.72 ± 1.0 ^a	51.39 ± 3.7 ^{ab}	69.11 ± 4.6 ^a
<i>H. sabdariffa</i>	12.44 ± 3.2 ^a	40.72 ± 3.8 ^b	52.91 ± 4.8 ^c
<i>C. paradisi</i>	17.82 ± 1.0 ^a	53.91 ± 1.7 ^a	71.74 ± 2.1 ^a
<i>O. sanctum</i>	16.59 ± 1.0 ^a	43.72 ± 3.0 ^{ab}	60.32 ± 2.9 ^{ab}

Los datos se presentan como la media ± EE (n=3). Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa P≤0.05 con la prueba de Tukey.

Estudios han demostrado un efecto antiobesogénico para *H. sabdariffa* en diferentes tipos de extractos. Tal es el caso reportado por Alarcón-Aguilar y colaboradores (2007), quienes observaron una menor ganancia de peso corporal y tejido adiposo abdominal en ratones obesos inducidos con glutamato monosódico y tratados con el extracto metanólico obtenido a partir de flores de *H. sabdariffa*.

En el caso de los grupo tratado con infusiones de *O. sanctum* no hubo diferencia estadística significativa contra el control obeso. Sin embargo, algunos autores como Carrasco y col. (2008) han reportado que a partir de una disminución del 5 % de peso corporal se puede mejorar las condiciones de salud de personas con obesidad.

Por su parte, *C. paradisi*, no disminuyó el peso del tejido adiposo, pero diferentes efectos positivos contra el metabolismo lipídico se han reportado para éste material y serán abordados con más detalle en secciones posteriores de este trabajo.

8.5.2. Evaluación de lípidos en heces

La absorción de grasas es un proceso muy eficiente, de tal manera que aproximadamente el 95 % de los lípidos de la dieta son absorbidos a nivel intestinal. Una vez absorbidos, los triglicéridos son transportados en moléculas denominadas quilomicrones las cuales reparten su contenido a músculo y tejido adiposo, principalmente (Kalogeris y col., 1996). Entre algunos de los efectos reportados para los compuestos bioactivos de las infusiones y su efecto antiobesogénico se encuentra la inhibición de la absorción de grasa desde del intestino (Hursel y Westerterp-Plantenga, 2010). Lo cual pudiera verse reflejado en la disminución de triglicéridos en tejido adiposo. Por esta situación se decidió evaluar el contenido de triglicéridos en heces fecales (Figura 12).

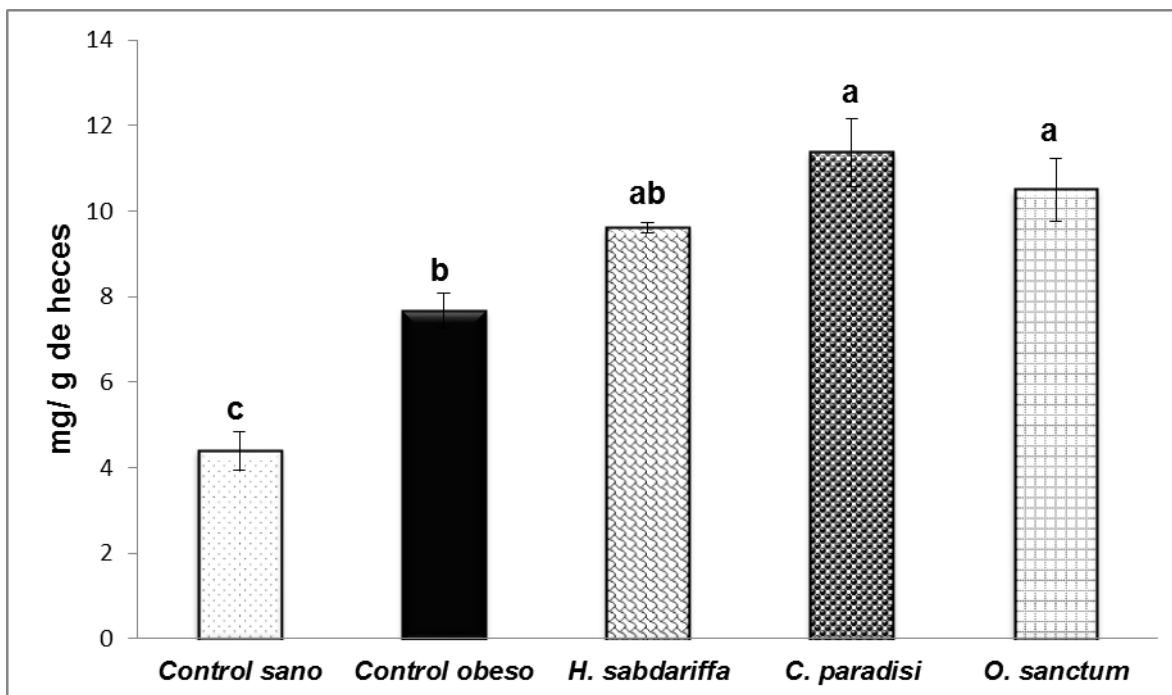


Figura 12. Concentración de triglicéridos en heces fecales de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones de *Hibiscus sabdariffa*, *Citrus paradisi* y *Ocimum sanctum* L. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

En estos resultados, se puede observar que el grupo control obeso tiene mayor concentración de lípidos en heces fecales que control sano, esto debido a la diferencia de ingesta de triglicéridos de la dieta, siendo mayor en el control obeso.

En el caso de los animales tratados con las infusiones de *O. sanctum* y *C. paradisi* presentaron un incremento del contenido de triglicéridos en heces fecales comparado con el grupo control obeso, siendo estadísticamente significativo. Este efecto puede atribuirse a una inhibición de la lipasa pancreática y de ese modo influir en la digestión de grasas y afectar la ingesta de energía (McDougall y Stewart, 2005).

8.5.3. Perfil lipídico de ratas obesas.

Una ruta mayor para disponer del flujo de ácidos grasos libres en el hígado es la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), las cuales son ricas en contenido de triglicéridos y colesterol. Estas partículas son liberadas al plasma para llevar su contenido a tejido muscular y tejido adiposo para almacenamiento de triglicéridos. Los remanentes de las VLDL son neutralizados por endocitosis hepática. Una fracción menor sufre mayor lipólisis con subsecuente transformación a remanente de VLDL (IDL, por sus siglas en inglés) y LDL. Tanto IDL como LDL son endocitados en el hígado. Sin embargo, cerca del 60 % de la neutralización de LDL ocurre en sitios extra-hepáticos (Bradbury y Berk 2004).

Los resultados obtenidos en la evaluación del perfil lipídico de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones se muestra en el Cuadro 11. El control obeso presentó niveles de triglicéridos en ayuno hasta 1.6 veces más que el control sano. En el caso de todos los grupos de ratas tratadas con infusiones, se observó una disminución en la concentración de triglicéridos, lo cual indica una regulación en el metabolismo de lípidos, en el cual órganos como hígado y tejido adiposo están íntimamente involucrados. De tal manera que al presentarse una menor síntesis de VLDL, ya sea por disminución en la absorción de triglicéridos o por la síntesis de *novo*, esto se ve reflejado en los triglicéridos que se encuentran en circulación en el torrente sanguíneo.

Esta misma teoría concuerda con los resultados reportados por Yang y colaboradores (2010) quienes reportaron una disminución en la concentración de triglicéridos postprandiales atribuido a una menor síntesis de *novo* en hámster alimentados con dieta alta en grasa saturada y tratados con extracto acuoso (no infusión) de *H. sabdariffa*.

Cuadro 11. Perfil de lípidos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Control sano	Control obeso	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
Triglicéridos (mg/dL)	95.0 ± 7.8 ^{bc}	159.6 ± 9.4 ^a	105.2 ± 9.4 ^{bc}	82.7 ± 9.5 ^c	117.0 ± 9.6 ^b
Colesterol total (mg/dL)	94.3 ± 4.6 ^a	104.0 ± 2.2 ^a	102.3 ± 3.8 ^a	109.0 ± 2.9 ^a	101.2 ± 2.4 ^a
HDL (mg/dL)	52.30 ± 3.0 ^a	35.34 ± 2.4 ^b	51.1 ± 0.2 ^a	48.3 ± 2.4 ^a	49.0 ± 5.9 ^a

Los datos se representan como la media ± EE. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. HDL: lipoproteínas de alta densidad.

Otra vía por la cual estarían ejerciendo sus efectos hipolipidemicos los compuestos activos presentes en las infusiones pudiera ser la β -oxidación. Algunos estudios realizados en ratones inducidos con dieta alta en grasa y tratados con polifenoles de limón, han reportado una menor ganancia de peso y grasa corporal, así como una disminución en la concentración de triglicéridos en suero. Esto debido al incremento de β -oxidación de ácidos grasos, medido por de la expresión de mRNA de acil-coA oxidasa en hígado y tejido adiposo (Fukuchi y col., 2008).

La concentración de colesterol en suero no se alteró con el consumo de la dieta alta en grasa saturada y fructosa (Cuadro 11). Sin embargo, sí se disminuyeron los niveles de HDL en ratas obesas comparado con el control sano (32 %). En el caso de las ratas obesas tratadas con infusiones, se observó que hubo una recuperación en los niveles de HDL, siendo estadísticamente similares al control sano. Estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos para estos materiales donde se les atribuye un efecto positivo en el metabolismo de lípidos. Especialmente en la regulación de los niveles séricos de colesterol y HDL en animales obesos (Alarcón-Aguilar y col., 2007; Adeneye, 2008; Peng y col., 2011).

8.5.4. Concentración de triglicéridos y grado de hiperplasia en tejido adiposo

Durante la obesidad se aumenta el tamaño y el número de las células grasas (adipocitos), cada célula grasa pesa de 0.4 a 0.6 microgramos (Hernán-Daza, 2002). La función principal de estas células es el almacenamiento de triglicéridos (Guilherme y col., 2008). Cuando existe una pérdida de peso corporal, comienza una disminución en el tamaño de estas células producto de la disminución del contenido de triglicéridos (Hernan-Daza, 2002). En este trabajo, se realizó la evaluación del efecto de las infusiones sobre el contenido de triglicéridos de tejido adiposo abdominal de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada (Figura 13).

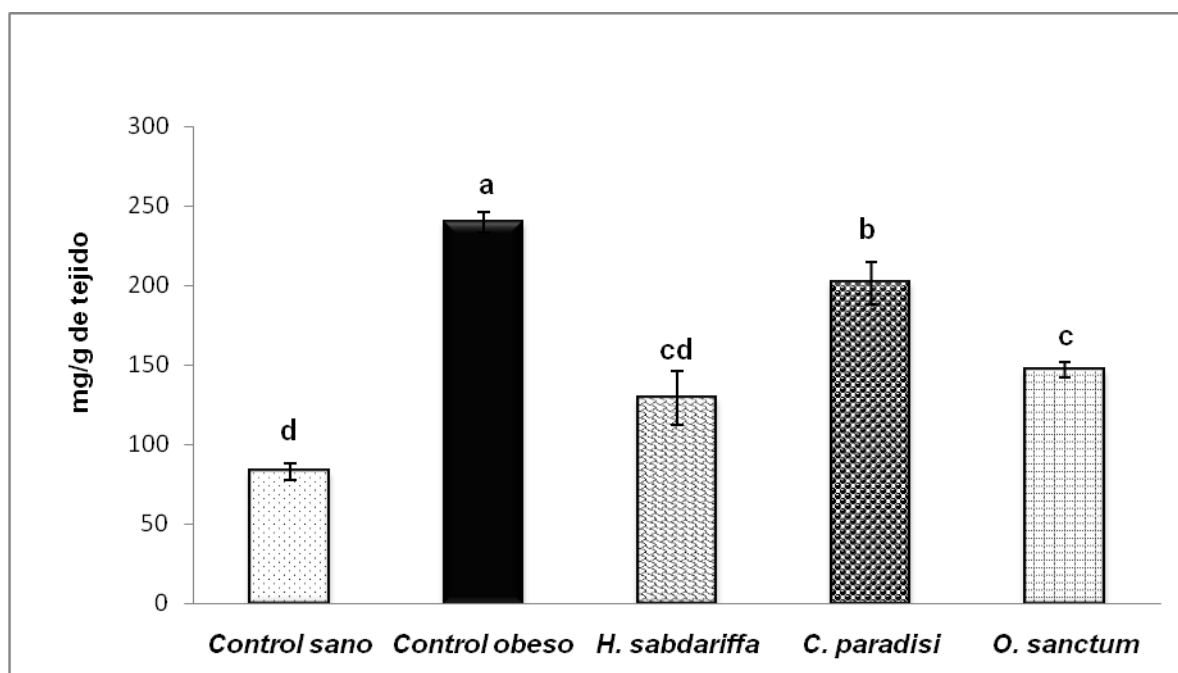


Figura 13. Concentración de triglicéridos en tejido adiposo abdominal de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Se utilizó únicamente esta sección del tejido adiposo debido a que se ha reportado que tiene una mayor relación con ciertas alteraciones metabólicas (Guilherme y col., 2008).

Los resultados obtenidos muestran que las infusiones de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* disminuyó el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo, comparado con el control obeso y siendo estadísticamente similar al control sano.

Trayhurn y Beattie (2001) reportaron que el tejido adiposo crece principalmente por una combinación del aumento en el volumen celular (hipertrofia) y en el número de células grasas (hiperplasia). Así mismo, los autores reportaron que ratas adultas alimentadas *ad libitum* presentaron un aumento de peso corporal y que el peso de cada uno de los cuatro depósitos adiposos estudiados (mesentérica epidídimo, subcutánea inguinal y retroperitoneal) aumentó progresivamente con la edad y la alimentación *ad libitum*. Sin embargo, éste crecimiento de los dos depósitos de grasa intra-abdominal evaluados (mesentérica y del epidídimo) se debió principalmente a la hipertrofia (aumento en el volumen celular de 83 % y 64 %, respectivamente) y en menor grado a una hiperplasia moderada.

Una disminución de triglicéridos en adipocitos se ve reflejado en la hipertrofia, la cual se midió mediante análisis histopatológico de adipocitos y por la evaluación del volumen de los adipocitos (Figura 14). Ambos resultados mostraron que el tratamiento con infusión de *H. sabdariffa* disminuyó la hipertrofia de adipocitos comparado con aquellos animales tratados con las otras dos infusiones.

Wolfram (2005) reportó que infusiones como el té verde disminuyeron el contenido de triglicéridos del tejido adiposo y por lo tanto el tamaño de estos, aminorando la hipertrofia de los adipocitos. De manera que los compuestos bioactivos contenidos en la infusión de *H. sabdariffa* podrían estar ejerciendo efectos similares al té verde, presentando beneficios sobre esta alteración en adipocitos causada por la obesidad.

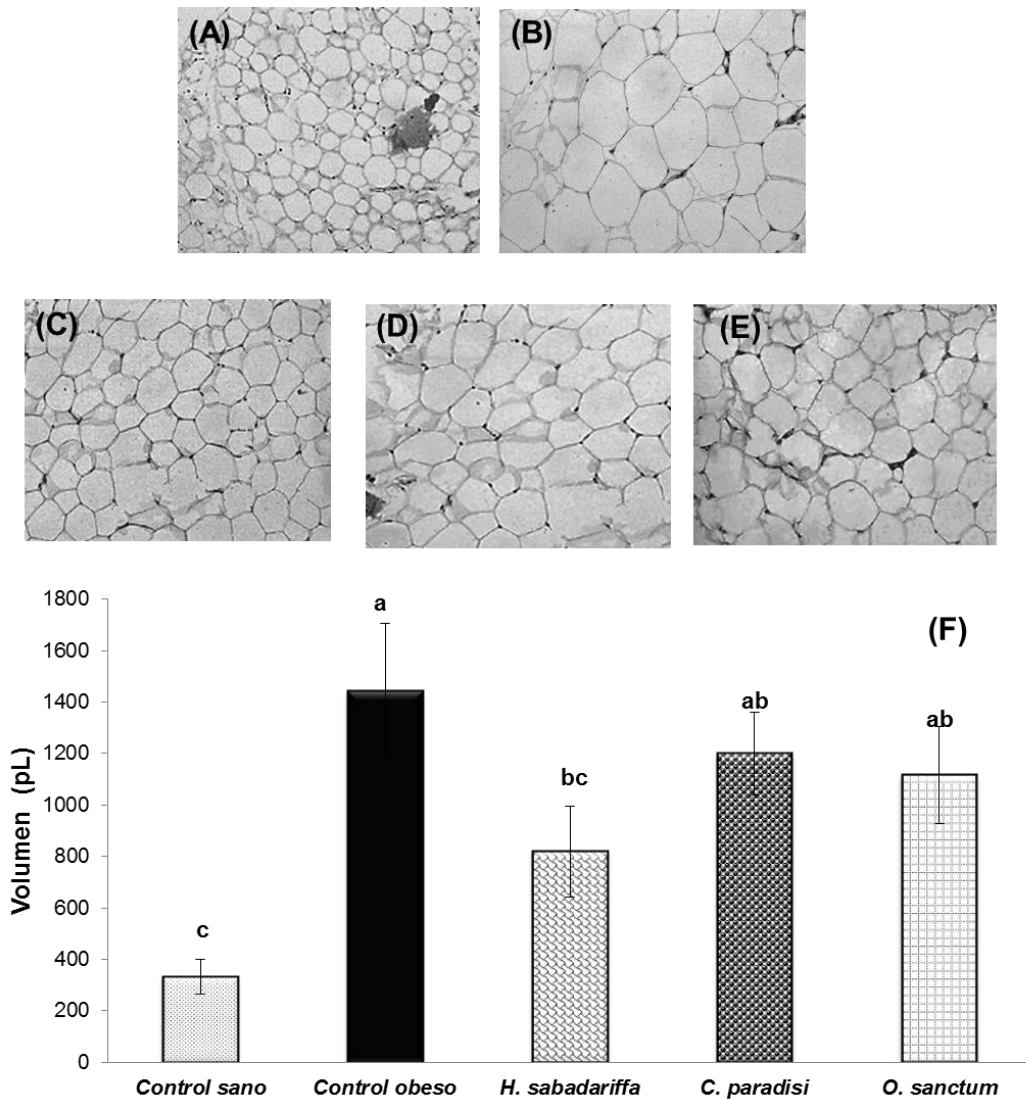


Figura 14. Volumen de adipocitos de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa, tratadas con infusiones. Microfotografías de adipocitos (100x) teñidos con H&E de: (A) control sano, (B) control obeso, (C) *Hibiscus sabdariffa* (D) *Citrus paradisi* y (E) *Ocimum sanctum* L. (F) Volumen de adipocitos expresado en picolitros (pL). Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

En el caso de los animales tratados con la infusión de *O. sanctum* se observó una disminución significativa del contenido de triglicéridos en tejido adiposo comparada con el control obeso, siendo menor este efecto para *C. paradisi* (Figura 13). Estos resultados concuerdan con la hipertrofia de adipocitos medida por el volumen, ya que el tratamiento de ambas infusiones tuvo un efecto positivo sobre este parámetro comparado con el control obeso (Figura 14). De manera que, los compuestos bioactivos encontrados en las infusiones ejercieron un efecto sobre la hipertrofia de adipocitos disminuyendo así el almacenamiento de triglicéridos en tejido adiposo.

8.5.5. Concentración de triglicéridos y el grado de esteatosis en hígado.

Las células adiposas se alimentan de ácidos grasos libres provenientes del torrente sanguíneo (principalmente de triglicéridos circulantes). Esta capacidad de absorber el flujo de ácidos grasos libres de la circulación le da al tejido adiposo un papel especial para proteger otros tejidos del flujo excesivo de ácidos grasos libres, pero cuando hay un exceso estos lípidos se transportan a otros órganos, principalmente al hígado (McCullough, 2004). Al hígado pueden llegar ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, transportándose acompañados con albúmina o puede provenir directamente de la dieta en forma de quilomicrones.

Los hepatocitos tienen los mecanismos para unir, transformar, catabolizar y exportar el exceso de flujo de ácidos grasos libres a través de las acciones de proteínas de unión de ácidos grasos, síntesis de triglicéridos y secreción como VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad), β -oxidación mitocondrial, β -oxidación por el sistema citocromo P450 y ω -oxidación microsomal. Cuando se satura la combinación con albúmina, las células hepáticas captan más ácidos grasos libres. Este exceso de ácidos grasos libres en el hígado juega un papel primordial en la elevada secreción de VLDL que lleva a hipertrigliceridemia y dislipidemias asociadas (Luyckx y col., 2000). La alta ingestión de triglicéridos, aumenta en la secreción de VLDL hepática (Bradbury y Berk, 2004).

Se evaluó el contenido de triglicéridos en hígado con el fin de medir el efecto de las infusiones sobre el almacenamiento de éstos, ya sea por aquellos provenientes del tejido adiposo o bien por la síntesis de *novo*.

Los resultados del contenido de triglicéridos en tejido hepático de ratas con obesidad inducida por dieta y tratadas con infusiones son presentados en la Figura 15. Se puede observar que el contenido de triglicéridos en hígados de ratas tratadas con infusiones de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* es menor en comparación al control obeso, presentando concentración similar a la encontrada en ratas sanas. Este resultado podría estar asociado a la menor absorción presentada en ratas tratadas con esta infusión, evaluado mediante la concentración de triglicéridos en heces, así mismo a la disminución de triglicéridos en tejido adiposo. Aunado a esto, posiblemente exista una menor síntesis de *novo* de lípidos en este órgano o bien que el exceso de triglicéridos se están metabolizando en β -oxidación.

Yang y colaboradores (2010) reportaron una menor síntesis de *novo* en hámster alimentados con dieta alta en grasa saturada y tratadas con extracto acuoso (no infusión) de *H. sabdariffa*, de manera que este efecto pudiera ser similar en las infusiones de este mismo material.

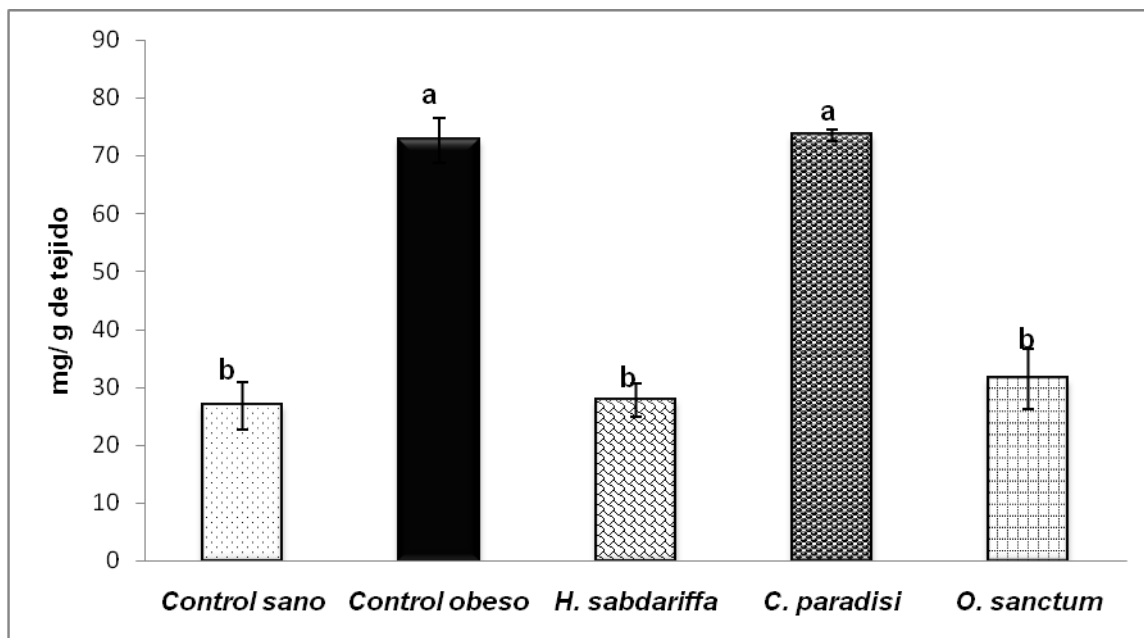


Figura 15. Concentración de triglicéridos en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

El exceso de triglicéridos en hígado se conoce como esteatosis o hígado graso. El grado de esteatosis se puede diagnosticar mediante análisis histológico. La tinción con H&E de la sección del hígado mostró que ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa indujo esteatosis severa (85-95 %) que se caracteriza por la presencia de grandes y medianas gotitas de lípidos, así como los hepatocitos y sinusoides alterados (Figura 16). Estos resultados concuerdan con el contenido de triglicéridos del hígado, que el cual fue 2.7 veces mayor en comparación con el control sano (Figura 15).

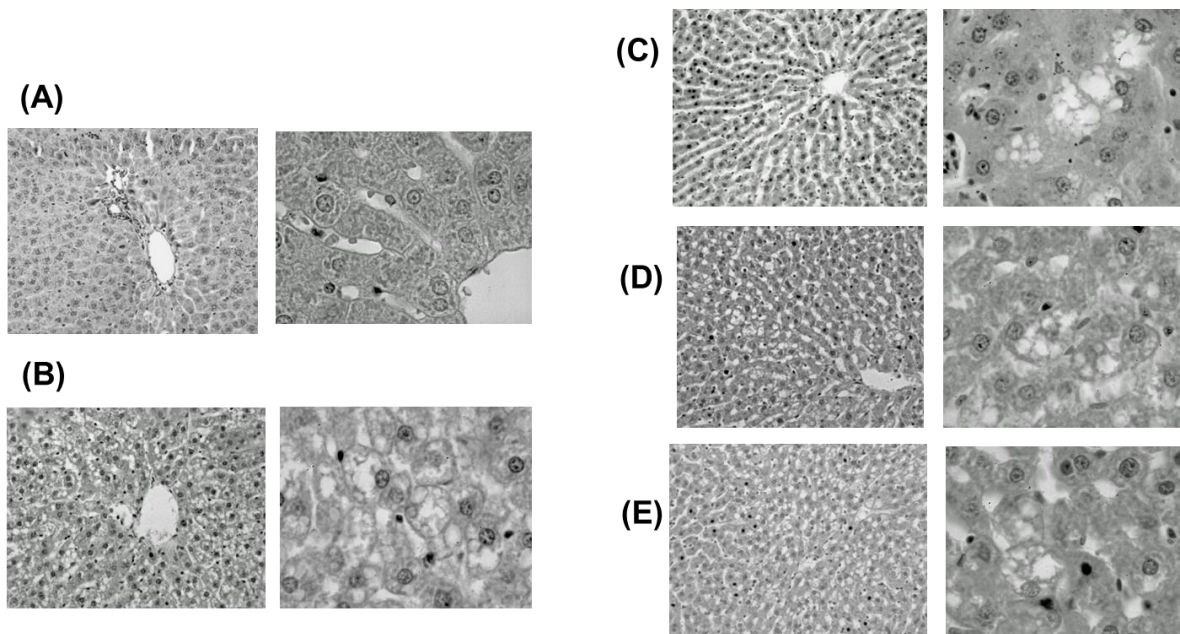


Figura 16. Identificación de esteatosis en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Microfotografías de tejido hepático teñidas con H&E con amplificación 100X (izquierda) y 400X (derecha). (A) control sano, (B) control obeso, (C) *Hibiscus sabdariffa* (D) *Citrus paradisi* y (E) *Ocimum sanctum* L.

8.5.6. Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en tejidos de hígado de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa.

El consumo de las infusiones disminuyó la acumulación de lípidos en el hígado y la progresión de la esteatosis. Con el fin de demostrar si este efecto estuvo relacionado con la modulación de metabolismo de los lípidos mediante infusiones, se evaluó la expresión de genes implicados en la síntesis y la β -oxidación de ácidos grasos en el hígado. Los resultados son mostrados en las Figuras 17 y 18.

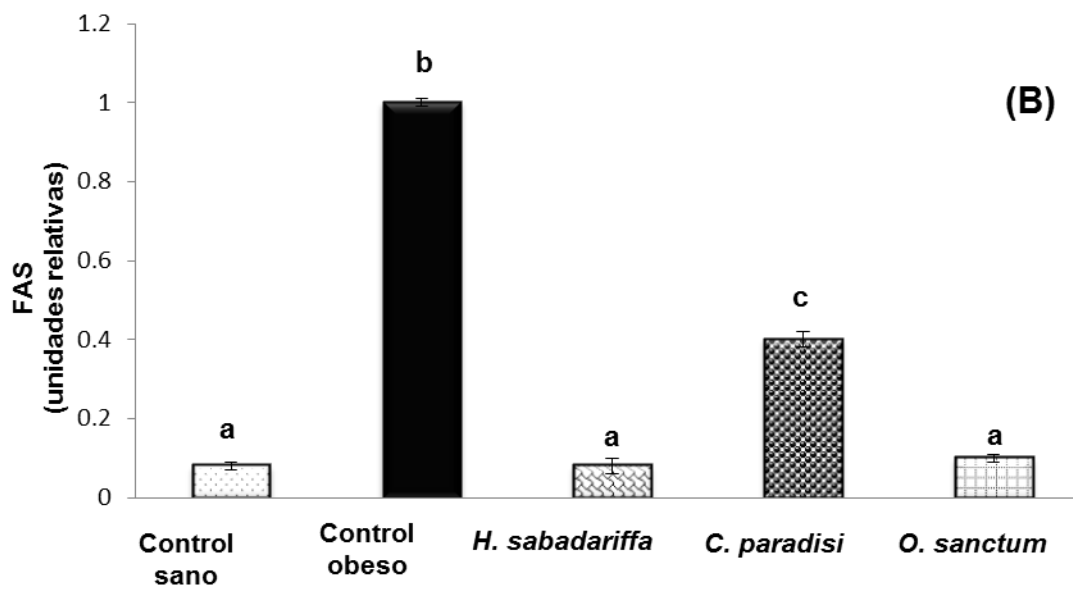
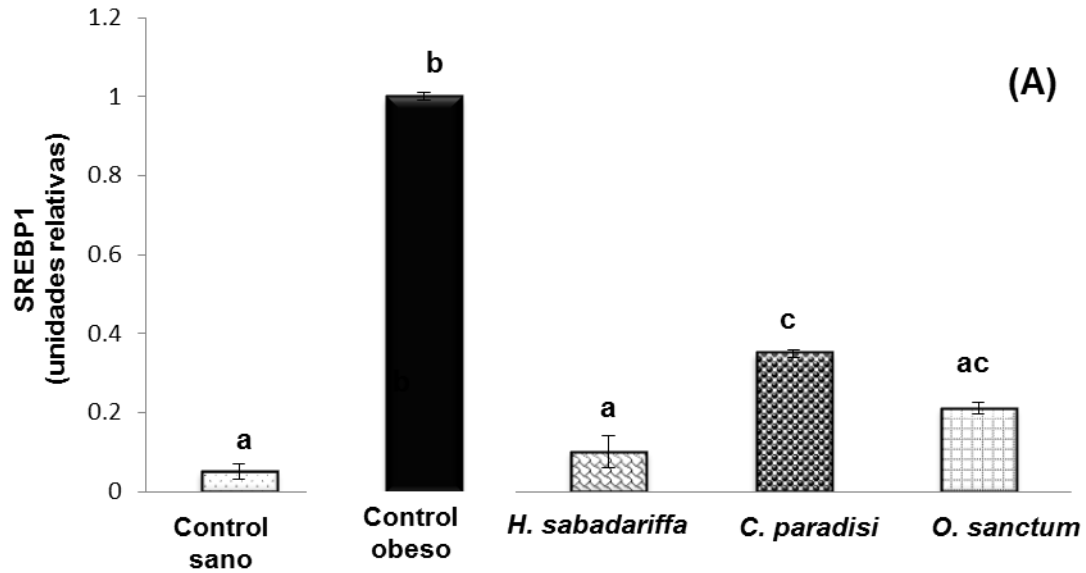


Figura 17. Cuantificación de mRNA de SREBP1(A) y FAS (B) en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Se empleó la media geométrica entre SOD y CYCA como genes de referencia. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Examinando los resultados obtenidos se puede observar que los animales que consumieron la dieta alta en grasa saturada y fructosa presentaron una mayor expresión de los genes lipogénicos analizados (SREBP-1c y FAS) que aquellas que consumieron dieta normal. Lo que indica una clara alteración en el metabolismo de lípidos por la dieta.

En caso de las ratas obesas con tratamiento, se observó que todos los animales presentaron una expresión menor de los genes SREBP-1c y FAS, siendo mayor este efecto en los grupos tratados con *H. sabdariffa* y *O. sanctum*. Estudios anteriores reportan que tratamiento con extracto acuoso de *H. sabdariffa* en hepatocitos regula la expresión de SREBP-1c, disminuyendo la acumulación de lípidos en el hígado (Villalpando-Arteaga y col., 2013). La disminución en la expresión de estos genes, sugiere que la atenuación observada en la esteatosis hepática en los grupos tratados con infusiones puede estar relacionada con una menor síntesis de ácidos grasos, ya que, los resultados de correlaciones entre el grado de esteatosis de los animales con la respuesta en expresiones de genes involucrados en síntesis de ácidos grasos se obtuvo valores de $r^2 = 0.75$ para SREBP-1c y $r^2 = 0.82$ para FAS.

De manera alternativa, la reducción de los niveles de lípidos hepáticos a causa del tratamiento con las infusiones podría estar relacionado con un aumento en la oxidación mitocondrial, lo cual es regulado por PPAR α y CPT1a (Fruchart y Duriez, 2006). De manera similar que para los genes SREBP-1c y FAS, se puede observar que la dieta tuvo una influencia sobre la expresión de los genes PPAR α y CPT1a, ya que los animales tratados mostraron una menor expresión que aquellas ratas pertenecientes al grupo sano.

Por otro lado, las infusiones de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* indujeron la expresión relativa de PPAR α en comparación con el control obeso (Figura 18). Estudios previos reportaron que el extracto del *H. sabadariffa* mostró una mejora del metabolismo de los lípidos a través hasta la regulación de la expresión de PPAR α en un modelo animal de diabetes tipo II (Yang y col., 2010).

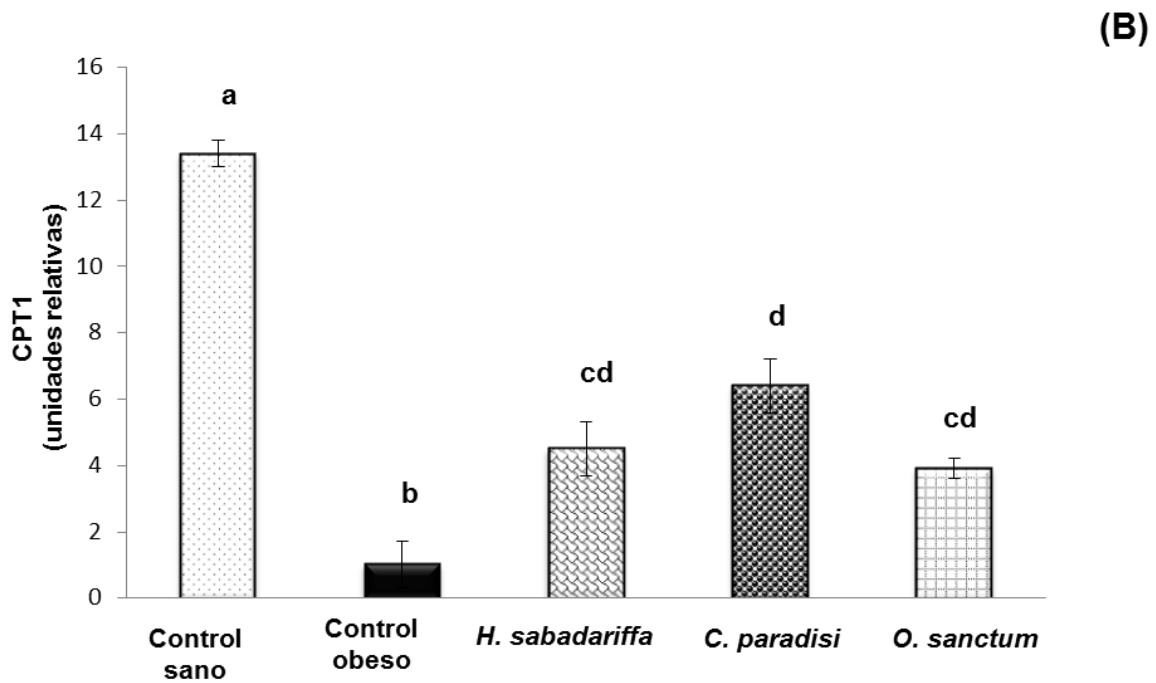
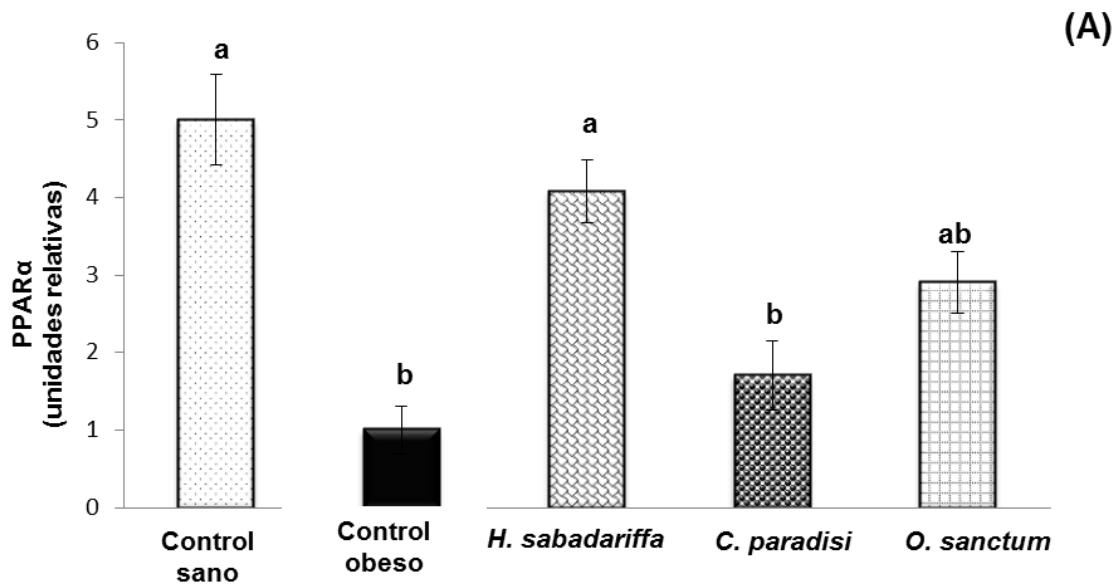


Figura 18. Cuantificación de mRNA de PPAR α (A) y CPT1a (B) en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Se empleó la media geométrica entre SOD y CYCA como genes de referencia. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Dado que PPAR α regula la transcripción de CPT1a, era de esperarse que tratamientos con infusiones de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* tuvieran un mayor efecto sobre la expresión de CPT1a; sin embargo, el tratamiento con infusión de *C. paradisi*, reguló la expresión del gen CPT1a 1.5 veces más que el control obeso (Figura 18). Esto puede ser debido a que se ha reportado que la regulación de PPAR α no es directamente proporcional a la expresión de CPT1a y que la regulación transcripcional de CPT1a involucra varias vías independientes a PPAR α como el proliferador peroximal receptor gamma activado cofactor 1 (PGC1) (Louet y col., 2001).

Estudios previos indican que la regulación positiva de CPT1a reduce la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina en ratones *db/db* genéticamente obesos (Orellana-Gavalda y col., 2011). CPT1a controla la entrada de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana externa mitocondrial mediante la unión de ellos a la carnitina, a fin de llevar a cabo la β -oxidation (Orellana-Gavalda y col., 2011). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la disminución de esteatosis hepática, observado en el grupo tratado con infusión de *C. paradisi*, podría también estar asociada a la absorción de ácidos grasos ($r^2 = -0.52$). Sin embargo, este mecanismo no se considera el principal en comparación con la síntesis de ácidos grasos.

8.6. Efecto del consumo de infusiones sobre enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con la obesidad.

8.6.1. Resistencia a la insulina

El principal problema asociado con la obesidad es la diabetes. Su incidencia y prevalencia en todo el mundo se ha correlacionado con un consumo elevado de alimentos procesados, ricos en grasas saturadas, y bebidas con alto contenido de fructosa (Popkin y col., 2012). Como resultado del consumo de este tipo de dietas, se tienen modificaciones en el metabolismo, principalmente en el de los hidratos de carbono y lípidos que alteran la fisiología del hígado y el tejido adiposo.

En el modelo de obesidad implementado en este proyecto para observar el efecto del consumo de infusiones, se presentaron algunas características de la diabetes, tales como los niveles séricos elevados de glucosa e insulina. El control obeso presentó niveles de glucosa de 120 mg/dL, que se consideran pre-diabéticos. Generalmente, la hiperglucemia va acompañada de cantidades elevadas de insulina. De acuerdo con este punto, el control obeso mostró un aumento de 1.7 veces en los niveles de insulina sérica comparado con el control sano. Por lo tanto, el valor de HOMA aumentó casi 4 veces (Cuadro 12). En el caso de los animales obesos tratados con infusiones presentaron una mejora de estos parámetros, principalmente en ratas que consumieron las infusiones *H. sabdariffa* y *O. sanctum* (Cuadro 12).

Cuadro 12. Metabolitos en suero y valores de HOMA de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Control sano	Control obeso	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
Glucosa (mg/dL)	94.8 ± 4.0 ^b	122.4 ± 1.0 ^a	93.9 ± 5.5 ^b	102.1 ± 2.4 ^{ab}	87.8 ± 5.8 ^b
Insulina (μU/mL)	29.9 ± 0.5 ^b	51.9 ± 2.8 ^a	31.3 ± 0.8 ^b	31.3 ± 2.5 ^b	32.4 ± 2.2 ^b
HOMA (Unidades arbitrarias)	4.8 ± 0.6 ^d	18.7 ± 0.6 ^a	6.9 ± 0.3 ^c	9.1 ± 0.5 ^b	6.5 ± 0.5 ^{cd}

Los valores se expresan como ± el error estándar (n= 7). Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística significativa (P≤0.05) con la prueba de Tukey's.

El efecto hipoglucemiante observado en los grupos tratados con infusiones es coherente con varios estudios realizados con estos materiales vegetales. Aunque en otros estudios se ha utilizado diferentes extractos (no infusión), los resultados han sido similares, sugiriendo que la acción hipoglucémica de las infusiones se asocia con un aumento de la síntesis de glucógeno en el hígado, una gluconeogénesis reducida, así como una mejora de la resistencia a la insulina (Louet y col., 2001; Fruchart y Duriez, 2006; Mourtzinos y col., 2008).

8.6.2. Presión arterial, aterosclerosis y arterioesclerosis

La obesidad es un problema importante de salud pública tanto en países industrializados como en desarrollo. Esta patología conlleva al desarrollo de múltiples alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo de desarrollar diferentes complicaciones tales como diabetes mellitus, enfermedad cardíaca coronaria y la hipertensión. La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo modificable de mayor prevalencia en el mundo. Participa en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica cardiovascular, en la morbimortalidad por eventos cardíacos, cerebrovasculares e insuficiencia renal (Kopelman, 2000).

La Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología (2003) proponen una clasificación de los valores para presión arterial, donde valores ideales para presión sistólica <120 mm de mercurio (Hg) y presión diastólica <80 mm de Hg; valores normales sistólica 120-129 mm de Hg y diastólica 80-84 mm de Hg. Así mismo, esta clasificación incluye valores para hipertensión donde los valores de presión sistólica son 160-179 mm de Hg y diastólica 100-109 mm de Hg en un estadio II.

En la evaluación de las complicaciones de la obesidad se realizaron mediciones de presión arterial en ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasa saturada. Según El Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (1997), una alteración en la presión arterial se da por un cambio en cualquiera de las dos presiones, tanto sistólica como diastólica. Los resultados de presión sistólica y diastólica se presentan en la Figura 19. Ambos valores de presión arterial en los animales obesos se les puede considerar hipertensos. En el caso de las ratas tratadas con la infusión de *O. sanctum* los valores de presión sistólica son incluso menores a los del control sano. Sin embargo, este valor no se considera como hipotensión. López-Maya y Lina-Manjarrez (2008) reportaron que para hacer un diagnóstico de hipotensión, los valores de presión arterial sistólica deben ser menores de 90 mmHg.

El resto de las infusiones disminuyeron la presión arterial, tanto sistólica como diastólica (Figura 19) siendo estos valores similares a los del control sano, teniendo así un efecto positivo en esta alteración causada por una ingesta alta en grasa saturada y fructosa. En algunos estudios realizados con diversos fitoquímicos que se encuentran presentes en las infusiones han demostrado tener un efecto sobre la hipertensión mediante la modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona en ratas hipertensas (Sarr y col., 2006). Sin embargo, este no es el único mecanismo por el cual los polifenoles pudieran estar ejerciendo su efecto benéfico.

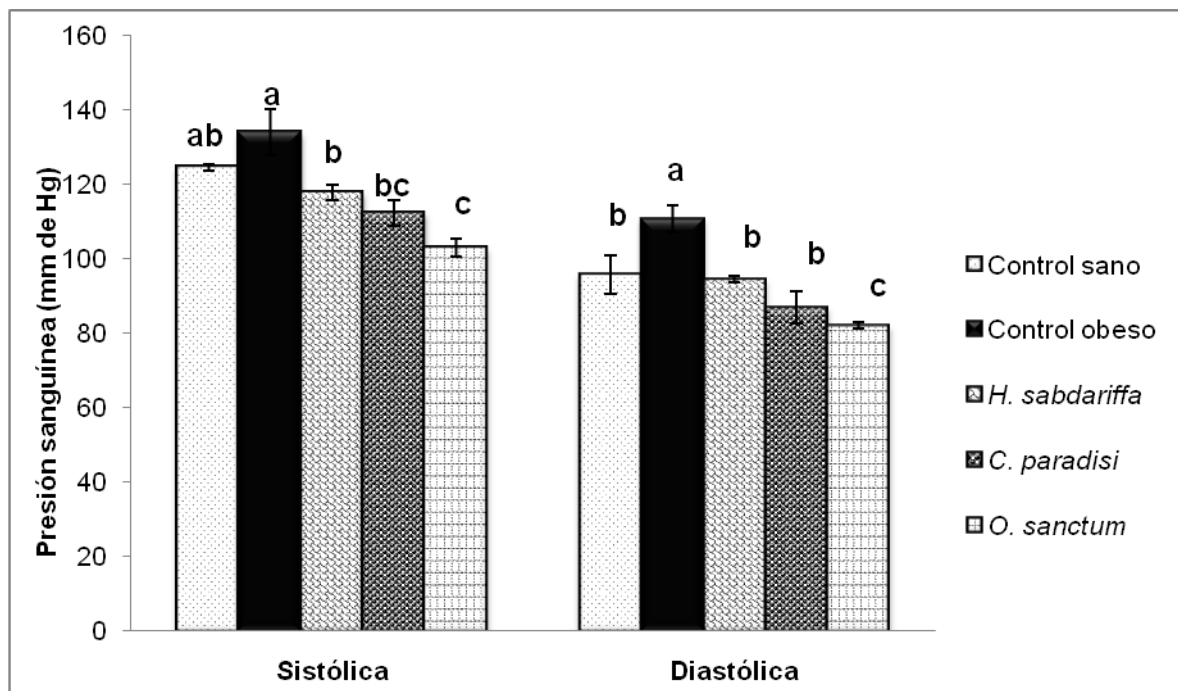


Figura 19. Presión arterial (sistólica y diastólica) de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Otra de las alteraciones que se pueden presentar en la obesidad se incluye a la aterosclerosis. Esta relación está dada por la coexistencia de factores como dislipemia, hipertensión, resistencia a la acción de la insulina y diabetes (Murillo y Esteban, 2005). La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias con grave repercusión en los órganos irrigados por éstas. Esta enfermedad puede interpretarse como la respuesta defensiva obligada del tejido conectivo de la pared arterial ante una agresión permanente y de carácter exponencial. En la zona dañada se produce la correspondiente respuesta tisular defensiva caracterizada por los fenómenos de las respuestas inflamatorias y de la inmunidad. La aterosclerosis debe considerarse como una enfermedad del metabolismo general cuyo órgano diana es la pared arterial (Fernández-Britto, 1998).

La OMS (1958) definió cuatro tipos de lesiones ateroscleróticas de acuerdo con sus características patomorfológicas: (a) estría grasa o banda adiposa; (b) placa fibrosa; (c) placa complicada y (d) placa calcificada.

Los resultados de la evaluación histopatológica de aortas de ratas sanas y obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa se muestran en la Figura 20. La evaluación de la aorta de las ratas se enfocó a la búsqueda de macrófagos, células espumosas o migración de células del músculo liso al espacio subendotelial, debido a que estas alteraciones son la primera etapa de esta patología (Chen y col., 2003). Sin embargo, no se observó diferencia entre ratas sanas y obesas, lo que podemos atribuírselo al tiempo de alimentación con este tipo de dieta y a la cepa de animal utilizada. En la aorta de ratas, tanto sanas como obesas la íntima muestra endotelio conservado, destacando predominio de la media, la que se aprecia rica en fibras elásticas (Figura 20). No se observan inclusión de macrófagos, ni formación de células espumosas. No se encontraron migración de células del músculo liso ni calcificaciones características de la formación de aterosclerosis.

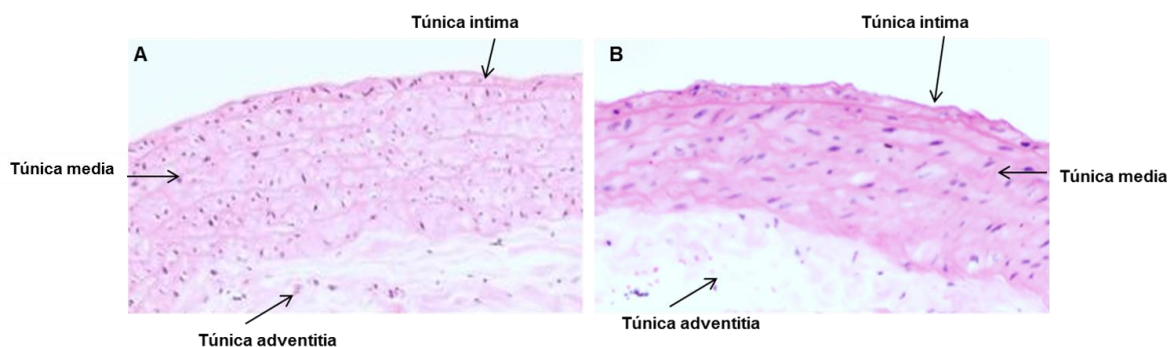


Figura 20. Aorta de ratas sanas (A) y obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa (B).

Dentro de la patología de la aterosclerosis, se describen tres variedades de enfermedades derivadas de ésta, cada una con sus propias características: (A) la aterosclerosis, (B) la calcificación de la capa media arterial o enfermedad de Monckeberg y (c) la arteriolosclerosis (Fernández-Britto, 1998). Esta última está relacionada con daño a riñón, que a su vez está estrechamente relacionado con hipertensión (Hall, 2003).

Debido a que se observó un incremento en la presión arterial de ratas considerándose como ratas hipertensas, y no se encontró alteración en aorta, se buscó otra forma de aterosclerosis que pudiera estar ligada a este aumento de presión. Con el conocimiento de que uno de los principales órganos que está relacionado con esta patología es el riñón (Textor y Canzanello, 1999), se hicieron mediciones de hipertrofia de arteriolas de riñón, fenómeno también conocido como arterioloesclerosis.

Los resultados de arterioloesclerosis de ratas obesas tratadas con infusiones se muestran el Figura 21. Estos resultados muestran una diferencia entre las arteriolas de las ratas sanas y las ratas obesas, donde estas últimas muestran una disminución en el diámetro de la luz y un aumento en el grosor de la pared (Figura 22). Esto conlleva a una disminución en irrigación hacia este órgano en ratas obesas, lo cual podría explicar el incremento de la presión arterial en estos animales. El grupo de ratas obesas tratadas con infusión de *H. sabdariffa* mostraron una disminución en la hipertrofia de arteriolas de riñón (Figura 21) , así como un incremento en el diámetro de la luz y el grosor de la pared (Figura 22). Resultados similares se encontraron en los animales tratados con la infusión de *O. sanctum*. Esto podría indicar que uno de los mecanismos por el cual estas infusiones disminuyen la presión arterial es mediante la disminución del proceso de arterioloesclerosis.

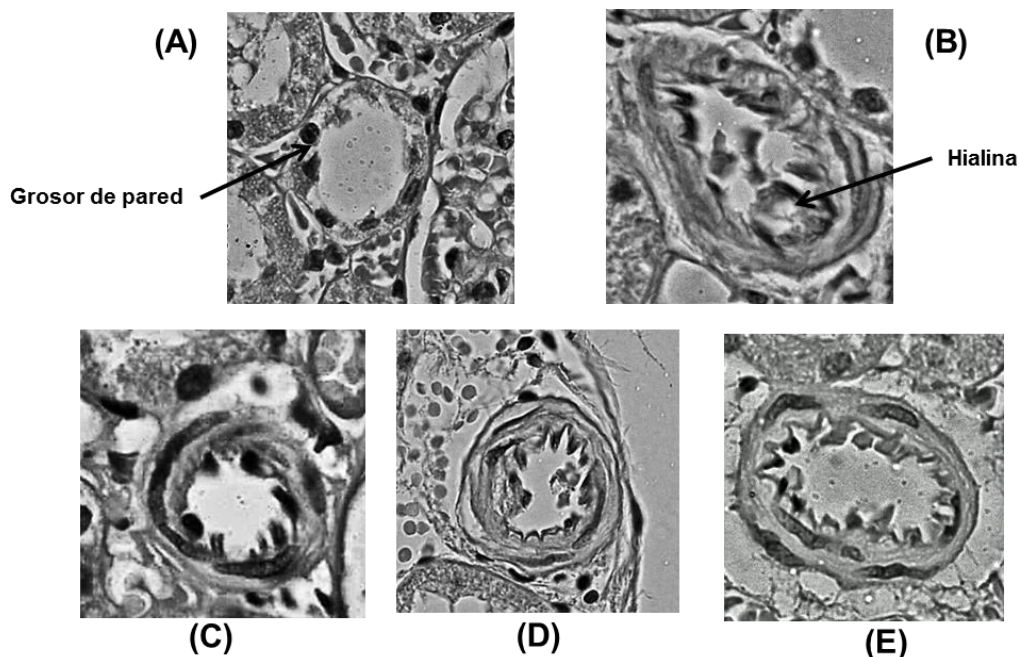


Figura 21. Arteriolas de riñón de ratas sanas (A) y obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa (B) y obesas tratadas con infusiones de *Hibiscus sabdariffa* (C), *Citrus paradisi* (D) y *Ocimum sanctum L.* (E).

Algunos autores, como Chen y colaboradores (2003) reportaron un efecto antihipertensivo de extracto acuoso de *H. sabdariffa* (0.5 y 1.0 % por 10 semanas) en conejos ateroscleróticos. Ellos atribuyen este efecto a la inhibición de la formación de células espumosas. Así mismo, los autores reportan que el extracto acuoso de *H. sabdariffa* inhibe la migración de células del músculo liso y la calcificación en el vaso sanguíneo de conejos.

En el caso del grupo de ratas obesas tratadas con la infusión de *C. paradisi*, se observó un menor efecto en estos parámetros comparado con el control obeso (Figura 21 y 22). Sin embargo, hubo una disminución en los valores de hipertensión, lo cual podría indicarnos que el mecanismo por el cual los polifenoles presentes en la infusión disminuyen la presión arterial es diferente al que muestra la infusión de *H. sabdariffa*.

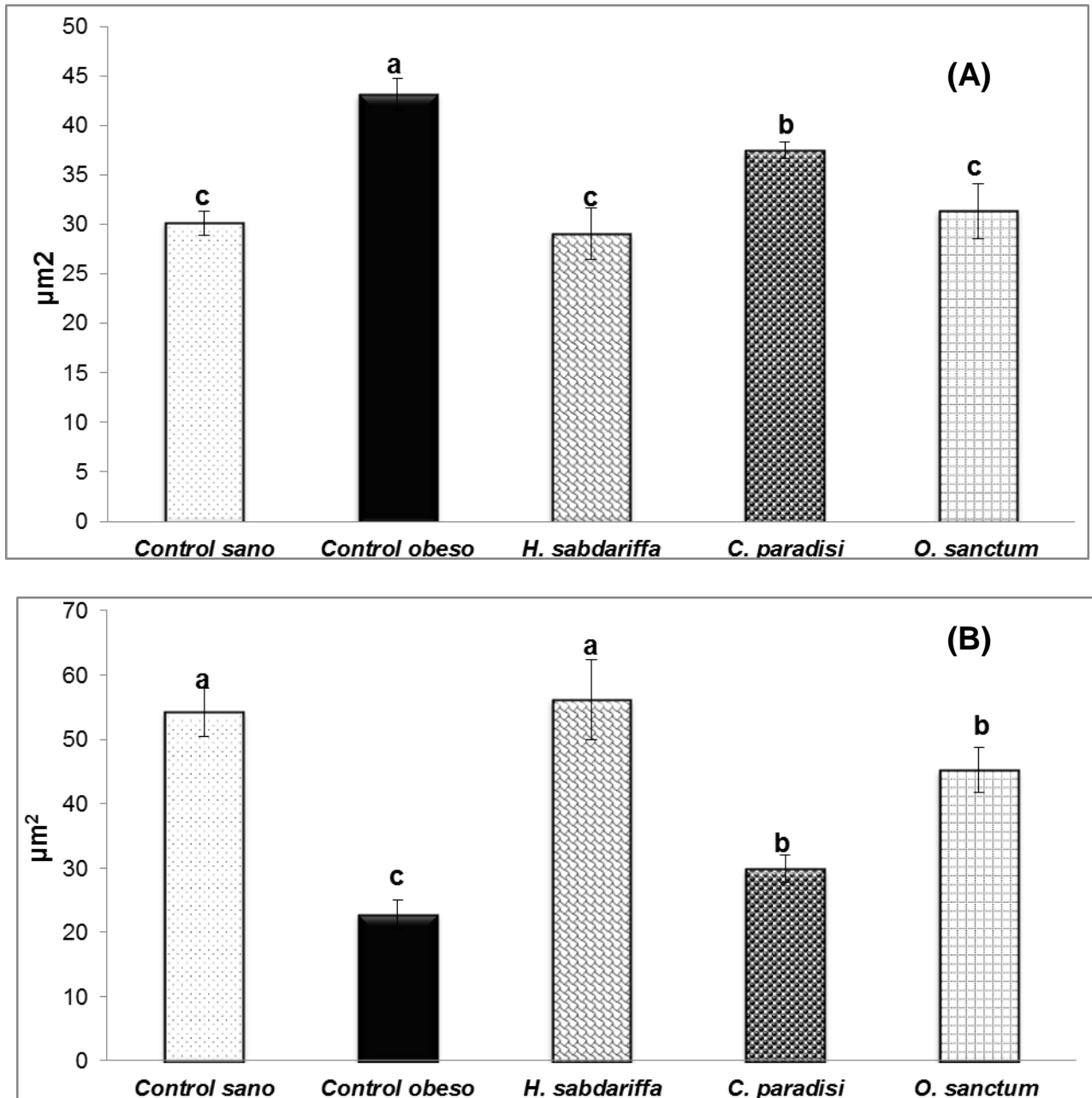


Figura 22. Parámetros de hipertrofia de arteriolas de riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa, y tratadas con infusiones. (A) Diámetro de luz en arteriolas, (B) Grosor de la pared de arteriolas de riñón. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

8.6.2.1. Contenido de lípidos en riñón y expresión de genes involucrados en el sistema renina-angiotensina-aldosterona

Como ya se mencionó, dentro de las alteraciones presentadas en riñón se encuentran algunas asociadas a un incremento en las concentraciones de lípidos, de tal manera que se determinaron las concentraciones de triglicéridos y de colesterol en este órgano, los resultados se presentan en el Cuadro 13. Las ratas alimentadas con dieta alta en grasa saturada y fructosa presentaron un aumento de la concentración de triglicéridos en el tejido renal (1.5 veces) en comparación con el control sano. En el caso de contenido de colesterol en riñón no hubo diferencias entre los grupos.

Cuadro 13. Lípidos en riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Control sano	Control obeso	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
Triglicéridos (mg/g)	24.1 ± 3.1 ^b	37.9 ± 4.5 ^a	26.4 ± 4.7 ^b	32.9 ± 2.4 ^{ab}	23.2 ± 5.2 ^b
Colesterol (mg/g)	20.2 ± 1.4 ^a	24.3 ± 1.4 ^a	23.1 ± 2.7 ^a	22.1 ± 1.4 ^a	20.6 ± 1.4 ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (n = 7). Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística (P≤0.05) con la prueba de Tukey's.

Hubo un efecto hipolipidémico en los riñones de las ratas que consumieron infusiones, esto en comparación con el control obeso: 30 % para tratamiento de *H. sabdariffa*, 13 % para *C. paradisi*, y 38 % para el grupo tratado con infusión de *O. sanctum*. (Cuadro 13).

Reportes previos han demostrado que un exceso de grasa renal induce una respuesta pro-inflamatoria, la infiltración de monocitos y macrófagos, y un aumento de la matriz extracelular (Gröne y Gröne, 2008). Los tratamientos con las infusiones de *H. sabdariffa* and *O. sanctum* inhibieron la acumulación de lípidos en el riñón, y estas infusiones disminuyeron la concentración de triglicéridos en sangre. Por lo tanto, un posible mecanismo para la disminución de la concentración de triglicéridos renal podría estar relacionado con la inhibición de la re-esterificación de ácidos grasos libres de la circulación o la disminución de la síntesis *de novo*.

Diversos estudios han demostrado que un exceso en la grasa intra-renal activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona en riñón lo que provoca un remodelado vascular y alteración en el flujo sanguíneo dentro del órgano. Por ejemplo, Chung y colaboradores (2010) reportaron que una dieta alta en grasas aumentó en la expresión de ANG y REN en la zona yuxtglomerular del riñón. Dando como resultado un aumento de la actividad inmune y la concentración de la angiotensina II en el riñón. La angiotensina II induce la constricción de las arteriolas eferentes, reduciendo el flujo sanguíneo renal, y también el aumento de la filtración glomerular (Dzau, 1994).

El consumo de infusiones por los animales obesos, especialmente de *H. sabdariffa* tuvo un efecto positivo sobre el remodelado vascular y sobre los niveles de lípidos en riñón. Con el fin de evaluar si esto estaba relacionado con la inactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona se evaluó la expresión de dos genes involucrados en este sistema en tejido de riñón y los resultados se presentan en la Figura 23. Los tratamientos con las infusiones mostraron una regulación positiva de ambos genes, siendo mejor para los tratamientos con *H.*

sabadariffa y *O. sanctum*. Por lo tanto, este mecanismo también podría estar relacionado a su efecto antihipertensivo ($r^2= 0.63$).

En el caso de los animales tratados con la infusión de *C. paradisi*, se observó una disminución en la presión arterial y, en menor grado que los demás tratamientos, una mejora en la remodelación vascular; así mismo, este tratamiento presentó una mayor expresión de los genes REN y ANG.

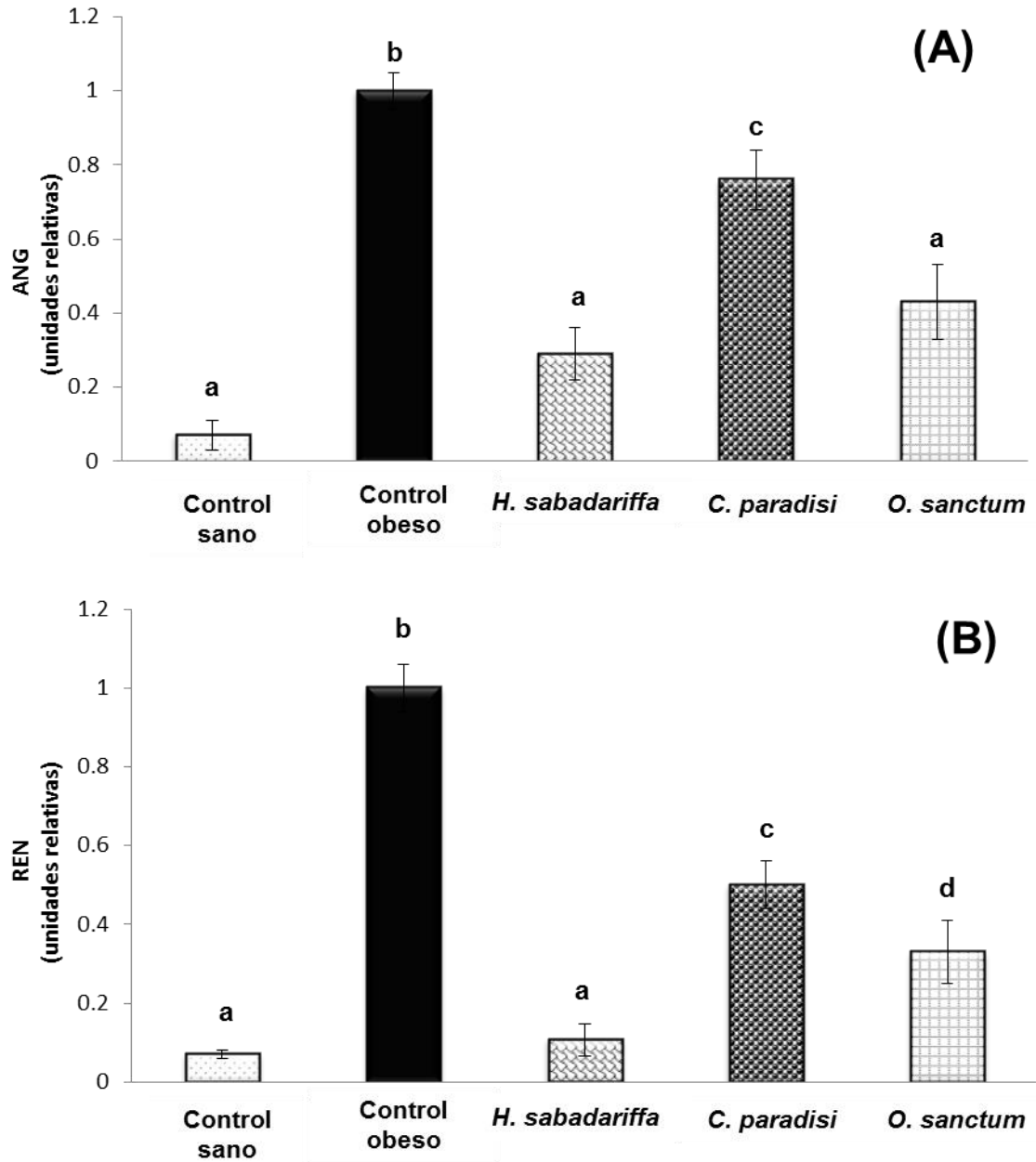


Figura 23. Cuantificación de mRNA de ANG (A) y REN (B) en riñón de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones. Se empleó SOD como gen de referencia. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

8.6.3. Marcadores de estrés oxidativo en riñón e hígado.

La alimentación alta en grasa saturada y fructosa incrementó la peroxidación de lípidos en el riñón (expresado como TBARS), y la oxidación de proteínas renales (abreviado en este trabajo como C=O) en comparación con los animales sanos (Cuadro14). Todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo sobre estos marcadores de estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de malondialdehído (MDA), un marcador de la peroxidación de lípidos, siendo estos valores similares a los del control sano.

El tratamiento con las infusiones también disminuyó la oxidación de proteínas en el riñón, en comparación con el control obeso. Siendo más importante para los grupo tratados con las infusiones de *C. paradisi* y *O. sanctum* (Cuadro 14). Estudios previos han demostrado que los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno, están implicados en el desarrollo de alteraciones en arterias que conllevan a enfermedades de los órganos afectados (Ding y col., 2013; Hopkins y col., 2013). De tal manera que, el efecto antioxidante observado en los animales tratados podría estar asociado con su efecto antihipertensivo y con la mejora de la microvasculatura renal.

Cuadro 14. Marcadores de estrés oxidativo en riñón de ratas obesas inducidas con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Control sano	Control obeso	H. sabdariffa	C. paradisi	O. sanctum
TBARS (nmol/ mg proteína)	6.7 ± 0.3 ^b	9.0 ± 0.3 ^a	7.8 ± 0.7 ^{ab}	5.2 ± 0.1 ^c	6.4 ± 0.1 ^{bc}
C=O (nmol carbonilo/mg de proteína)	17.9 ± 0.5 ^b	29.8 ± 1.4 ^a	21.4 ± 0.6 ^b	16.6 ± 1.2 ^b	17.1 ± 0.8 ^b

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (n = 7). Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística (P≤0.05) con la prueba de Tukey.

En el caso del tratamiento con la infusión de *C. paradisi*, aunque no se observó una mejora en la microvasculatura renal, su efecto antioxidante pudiera estar relacionado de igual manera a un efecto antihipertensivo. Estudios previos han reportado de que los compuestos polifenoles son responsables de la actividad antihipertensiva y antioxidante de los materiales vegetales utilizados en la preparación de la infusión (Nyman y col., 1998; Díaz- Juárez y col., 2009; McKay y col., 2010; Hopkins y col., 2013). Por ejemplo, Díaz- Juárez y colaboradores (2009) sugirieron que el efecto antihipertensivo de extractos de *C. paradisi* se asocia a los flavonoides contenidos como la naringina, compuesto identificado en este trabajo.

Del mismo modo, los polifenoles identificados en la infusión de *O. sanctum* tales como el ácido rosmárinico también se ha reportado su actividad antihipertensiva a través de la reducción de la endotelina-1 y la actividad de la ECA en plasma de las ratas alimentadas con fructosa (Karthik y col., 2011).

Por otra parte, análisis *in vitro* indican que los niveles elevados de lípidos tienen numerosos efectos adversos sobre la función mitocondrial, incluyendo el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la generación de EROs. Esta situación se ve agravada debido a que los lípidos también perjudican las defensas antioxidantes endógenas (Bakker y col., 2000). Un efecto similar se observó en este trabajo (Cuadro 15), correlacionando una reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes (Cuadro 15) CAT, GPX y GST en tejido hepático de los animales obesos ($r^2= 0.85$, $r^2= 0.79$ y $r^2= 0.92$ respectivamente).

Cuadro 15. Marcadores de estrés oxidativo en hígado de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa y tratadas con infusiones.

	Control sano	Control obeso	<i>H. sabdariffa</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>O. sanctum</i>
TBARS (nmol/mg proteína)	3.7 ± 0.1 ^b	21.0 ± 2.8 ^a	3.3 ± 0.4 ^b	5.3 ± 1.1 ^b	3.6 ± 0.3 ^b
C=O (nmol carbonilo/mg de proteína)	18.2 ± 0.5 ^d	34.3 ± 0.3 ^a	21.5 ± 0.7 ^c	26.5 ± 1.3 ^c	23.3 ± 0.7 ^c
CAT (µmol/min/mg proteína)	6.1 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.2 ^b	6.0 ± 0.4 ^a	4.5 ± 0.4 ^b	7.7 ± 0.9 ^a
GPX (µmol/min/mg proteína)	12.2 ± 0.2 ^a	10.4 ± 0.1 ^b	12.5 ± 0.1 ^a	11.8 ± 0.1 ^a	12.5 ± 0.1 ^a
GST (µmol/min/mg proteína)	686.3 ± 31.0 ^a	471.0 ± 27.6 ^b	588.1 ± 32.9 ^b	491.4 ± 35.9 ^b	695.7 ± 40.0 ^e

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (n = 7). Letras diferentes por renglón en TBARS y C=O significa diferencia estadística (P≤0.05) con la prueba de Tukey. Letras distintas por renglón en la evaluación enzimática significa diferencia estadística evaluada mediante el método de Dunn's (P≤0.05).

El tratamiento con las infusiones de *H. sabdariffa* y *O. sanctum* recuperó la actividad de las tres enzimas, CAT, GPx y GST, alcanzando valores similares a los animales no obesos (Cuadro 15); mientras que, el tratamiento con la infusión de *C. paradisi* únicamente tuvo efecto sobre CAT y GPx, esto en comparación con el control obeso.

La mejora en la actividad de las enzimas antioxidantes por el tratamiento con infusiones puede relacionarse con la presencia de algunos compuestos cuantificados en este trabajo, como la rutina y el ácido cumárico. Se ha reportado que el tratamiento con estos compuestos mejora la actividad de GPx y GST en el tejido hepático de ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasa saturada (Hsu y col., 2009).

Otro efecto observado en las ratas obesas fue el incremento en la peroxidación de lípidos en hígado (expresado como TBARS). Este efecto está relacionado con la reducción en la actividad de sistema antioxidante endógeno y la concentración relativamente alta de ácidos grasos fácilmente peroxidable en el tejido hepático ($r^2= 0.97$).

El consumo de infusiones redujo los niveles de MDA hepático, un marcador de la peroxidación lipídica en los tejidos (aproximadamente 84 %), especialmente en los grupos tratados con infusiones de *O. sanctum* y *H. sabadariffa* (Cuadro 15).

Otras moléculas afectadas por la obesidad y la disminución de las defensas antioxidantes endógenas en animales obesos son las proteínas hígado. Cuando las proteínas interactúan con las EROs, se formaron compuestos carbonilos reactivos (abreviado en este trabajo como C=O), los cuales producen glicación y lipoxidación (Gumieniczek, 2005). Este daño a las proteínas afecta a su función y puede causar cambios negativos en el metabolismo, incluyendo la homeostasis de los lípidos y los hidratos de carbono.

De tal manera que con el fin de evaluar si el tratamiento con infusiones tuvo un efecto protector sobre proteínas de hígado de ratas obesas se evaluó la concentración de C=O y los resultados se muestran en el Cuadro 15. Las ratas obesas sin tratamiento mostraron una mayor concentración de proteínas oxidadas en comparación con el control sano, indicando un efecto de la dieta sobre este marcador de estrés oxidativo.

El tratamiento con las infusiones también disminuyó la oxidación de proteínas en hígado en comparación con control obeso (37 % para *H. sabdariffa*, 31 % para *O. sanctum* L., y 22 % *C. paradisi*). Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados con diferentes extractos de estas plantas. Por ejemplo, Farombi e Ige (2007) demostraron que un extracto metanólico de *H. sabdariffa* administrado a ratas diabéticas inducidas con aloxan disminuye el nivel de oxidación proteínas en el hígado.

9. Conclusiones

La ingesta de infusiones elaboradas a partir de *H. sabadariffa*, *O. sanctum* y *C. paradisi* en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa saturada y fructosa ejerció un efecto sobre el metabolismo de lípidos, atenuando la hipertrofia de adipocitos, así como su concentración de triglicéridos y esteatosis hepática, lo cual está relacionado con una menor síntesis de *novo* de ácidos grasos y un aumento en la β -oxidación hepática, esto a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en estas vías.

El consumo de infusiones mejoró el estado de salud de las ratas obesas, disminuyendo los parámetros de resistencia a la insulina, presión arterial, arterioesclerosis y el estado oxidativo.

No todas las infusiones ejercieron el mismo efecto sobre parámetros de obesidad, por lo cual no pueden ser consideradas por igual como antiobesogénicas. Sin embargo, todos los tratamientos mostraron un beneficio sobre alteraciones metabólicas en ratas obesas, lo que indica que éstas bebidas son una alternativa viable para contrarrestar las alteraciones causadas por esta patología.

10. Referencias

- Adams, M.C., Prins, J.B., Holder, J.C., Smith, S.A., Sanders, L., Digby, J.E., Sewter, C.P., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K., O'Rahilly, S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100:3149-3153.
- Adeneye, A.A. Methanol seed extract of *Citrus paradisi* Macfad lowers blood glucose, lipids and cardiovascular disease risk indices in normal wistar rats. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*, 2008, 8:16-20.
- Aebi, H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer. *Methods of enzymatic analysis*, 1974. vol. 2 (pp. 673-678). Germany: Verlag Chemie, Weinheim.
- Alarcon, F., Zamilpa, A., Perez, D., Almaza, J.C., Romero, E., Campos, E.A., Vazquez, L.I. Roman, R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 114:66-71.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D., Almanza-Perez, J.C., Romero-Nuñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carillo, L.I., Roman-Ramos, R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 114:66-71.
- Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Revista de Gastroenterología de México*, 2005, 70 (3): 52-56.
- Antolovich, M., Prenzler, R., Patsalides, E., Mcdonald, S., Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127: 183-198.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin Çelik, M., Bektaşoğlu, S., Işıl, B., Berker, K., Özyurt, D. Comparative evaluation of various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 2007, 12:1496-1547.
- Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11:419-421.

- Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 2003, 523-524: 9-20
- Asen, S., Stewart, R.N., Norris, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissue and its effect on color. *Phytochemistry*, 1972, 11:1139-1144.
- Badimon, L., Chesebro, J.H., Badimon, J.J. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*, 1992, 86: 74-85.
- Bakker, S.J., IJzerman, R.G., Teerlink, T., Westerhoff, H.V., Gans, R.O., and Heine, R.J. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis*, 2000, 148: 17–21.
- Bayr, H. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 2005, 33(12): S498-S501.
- Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P., Chen, J., Accavetti, M.A., Tarpey, M.M., White, C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*. 1994, 375: 81-88
- Bedascarrasbure, E., Mmaldonado, L., Alvarez, A., Rodríguez E. Contenido de Fenoles y Flavonoides de Propoleos, Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2004, 23 (3): 369-72.
- Beltrán-Morales, F.A, Ruiz-Espinoza, F.H., Loya-Ramirez, J.G., Murillo-Amador, B., Zamora-Salgado, S., Beltrán-Morales, J.A., Troyo-Dieguez, E., García-Hernández, J.L. En García-Hernández, J.L.; Orona-Castillo, I.; Salazar-Sosa, E., Fortis-Hernández, M., Trejo-Escareño, H.I. (Eds.) Situación actual y perspectivas en la producción de hierbas aromáticas orgánicas en Baja California Sur. En Agricultura Orgánica, Tercera parte (1ra ed) (pp. 350-368). Durango Dgo., México. D.R. 2010, Universidad Juárez del estado de Durango.
- Berliner, J., Heinecke, J. The role of oxidized lipoproteins in the atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, 20:700-27.

- Bradbury, M.W. y Berk, P.D. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clinics in Liver Disease*, 2004, 8: 639-671.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding reproduction research laboratories. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995, 22: 25-30.
- Brewster, U.C. y Perazella, M.D. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American Journal of Medicine*, 2004, 116:263-272.
- Briaud, I., Harmon, J., Kelpe, C.L., Segu, V.B.G., Poitout, V. Lipotoxicity of the pancreatic beta-cells is associated with glucose-dependent esterification of fatty acid into neutral lipids. *Diabetes*, 2001, 50(2): 315-21.
- Brouillard, R., Figueiredo, P., Elhabiri, M., Dangles, O. Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruit and vegetables. En *Phytochemistry of Fruit and Vegetables. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 1997, 29-49.
- Bruhn, C.M. Aspectos de calidad y seguridad alimentaria de interés para el consumidor. En *Tecnología Pos-cosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª edición. Kader, A. (Ed.). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 2007, 37-44.
- Caetano, E.P., Zatz, R., Praxedes, J.N. The clinical diagnosis of hypertensive nephrosclerosis-how reliable is it? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1999, 14: 288-290.
- Carrasco, F., Moreno, M., Irribarra, V., Rodríguez, L., Martín, M. A., Alarcón, A., Atalah, E. Evaluación de un programa piloto de intervención en adultos con sobrepeso u obesidad, en riesgo de diabetes. *Revista médica de Chile*, 2008, 136(1): 13-21.

- Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51: 5472-5477.
- Chung, S., Park, C.W., Shin, S.J., Lim, J.H., Chung, H.W., Young, D.Y., Kim, H.W., Kim, B.S., Lee, J.H., Kim, G.H., Chang, Y.S. Tempol or candesartan prevents high-fat diet induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2010, 25:389-399.
- Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, 1997.
- Crespo, S., Güell, E., Menéndez, R., González, R. Estudio del mecanismo de acción hipoglicemiante de albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) II. Efecto sobre la incorporación de glucosa en adipocitos de rata. *Revista Cubana Farmacia*, 1988, 22(1): 86-91.
- Derás, M., Crespo, S., González, R. Estudio del mecanismo de acción hipoglicemiante de la albahaca morada IV. Efecto sobre la secreción de insulina inducida por dexametazona; *Revista Cubana Farmacia*, 1988, 22(1):101-8.
- Díaz-Juárez, J.A., Tenorio-López, F.A., Zarco-Olvera, G., Del Valle-Mondragón, L., Torres-Nevárez, J.C., Pastelín-Hernández, G. Effect of *Citrus paradisi* extract and juice on arterial pressure both *in vitro* and *in vivo*. *Phototherapy Research*, 2009, 23:948-954.
- Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 279(6):R2048-R2056.
- Ding, Y., Wu, C.C., Garcia, V., Dimitrova, I., Weidenhammer, A., Joseph, G., Zhang, F, Manthati, V.L., Falck, J.R., Capdevila, J.H., Schwartzman, M.L. 20-HETE induces remodeling of renal resistance arteries independent of

blood pressure elevation in hypertension. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2013, 305(5):F753-63.

- Dinneen, S., Gerich, J., Rizza, R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 1992, 327:707-713.
- Dzau, V.J. Pathobiology of atherosclerosis and plaque complications. *American Heart Journal*, 1994, 128:1300-1304.
- Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R., Venkateswaran, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimical et Biophysica Acta*, 2000, 1529:103-113.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), 2012.
- Ericsson, J., Jackson, S.M., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., Edwards, P.A. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272:7298-305.
- Fain, J. N., Cheema, P. S., Bahouth, S. W., Lloyd Hiler, M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, 300: 674-678.
- Farombi, E.O., e Ige, O.O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyz of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2007, 21: 601–609.
- Feldstein, A.E., Papouchado, B.G., Adams, L., Gores, G.J. Hepatic stellate cells and fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2005, 3(4): 384-9.
- Feldstein, A.E., Werneburg. N.W., Canbay, A., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Rydzewski, R., Burgart, L.J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by simulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004, 40(1): 185-94.

- Fernández-Britto, J.E. La lesión aterosclerótica: estado del arte a las puertas del siglo XXI. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1998, 17:112-127.
- Folch, J., Less, M., Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226:497-509.
- Folin, O., Ciocalteu, V.J. On tyrosine and tryptophane determination in proteins; In *Analysis of phenolic Plant Metabolites*. Waterman, G.P., Mole, S., Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña. 1927.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80:1925-41.
- Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A., Coppack, S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity and Relative Metabolism Disorder*, 2003, 27: 875-888.
- Fruchart C. y Duriez, P. Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today*, 2006, 42:39–64.
- Fujioaka, K., Greenway, F., Sheard, J., Ying, Y. The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome. *Journal of Medicinal Food*, 2006, 9: 49-54.
- Fukuchi, Y., Hiramitsu, M., Okada, M., Hayashi, S., Nabeno, Y., Osawa, T., Naito, M. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulation of mRNA levels of the enzymes in β -oxidation in mouse white adipose tissue. *Journal of Clinical and Biochemical Nutrition*, 2008, 43:201–209.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makisima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinic Investigation*, 2004, 114:1752-1761.
- Galicia- Flores, L.A., Salinas. Moreno, Y., Espinoza-García, B.M., Sánchez-Feria, C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos

de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Chapingo serie Horticultura*, 2008, 14(2):121-129.

- Garzón, G.L. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 2008, 13(3):27-36.
- Gervois, P., Pineda-Torra, I., Fruchart, J.C., Staels, B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2000, 38: 3–11
- González, R., Crespo, S., Deás, M. Estudio del mecanismo de acción hipoglicemiante de la albahaca morada (*Ocimum sanctum* L.) III. Efecto sobre la lipólisis y la adenilciclase en tejido adiposo de Rata. *Revista Cubana Farmacia*, 1988, 22(1):92-100.
- Gröne, E.F. y Gröne, H.J. Does hyperlipidemia injure the kidney? *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2008, 4:424-425.
- Guías del 2003 de la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología para el manejo de la hipertensión arterial. *Journal of Hypertension*, 2003, 21:1011-1053.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecules Cell Biology*, 2008, 9(5):367-377.
- Gumieniczek, A. Effects of repaglinide on oxidative stress in tissues of diabetic rabbits. *Diabetes Research & Clinical Practice*, 2005, 68: 89–95.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249:7130-7139.
- Louet, J., Chatelain, F., Decaux, J., Park, E., Kohl, C., Pineau, Girard, and J. P. Pegorier. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α)-independent pathway. *Biochemical Journal*, 2001, 354:189-197.
- Hall, J.E. The kidney hypertension and obesity. *Hypertension*. 2003, 41: 625-633.

- Hamdy, O., Porramatikul, S., Al-Ozairi, E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Current Diabetes Review*, 2006, 2:367-373.
- Haoneng, T.A.N.G., Lingli, T.A.N.G. Obesity and metabolic syndrome. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2010, 5: 020.
- Harman-Boehm, I., Bluher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Kloting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., Rudich, A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92:2240-2207.
- Hernán-Daza, C. La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colombia Médica*. 2002. 33: 72-80.
- Herrera-Arellano, A. Flores-Romero, S., Chávez-Soto, M.A., Tortoriello, J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedical*, 2004, 11: 375-382.
- Hirai, S., Takahashi, N., Goto, T., Lin, S., Uemura, T., Yu, R., Kawada, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of inflammation*, 2010, 367838-367846.
- Hopkins, A.L., Lamm, M.G., Funk, J.L. Ritenbaugh, C. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 2013, 85:84-94.
- Hsu, C.L., Wu, C.H., Huang, S.C., Yen, G.C. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2009, 57:425-431.
- Hursel, R. y Westerterp-Plantenga, M.S. Thermogenic ingredients and body weight regulation. *International Journal of Obesity*. 2010, 34:659-669.
- Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI); Anuario estadístico del estado de Guerrero. México. 2005.

- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., Yagi, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2009, 32(7): 1215-1219.
- James, E., Simon, M., Morales, R., Winthrop, B., Phippen, R., Fontes, V., Zhigang, H. Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb; J. Janick (ed.). 1999, 499-505.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50:5878-5883.
- Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51: 4442-4449.
- Jualiani, H.R., Simon, J.E., Janick, j., Whipkey, A. Antioxidant activity of Basil. *Trends in new crops and new uses*, 2002, 575-579.
- Kalogeris, T.J., Monroe, F., Demichele, S.J., Tso, P. Intestinal synthesis and lymphatic secretion of apolipoprotein A-IV vary with chain length of intestinally infused fatty acids in rats. *The journal of Nutrition*. 1996, 126: 2720-2729.
- Karthik, D., Viswanathan, P., Anuradha, C.V. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2011, 58:514-521.
- Kelm, M.A., Nair, M.G. Strasburg, G.M. DeWitt, D.L. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*, 2000, 7:7-13.
- Kershaw, E. E., Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2004, 89: 2548-2556.
- Khan, M.A., Tania, M., Zhang, D.Z., & Chen, H.C. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2010, 22(2):87-92.

- Kim, M.S., Kim, J.K., Kim, J., Moon, S.R., Shin, B.C., Park, K.W., Yang, H.O., Kim, S.M., Park, R. *Hibiscus* extract inhibits the lipid droplet accumulation and adipogenic transcription factors expression of 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2003, 4: 499-504.
- Kim, S., Moustaid-Moussa, N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte; *Journal of Nutrition*, 2000, 130: 3110S-3115S.
- Kolehmainen, M. Vidal, H., Alhava, E., Uusitupa, M.I.J. Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP-1c) Expression in Human Obesity. *Obesity Research*, 2012, 9:706-712.
- Kopelman, P.G. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000, 404: 635-643.
- Lansky, E.P., Newman, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007,109:177-206.
- Lapornik, B., Prošek, M., Golc Wondra, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 2005, 71(2): 214-222.
- Larrosa, M., Tomas, F.A., Espin, J.C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006,17: 611-625.
- Lenz, A.G., Costabel, U., Shatiel, S., Levine, R.L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Analytical Biochemistry*, 1989, 177:419-425.
- Livak, J.K y Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25:402–408.
- López- Maya, L., Lina- Manjarrez, F. Prevención de hipotensión supina en la embarazada sometida a cesárea bajo BPD precarga contra carga rápida. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 2008, (31): 21-27.

- Loy, S., Simon, R., Delgado, R. Un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 2002, 21:3-10
- Luke, R.G. Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence. Essential hypertension is an important cause of end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplant*, 1999 14: 2271-2278.
- Luyckx, F., Lefebvre, P., Scheen, A. Non alcoholic steato-hepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metabolis*. 2000, 26: 98-106.
- Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Zanchetti, A. 2007 ESH-ESC practice guidelines for the management of arterial hypertension: ESH-ESC task force on the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension*, 2007, 25(9): 1751-1762.
- Marín, R., Gorostidi, M., Pobes, A. Hipertensión arterial y enfermedad vascular renal: nefroangioesclerosis. *Nefrología*, 2002, 22:36-45
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003, 17:24–38
- Martínez-González, J., Llorente-Cortés, V., Badimon, L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas; Genética y biología molecular en cardiología. *Revista Española de Cardiología*, 2001, 54:218-231.
- Mascaró, C., Acosta, E., Ortiz, J., Marrero, P., Hegardt, F., Haro, D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273:8560-8563.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. Metabolismo lipídico I: Ácidos Grasos, Triglicéridos y Lipoproteínas; En: Bioquímica. Mc. Graw-Hill Interamericana. 1998, 693-696.

- Maury, E., Brichard, S.M., Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular Cell Endocrinology*, 2010, 314:1-16.
- McCullough, A.J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease*, 2004, 8:521-533.
- McDougall, G.J. y Stewart, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*. 2006, 23:189-195.
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., Allostasis. Allostatic load. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress*. 2. Academic Press; New York: 2007. pp. 135–141
- McKay, D.L., Chen, C.Y., Sattzman, E., Blumberg, J.B. *Hibiscus sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140:298-303.
- Meydani, M., Hasan, S.T. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*, 2010, 2:737-751.
- Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A., Horton, J.D. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 45358-45366.
- Morales, M.R., Simon, J.E. New basil selections with compact inflorescences for the ornamental market. In *Progress in new crops*; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Arlington, V.A. 1996, 543-546.
- Mourtzinou, I., Makris, D., Yannakopoulou, Y., Kalogeropoulos, N., Michali, I., Karathanos, V. Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of β -Cyclodextrin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56:10303-10310.
- Mozaffari-Khosravi, H., Jalali-Khanabadi, B.A., Afkhami-Ardekani, M., Fatehi, F. Effects of Sour Tea (*Hibiscus sabdariffa*) on Lipid Profile and Lipoproteins in Patients with Type II Diabetes. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2009, 15:899-903.

- Murillo, A.Z., y Esteban, B.M. Obesidad, factor de riesgo cardiovascular. *Revista Española de Obesidad*, 2005, 3(2):89-94.
- Navar, L.G. The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney international*, 2004, 65(4):1522-1532.
- Neve, B.P., Corseaux, D., Chinetti, G., Zawadzki, C., Fruchart, J.C., Duriez, P., Staels, B., Jude, B. PPAR agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation*, 2001, 103:207–212.
- Nyman, U., Joshi, P., Madsen, L.B., Pedersen, T.B., Pinstrup, M., Rajasekharan, S., George, V. Pushpangadan, P. Ethnomedical information and in vitro screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 60:247-263.
- Odigie, I.P., Ettarh, R.R., Adigun, S.A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1 C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 86: 181-185.
- Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M. DPPH (1,1 Diphenyl-2Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some Medicinal Plant. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 24:1202-1205.
- Orellana-Gavaldá, M., Herrero, L., Maladrino, M.I., Pañeda, A., Rodríguez-Peña, M.S., Petry, H., Asins, G., Van Deventer, S., Hegardt, F.G., Serra, D. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology*, 2011, 53:821-831.
- Organización Mundial de la salud (OMS). Reporte sobre la salud en el mundo. 1958.
- O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, I.I., Jobe, B.A., Roberts, C.T. Jr., Slifka, M.K., Marks, D. L. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 2009, 33: 978-990.

- Paglia, D.E. y Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1976, 70:158–169.
- Peng, C.H., Chyau, C.C., Chan, K.C., Chan, Wang, C.J., Huang, C.N. *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, and glycation oxidative stress while improving insulin resistance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011, 59: 9901-9909.
- Phippen, W.B. y Simon, J.E. Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998, 46:1734-1738.
- Pickup, J. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27:813–823.
- Popkin, B.M., Adair, L.S., Ng, S.W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 2012, 70:3-21.
- Postic, C., Dentin, R., Girard, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metabolism*, 2004, 30(5):398-408.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53(10): 4290-4302.
- Pryor, W. y Shipley-Godber, S. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, 10:177-184.
- Rajala, M.W. y Scherer, P. Minireview: The adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 2003, 144:3765-3773.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggene, A., Pannala, A., Yang, M. Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26:1231-1237.
- Rincón, A.L., Vásquez, A., Marina y Padilla, F.C. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscara de naranja (*Citrus*

- sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2005, 3(55):305-310.
- Riordan, N.H., Ichim, T. E., Min, W.P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J.P., Harman, R.J., Patel, A.N., Murphy, M.P., Lee, R.R., Minev, B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 2009, 7:1-9.
 - Rivera, J.A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C.A., Popkin, B.M., Willet, W.C. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Publica de México*, 2008, 50:173-195.
 - Robertson, R.P. Beta cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004, 53(1):119-24.
 - Rocha-Guzmán, N.E., Medina-Medrano, J.R., Gallegos-Infante, J.A., Gonzales-Laredo, R.F., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán- Maldonado, H., González-Herrera, S.M. Chemical evaluation, antioxidant capacity and consumer acceptance of several oak infusions. *Journal of Food Science*, 2012, 77:162-166.
 - Roginsky, V. y Lissi, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 2005, 92:235-254.
 - Ronti, T., Lupattelli, G., Mannarino, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, 2006, 64: 355-365.
 - SAGARPA-ASERCA; proveedor de plantas medicinales al mundo. *Claridades Agropecuarias*.1999:73: 13-21.
 - Salomón, R., Martínís, M.C. S. Hígado graso no alcohólico. *Temas de Gastroenterología Vol. Iii*, 255.
 - Saltiel, A.R. y Ronald, C.K. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 2001, 144:799-806
 - Sánchez, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International*, 2002, 8(3):121-39.

- Saran, M., Michel, C., Bors, W. Reaction of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radical Research Communications*, 1990, 10:221-226.
- Sarr, M., Chataigneau, M., Martins, S., Schott, C., El Bedoui, J., Oak, M.H., Muller, B., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research.*, 2006, 71:794–802.
- Sáyago-Ayerdi, S., Arranz, S., Serrano, J., Goñi, I. Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55:7886–7890.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 2005, 21(2): 207-213.
- Shi, H., Clegg, D.J. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology Behavior*, 2009; 97: 199-204.
- Shoelson, S. E., Herrero, L., Naaz, A. Obesity, inflammation, and insulinesistance. *Gastroenterology*, 2007, 132: 2169-2180.
- Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W.B., Vieira, R.F., Hao, Z. Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In *PerspectiVes on new crops and new uses*; Janick, J., Ed. 1999, 499-505.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 29:152-178.
- Snijder, M. B., Dekker, J.M., Visser, M., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D., Kostense, P.J., Yudkin, J.S., Heine, R.J., Nijpels, G., Seidell, J.C. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003,77:1192-1197.
- Suanarunsawat, T., Devakul, W., Songsak, A. Antioxidant activity and lipid – lowering effect of essential oils extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in

rats fed with a high cholesterol diet. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, 2010, 46:52–59.

- Summers, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45(1):42-72.
- Surmi, H.A. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidology*, 2008, 3: 545-556.
- Tada, H., Murakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K., Ishimura, K. Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root culture of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 1996, 42 (2): 431-434.
- Tchkonina, T., Tchoukalova, Y.D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R.A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M.D., Kirkland, J.L. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 2005, 288:267-277.
- Textor, S.C. y Canzanello, V.J. Importance of blood pressure reduction for prevention of progression of renal disease. *Current Hypertension Reports*. 1999, 1:423-430.
- Tipoe, G.L., Leung, T.M., Hung, M.W., Fung, M.L. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 2007, 7(2): 135-144.
- Tovar, A.R., y Torres, N. Molecular nutrition: a new era in nutrition. *Revista de Investigación Clínica*, 2003, 55:177-180.
- Trayhurn, P. y Beattie, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2001, 60:329-339
- Tsai, P.J., McIntosh, J., Pearce, P., Camdem, B., Jordan, B.R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) extract. *Food Research International*, 2002, 35: 351-356.

- Van Es, A. J., Vogt, J. E., Niessen, C., Veth, J., Rodenburg, L., Teeuwse, V., Van der Beek, E. Human energy metabolism below, near and above energy equilibrium. *British Journal of Nutrition*, 1984, 52(3): 429-442.
- Vernia- Miralles, S. SREBP1 en estados de resistencia a insulina. Tesis Doctoral. Universitat de València. España, 2007.
- Vilar-Rojas, C., Guzman-Grenfell, A.M., Hicks, J.J. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Archives of medical research*, 1996, 27(1): 1.
- Villalpando-Arteaga, E.V., Mendieta-Condado, E., Esquivel-Solís, H., Canales-Aguirre, A.A., Gálvez-Gastélum, F.J., Mateos-Díaz, J.C., Rodríguez-González, J.A., Márquez-Aguirre, A.L. *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- γ and SREBP-1c in diet-induced obese mice. *Food & Function*, 2013, 4:618-626.
- Vohl, M.C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T.J., Tchernof, A. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obesity Research*, 2004,12:1217-1222.
- Wajchenberg, B. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 2000, 21 (6): 697-738.
- Wajchenberg, B.L., Giannella-Neto, D., Silva, M.E., Santos, R.F. Depotspecific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone Metabolism Research*, 2002, 34:616-621.
- Willcox, J. K., Ash, S.L., Catignani, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2004, 44(4):275-295.
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S., Elste, V., Weber, P. TEAVIGO (epigallocatechingallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 2005, 49:54-63.

- Wright, J.R., Colby, H.D., Miles, P.R. Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1981, 206:296–304.
- Wrolstad, R. E. Anthocyanin pigments: Bioactivity and coloring properties. *Journal of food science*, 2004, 69(5): C419-C425.
- Wu, T., Guan, Y., Ye, J. Determination of flavonoids and ascorbic in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 2007, 100: 1573-1579
- Xu, P., Jia, W., Bi, L., Liu, X., Zhao, Y. Studies on components and quality of essential oil from *Mentha piperita* L. produced in Xinjiang, China. *Chemistry and Industry of Forest Product*, 2003, 23: 43–45.
- Yang, M.Y., Peng, C.H., Chan, K.C., Yang, Y.S., Huang, C.N., Wang, C.J. The hypolipidemic effects of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58:850-9.
- Yessoufou, A., Wahli, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Medical Weekly*, 2010, 140: w13071.
- York, D. y Bouchard, C., How obesity develops: insights from the new biology. *Endocrine*, 2000; 13(2):143-54.
- Zhang, R.Y., Liou, J.G., Cong, B.L. Petrogenesis of garnet-bearing ultramafic rocks and associated eclogites in the Su-Lu ultrahigh-pressure metamorphic terrane, China. *Journal of Metamorphic Geology*, 1994, 12:169–186.
- Zugasti-Murillo, A., Basilio-Moreno, E. Obesidad, factor de riesgo cardiovascular. *Revista Española de Obesidad*, 2005, 3 (2): 89-94.