



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO



**Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico
y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de
Sechium edule (chayote) en macrófagos RAW 264.7
activados por LPS**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA
MCP. MIGUEL ANGEL CORONA ALARCÓN**

DIRECTORA DE TESIS DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO A 03 DE OCTUBRE DE 2023.

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.

COMITÉ TUTORAL Y REVISOR

Dra. Gabriela Rosas Salgado,
Tutor Principal.

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama,
Tutor Personal.

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz,
Miembro del sínodo y comité revisor.

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Miembro del comité revisor.,

Dra. Gladis Fragoso del Carmen González,
Miembro del comité revisor.

Dra. Judith González Christen
Miembro del sínodo.

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Miembro del sínodo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, la Dra. Gabriela Rosas Salgado, por su tiempo, dedicación apoyo y no darse por rendida a pesar de las dificultades y retos para mi formación.

A mi comité tutorial y revisor de tesis: la Dra. Gladis Fragoso del Carmen González, la Dra. Judith González Christen, el Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, el Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz, el Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, y el Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer por todo su apoyo, críticas sugerencias, comentarios y enseñanzas.

A la Dra. Celeste Trejo Moreno, la Dra. Marisol Méndez Martínez, y el Mtro. Zimri Aziel Alvarado Ojeda, quienes me asesoraron, capacitaron y enseñaron teniendo mucha paciencia hacia mi.

Al Mtro. Juan Carlos Villegas García (Técnico Académico de Laboratorio, Facultad de Medicina, UAEM) por apoyarnos en distintas actividades.

DEDICATORIAS

A mi mamá y mis hermanos Enrique y Paulina por la paciencia y apoyo en esta etapa.

A mi compadre Lupe y el resto de su familia por su amistad, su apoyo y entendimiento.

A Michu, más que un gato un gran compañero que me ayudó a superar los momentos más duros.

A dos grandes amistades Carolina y Marisol, en el momento de tomar mi decisión, me ayudaron con ese empujón final para dejar los miedos y lanzarme a esta aventura.

ÍNDICE

1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCIÓN	4
2.1 RESPUESTA INFLAMATORIA	4
2.1.1 DEFINICIÓN	4
2.1.2 CLASIFICACIÓN	4
2.2 MACRÓFAGOS	8
2.2.1 ORIGEN	8
2.2.2 RECEPTORES	9
2.2.3 MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN	11
2.2.2.1 M1	13
2.2.2.1.1 ACTIVACIÓN	13
2.2.2.1.1.1 LIPOPOLISACÁRIDO	14
2.2.2.1.1.2 CITOCINAS (TNF-a, IL-6)	16
2.2.2.1.1.3 ROS/RNS	18
2.2.2.1.1.4 FAGOCITOSIS	20

2.2.2.2 M2	21
2.2.2.2.1 FENOTIPOS DE M2	21
2.2.2.2.2 CITOCINAS (IL-4, IL-10 Y TGF-b)	22
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	26
2.4 TRATAMIENTOS ANTIINFLAMATORIOS	27
2.5 MACRÓFAGOS RAW 264.7	28
2.6 FITOFÁRMACOS	29
2.7 CUCURBITÁCEAS COMO ANTIINFLAMATORIOS	30
3) ANTECEDENTES	31
3.1 <i>Sechium edule</i>	31
3.2 ETNOMEDICINA DE <i>Sechium edule</i> .	32
3.3 FITOQUÍMICA DE <i>Sechium edule</i> .	32
3.4 VENTAJAS DEL <i>Sechium edule</i> .	34
4) JUSTIFICACIÓN	35
5) HIPÓTESIS	36
6) OBJETIVO GENERAL	37

7) OBJETIVOS PARTICULARES	38
8) METODOLOGÍA	39
8.1 CULTIVO DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	39
8.1.1 VIABILIDAD CELULAR EN MACRÓFAGOS RAW 264.7	39
8.1.2 OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA	40
8.1.3 TÉCNICA DE ELISA	40
8.2 CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR REACCIÓN DE GRIESS	41
8.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FAGOCITICA POR ROJO NEUTRO	41
8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
9) RESULTADOS	42
10). DISCUSIÓN	49
11) CONCLUSIONES	53
12) PERSPECTIVAS	54
13) BIBLIOGRAFÍA	55

1. RESUMEN

La respuesta inflamatoria es el mecanismo fisiológico que responde a cambios en el equilibrio del sistema como los estímulos dañinos, y tiene la finalidad de regresarlo al estado basal. Se divide en 3 tipos que son aguda, crónica y metainflamación lo que depende de las células que participan. Una de las principales células que participan en todas las formas del proceso inflamatorio es el macrófago (MF). Estos son células mononucleares cuya función principal es ser sensores del sistema aunque dependiendo de su entorno se polarizan hacia diferentes fenotipos, cada uno con sus funciones y marcadores distintos. *In vitro* se clasifican en M0 a los que se encuentran inactivados, M1 o de activación clásica a los de perfil proinflamatorio y M2 o de activación alternativa a los de perfil inmunoregulador (con su propia división en M2a, M2b, M2c y M2d). Los MF poseen diferentes tipos de receptores en su membrana con los que sensan su ambiente, como los receptores de tipo Toll (TLR). Uno de los TLR más implicados en el reconocimiento ligandos de patógenos (como bacterias gran negativas a través del LPS) y no patógenos, es el TLR4. El TLR4 se une al LPS por lo que activa la MF lo que trae por consecuencia la producción de citocinas (tanto proinflamatorios y antiinflamatorios), aumento de la fagocitosis, y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Desde la antigüedad, se han buscado posibles remedios para controlar los aspectos negativos de la inflamación. Actualmente el manejo farmacológico más común son los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los esteroides. Los primeros sólo contrarrestan las molestias y los segundos suprimen la inflamación de manera muy eficiente, sin embargo, ambos casos traen efectos secundarios que imposibilitan su uso por tiempos prolongados, lo que es un problema para el manejo de enfermedades crónicas que requieren su uso constante, por lo que buscar en los fitomedicamentos una opción terapéutica es una posibilidad de interés. Las cucurbitáceas brindan esta posibilidad, y entre ellas *Sechium edule* (chayote). El extracto hidroalcohólico de la raíz de la planta (HA-rSe) es rico en ácido cinámico, ácido caféico, ácido cumárico y la vitexina, y tiene efecto antiulcerante, antioxidante, antihipertensivo, antidisfunción endotelial, antifibrótico y antiesteatótico, patologías en las que la inflamación juega un papel preponderante, sin embargo, aún no se conoce el proceso mediante el cual suprime e interfiere con el proceso inflamatorio. Partiendo de esta premisa surge la pregunta de investigación que rige el presente trabajo, ¿El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* modifica la actividad fagocítica, la producción de nitritos y citocinas en macrófagos activados por LPS? lo que lleva al objetivo de este

trabajo, que es: Evaluar el extracto hidroalcohólico de *Sechium edule* en la modulación la actividad fagocítica, producción de nitritos y citocinas en macrófagos activados por LPS.

Para satisfacer este objetivo se utilizaron macrófagos RAW 264.7 que fueron activados con LPS. Con la intención de determinar la concentración de trabajo, primero se evaluó el efecto tóxico tanto de las concentraciones a evaluar de rSe-HA como de los diferentes tratamientos. Posteriormente se evaluó el efecto de 5 concentraciones de rSe-HA (0.1875, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 µg/ml) sobre la producción de factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α). Una vez determinada la concentración de trabajo se evaluó su efecto sobre la actividad fagocítica, la producción de Óxido Nítrico (ON) y la producción de citocinas (interleucinas 4, 6 y 10 y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Los controles para estos experimentos fueron células activadas con LPS sin tratamiento o tratadas con dexametasona (84 mM). Para la realización de estos ensayos, las células se cultivaron a 37°C y a 4% de CO₂, en un inicio por 24 horas para el establecimiento del cultivo y posteriormente se activaron por 4 horas con LPS (100 ng/ml) y pasado ese tiempo se colocaron los diferentes tratamientos por 12 y 22 horas según el caso. Al final del tiempo experimental se cosechó el medio de cultivo para medición de ON y citocinas, y se utilizaron las células adheridas para evaluar la actividad fagocítica. Los resultados obtenidos indicaron que ninguno de los tratamientos eran tóxicos para las células. Con base en la producción de TNF- α se determinó que la concentración efectiva (CE) sería de 0.75 µg/ml, que fue tan eficiente como la dexametasona. Esta concentración controló de manera eficiente la fagocitosis y la producción de NO a las 22 horas sin embargo ningún tratamiento (dexametasona o *rSe-HA*) tuvo efecto a las 12 horas. Con respecto a las citocinas, a las 12 horas el *rSe-HA* fue eficiente al incrementar la IL-10 y a las 22 horas moduló la expresión de TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10, lo que probablemente indique un perfil de tipo M2c.

Los efectos observados se pueden relacionar a que moléculas presentes en el extracto, como como los ácidos grasos (ácido hexadecanoico, ácido hexadecanoico-metil-éster, metil tetradecanoato y el ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxipropil-éster), los ácidos hidroxicinámicos (ácido cumárico y caféico), los terpenos (estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one y stigmasta-5,22-dien-3-ol), los flavonoides (vitexina) y fenilpropanoides (ácido cinámico) inhiben la activación de NF- κ B como se ha reportado por diversos autores, mientras que la vitexina y el ácido cinámico también actúan sobre las vías de las MAPK (ERK, p38 y JNK) coadyuvando a la inhibición de la acción de este factor de transcripción, lo que no sólo actúa sobre la producción de citocinas, sino sobre la producción de la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) y la fagocitosis. Moléculas como el ácido cinámico, ácido cumárico, vitexina y ácido cafeico también presentes en el extracto, tiene reportes de ser antioxidantes, por lo que

bloquean al ON si es que este se llegara a producir. Por otro lado, la vitexina, se ha reportado que actúa sobre la vía de Nrf2 lo que lleva a la producción de IL-10, que lleva a un ambiente regulador.

Con base en estos resultados se puede decir que el rSe-HA modula la actividad fagocítica, la producción de nitritos y lleva el perfil de citocinas hacia un fenotipo inmunoregulador de tipo M2c.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 RESPUESTA INFLAMATORIA

2.1.1 DEFINICIÓN

La respuesta inflamatoria es la respuesta fisiológica que responde a los cambios en el equilibrio del sistema como respuesta a estímulos dañinos [entre los que se encuentran las enfermedades infecciosas, la presencia de cuerpos extraños, la isquemia, los traumatismos, las quemaduras, la muerte celular, los procesos metabólicos, eventos autoinmunes que producen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)]. Esta respuesta se caracteriza por la producción de mediadores proinflamatorios (entre los cuales se incluyen citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, enzimas, factor activador de plaquetas, eicosanoides, etc.) cuya finalidad es regresar al sistema a su estado normal. La respuesta inflamatoria se caracteriza por la participación orquestada de varias moléculas y células entre las que se encuentran los macrófagos (M θ) (1–3).

2.1.2 CLASIFICACIÓN

La respuesta inflamatoria puede dividirse de acuerdo a las células participantes en aguda, metainflamación y crónica:

- **Respuesta inflamatoria aguda y su fisiopatología:** su función principal es eliminar el agente nocivo y limitar la extensión del daño, normalmente ocurre a los pocos minutos posteriores a la producción del mismo con una duración de unos cuantos días (1,4,5). Se divide en 3 fases:
 - Inicio. - Ocurre cuando se perturba la homeostasis del sistema en respuesta a algún estímulo. Los signos por los que se manifiesta son: dolor, rubor, calor, tumor y pérdida de la función. Estos son el resultado de eventos microvasculares, celulares y moleculares (aumento del flujo sanguíneo al área inflamada, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular con fuga de plasma al tejido dañado) que culmina en el reclutamiento y acumulación de leucocitos, la producción y liberación de citocinas proinflamatorias (como IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23 y TNF-a) y quimiocinas (como CCL2 y CXCL8) que atraen y activan a los neutrófilos (6-8).

- Resolución. - Implica la reposición de células y el retorno del tejido a su estado basal con la degradación de mediadores proinflamatorios, normalización de la permeabilidad vascular y cese de infiltración de leucocitos (9).
- Fase posterior a la resolución. - En esta fase, el tejido afectado desarrolla una inmunidad adaptativa y pasa a un estado de homeostasis adaptativa por cambios en mediadores lipídicos, efectos tardíos de enzima COX-2 (que fomenta la producción de prostaglandinas antiinflamatorias como PGD2 y 15d-PGJ2) además del perfil de macrófagos que permanece en M2 (6,10).
- **Metainflamación y su fisiopatología:** es la activación inmune que ocurre en ausencia de estímulos francos que afecta a nivel sistémico a través de inflamación de bajo grado inducida por alteraciones metabólicas como la obesidad, el envejecimiento, la caquexia, la hipertensión arterial sistémica y la diabetes mellitus tipo 2 (11,12). Esta inflamación de bajo grado es de duración crónica, se localiza a nivel sistémico, principalmente en tejidos dependientes de insulina, con participación mayor de los M Θ 's y linfocitos (Th1, Th2, Th17, Th9), activada por DAMPs metabólicos y no causa daño a los tejidos (13,14). En la obesidad, el exceso de energía desencadena una inflamación crónica en respuesta a hipoxia en el tejido adiposo, por un desbalance entre las células (adipocitos y células inmunes) y la matriz extracelular en el tejido, actuando los ácidos grasos (como el ácido palmítico que activa la vía proinflamatoria JNK) y la fetuina A (que actúa como molécula adaptadora de ácidos grasos para desencadenar la vía de TLR4) (12,15). para promover el reclutamiento de M Θ 's por adipocinas (como la quimiocina CCL2) que conlleve al restablecimiento de balance fisiológico.
- **Respuesta inflamatoria crónica y su fisiopatología:** Es una condición anormal, que ocurre por infecciones no resueltas, persistencia de cuerpos extraños (rechazo crónico de aloinjertos), exposición química recurrente o episodios de inflamación aguda recurrentes, progresivos o no resueltos adecuadamente (Enfermedades reumatológicas, etc.). Esta persiste por semanas, meses o incluso años, lo que lleva a la degeneración de tejidos y/o aparición de otras patologías (4,5,16). Se caracteriza por la infiltración de células mononucleares (como los monocitos y linfocitos), formación de neovasos, y aparición de moléculas de adhesión en la superficie de células endoteliales que causan adhesión de células mononucleares permitiendo su posterior extravasación. Los monocitos al migrar al compartimento extravascular se diferencian en M Θ 's, los cuales producen mediadores proinflamatorios (como TGF- β , IL-6, TNF- α) que activan a los

fibroblastos para depositar colágeno y activar otros M θ 's y linfocitos para liberar mediadores que perpetúa la respuesta inflamatoria, lo que lleva a la formación de fibrosis (1,7,9). Entre las citocinas participantes se encuentran IL-6, IL-1 α , IL-17, TNF- α e IL-18; mientras que los linfocitos principales son los Th2, T $\gamma\delta$ y B (17–19).

- Células que participan en la inflamación.

En la tabla 1 se muestran las diferentes células que participan en la respuesta inflamatoria.

Tabla 1. Células que participan en la respuesta inflamatoria	
Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> - Conforman el 60-70% de los glóbulos blancos. - Son las primeras células en llegar al sitio de inflamación. - Fagocitan bacterias y otros detritos celulares. - Mueren por Apoptosis y desaparecen a las 24-48 horas tras llegar al sitio de inflamación.
Eosinófilos	<ul style="list-style-type: none"> - Representan 2-3% de los glóbulos blancos. - Llegan al sitio de inflamación 2-3 horas después de los neutrófilos. - Participan en las reacciones alérgicas por liberación de mediadores específicos.
Basófilos	<ul style="list-style-type: none"> - Menos del 1% de los leucocitos circulantes. - Participan en reacciones inflamatorias como las reacciones alérgicas al contener entre sus gránulos histamina.
Monocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Constituyen de 3-8% del total de leucocitos. - Semivida cercana a las 24 horas, tras lo cual migran a la zona de lesión. - Producen mediadores vasoactivos (como prostaglandinas y leucotrienos), factor activador de plaquetas (PAF), citocinas inflamatorias (como las interleucinas) y factores de crecimiento [factor de crecimiento transformante beta (TNF-β) por ejemplo] que fomentan la regeneración de tejidos. - Los macrófagos tienen capacidad fagocítica y son activos en la destrucción de patógenos mediante el reconocimiento de diversos patrones [por ejemplo: patrones moleculares asociados a patógenos

	<p>como el lipopolisacárido (LPS), RNA de doble hélice (como en los virus), manoproteínas (como en los hongos)].</p>
Linfocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Son los leucocitos más pequeños. - Participan en la inflamación mediada por mecanismos tanto inmunitarios (agentes infecciosos) como no inmunitarios (lesión y muerte celular programada). - Se dividen en 2 categorías mayores: T (CD4 y CD8) y B, los cuales migran de los órganos linfoides a la zona de inflamación para ejercer sus funciones efectoras actuando en conjunto con los macrófagos; En los órganos linfoides reciben señales durante la presentación de antígeno, que los activa para migrar hacia los sitios de inflamación. Los linfocitos T CD4, liberan citocinas que orquestan la respuesta inmune, mientras que los linfocitos T CD8, ejercen funciones citotóxicas sobre las células infectadas o dañadas. Las células plasmáticas se desarrollan a partir de linfocitos B activados y producen anticuerpos dirigidos contra antígenos persistentes en el sitio de inflamación y componentes alterados del tejido.
Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> - Actúan como sensores de la homeostasis del sistema y participan en su mantenimiento. - Promueven la eritropoyesis. - Eliminan las sinapsis neuronales inmaduras o defectuosas. - Median el metabolismo de lípidos en surfactante. - Actúan como sensibilizadores a la insulina mediante la IL-10. - Fagocitan eritrocitos viejos o dañados y los digieren para extraer el grupo hemo, así como células dañadas - Tienen propiedades microbicidas para patógenos intracelulares. - Participan en la regeneración de tejidos. - Inducen lipólisis en la grasa blanca y termogénesis en la grasa magra.
Mastocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Se desarrollan hasta llegar a la circulación y se alojan en los tejidos. - Su activación induce liberación de contenido granular (histamina, proteasas, citocinas como TNF-α e IL-6), síntesis de mediadores lipídicos derivados de los precursores de la membrana celular

	(metabolitos ácido araquidónico como prostaglandinas y PAF) y estimulación de la síntesis de citocinas y quimiocinas en otras células inflamatorias (como los monocitos y los macrófagos).
Plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> - Pequeños discos con envoltura membranosa que circulan en la sangre con un papel activo en la hemostasia. - Al activarse (por una variedad de factores como PAF, ADP y trombina (la cual es activada cuando se activa la cascada de coagulación) liberan mediadores inflamatorios, como el TGF-β.
Células endoteliales	<ul style="list-style-type: none"> - Forman el recubrimiento epitelial de los vasos sanguíneos. - Producen agentes antiplaquetarios y antitrombóticos (los cuales mantienen la permeabilidad vascular), vasodilatadores y vasoconstrictores (los cuales regulan el flujo sanguíneo). - Conforman una barrera de permeabilidad selectiva (regulan la extravasación de leucocitos mediante moléculas de adhesión). - Regulación y modulación de las respuestas inmunitarias mediante la secreción de mediadores de la inflamación (como por ejemplo: factores estimulantes de colonias, quimiocinas, citocinas, eicosanoides, etc.). - Participan en el proceso de reparación (mediante la producción de factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis).

2.2 MACRÓFAGOS

2.2.1 ORIGEN

Su nombre deriva del griego "grandes comedores" (makros- grande y phagos- comer) (7). Su ontogenia inicia en la hematopoyesis, en la médula ósea las células madre hematopoyética mieloides se diferencian en premonocitos, los cuales siguen dos caminos: 1) migran al saco vitelino, de donde migra y continúa el proceso en el hígado fetal y posteriormente migran a los tejidos específicos donde se diferencian a macrófagos residentes, y 2) permanecen diferenciados como monocitos en la médula ósea y posteriormente entran a la circulación donde permanecen (con una vida media de 72 horas) hasta recibir un estímulo inflamatorio para su reclutamiento y diferenciación en M θ 's (20). Dependiendo del sitio

donde se encuentran se denominan los distintos M0's residentes: los alveolares, esplénicos, células de Kupffer, células microgliales, y células mesangiales entre otros (21,22).

2.2.2 RECEPTORES

Parte de la actividad de los M0's es distinguir entre las moléculas que son "propias" y las que no lo son; por ello cuentan con numerosos receptores los cuales se encargan de mantener dicha función, entre los cuales se incluyen los receptores de reconocimiento de patógenos [los cuales están ubicados tanto en la superficie celular y en el entorno intracelular que pueden reconocer una serie de moléculas llamadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), (PRR)], receptores del complemento [por ejemplo CR1, CR3 y CR4, (CR)], receptores Fc (FcR), receptores de manosa (los cuales detectan residuos de monosacáridos en membranas bacterianas y fúngicas) (7,23).

La clase principal de PRR son los TLR ubicados tanto en la membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10) como en membranas intracelulares (localizados en endosomas o lisosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11 y TLR13). Estos permiten reconocer PAMP's que incluyen residuos de lípidos y carbohidratos de bacterias Gram-positivas (TLR1, TLR2 y TLR6), LPS de bacterias gramnegativas (TLR4), patógenos fúngicos (TLR2), proteínas bacterianas como flagelina y profilina (TLR5 y TLR11), ácido nucleico y sus derivados (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9), RNA de doble hebra (TLR3), compuestos antivirales sintéticos y análogos de nucleótidos guanina (TLR8), y DNA que contiene motivos CpG no metilados abundantes en DNA bacteriano (TLR9) (7,21,24). Los TLR también pueden formar heterodímeros o formar complejos con moléculas accesorias (como la proteína de unión a LPS y CD14 en el caso de TLR4) (20). El reconocimiento de patógenos independiente de TLR es especialmente importante para el reconocimiento intracelular de patógenos y puede ocurrir a través de los receptores similares al dominio de oligomerización de ligando unión a nucleótidos (NOD), o helicasas similares al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) lo que activa las vías de MyD88 y TRIF principalmente (7,20,25).

En la tabla 2 se muestran otros tipos de receptores de M0's.

Tabla 2. Receptores de los macrófagos.	
NLR (receptores tipo NOD)	❖ Son de expresión intracelular.

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Los principales son NOD1 y NOD2. ❖ Son receptores de peptidoglicano: D-g-glutamil-meso-DAP para NOD1 y muramil dipéptido para NOD2. ❖ Activan NF-κB por reclutamiento y activación de RIP2, lo que activa el complejo IκB. ❖ ASC es una proteína adaptadora que recluta caspasa-1.
RLR (receptores tipo RIG)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Son sensores de infección viral. ❖ Los principales son gen 1 inducible de ácido retinoico (RIG-1) y gen asociado a diferenciación de melanoma (MDA) los cuales detectan dsRNA. ❖ Activan NF-κB e IRF3 resultando en la expresión de citocinas proinflamatorias e interferones tipo 1 (IFNα e IFNβ).
SR (receptores de basura)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Reconocen PRR tanto opsonizantes como no opsonizantes, incluyendo SR-A (SR-AI, SR-AII, MARCO), SR-B (CD36, SR-BI, Croquemort, CD163), SR-C (dsR-CI) y SR-E (LOX-1). Así como SR-A (SR-CL1 basado en expresión de dominios de lectina) y SR-D (macrosialina).
CLR (receptores de lectina tipo C)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Reconocen carbohidratos. ❖ Señalizan mediante ITAM o adaptadores de soporte de ITAM como FcyR; estos últimos señalizan vía syk/CARD9, lo que resulta en la activación de NF-κB. ❖ Incluyen a Dectina-1 (que responde a β-glucanos de la pared celular micótica desencadenando la fagocitosis, el estallido respiratorio, la activación de inflamomas, la producción de citocinas, la polarización de respuestas por Th1 y Th17; actuando de forma cruzada con TLR2 y otros TLR de MyD88), Dectina-2 y Mincle (ambos reconociendo α-mananosa fúngica con la asociación de Dectina-2 a inducción de Th17 y reconocimiento innato).

<p>Siglecs (lectinas similares a ligando de ácido siálico)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas que reconocen glicoconjugados sialilados. ❖ Hay 13 familias en humanos. Activadores 1 (CD169), 2 (CD22) y 4. Supresores 3 (CD33), 5 (CD170), 11 y 14 a 16 (siglecs similares a CD33). ❖ Los supresores actúan mediante motivos inhibitorios basados en inmunoreceptor tirosina (ITIM) en el citoplasma los cuales reclutan enzimas fosfatasa SHIP, SHP-1 y SHP-2 que resultan en el antagonismo de la activación dependiente de ITAM.
<p>FcyR</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Traducen la señal mediante ITAM (activación por FcyRIIIa, FcyRI y FcyRIIa) o ITIM (supresión por FcyRIIb). ❖ En macrófagos se encuentran FcyRI (CD64) que liga IgG monomérica y los receptores de baja afinidad FcyRII (CD32) y FcyRIII (CD16) los cuales ligan complejos inmunes de IgG. FcyRIIIa induce la expresión y secreción de TNF-α.
<p>Otros</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ CD200R que interactúa con CD200, glicoproteína de superficie celular que contiene dominios similares a Ig, suprime expresión de TNF-α, IL-1β, MMP13 e IL-10. ❖ CD172a que interactúa con CD47 y causa supresión de MF al interactuar con SHP1 y SHP2 suprimiendo IL-12 pero no TNF-α, IL-1 e IL-6.

2.2.3 MORFOLOGIA Y CLASIFICACION

Los M θ 's se caracterizan por su gran tamaño (aproximadamente 5-50 μ m de diámetro), poseen forma irregular y son mononucleares. Su citoplasma es abundante y contiene gránulos azurófilos de hasta 2 μ m, que contienen el cóctel químico necesario para matar y digerir a los patógenos invasores (20,21). *In vitro* se les denomina M0 a los M θ 's inactivados y de acuerdo a las condiciones en las que se encuentran, sus

marcadores de membrana y las citocinas que se producen se polarizan a 2 tipos: M1 y M2 (incluyendo sus subtipos); aunque *in vivo* se han observado otras poblaciones (23,26,27).

En la tabla 3 se muestran los diferentes fenotipos de M0's y sus funciones principales.

Tabla 3. Diferentes fenotipos de macrófagos.			
Macrófago	Funciones principales	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
M0	Potencial para polarización.	x	
M1	Actividad proinflamatoria.	x	x
M2	Participan en la inmunomodulación.	x	x
M2a	Involucrados en la inflamación alérgica, eliminación de parásitos, reparación de tejidos.	x	x
M2b	Involucrados en el estrés oxidativo, eferocitosis.	x	x
M2c	Involucrados en la respuesta antiinflamatoria, remodelación de tejidos, deposición de matriz.	x	x
M2d	Involucrados en la angiogénesis, respuesta anti y proinflamatoria.	x	x
M3	Relacionados con el cambio entre respuestas M1 y M2.		x
Mox	Capaces de realizar una fagocitosis más débil pero con actividad proaterogénica.		x
M4	Involucrados en la respuesta proinflamatoria, estrés oxidativo, fagocitosis baja y reparación de tejidos.		x
Mhem	Ateroprotectores.		x
Cst3hi	Involucrados en la respuesta inflamatoria, presentación de antígenos y procesamiento, desgranulación de neutrófilos, endocitosis, proteosoma, migración de células musculares, activación de linfocitos, catabolismo de carbohidratos, catabolismo activo de glicofosfolípidos.		x

M17	De actividad proinflamatoria.		x
Mreg	Participantes en la regulación de la respuesta por Treg y la respuesta antiinflamatoria.		x
Trem ^{hi}	Participan en la desgranulación de neutrófilos, activación de leucocitos mieloides, respuesta a lipoproteínas, catabolismo de lípidos, diferenciación de osteoclastos, desarrollo de vasculatura, respuesta a ROS, mantenimiento de locomoción.		x
Fscn1 ^{hi}	Participan en la presentación y procesamiento de antígenos, desgranulación de neutrófilos, apoptosis, señalización NF-κB, organización de actina en citoesqueleto, regulación positiva de actividad de hidrolasas.		x

2.2.3.1 MACRÓFAGOS M1

Estos M θ 's, también conocidos como M θ 's activados clásicamente, son la primera línea de defensa contra patógenos y se encargan de desencadenar la respuesta inflamatoria lo que incluye la producción de reactivos microbicidas y de moléculas proinflamatorias (entre ellas incluido el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), además de estar involucrados en la respuesta de las células T colaboradoras 1 (Th1) a las infecciones (28,29,30). También se encargan de producir INF- γ que controla la expresión de genes que codifican para receptores de citocinas, marcadores de activación celular y moléculas de adhesión celular; además de la producción de reactivos microbicidas y tumorocidas, como óxido nítrico (NO) y ROS (23,28,29).

2.2.3.1.1 ACTIVACIÓN

Es la polarización de M0 a M1, y es el resultado de la unión de un ligando al receptor (como el LPS o citocinas como TNF- α , GM-CSF e IFN- γ) (26,30). Tras su activación expresan en su superficie: B7, B7.1, MCP3, IP-10, CD16, CD32, CD62, CD127, CTLA8, CD38, Gpr18, Fpr2, WNTA 5A, GPD2, CD120b, TLR2, SLAMF7 y se encargan de la producción de CXCL8, CCL5, CCL2, INF- γ , TNF- α , INF-

β , iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23 (31). Entre sus funciones están la producción de citocinas proinflamatorias, la fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno, y fomentan la adipogénesis con la edad, además de encontrarse aumentados en la obesidad (32).

2.2.3.1.1.1 LIPOPOLISACÁRIDO

El LPS es uno de los glicolípidos más inmunoestimuladores que constituyen la membrana externa de las bacterias Gram negativas (estimando que se encuentra en una cantidad de 3.5×10^6 moléculas por bacteria) (33,34). Se compone de 3 regiones: el glucolípido A, un heteropolisacárido conocido como core (el cual se divide en interno y externo) y el antígeno O (región sacárida adicional que es un polímero de 1-8 residuos glicolípidos que varían entre especies bacterianas) (33,35). El LPS activa pobremente la inmunidad innata, por lo que requiere a la proteína de unión a LPS (LBP) para formar un complejo de alta afinidad con la fracción de lípido A del LPS (Fig 1), el cual es identificado por CD14 que ayuda a que el LPS sea transferido al complejo compuesto por dímeros de TLR4 y de la proteína MD2 (33,35,36). TLR4 es una proteína receptora transmembrana de tipo I que comprende una región citosólica conservada, denominada dominio Toll-IL-1R (TIR), que es característica de la superfamilia del receptor de IL-1/TLR y pertenece a un subgrupo caracterizado por repeticiones ricas en leucina dentro de su dominio extracelular (35,37). Mientras que la proteína MD2 está asociada con el dominio extracelular de TLR4 y es necesaria para el reconocimiento del LPS (35,37). La interacción entre LPS y el complejo del receptor TLR4/MD2 desencadena una oligomerización de TLR4 y la posterior activación de la señalización a través del dominio TIR citoplasmático de TLR4 (33,34,36). La cual está mediada en gran medida por el reclutamiento de proteínas adaptadoras (como el factor de diferenciación mieloide 88, MyD88), la proteína tipo adaptadora MyD88 (MAL), la molécula adaptadora que contiene TIR (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) que implican la activación de la vía I κ B / NF- κ B, así como de los miembros p38MAPK y c-jun N terminal cinasa (JNK) de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (35–37).

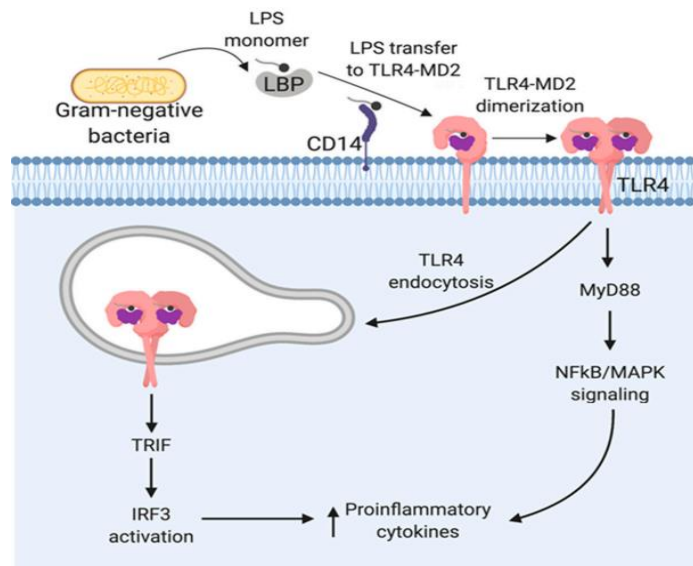


Figura 1. Reconocimiento de LPS por TLR4. LBP se une a LPS de las bacterias Gram negativas y lo lleva a una molécula de CD14 que pueda encontrarse en forma soluble o anclada a membrana. CD14 transfiere LPS al dominio del complejo TLR4/MD2, lo que lleva a la homodimerización de TLR4. Este cambio en la conformación lleva a la dimerización del dominio citoplasmático TIR que provee un sitio de unión para MyD88. Esta unión activa la señalización por NF-κB y MAPK, lo que causa la transcripción de citoquinas proinflamatorias. La endocitosis del complejo TLR4/MD2 lleva también a activar la vía de TRIF, que se encarga de mediar la activación de IRF3 y con ello la producción de interferones tipo I (Tomado de 37).

Además de las señales tempranas dependientes de MyD88, TLR4 desencadena una transducción de señales dependiente de TRIF e independiente de MyD88, retardada a través de la activación de la cinasa de unión al activador de NF-κB 1 (TBK1) asociada a un miembro de la familia TRAF del factor de respuesta de IFN 3 (IRF3) y la activación tardía de NF-κB (34–36). Esta parte retrasada de la señalización de TLR4 requiere la internalización de TLR4 dependiente de dinamina y el reclutamiento posterior de TRAM que inicia vías dependientes de TRIF que permiten a TLR4 desencadenar la liberación de interferones de tipo I (33,35,36).

Después de la activación de TLR4, MAL/MyD88 y TRAM/TRIF median la activación temprana de los miembros de la familia MAPK: p38MAPK, ERK1/2 y JNK, mientras que la activación tardía de estas cinasas es dependiente de TRAM/TRIF (33,34,36,37). Esta activación de ERK1/2 implica además la activación de Tpl2, que se ha demostrado que es un requisito previo para el transporte del transcrito de TNF-α desde el núcleo al citoplasma y, por lo tanto, es esencial para su producción (35–37). TNF-α es la primera citocina que se produce y desencadena el proceso de activación y producción de las demás citocinas (38) (Figura 2).

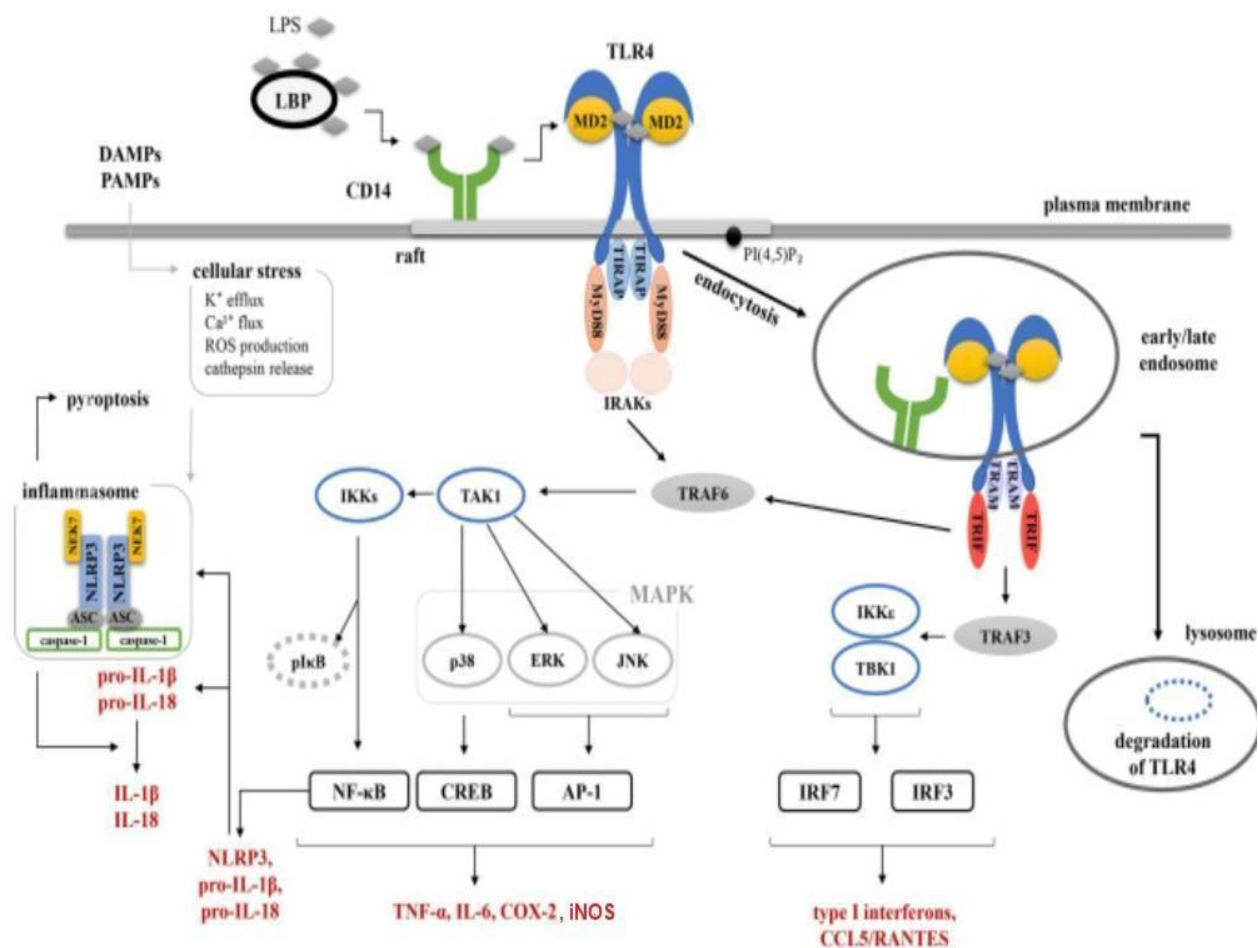
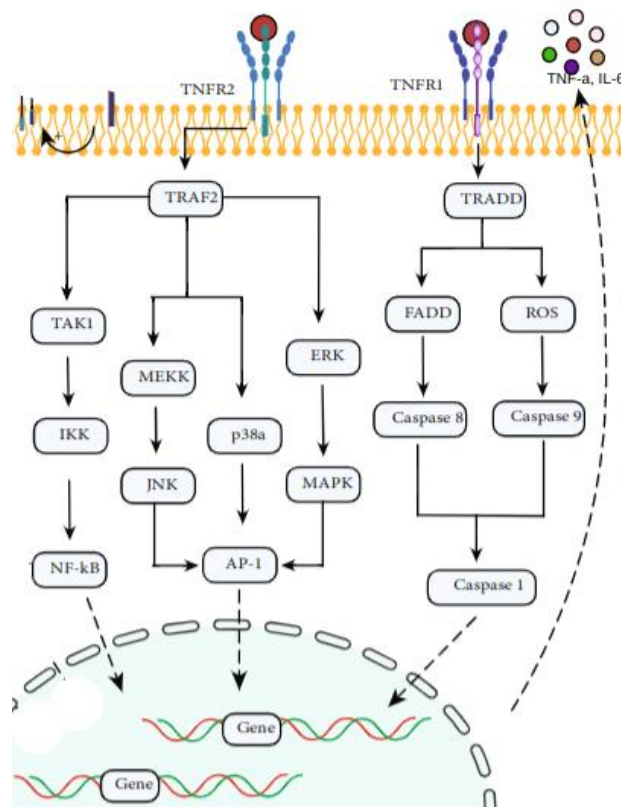


Figura 2. Vía de señalización de TLR4 activada por LPS. Tras la interacción entre LPS y la proteína LBP, CD14 lleva al polisacárido a interactuar con TLR4 lo que lleva a la formación de homodímeros por MD2, esto activa TIRAP y de ahí puede seguir la vía de MyD88/IRAKs o ser endocitado y seguir la vía de TRIF. La vía de IRAKs activa TRAF6 el cual se encarga de activar TAK1 e IKKs, siendo TAK1 el encargado de activar p38 (que activa CREB para la producción de IL-10) y ERK/JNK que activan AP-1; mientras que IKKs mediante la fosforilación de IκB se permite la homodimerización y translocación al núcleo de NF-κB. Tanto NFκB como AP-1 transcriben moléculas de potencial proinflamatorio como TNF-α, IL-6, COX-2 e iNOS; además de NFκB participar en la producción de NLRP3 (que participa en la piroptosis por el inflammasoma), pro-IL-18 y pro-IL-1b. La vía de TRIF puede de la misma forma llevar a la activación de TRAF6 o mediante TRAF3 activar IKKε y TBK1 para la formación de IRF7 e IRF3 que trasloca al núcleo para la formación de interferones de tipo I, y la quimiocina CCL5/RANTES. En este caso el endosoma posteriormente es degradado por lisosomas. (Tomado de 39).

El LPS regula la estabilidad de la transcripción de TNF-α e IL-10 a través de la activación de la vía p38MAPK/MK2, que además involucra la unión de elementos ricos en AU, la proteína de dedo de zinc CCCH Tristetraprolina (TTP) y bloquea la descomposición del mRNA dirigida por TTP inhibiendo el reclutamiento de la deadenilasa Factor 1 Asociado a CCR4 (CAF1) (32,33). La vía p38MAPK/MK2 no solo influye en la afinidad de TTP hacia sus mRNA diana y la posterior degradación del RNA, sino que también controla la expresión de mRNA y proteína de TTP (32–34).

2.2.3.1.2 CITOCINAS

- **TNF- α .** Esta citocina se produce cuando un estímulo (como el LPS en este caso) activa a su receptor. El estímulo culmina con la translocación al núcleo de NF- κ B y AP-1, que son los factores de transcripción necesarios para la transcripción del gen que codifica para la citocina (40-43). Esta citocina es de las primeras en producirse por este tipo de estímulo y media sus actividades biológicas a través de sus receptores (TNF-R1 y TNF-R2) (40-43). TNFR1 activa la estimulación de la expresión de genes proinflamatorios (regulados por NF- κ B y AP-1) por lo que coordina la expresión de otras citocinas lo que se potencia el estado proinflamatorio (40-43) (Figura 3). Otras actividades que realiza son: toxicidad celular, defensa del huésped contra patógenos intracelulares, activación de células endoteliales, producción de inmunoglobulinas, proliferación de células B, activación de células T, estimulación de células naturalmente asesinas, fiebre, edema, aumento en la producción de ROS, y facilitación de la adhesión de leucocitos (40-42).



- **Figura 3. Vías de señalización de TNF- α .** La unión de TNF- α con su receptor lleva a la activación de IKK-B que lleva a que se fosforile IK-Ba en los residuos serina S32 y S36 causando su poliubiquitinación y degradación. Con ello el heterodímero de NF- κ B p50/p65 puede translocar libremente al núcleo al fosforilarse y activar los genes para la producción de moléculas inflamatorias (Tomado de 44).

- **IL6.-** Esta citocina también es producto de la activación de NF- κ B y AP-1 pero en menor proporción que TNF- α y al mismo tiempo su producción es mediada por la de TNF- α . El receptor de esta citocina está unido a dos dímeros de GP130 que son los encargados de transducir la señal cuando el ligando se une a su receptor (45-47). Cuando esto sucede de activan diversas enzimas (Fig 4 B) que culminan en la fosforilación de STAT3 que se dimeriza y entra al núcleo permitiendo la expresión de genes como SOCs, TIMP1, APPs, Pim1, c-Myc, y moléculas proinflamatorias (45-47). Lo que se manifiesta en la producción de proteínas de fase aguda, de IL-4, proliferación de células Th1 y Th2, supresión de la diferenciación de Treg inducida por TGF- β , expresión y producción de quimiocinas en células endoteliales, estimulación de síntesis de colágeno y expresión de proteínas proinflamatorias como COX-2 (45-47) (Figura 4).

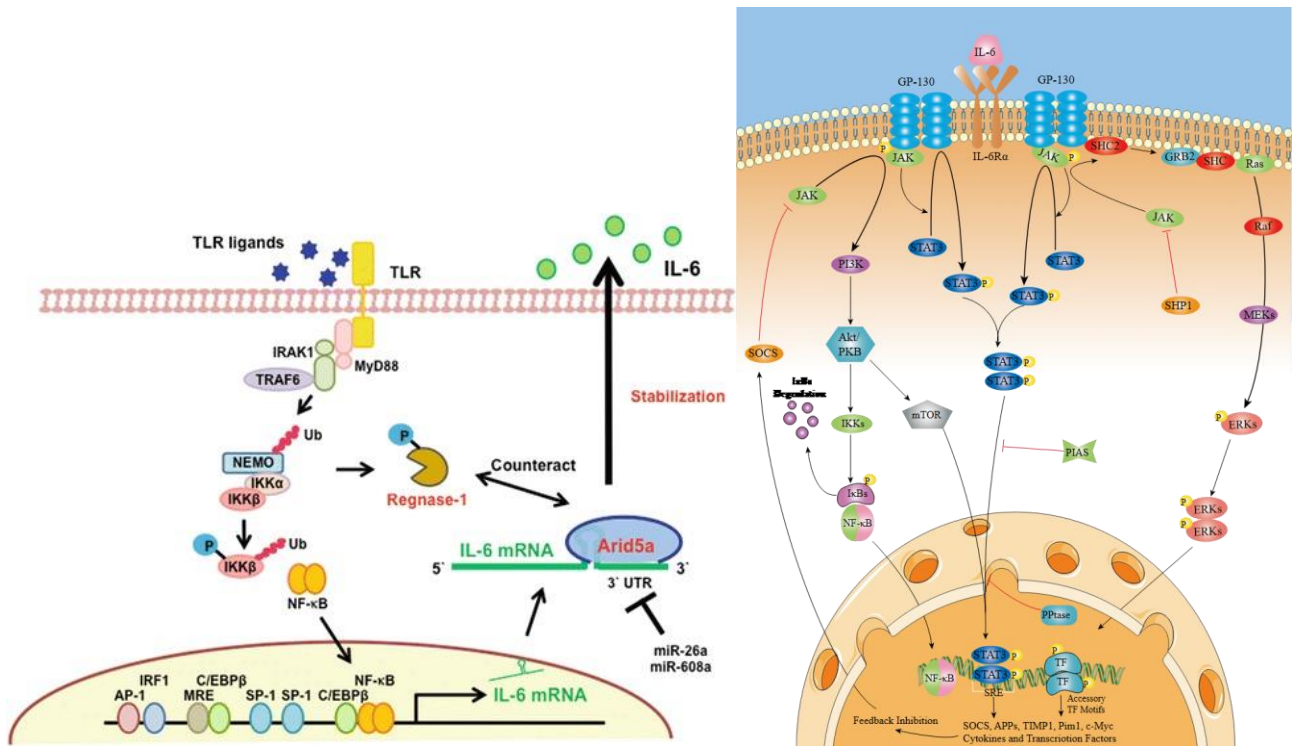


Figura 4. Vías de producción y señalización de IL-6. a) Tras la activación de TLR4, se activa la vía de MyD88 que lleva a la activación de vía de IKK que a su vez activa a NF- κ B. Tras su activación, este último se transloca al núcleo donde al unirse al DNA permiten el aumento de expresión de genes que codifican a proteínas proinflamatorias como IL-6. b) Tras la unión de IL-6 con su receptor IL-6Ra, se activan las GP130 que activan a las JAK y éstas fosforilan STAT3, lo que permite formación de homodímeros y con ello su translocación al núcleo. Al fosforilarse JAK, también se activan vías como PI3K que lleva a la activación de NF- κ B y esta fomenta la producción de citocinas proinflamatorias. JAK también activa SHC2 que lleva a la fosforilación de ERK y este transloca al núcleo donde también codifica para proteínas proinflamatorias. (Tomado de 45-47).

2.2.3.1.3 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO Y OXÍGENO

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el NO, el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el peroxinitrito (ONOO⁻) participan tanto en la inflamación como en la defensa del huésped contra los microbios al dañar componentes intracelulares y su producción requiere la activación de la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (NOS) (7,48,49). De ella hay 3 isoformas la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS) que es la más importante en procesos inflamatorios (49,50).

Estas enzimas sintetizan NO a través de la conversión de L-arginina, NADPH y O₂ a L-citrulina, NADP⁺ y NO (50). La actividad de iNOS es controlada por la disponibilidad de L-arginina y la tetrahidroxipterina (BH₄) (50) (Figura 5). Entre sus efectos están una amplia variedad de actividades inmunitarias, incluida la señalización celular (tanto intracelular como extracelular), la destrucción de tumores y la acción antimicrobiana, además de la modulación del reclutamiento de neutrófilos en los sitios de inflamación y puede interactuar con el anión superóxido para generar peroxinitrito el cual no es tan reactivo como el anión superóxido y entre sus funciones está la inactivación de enzimas como glutatión reductasa, tirosina hidroxilasa, superóxido manganeso dismutasa y activación de otras como la ciclooxigenasa (20,49,50).

Por otro lado, durante el estallido respiratorio se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que son derivados inestables, reactivos y reducidos parcialmente de oxígeno, los cuales incluyen peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ion superóxido (O₂⁻) y radical hidroxilo (OH⁻) (7,48,51). Se generan mediante la actividad de las enzimas oxidasas de Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) transmembranal (NOX), durante la oxidación de lípidos, de las ciclooxigenasas y de la Cadena de Transporte de Electrones mitocondrial (ETC) en respuesta a estímulos extracelulares (como factores de crecimiento y citocinas) y entre los efectos que causan destacan la activación de inflamación (por sí mismos o por daño celular), la eliminación de patógenos, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y participan en la actividad fagocítica de los M ϕ 's (48,52,53). La NADPH oxidasa se ensambla en la membrana plasmática y membranas de vesículas intracelulares y se encarga de transferir electrones al oxígeno molecular para generar el anión superóxido (53). También al activarse la NADPH oxidasa se suprime la actividad de NF-kB, la transcripción de citocinas proinflamatorias y la polarización a M1 (53).

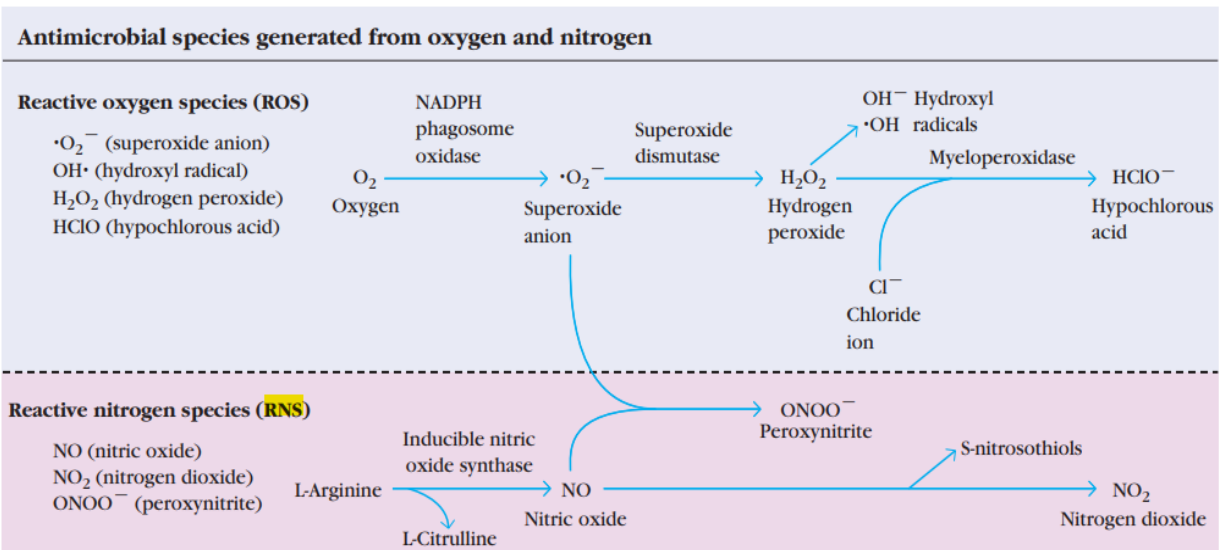


Figura 5. Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En el citoplasma de los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, la enzima fagosoma NADPH oxidasa se encarga de transformar el oxígeno en anión superóxido, el cual mediante la enzima superóxido dismutasa se transforma en peróxido de hidrógeno. En este punto por acción de la enzima mieloperoxidasa, el peróxido de hidrógeno con la adición de un ion cloruro y la pérdida de radical hidroxilo se vuelve ácido hipocloroso. El anión superóxido también puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito. El óxido nítrico es producido por la enzima sintasa inducible de óxido nítrico desde L-arginina con la producción de L-citrulina (Tomado de 20).

2.2.3.1.4 FAGOCITOSIS

La fagocitosis, es la capacidad de una célula de englobar partículas extracelulares y es uno de los parámetros que caracterizan a la activación de los macrófagos (primer mecanismo de defensa de la respuesta inmune) (54). La fagocitosis comprende varias etapas: quimiotaxis, adhesión, endocitosis, incremento del metabolismo celular, formación del fagosoma, formación del fagolisosoma, acidificación del fagolisosoma, formación de ROS y RNS, activación de hidrolasas lisosomales y exocitosis (55) (Figura 6, panel a). En macrófagos, la activación de NF- κ B y AP-1, además de incrementar la producción de interleucinas inflamatorias y con ello estimular una mayor actividad fagocítica, participa el primero en conjunto con Bcl10 en el aumento de expresión de receptores entre ellos el receptor para la fracción constante de las Inmunoglobulinas (FcR) (56, 57). Al mismo tiempo, al activarse la vía de MAPK y PI3K se fomenta la polimerización de actina, lo cual facilita la endocitosis (58) (Figura 6, panel b).

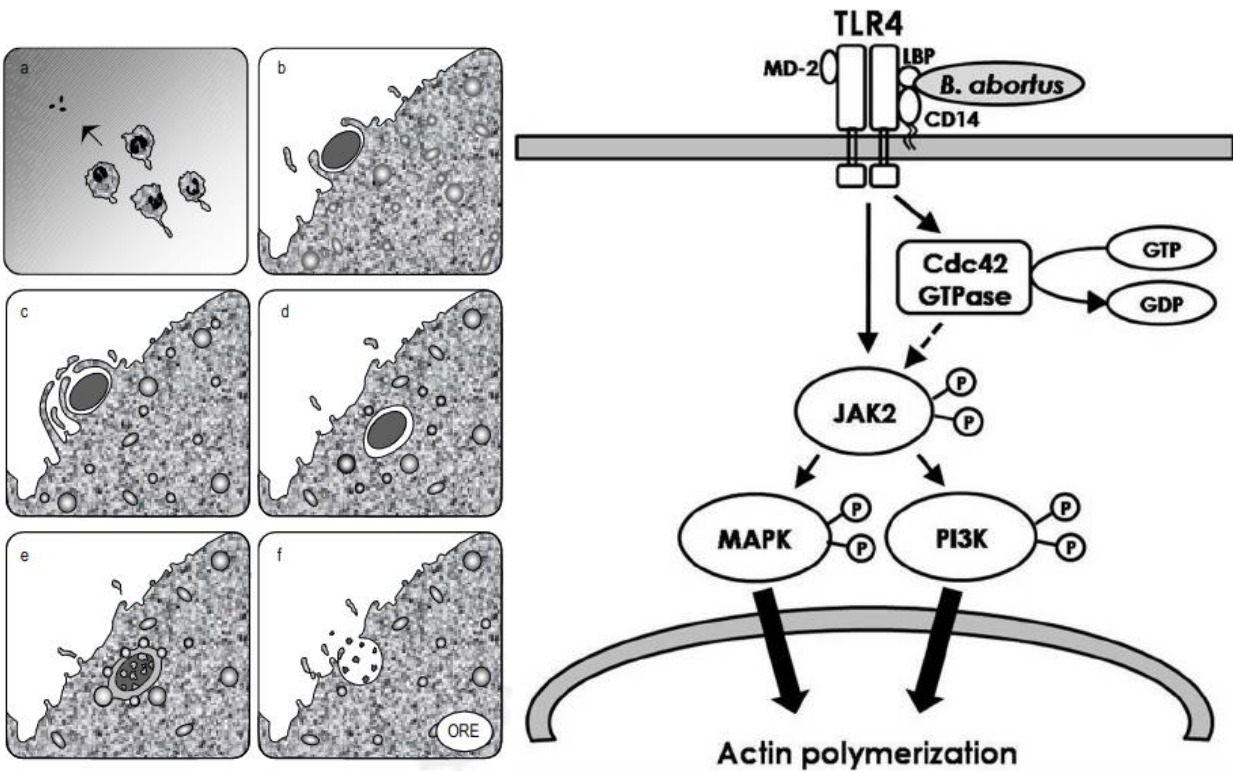


Figura 6. Fases de la fagocitosis y rol de la vía de TLR4. a) En la imagen se muestran las principales fases de la fagocitosis: quimiotaxis, adherencia del microorganismo al macrófago, endocitosis, formación del fagosoma, formación del fagolisosoma y exocitosis (146). b) Una vez que se activa la vía de TLR4, se activan las vías de MAPK y PI3K que entre sus efectos incrementan la capacidad de polimerización de actina, lo que permite facilitar la endocitosis (Tomado de 58).

2.2.2.2 MACRÓFAGOS M2

También llamados M0's activados alternativamente (inducidos por estímulos como IL-4, IL-10, IL-13 o inmunocomplejos) se encargan de regular la respuesta inflamatoria (29,59,60). Entre su actividad están la promoción de fibrosis, eliminación de parásitos, resolución de la inflamación, remodelación tisular, actividad fagocítica (32,61).

2.2.2.2.1 FENOTIPOS DE M2

Se dividen en subtipos M2a, M2b, M2c y M2d en función de los estímulos aplicados y los cambios transcripcionales. Tienen características comunes como niveles altos de producción de IL-10, bajos de IL-12, y la generación de Arginasa-1 (Arg-1), la cual compite con iNOS por la L-arginina y reduce la producción de NO (20,29,59). La polarización de M2a es estimulada por IL-4 e IL-13: los macrófagos M2b son activados por complejos inmunes más ligandos de los TLR o IL-1B; los macrófagos M2c son

estimulados por IL-10 y TGF- β ; y la polarización en M2d es inducida por IL-6 y adenosina (7,29,59) (Figura 7).

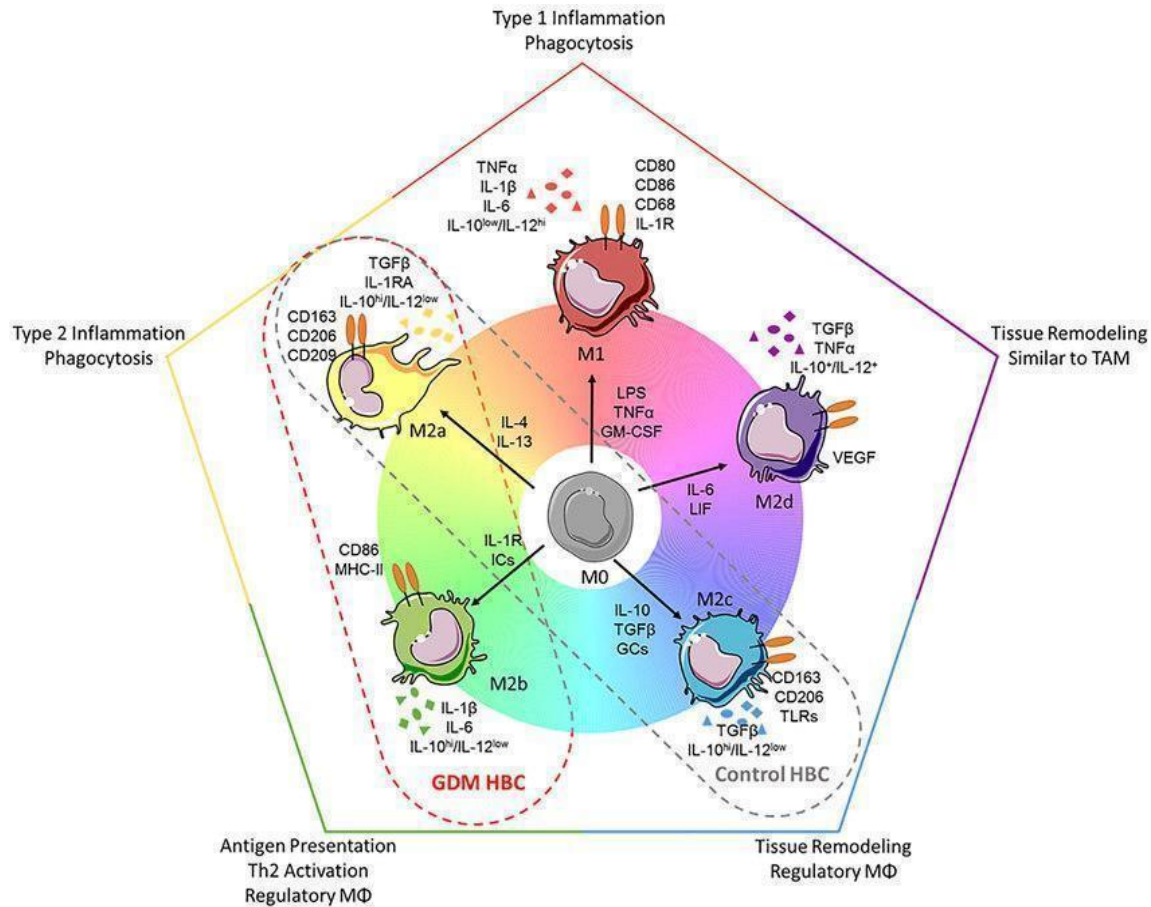


Figura 7. Espectro de polarización de macrófagos humanos. A pesar de haber varios estados intermedios, clásicamente se dividen en 2 categorías: M1 (de activación clásica y perfil inflamatorio) y M2 (de activación alternativa y perfil antiinflamatorio). Dentro de este espectro se ha dividido a los M2 en fenotipos M2a, M2b, M2c y M2d. Siendo cada uno inducido por ciertas citocinas, teniendo cada uno diferentes marcadores de superficie, con liberación distinta de citocinas y con diferente funcionalidad (Tomado de 62).

2.2.2.2.2 CITOCINAS

- **INTERLEUCINA-4.**- Es una citocina producida por M θ 's M2a y otras células, tanto de forma basal como por acción de la misma citocina mediante retroalimentación positiva por el factor de transcripción AP-1 (63-68). Tras la activación por TLRs, mediante la vía de MyD88, se activan NF-kB y AP-1 que fomentan la producción de IL-4. Al mismo tiempo IL-4 es producida por retroalimentación de la misma citocina que al unirse a su receptor, activa las vías de JAK que fosforilan a STAT6 permitiendo su traslocación al núcleo y con ello polarización al fenotipo M2a

(61,63,65-69) (Figura 8). Otro mecanismo es la activación de NFAT por calcineurina (Figura 8). NFAT, en su vía de activación, se transloca al núcleo y junto con AP-1 que viene de la vía de PKC/RAC/RAS ayudan a la transcripción del gen para IL-4 (63,65-69).

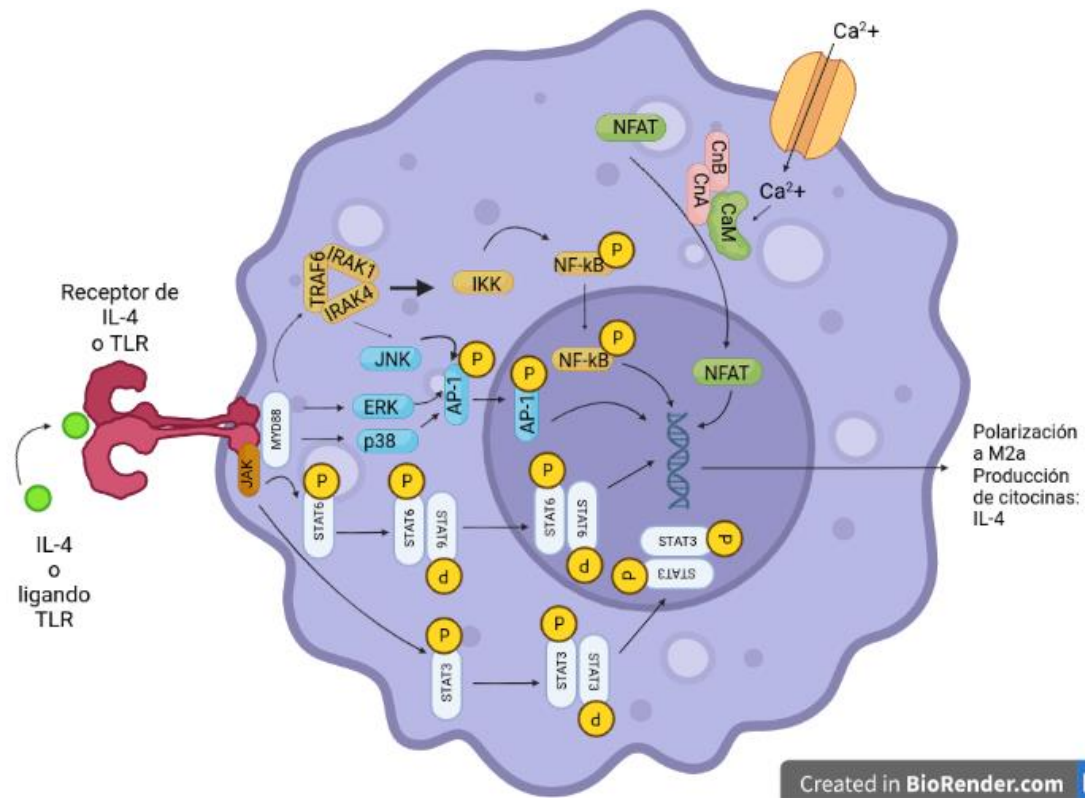


Figura 8. Vía de producción y señalización de IL-4. IL-4 al unirse a su receptor o al unirse TLR con su ligando, se activan las vías de JAK que fosforilan STAT3 y STAT6, los cuales al activarse translocan al núcleo donde fomentan tanto la expresión de IL-4 que funciona como retroalimentación positiva como la polarización del macrófago a perfil M2a. Otra vía es mediante la activación de MyD88 se produce la activación de TRAF6/IRAK1/IRAK4 que activa NF-κB y la vía de MAPK (JNK, ERK, p38) que activan AP-1. Ambos factores de transcripción al activarse translocan al núcleo y participan en la producción de IL-4. Otra vía de producción de esta citocina es de manera basal por activación de NFAT por Calmodulina, la cual requiere del calcio intracelular que es transportado por canales iónicos y bombas constitutivas de la célula. (65-68).

- **INTERLEUCINA-10.-** Esta citocina es producida como parte de la respuesta a la activación de TLR4 por las vías de ERK1/2 y p38 que activan al factor de transcripción CREB, y a su vez esta citocina estimula su propia producción por retroalimentación positiva por el receptor de IL-10 que activa JAKs y estas al factor de transcripción STAT3 que lleva a producir moléculas inflamatorias, entre ellas IL-10 (70-72). Además, al translocar STAT3 al núcleo activa genes efectores encargados de la represión de genes proinflamatorios a nivel de transcripción y fomenta la polarización al perfil M2c (70-72). Entre sus efectos está el inhibir funciones de los M0's clásicos, incluida la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , la producción de NO, la expresión de MHC de clase II y moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 (7,20,73).

Se produce principalmente mediante MAPK, ERK 1/2, p38, MSK1 y factores de transcripción como CREB, NF- κ B, C/EBP β , C/EBP δ y Nrf2 (74-76). La vía de señalización de IL-10 mejor caracterizada es el sistema Jak/STAT, en la cual la interacción IL-10/IL-10R involucra a las tirosina cinasas de la familia Jak (Jak 1 y Tyk2, que están asociadas con IL-10R1 e IL-10R2, respectivamente) (7,73). Esta citocina induce la fosforilación de tirosina y la activación de los factores de transcripción latentes STAT3, STAT1 lo que regula al alza la expresión de SOCS3 previniendo la translocación nuclear de NF- κ B y fosforilación de ERK 1/2 (20,73,76) (Figura 9). Los efectos inhibidores de IL-10 sobre IL-1 β y la producción de TNF- α son cruciales para su actividad antiinflamatoria, ya que estas citocinas a menudo tienen actividades sinérgicas en vías y procesos inflamatorios y amplifican estas respuestas al inducir mediadores secundarios como quimiocinas (MCP 1, MCP-5, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , RANTES, MDC), prostaglandinas y PAF(20,73).

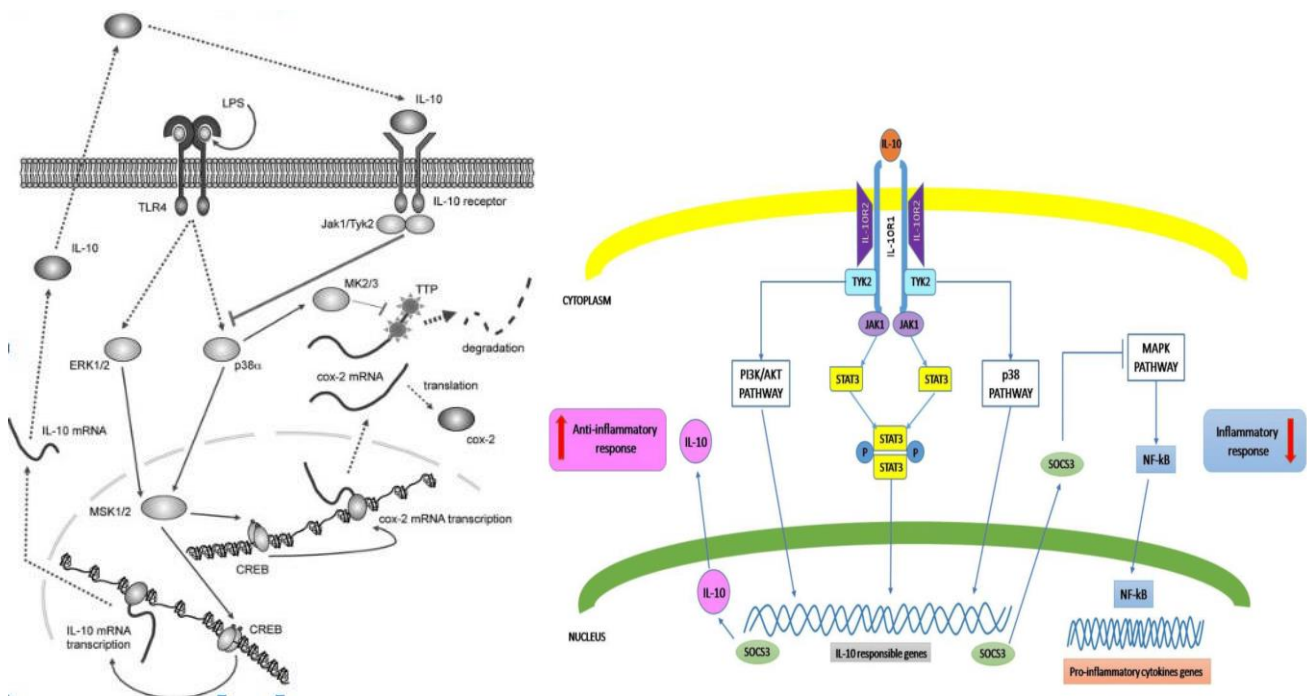


Figura 9. Vía de producción y señalización de IL-10/IL-10R. a) Tras la unión de TLR4 con su ligando, la vía de MyD88 lleva a la activación de las vías de MAPK ERK 1/2 y p38 que activan MSK 1/2 y esta a su vez activa CREB dentro del núcleo, lo que permite que transcriba para la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10. IL-10 a su vez puede retroalimentar positivamente su producción al unirse al receptor IL-10R, lo que lleva a la activación del factor de transcripción STAT3, el cual forma homodímeros y trasloca al núcleo para fomentar la producción de moléculas antiinflamatorias, entre ellas nuevamente IL-10. b) Tras la unión de IL-10 con los dímeros que forman su receptor, se activan: 1) la fosforilación de STAT3 mediada por JAK1 y TYK2, tras la cual se forman homodímeros de STAT3 fosforilado que son capaces de traslocar al núcleo donde al unirse con elementos de respuesta lleva a la expresión de mediadores antiinflamatorios entre los cuales se encuentran IL-10, llevando a cabo una retroalimentación positiva y la inhibición de señalización de

TLRs como TLR4 a nivel de IRAK y TRAF6 lo que lleva a la disminución de expresión de proteínas proinflamatorias, y 2) las vías de señalización de AKT y p38 que estimulan la producción de moléculas antiinflamatorias como SOCS3 (Tomado de 77).

- **TGF- β .**- Esta citocina se produce de manera constante y es sintetizada como un precursor (pro-TGF- β) el cual es procesado por el aparato de Golgi. Se asocia con el homodímero Proteína Asociada a Latencia (LAP) al madurar y es secretado solo o en conjunto con la Proteína de Unión de TGF- β Latente (LTBP). Para que pueda actuar necesita liberarse por el Activador de TGF- β (TA) por proteólisis de LAP o cambios conformacionales (78). Esta citocina al unirse a su receptor (TGF- β RI o TGF- β RII) activan río abajo Smad7 y posteriormente las vías que convergen en la activación del dímero Smad2/3-Smad4 que se une al DNA lo que ayuda a la producción de citocinas no inflamatorias y bloquean la expresión de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y puede activar otras vías como MAPK, PI3K, PP2A, Rho y Par6 (44,78,79) (Figura 10).

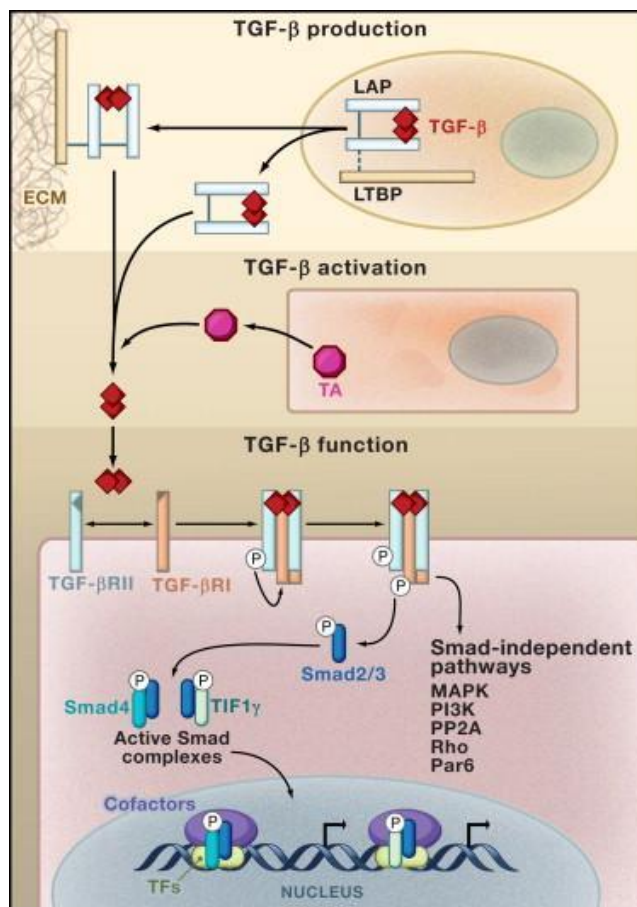


Figura 10. Vía de producción y señalización de TGF- β /TGF- β R. a) Es sintetizada constitutivamente como precursor pro- TGF- β , el cual madura en el aparato de Golgi para luego asociarse a homodímeros LAP y estos pueden unirse a LTBP. Para la liberación debe darse proteólisis de LAP o que sufra cambios conformacionales por TA. b) Tras la unión de TGF- β con los dímeros que forman su receptor, se activan: 1) la vía de TAK1, MLK3 y MEKK1 que activa MKK3/6 y esto activa p38MAPK y MKK4, este último activa JNK y esto lleva a la activación de Smad2/3 que se unen a Smad4, 2) la vía de Smad2/3 que interactúa con la vía anterior mediante JNK y 3) la vía de

Shc/GRB2 que lleva a la activación de Erk que interactúa con la vía anterior en Smad2/3. Smad2/3 al unirse a Smad4 puede translocar al núcleo y fomentar la producción de moléculas antiinflamatorias (Tomado de 78).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Los signos característicos de la respuesta inflamatoria son:

- Calor, debido al aumento local de la temperatura secundaria a la vasodilatación y al aumento del consumo local de oxígeno (2,5,80).
- Rubor, producido por el aumento de irrigación en la zona afectada, por incremento del flujo sanguíneo (2,5,80).
- Dolor, provocado por distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas como mediadores químicos (2,5,80).
- Edema, resultante del aumento de la permeabilidad capilar y consiguiente difusión de líquido en el tejido intersticial (2,5,80).
- A estos signos Rudolf Virchow, les sumó un quinto signo clínico: la pérdida de funcionalidad, resultante de la limitación a la que conduce la conjugación de los cuatro signos ya mencionados (5,7,80).

Otras consecuencias funcionales son la aparición de síntomas sistémicos como fiebre, aumento del número de neutrófilos circulantes (neutrofilia), aumento de frecuencia cardíaca (taquicardia), sensación de ansiedad y aprensión, aparición del síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y la sepsis (posterior a procesos infecciosos) (7,9,80).

De los signos, la vasodilatación depende de TNF- α , que estimula la producción de iNOS en los M ϕ 's y a COX-2 para aumentar la producción de PGE2, PGF2 α y PGI2, de las cuales PGI2 tiene la mayor actividad vasodilatadora (43). El edema es inducido por acción de histamina, serotonina, cininas, y anafilotoxinas de complemento; los cuales actúan en los mastocitos para liberar histamina, óxido nítrico, factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandinas; lo que resulta en acumulación de infiltrado celular fuera del compartimento vascular, aunque suele ser reversible y transitorio (7,80,81). TNF- α también causa disrupción de la estructura del endotelio al inducir la activación de metaloproteinasas que degradan el glicocálix endotelial, desestabiliza el citoesqueleto de las células endoteliales, causa la fosforilación de tirosina en la cadherina (proteína importante en las uniones celulares) y por el aumento de expresión de receptor B1 de bradicinina (43) lo que facilita la extravasación de los neutrófilos. La aparición de

fiebre por TNF- α (que llega al hipotálamo atravesando la barrera hematoencefálica o por transporte activo mediado por células a su alrededor) se da al actuar sobre células endoteliales del hipotálamo o la microglía de la zona para producir PGE₂, que se une al receptor 3 de PGE de las neuronas termorreguladoras del núcleo supraquiasmático lo que incrementa la temperatura (43).

Durante la inflamación crónica, aparecen signos y síntomas como artralgias y mialgias generalizadas o localizadas, fatiga crónica, insomnio, depresión, ansiedad, complicaciones gastrointestinales (como constipación, diarrea y reflujo), pérdida o aumento de peso, presencia de infecciones recurrentes y/o granulomas (82,83).

Por otra lado, en la meta-inflamación hay evidencia de hipoxia del tejido adiposo por la compresión de los capilares y flujo inadecuado de sangre, ocasionando apoptosis y con ello la secreción de citocinas proinflamatorias (84). También hay aumento de ácidos grasos en la circulación, los cuales se pueden acumular en varios sitios, entre ellos el hígado y músculo esquelético, donde producen intermediarios como diacilglicerol y ceramidas; estos pueden inhibir la señalización intracelular de insulina por la activación de JNK o inhibición de IKK β , las cuales debilitan la señalización de insulina por la fosforilación de serina del IRS, causando una resistencia sistémica a la insulina con una disminución del transporte de glucosa (84,85). También se asocia con albuminuria, fibrosis renal y resistencia a la insulina, además de acumulación de lípidos que aumentan la respuesta inflamatoria local (85).

2.4 TRATAMIENTOS ANTIINFLAMATORIOS

Entre los más utilizados actualmente se encuentran los AINES y los esteroides:

AINES. – Estos antiinflamatorios Inhiben las enzimas ciclooxigenasas, los de la nueva generación inhiben principalmente las COX2. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la primera enzima en la vía sintética de PG's y leucotrienos (LT's) al encargarse de convertir al ácido araquidónico en los productos intermediarios PGG₂ y PGH₂, y conducir a la producción de prostanoïdes, TXA₂ y diversas PG (86-88). La inhibición de la COX-2 contribuye a las acciones antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias; mientras que la inhibición simultánea de COX-1 contribuye a los efectos secundarios (86-88). La mayoría de los AINES son inhibidores competitivos, reversibles y que actúan en el sitio activo de COX; aunque en el caso del ácido acetilsalicílico (ASA), este acetila las enzimas y las inhibe de manera irreversible (86,87). Las clases de AINES incluyen salicilatos (ASA, diflunisal), derivados de para-aminofenol

(paracetamol), derivados de ácido acético (indometacina, sulindaco, etodolaco, tolmetina, ketorolaco, diclofenaco), fenamatos (ácido mefenámico, meclofenamato, ácido flufenámico), derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina), derivados del ácido fenólico (piroxicam, meloxicam, nabumetona) y AINES diarilheterocíclicos (celecoxib, parecoxib, etoricoxib y lumaritoxib) (86,88,89). Pese a su eficiencia y aunque se ha buscado que sean selectivos para la COX2, la mayoría de ellos afectan al igual a la COX1, por lo cual se producen efectos adversos como dolor abdominal, náusea, diarrea, úlceras gástricas, retención de líquidos y sodio, cefalea e inhibición de activación de plaquetas (88).

Corticosteroides. - Son esteroides sintéticos similares a las hormonas producidas en la corteza suprarrenal (90,91) y se unen a receptores de glucocorticoides (GR) en el citoplasma, produciendo un cambio estructural y transloca al núcleo donde forman homodímeros y se unen al DNA en los elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) (90,91) o a los factores de transcripción. La acción de estos fármacos se da por 2 procesos que se relacionan con la expresión o la inhibición de moléculas inflamatorias o antiinflamatorias.

En la transactivación se induce la expresión de genes que codifican para proteínas antiinflamatorias y la transrepresión (la supresión de genes), se inhibe la producción de proteínas proinflamatorias (90), que se puede deber a la interacción con el promotor del gen correspondiente. A pesar de su gran eficiencia presentan efectos adversos relacionados con su uso prolongado como hipertensión, hiperglucemia con glucosuria, mayor susceptibilidad a infecciones, úlceras gastroduodenales, miopatías, nerviosismo, insomnio, cataratas, osteoporosis, osteonecrosis y retraso del crecimiento (88). El corticoide más utilizado es la dexametasona, de larga duración de acción, elevada potencia antiinflamatoria e inmunosupresora y baja actividad mineralocorticoide, cuya vía de administración puede ser oral, intravenosa, intraarticular o intramuscular y con dosis individualizada en base a la enfermedad y respuesta del paciente (91,92).

2.5 MACRÓFAGOS RAW 264.7

Se trata de una línea celular obtenida por el Dr. Peter Ralph en 1977 y se diferencia de otras por la necesidad de activarlas con LPS para producir NO al no ser suficiente su interacción con INF- γ . Proviene de ascitis de ratón, y entre sus aplicaciones más importantes está su uso como modelo para estudio de procesos inflamatorios, ya que presentan las características clásicas de un macrófago

activado como en la fagocitosis de perlas de látex y zymosan, la producción de ON y de citocinas, así como de cambiar su perfil de acuerdo a las condiciones de cultivo, es decir, tiene la capacidad de cambiar a las diferentes clases de M2 que se han reportado en la bibliografía (93-95).

2.6 FITOFÁRMACOS

Las plantas y sus componentes se han utilizado durante siglos por sus propiedades medicinales. Uno de los fármacos antiinflamatorios (y antiplaquetarios) más utilizados es la aspirina, el cual es un inhibidor de la COX que se desarrolló originalmente a partir de un producto natural (96-98). Han pasado casi 250 años desde que se descubrió por primera vez que la corteza del sauce (género *Salix*) podría tratar los síntomas de la fiebre, tras el cual se estimuló más investigaciones y, finalmente, el componente activo salicina se aisló de la corteza de sauce en 1828 y poco después, se aisló de otra planta, la reina de los prados (*Filipendula ulmaria*) (96-98). A lo largo del siglo XIX, la investigación continuó mejorando las propiedades farmacéuticas de la salicina, con la síntesis exitosa de ácido acetilsalicílico en 1899, que fue comercializado como aspirina (96,97).

La investigación de fitofármacos intenta rescatar el conocimiento de la flora medicinal, descubrir su potencialidad terapéutica y realizar los procedimientos de investigación pertinentes para que dichos productos puedan ser dosificados adecuadamente con mayor calidad y seguridad que permita ponerlos al alcance del médico a través de la prescripción. En México se ha documentado ampliamente el uso de plantas como remedios para el cuidado de la salud (96,97). Numerosas publicaciones etnobotánicas describen el empleo de los recursos herbolarios, lo que hace de las plantas no sólo un recurso natural sino parte de la historia y presente de un país y un importante segmento de la “cultura médica tradicional” preservado a través de generaciones, que en algunos grupos de la población continúa siendo el único recurso para el tratamiento de las enfermedades (96-98).

Debido a ello, la Secretaría de Salud reconoció la importancia de crear un marco de regulación para el control de las plantas medicinales como recursos terapéuticos y fue a partir de 1998 que reconoció al “medicamento herbolario” dentro de la medicina oficial (97). Los fitofármacos o medicamentos herbolarios se definen como: “los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos, y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional” (96,97). Es

importante mencionar que no se consideran fitofármacos o medicamentos herbolarios aquellos asociados a principios activos aislados y químicamente definidos, ni aquellos propuestos como inyectables (96,97).

2.7 CUCURBITÁCEAS COMO ANTIINFLAMATORIOS

La familia de las Cucurbitáceas incluye plantas con valor medicinal valioso y se compone de más de 130 géneros y cerca de 800 especies (99-101). Las semillas o partes del fruto de algunos de sus miembros se ha reportado que poseen efectos laxantes, eméticos y antihelmínticos debido al metabolito secundario cucurbitacina, el cual también ha sido investigado por sus propiedades citotóxicas, hepatoprotectoras, antiinflamatorias y cardiovasculares (99-101).

Se ha reportado que varias plantas de esta familia se usan para controlar procesos inflamatorios como *Telfairia occidentalis*, *Zehneria scabra* y *Lagenaria breviflora*, las cuales poseen moléculas como alcaloides, saponinas, terpenoides, taninos, fitosteroles y flavonoides que se ha reportado que inhiben la expresión de COX-2, la producción de PGE2, la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 e inducen la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 (102-104). Me parece que en esta sección introduce a *Sechium edule* como un ejemplo de Cucurbitáceas.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Sechium edule*.

En la medicina tradicional de varios países, el chayote se utiliza para el tratamiento de patologías como el síndrome metabólico e inflamación (98,105,106). Es una planta herbácea originaria de México que crece en climas de cálidos a templados y de los 500 a los 2000 m de altitud (98,105,106). Es una planta enredadera trepadora de hojas acorazonadas que puede llegar a tener una longitud de 8 a 15 cm (98,105,106). Las hojas jóvenes presentan pubescencia y las hojas más viejas son de textura áspera y fibrosa (98,105,106). Presentan zarcillos para sujeción, sus flores son unisexuales, de color blanquecino-amarillo en forma de estrella, organizadas en racimos de 10 a 30 cm de largo (98,105,106). El fruto es liso o con espinas, de forma ovoide o globosa y tiene una coloración verde pálido a verde oscuro, es carnoso cuando está tierno y al madurar la pulpa se vuelve fibrosa, su sabor es muy suave y delicado (insípida) y presenta una semilla suave y aplanada, mientras que los tallos son largos y glabros y de una misma raíz se pueden formar muchos tallos (98,105,106). La raíz produce raíces adventicias de forma tuberosa y al igual que el fruto también es comestible (98,105,106).

Información taxonómica:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Cucurbitales

FAMILIA: Cucurbitaceae

GÉNERO: *Sechium*

ESPECIE: *Sechium edule*

3.2 ETNOMEDICINA DE *Sechium edule*

La inflamación juega un papel preponderante en el desarrollo gran parte de las enfermedades crónicas sin importar su etiología, y actúa en conjunto con otro factor preponderante de generación de daño e incremento del estado proinflamatorio como lo es el estrés oxidante (78). En la medicina tradicional mexicana la planta ha sido utilizada por sus diversas propiedades, en las que actúa como antiinflamatorio, vasodilatadora, hipotensora y antioxidante (107). La planta se utiliza como infusión de hojas para el tratamiento de padecimientos renales como dolor renal, cálculos renales y disuria, enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis e hipertensión, patologías de origen gastrointestinal como gastritis y estreñimiento, y en parasitosis intestinal (107).

Las propiedades diuréticas, antioxidantes, antihipertensivas y antiinflamatorias de las hojas, frutos y semillas han sido confirmadas por estudios farmacológicos como las investigaciones de Siciliano (2004), Castro (2014) y Ramírez (2019) sobre el efecto antiinflamatorio, Siciliano (2004) y Ordoñez (2005) como antioxidante, Lombardo (2008) y Castro (2014) como antihipertensivo, Sateesh (2012) como antiulcerante, Trejo (2018) como antidisfunción endotelial y Alvarado (2018) como antifibrótico y antiesteatótico, (98,105,106,108,109).

3.3 FITOQUÍMICA DE *Sechium edule*

Siciliano y colaboradores reportaron que la raíz de *S. edule* presenta flavonoides con uniones C-glucosídicas y O-glucosídicas, como la apigenina y luteolina, los cuales están relacionados con efectos vasorrelajantes, antioxidantes, antiinflamatorios y hepatoprotectores (105,106,108,109).

Costet (2020) identificó en el extracto rSe-HA como compuestos mayoritarios: ácido cinámico, estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one y stigmasta-5,22-dien-3-ol, ácido hexadecanoico, ácido hexadecanoico-metil-éster, metil tetradecanoato y el ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxipropil-éster y ácido cumárico los cuales poseen efectos como antioxidantes al actuar sobre los radicales libres producidos y antiinflamatorios al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y aumentar la producción de citocinas antiinflamatorias (98,105,108). Aunque se tiene referencia de la presencia de

moléculas como la vitexina, ácido palmítico, ácido linoleico, cloruro de ácido linoleico, 11-Z-ácido hexadecanoico y 2- palmitoilglicerol (98,105,106,108,109).

En la tabla 3 se muestran las diferentes moléculas halladas en rSe-Ha y sus efectos reportados sobre la respuesta inflamatoria (103,110-132).

Tabla 3. Moléculas encontradas en el rSe-HA y sus efectos asociados.		
Tipo de molécula	Moléculas	Efecto
Flavonoides	Vitexina	Inhibe la activación de NF- κ B y la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-33, y TNF- α , iNOS, PGE2 y MCP-1, reduce la expresión de p38MAPK, ERK1/2 y JNK y aumenta la expresión de IL-10.
Terpenos	Estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one y stigmasta-5,22-dien-3-ol	Inhiben la activación de NF- κ B, la expresión de COX-2 y la actividad de PLA2.
Ácidos carboxílicos (Fenilpropanoides)	Ácido cinámico	Desactivación proteincinasa 5 activada, lo que inhibe las vías MAPK y NF- κ B, inhibe la fosforilación de JNK, NF- κ B y p38MAPK lo que resulta en la disminución de iNOS y COX-2 y de TNF- α , IL-1 β e IL-18.
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cumárico	El primero disminuye la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α y NF- κ B p65. El segundo inhibe la expresión de COX-2 e

		iNOS, lo que disminuye la producción de NO.
Ácidos grasos	Ácido hexadecanoico, Ácido hexadecanoico-metil-éster, Metil tetradecanoato y el Ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxi-propil-éster	Disminuyen los niveles de TNF-a, IL1b, IL6, e inhiben NFkB e iNOS, además de inhibir la actividad de NO y producción de COX2.

3.4 VENTAJAS DE *Sechium edule*

S. edule, es considerada por la FDA como una planta GRAS (106,133,134). Se denomina como un producto tipo "GRAS" (acrónimo de la frase "Generalmente Reconocido como Seguro") a cualquier sustancia que se agregue intencionalmente a los alimentos como un aditivo alimentario [de acuerdo a las secciones 201 (s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos] y que está sujeto a revisión y aprobación previas a la comercialización por parte de la FDA, a menos que en la sustancia sea generalmente reconocido, entre los expertos calificados, que ha demostrado adecuadamente que es seguro en las condiciones de su uso previsto, o a menos que el uso de la sustancia esté exceptuado de la definición de aditivo alimentario (106,133,134).

4. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inflamatoria es un mecanismo complejo que involucra diversos procesos como la activación de diversos factores de transcripción entre ellos NF- κ B y AP-1 que llevan a la expresión de genes que codifican para proteínas que actúan en diferentes partes de este proceso. Entre las moléculas producidas están las COX, que son una familia de enzimas que al activarse producen diversos eicosanoides que participan en la inducción de las características patognomónicas de la inflamación y sobre ellas actúan los antiinflamatorios no esteroideos. La nueva generación AINES tratan de solo actuar sobre la COX-2, sin embargo, dicha especificidad no ha sido alcanzada por completo. Por otro lado, los antiinflamatorios esteroideos actúan de manera más profunda, evitando la acción de los factores de transcripción o evitando o promoviendo la expresión de genes que modulan la respuesta inflamatoria, sin embargo, este proceso tampoco es selectivo ya que actúan sobre genes no relacionados con la respuesta inflamatoria lo que genera problemas no deseados.

Hay enfermedades inflamatorias crónicas que requieren del uso a largo plazo de antiinflamatorios, sin embargo, por los problemas no deseados mencionados, no se recomienda su uso prolongado. Por esta razón los fitomedicamentos, que en sí son un conjunto de moléculas con diferentes blancos terapéuticos, son una posibilidad de interés.

S. edule suele usarse para tratar diversas patologías en las cuales la inflamación juega un papel preponderante. En resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, se ha evidenciado la eficacia tanto de su extracto hidroalcohólico como de las fracciones acetónica y metanólica para controlar la producción de citocinas y moléculas de adhesión en enfermedades como la disfunción endotelial, o la producción de citocinas proinflamatorias en la esteatosis hepática no alcohólica, sin embargo no se ha comprobado si el extracto en sí funciona como antiinflamatorio.

Los macrófagos juegan un papel central en este proceso y al censar cambios en la homeostasis, se activan y adquieren características inflamatorias como ser fagocíticos, producir ON y citocinas proinflamatorias. Con base en lo anterior, surge la pregunta de investigación que rige este proyecto que es ¿El extracto hidroalcohólico de *Sechium edule* modula la producción de óxido nítrico, la fagocitosis y la producción de citocinas de macrófagos RAW 264.7 activados por LPS?

5. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* modula la producción de óxido nítrico, la fagocitosis y la producción de citocinas de macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el extracto hidroalcohólico de *Sechium* para modular la producción de óxido nítrico, la fagocitosis y la producción de citocinas de macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la CE del *rSe-HA* para el control de la activación de los macrófagos RAW 264.7 a través de la producción de TNF- α .
2. Evaluar el efecto de la CE del *rSe-HA* sobre la producción de nitritos de los macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.
3. Evaluar el efecto de la CE del *rSe-HA* sobre la actividad fagocítica de los macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.
4. Evaluar el efecto de la CE del *rSe-HA* sobre la producción de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, y TGF- β de los macrófagos RAW 264.7 activados por LPS.

8. METODOLOGÍA

8.1 CULTIVO DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC ® Tib-71 TM) se cultivó en atmósfera de CO₂ al 5 % y a 37 °C en medio DMEM ADVANCED (GIBCO) suplementado con 1% de glutamina, 5% de SFB (inactivado por calentamiento a 56 °C) y con antibiótico Penicilina-Estreptomicina (1%) en frascos de cultivo de 150 cm² hasta alcanzar una confluencia del 70-90%. Se retiró el medio de cultivo y las células fueron desprendidas con 6 mL de tripsina Verseno (GIBCO) 0.05% y se incubaron en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C por 30 min. Pasado ese tiempo, las células se desprendieron por golpes suaves en la base de la caja y mediante uso de un gendarme, e inmediatamente se inactivó la tripsina mediante la adición de 10 mL del mismo medio de cultivo. La suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Para determinar la concentración efectiva que se usaría a lo largo de los experimentos, primero se evaluó la toxicidad de los tratamientos que se utilizarían, para lo cual las células se sembraron en cajas de 96 pozos y con una densidad de 2.5×10^5 células/pozo. Las condiciones de cultivo para estos experimentos fueron células sanas sin tratamiento, DMSO al 60% (control de muerte), LPS 100 ng/ml (control de activación), dexametasona 84 mM (control farmacológico) y rSe-HA a diferentes concentraciones (0.1875, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 µg/mL) durante 24 horas. Por otro lado, para la determinación de la concentración efectiva (CE) las condiciones de cultivo fueron las mismas a excepción del DMSO.

Una vez determinada la CE ésta fue la que se usó para las posteriores evaluaciones en las que se utilizaron los controles antes descritos. Para todas las evaluaciones, a excepción de la de toxicidad, las células se sembraron en una densidad de 1.25×10^6 células/pozo en placas de 24 pozos. El protocolo de cultivo para llevar a cabo las diferentes evaluaciones abarcó 24 horas para el establecimiento del cultivo, 4 horas de exposición a LPS y 12 ó 22 de exposición a los diferentes tratamientos.

8.1.1 VIABILIDAD CELULAR POR CRISTAL VIOLETA

Una vez pasado el tiempo experimental, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células (100 µL de PBS por pozo), se agregaron 50 µL/pozo de solución de cristal violeta 0.1% y se incubaron por 25 minutos a

temperatura ambiente (TA). Pasado el tiempo de incubación se lavaron nuevamente hasta retirar el excedente del colorante y se dejó secar la placa sin tapa por 2 horas a TA. Posteriormente se agregaron 200 μ l de metanol al 100% y se dejó incubar la microplaca durante 25 minutos a TA. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (VersaMax, Molecular Device).

8.1.2 OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA

Para esta evaluación, las células se sembraron en las condiciones descritas en la sección 8.1. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se cosechó en tubos Eppendorf y se congelaron a -80°C hasta su uso. Para la determinación de esta concentración se utilizó como parámetro la disminución de la concentración de TNF- α en el medio de cultivo.

8.1.3 TÉCNICA DE ELISA

Se utilizaron los kit de ELISA mouse TNF- α (BD OptEIA™), TGF- β (marca), IL-4 (marca), IL-6 (marca) e IL-10 (marca). Brevemente, siguiendo las indicaciones de los fabricantes, el ELISA en sándwich se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano. Las microplacas se cubrieron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos de captura para la citocina correspondiente. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces para TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6 e IL-10 con PBS-Tween 20 (0.05%), se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-BSA 1% (200 μ l/pozo) y se lavaron tres veces para TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6 e IL-10. Las placas se incubaron por dos horas con las diferentes muestras o con el estándar de la citocina (TNF- α 500-7.8125 pg/ml, TGF- β 1000-15.625 pg/ml, IL-4, IL-6 e IL-10 2000-31.25 pg/ml) a temperatura ambiente. Posteriormente se volvieron a lavar (tres veces para TNF- α y TGF- β y cinco veces para IL-4, IL-6 e IL-10) y se incubaron en el caso de TNF- α y TGF- β con el anticuerpo de detección mientras que en el caso de IL-4, IL-6 e IL-10 con el conjugado de anticuerpo de detección y enzima HRP por 1 hora a temperatura ambiente.

Tras el tiempo de incubación las placas destinadas a TNF- α y TGF- β se lavaron 3 veces más respectivamente y tras ello se incubaron con enzima HRP por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron los lavados correspondientes (cinco veces para TNF- α , tres veces para TGF- β y siete veces para IL-4, IL-6 e IL-10) y se agregó TMB (200 μ l/pozo) dejando incubar durante 5 (TNF- α) y 30 min (TGF- β , IL-4, IL-6 e IL-10) en oscuridad. Finalizada la incubación se detuvo la reacción con H_2SO_4 0.2N y se leyeron las placas a una longitud de onda de 450 nm a 37°C con el

equipo VersaMax (Molecular Device). Se determinaron las concentraciones de las citocinas empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una $R^2 > 0.95$.

8.2 CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR REACCIÓN DE GRIESS

En una placa de 96 pozos se depositaron 60 μL de cada sobrenadante del cultivo celular y se mezclaron con 100 μL del reactivo de Griess, este último se preparó mezclando una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0,1% p/v en 5% de HCl) con una solución de sulfanilamida (2% p/v en 5% HCl), dejando reposar por 5 minutos en oscuridad a 37°C. Finalmente se realizó la cuantificación colorimétrica con un lector de microplacas VersaMax (Molecular Device) a $\lambda = 540 \text{ nm}$. Se determinó la concentración de nitritos empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una $R^2 > 0.95$.

8.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FAGOCITICA POR ROJO NEUTRO

Una vez pasadas las 12 o 22 horas experimentales, se retiró el medio y se agregaron 200 μL de tinte rojo neutro incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se lavaron las células con dH_2O y se lisaron con 200 μL de metanol al 100% a temperatura ambiente por 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación se tomaron 100 μL de las diferentes muestras y se colocaron en placas de 96 pozos y se determinó la concentración con base en la absorbancia leída a 490 nm en un lector de placas VersaMax (Molecular Device).

8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos de cada uno de los parámetros analizados se recopilaron en una base de datos utilizando un programa Excel y posteriormente se analizaron con el programa INSTAT, la significancia de la diferencia entre los grupos se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey como prueba post-hoc con un valor de significancia de $P < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Las concentraciones de *rSe-HA* a evaluar son inocuas para las células.

El ensayo de cristal violeta permite medir la viabilidad celular de manera directa al ser un reactivo que se une al DNA y proteínas de células vivas, en este caso a los MØ's adheridos. Con la intención de determinar la CE del extracto, primeramente se evaluó el efecto tóxico de las diferentes condiciones a evaluar a través por este método. Para ello, se sembraron células RAW 264.7 por toda la noche y posteriormente se colocaron los diferentes tratamientos por 24 horas, tras ello se realizó la técnica mencionada. Como se indica en la figura 11, los resultados indican que ninguno de los tratamientos que se utilizaron a lo largo de este trabajo (Dexametasona 84 mM, LPS 100 ng/ml) ni las diferentes concentraciones de *rSe-HA* (0.1875, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 µg/ml) afectaron la viabilidad de las células, mientras que el DMSO (60%), que fue utilizado como control de muerte, disminuyó 92.6% ($P < 0.05$) la concentración de cristal violeta. La inocuidad de los tratamientos valida a los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones.

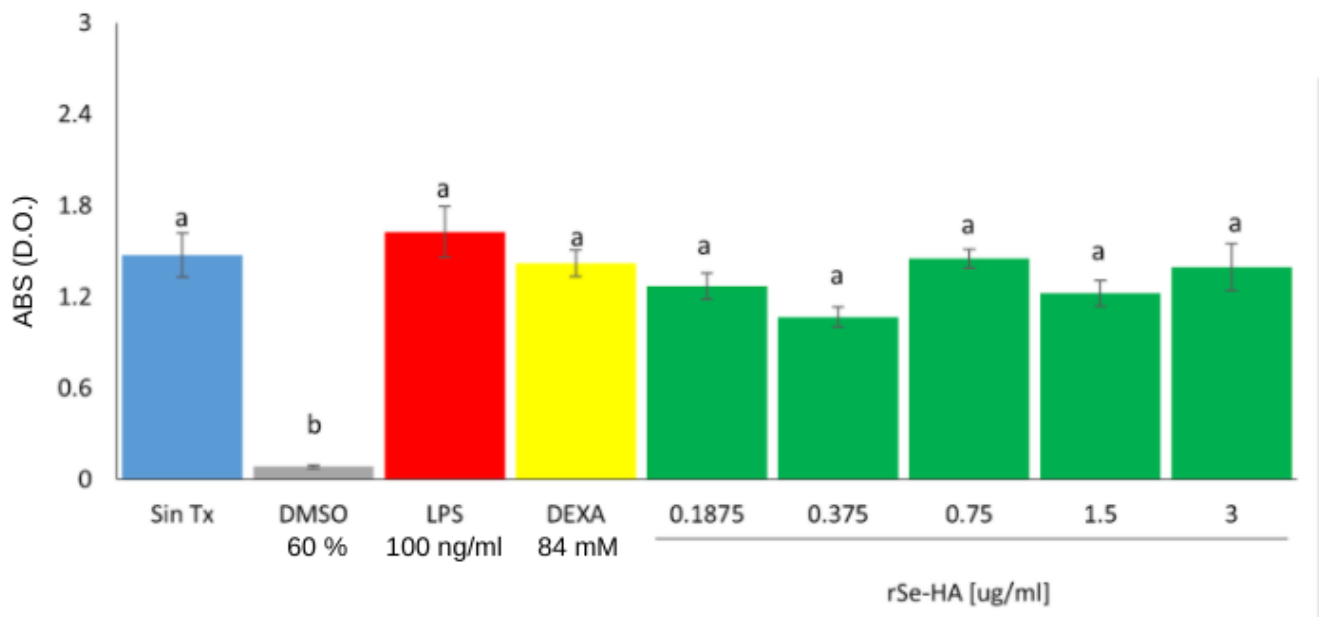


Figura 11. Evaluación de la toxicidad de las diferentes concentraciones del extracto *rSe-HA*. En la gráfica se representa la absorbancia del reactivo a 570nm de cada grupo evaluado. En esta evaluación se evalúa el efecto del DMSO (60%) como control de muerte. Las muestras se obtuvieron de cultivos de MØ's RAW 264.7 que se mantuvieron por toda la noche con LPS (100 ng/ml) a las cuales se les agregaron los diferentes tratamientos manteniendo los estímulos del LPS. Las muestras se tomaron 22 horas después de este último tratamiento. Los grupos analizados fueron células sin tratamiento, LPS (100 ng/ml), LPS+DEXA (84 mM), LPS + diferentes concentraciones de *rSe-HA*

(0.1875, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 $\mu\text{g/ml}$). Los datos se analizaron con la prueba Tukey con una $p < 0.05$ considerada como significativa. Literales diferentes implican diferencias significativas. Las diferentes condiciones a utilizar en los experimentos posteriores no afectan a la viabilidad de las células, lo que valida su uso para la determinación de la CE.

9.2 La Concentración Efectiva de *rSe-HA* es de 0.75 $\mu\text{g/ml}$

Una vez evaluada la inocuidad de los tratamientos, se determinó la CE, a través de la producción de $\text{TNF}\alpha$. Para lo cual los MØs se estimularon con LPS por 4 horas y posteriormente se incubaron con las diferentes concentraciones a evaluar durante 22 horas. La concentración de la citocina se determinó por ELISA en el medio de cultivo.

Como se aprecia en la figura 12, las concentraciones de 0.375, 0.75 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ llevaron la concentración de esta citocina al nivel del grupo tratado con dexametasona pese a la presencia constante del estímulo de LPS. De estas concentraciones se escogió la de 0.75 por ser la intermedia. De los controles, el LPS incrementó 97.2% ($P < 0.05$) la concentración de esta citocina con respecto al control. A partir de estos resultados se escogió la concentración de 0.75 $\mu\text{g/ml}$ para la realización de las diferentes evaluaciones.

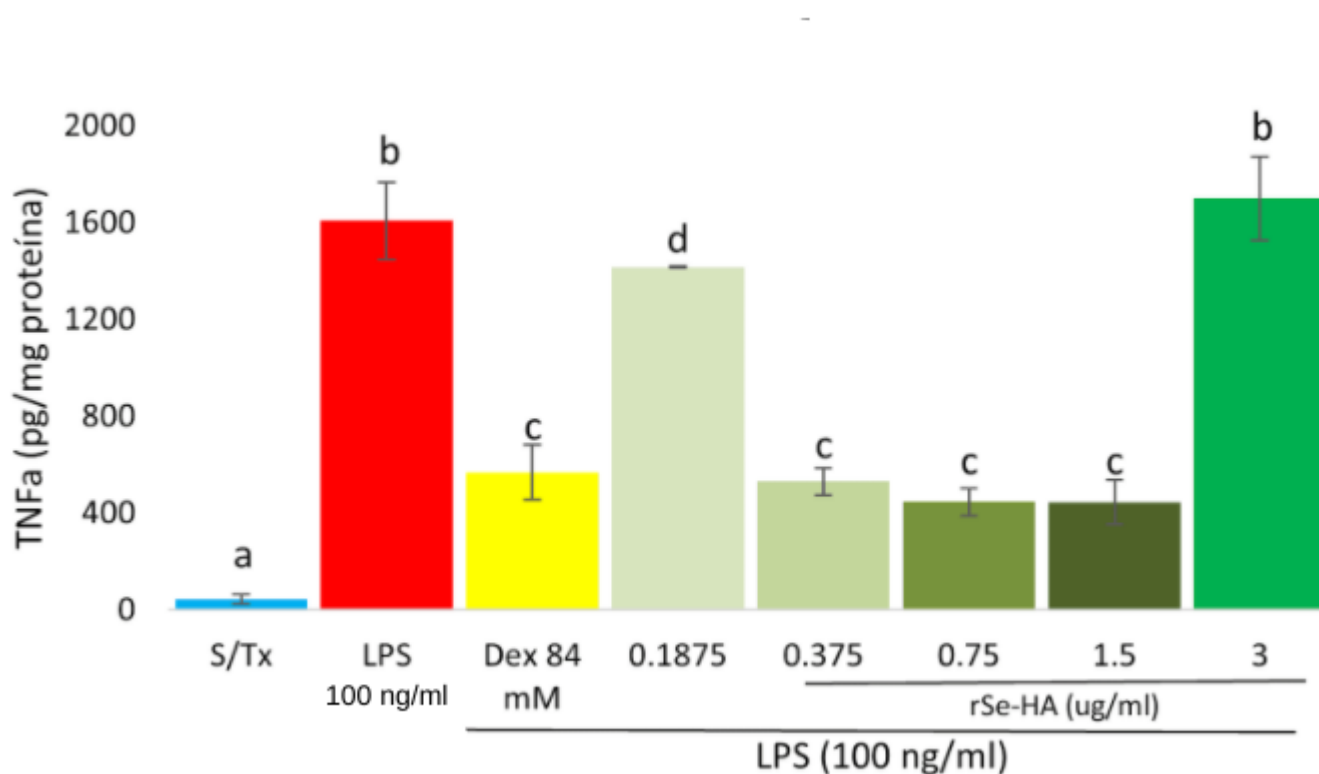


Figura 12. Determinación de la CE del *rSe-HA* a partir de $\text{TNF}\alpha$. La gráfica relaciona la concentración de $\text{TNF}\alpha$ en pg/mg de proteína presente en el medio de cultivo de cada condición evaluada. Las muestras se obtuvieron de cultivos de MØ's RAW 264.7 que se mantuvieron por toda la noche con LPS (100 ng/ml) a las cuales se les agregaron los diferentes tratamientos manteniendo los estímulos del LPS. Las

muestras se tomaron 22 horas después de este último tratamiento. Los grupos analizados fueron células sin tratamiento, o tratados con LPS (100 ng/ml), con LPS+DEXA (84 mM), con LPS + diferentes concentraciones de *rSe-HA* (0.1875, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 µg/ml). Los datos se analizaron con la prueba Tukey con una $p < 0.05$ considerada como significativa. Literales diferentes implican diferencias significativas. Las concentraciones de 0.375, 0.75 y 1.5 0.75 µg/ml muestran una eficacia similar a la del control farmacológico, siendo la mejor de ellas 0.75 µg/ml por lo cual se decidió como la CE a utilizar en posteriores experimentos.

9.3 El *rSe-HA* disminuyó la actividad fagocítica.

La fagocitosis es otro parámetro que indica que los MF se encuentran activados y por lo general se le atribuye a los M1, aunque el resto de fenotipos también la realizan. En este caso se considera como parámetro de activación M1 ya que se asocia a la producción de TNF- α evaluada anteriormente.

Para determinar si el *rSe-HA* modificaba esta función, se realizó la técnica de rojo neutro la cual consiste en agregar el colorante a células fagocíticas, las cuales fagocitarán una mayor proporción entre mayor sea la actividad fagocítica, siendo esta una característica de los macrófagos M1 y algunos fenotipos de M2 (95). Para este fin las células se incubaron por 4 horas con LPS 100 ng/ml y pasado ese tiempo se colocaron los diferentes tratamientos (Dex 84 mM y *rSe-HA* 0.75 µg/ml) manteniendo el estímulo con LPS durante 12 y 22 horas más. Pasado ese tiempo se retiró el medio de cultivo y se evaluó la concentración de rojo neutro dentro de las células se determinó por técnicas colorimétricas.

En la figura 13 se observa que a las 12 horas (panel a) no se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Por otro lado, a las 22 horas el LPS incrementó la absorbancia relacionada con la concentración del tinte un 69.4% ($P < 0.001$) con respecto al control, mientras que el *rSe-HA* lo disminuyó con respecto al grupo con LPS un 25.7% ($P < 0.001$) llevándolo a una concentración similar al del control farmacológico (29.2%, $P < 0.001$) a pesar de mantener el estímulo del LPS (panel b). Este resultado indica que la CE de *rSe-HA* revierte la actividad fagocítica evaluada por rojo neutro en M Θ 's pese a mantener el efecto constante del LPS.

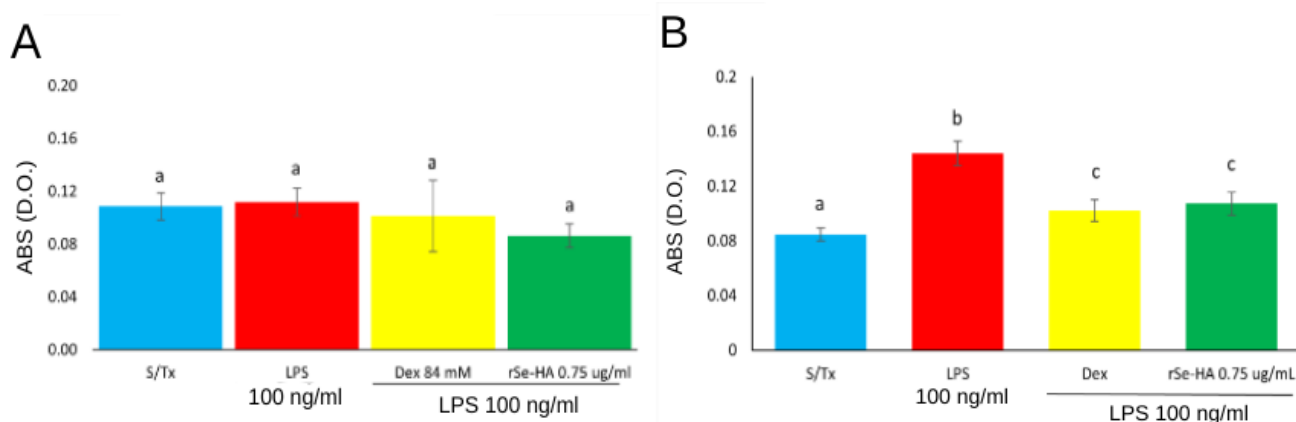


Figura 13. Evaluación de la CE sobre la activación de MØ Raw264.7 a través de la producción de nitritos y la actividad fagocítica.

La gráfica relaciona la concentración de nitrito y la actividad fagocítica de las células de los grupos control y la CE de *rSe-Ha*. Los cultivos de MØ's RAW 264.7 se mantuvieron por toda la noche al estímulo con LPS (100 ng/ml), a los cuales se les agregaron los diferentes tratamientos (Dex 84 mM y *rSe-HA* 0.75 µg/ml) manteniendo el estímulo con LPS (100 ng/ml). El ensayo se realizó 12 (panel a) y 22 horas (panel b) después de este último tratamiento. Los datos se analizaron con la prueba Tukey con una $p < 0.05$ considerada como significativa. Literales diferentes implican diferencias significativas. El *rSe-HA* reduce la actividad de los MØ's en su actividad fagocítica pese a la presencia del LPS a las 22 horas sin llegar al nivel del grupo sin tratamiento en el caso de la fagocitosis pero manteniendo la misma eficacia con respecto al grupo control farmacológico.

9.4 El *rSe-HA* disminuyó la producción de nitritos.

La producción de NO es otro parámetro que indica la activación de los MØ's y esta se mide indirectamente por la medición de la concentración de nitritos mediante la reacción de Griess ya que NO tiene un tiempo de vida muy corto. En este caso, se considera como parámetro de activación M1 al asociarse la actividad de las enzimas iNOS con la producción de $TNF\alpha$ evaluada anteriormente. Para este fin las células se incubaron por 4 horas con LPS y pasado ese tiempo se colocaron los diferentes tratamientos (Dex y *rSe-HA*) manteniendo el estímulo con LPS durante 12 y 22 horas más. Pasado ese tiempo se retiró el medio de cultivo y en él se evaluó la producción de nitrito por el método antes mencionado. En la figura 14 se observa que a las 12 horas (panel a) no hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Por otro lado, a las 22 horas el LPS incrementó la producción de nitritos en mM un 74.3% ($P < 0.005$) con respecto al control, con respecto al grupo con LPS la dexametasona lo redujo un 40.5% ($P < 0.005$) y el *rSe-HA* lo disminuyó a un 57.8% ($P < 0.005$) lo que es menor al control farmacológico y grupo sin tratamiento (panel b). Este resultado indica que la CE de *rSe-HA* revierte la producción de nitritos evaluada a través de la reacción de Griess en MØ's pese a mantener el efecto constante del LPS.

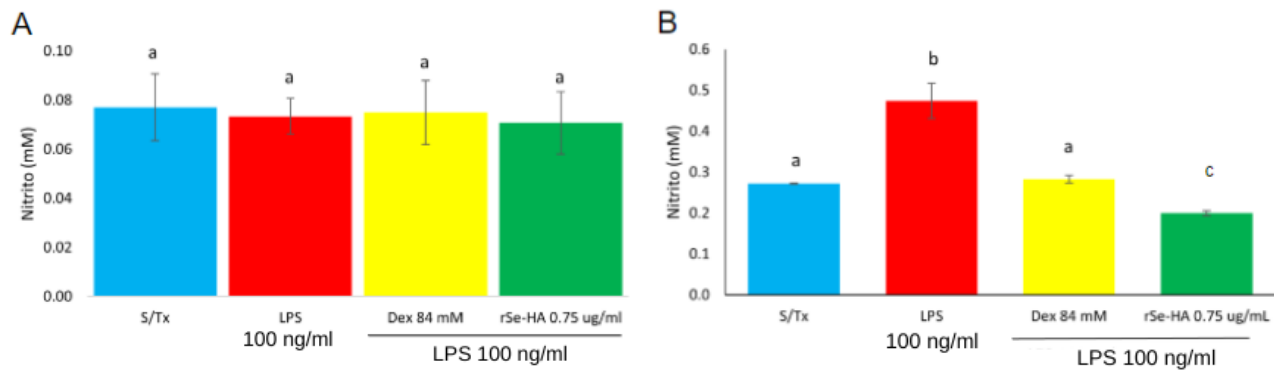


Figura 14. Evaluación de la CE sobre la activación de MØ Raw264.7 a través de la producción de nitritos y la actividad fagocítica.

La gráfica relaciona la concentración de nitrito y la actividad fagocítica de las células de los grupos control y la CE de *rSe-Ha*. Los cultivos de MØ's RAW 264.7 se mantuvieron por toda la noche al estímulo con LPS (100 ng/ml), a los cuales se les agregaron los diferentes tratamientos (Dex 84 mM y *rSe-HA* 0.75 µg/ml) manteniendo el estímulo con LPS (100 ng/ml). El ensayo se realizó 12 (panel a) y 22 horas (panel b) después de este último tratamiento. Los datos se analizaron con la prueba Tukey con una $p < 0.05$ considerada como significativa. Literales diferentes implican diferencias significativas. El *rSe-HA* reduce la actividad de los MØ's en la producción de radicales nitrógeno pese a la presencia del LPS a las 22 horas llegando a niveles más bajos que el basal y con mayor eficacia con respecto al grupo control farmacológico.

9.5 rSe-HA induce la producción de citocinas similar al M2c en presencia del estímulo de LPS.

La modulación de una respuesta inflamatoria a una no inflamatoria es el objetivo principal de los antiinflamatorios. Con la intención de saber si *rSe-HA* modulaba la expresión de citocinas, como lo hacen los antiinflamatorios esteroideos se evaluó la concentración de citocinas en el medio de cultivo siguiendo el protocolo de cultivo como se ha descrito anteriormente. Las citocinas evaluadas fueron TNF α , IL-6, TGF- β , IL-4 e IL-10 mediante ELISA del medio de cultivo. En la tabla 4 se observa que a las 12 horas *rSe-HA* es más eficiente al aumentar la producción de IL-10 un 329.9% ($P < 0.0001$) mientras que la dexametasona la disminuye 37% ($P < 0.0001$) y no hay diferencia significativa entre LPS 100 ng/ml y el control sin tratamiento. En la tabla 5 se observa que a las 22 horas el LPS aumentó la producción de citocinas proinflamatorias con respecto a las células no tratadas (TNF α 3662.9% y $P < 0.0001$, IL-6 226% y $P < 0.0001$), y disminuyó la producción de TGF- β (56.4%, $P < 0.0001$) lo que indica un fenotipo M1, mientras que la dexametasona a pesar de mantener el estímulo del LPS redujo TNF α (65%, $P < 0.0001$), IL-6 (79.8%, $P < 0.0001$) e IL-4 (61.5%, $P < 0.0001$) aumentando IL-10 (50.9%, $P < 0.0001$) y TGF- β (143.1%, $P < 0.0001$) indicando un fenotipo M2c como se ha reportado anteriormente (95). El *rSe-HA* redujo TNF α (72.2%, $P < 0.0001$), IL-6 (19.1%, $P < 0.0001$) e IL-4 (39%, $P < 0.0001$) mientras que aumentó IL-10 (36%, $P < 0.0001$) pero no modificó la expresión de TGF- β a pesar de mantener el estímulo del LPS.

Los resultados indican que rSe-HA (0.75 µg/ml) cambia el ambiente en el cual se encuentra el MØ de uno inflamatorio a uno inmunoregulador y con ello puede llevar a cabo la polarización de perfil M1 a semejante a M2c al seguir el patrón de citocinas de la dexametasona.

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados de la evaluación de citocinas producidas a las 12 y 22 horas en macrófagos, activados previamente por LPS, al ser tratados con *rSe-HA* y utilizando como control a la dexametasona 84 mM.

Tabla 4. Producción de citocinas a las 12 horas.

	12 hrs				
Condiciones	TNF- α	IL-6	IL-10	TGF- β	IL-4
Sin Tratamiento	6.3 \pm 0.5† (A)*	18.8 \pm 0.7 (A)	2.8 \pm 0.6 (A)	4.3 \pm 0.6 (A)	18.4 \pm 0 (A)
LPS (100 ng/ml)	20.7 \pm 1.4 (B)	31.4 \pm 2.3 (B)	18.4 \pm 4.4 (B)	4.3 \pm 0.7 (A)	23.5 \pm 3.6 (A)
LPS + Dexametasona (100 ng/ml) + (84 mM)	20.1 \pm 1.2 (B)	31.4 \pm 10.3 (B)	11.6 \pm 8.5 (C)	3.8 \pm 0.3 (A)	31.7 \pm 2 (B)
LPS + rSe-HA (100 ng/ml) + (0.75 µg/ml)	20.8 \pm 0.5 (B)	32.1 \pm 9.4 (B)	79.1 \pm 7.5 (D)	4.3 \pm 0.5 (A)	21.7 \pm 2.9 (A)

† Promedio \pm DS. *Literales diferentes implican diferencias significativas.

Tabla 5. Producción de citocinas a las 22 horas. Literales diferentes implican diferencias significativas.

22 hrs					
Condiciones	TNF- α	IL-6	IL-10	TGF- β	IL-4
Sin Tratamiento	43.9 \pm 18.8† (a)*	16.9 \pm 0.9 (a)	25.8 \pm 1.6 (a)	125.9 \pm 21.3 (a)	21.1 \pm 0.9 (a)
LPS (100 ng/ml)	1608 \pm 159.5 (b)	38.2 \pm 1.6 (b)	30.3 \pm 1.5 (a)	71 \pm 4.4 (b)	21.8 \pm 2.3 (a)
LPS + Dexametasona (100 ng/ml) + (84 mM)	569.1 \pm 112.9 (c)	7.7 \pm 0.8 (c)	45.7 \pm 6.2 (b)	172.6 \pm 9.4 (c)	8.4 \pm 2.5 (b)
LPS + rSe-HA (100 ng/ml) + (0.75 μ g/ml)	446.6 \pm 56.6 (c)	30.9 \pm 1.7 (d)	35.1 \pm 3.9 (c)	67.9 \pm 6.5 (b)	13.3 \pm 0.3 (c)

† Promedio \pm DS. *Literales diferentes implican diferencias significativas.

10. DISCUSIÓN

La respuesta inflamatoria, a pesar de tener como objetivo el regresar al sistema a la homeostasis, si se vuelve prolongada o en exceso puede desencadenar daños a la salud y favorecer la aparición y gravedad de patologías como cáncer, daño renal, depresión, demencia, disfunción endotelial (135). Por esto, desde siempre se ha buscado la manera de tratar estos aspectos negativos de la respuesta inflamatoria con el manejo farmacológico más común que son los antiinflamatorios tanto no esteroideos (por ejemplo: el paracetamol, indometacina, ketoprofeno) como los esteroideos (la betametasona, dexametasona, prednisona) (90,91,136). Entre los efectos de estos últimos están el modular la respuesta inflamatoria al polarizar los macrófagos a un fenotipo inmunoregulador M2c mediante la activación de STAT3 y STAT5, la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias mediante el mecanismo de transrepresión al actuar sobre GRE en DNA o factores de transcripción relacionados con la inflamación y el aumento de producción de citocinas antiinflamatorias a través de la transactivación al actuar sobre GRE en el DNA (90,91,136). Sin embargo, ante los efectos adversos que se producen por ambos tipos de fármacos, se tiene como ventana el uso de los fitofármacos para controlar la activación de los macrófagos que son células críticas en este proceso (137,138). Entre las ventajas que ofrecen los fitomedicamentos es que son una polifarmacia, es decir, a diferencia de la terapéutica convencional en la cual los fármacos sólo están conformados por una sustancia. En el caso de los fitomedicamentos, estos son un grupo de moléculas que actúan al mismo tiempo cubriendo varios blancos terapéuticos. En el rSe-HA las moléculas que se encuentran en mayor concentración son el ácido cumárico, ácido cinámico, vitexina, ácido hexadecanoico, ácido hexadecanoico-metil-éster, metil tetradecanoato, ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxipropil-éster, estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one, y stigmasta-5,22-dien-3-ol (98,106,108).

En el modelo de inflamación utilizado, se mantiene el estímulo de activación por LPS para asemejar las condiciones de un proceso infeccioso en el cual el estímulo permanece en el cuerpo hasta su erradicación, lo cual puede durar varios días. El LPS al activar al TLR4 induce la activación de TIRAP y la vía de MyD88 la cual activa IRAK2, TRAF6 y TAK1; a partir de ahí puede seguir el camino de NEMO e IKK α que se encargan de permitir la activación de NF- κ B para que este pueda traslocar al núcleo y ahí unirse a la región del DNA encargada de permitir la transcripción de citocinas proinflamatorias y de otras moléculas que tienen que ver con la inflamación como iNOS y COX2. El otro camino es a partir de MKK3/6 para activar p38 que activa AP-1 para que transloque al núcleo y promueva la producción de

citocinas proinflamatorias (35-39). Las vías de NF- κ B y AP-1 llevan a la transcripción de moléculas de potencial proinflamatorio como TNF- α , IL-6, COX-2 e iNOS y cuya producción alta caracteriza a un macrófago activado (35-39). De las moléculas que componen al rSe-HA, los ácidos grasos (ácido hexadecanoico, ácido hexadecanoico-metil-éster, metil tetradecanoato y el ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxi-propil-éster), los ácidos hidroxicinámicos (ácido cumárico) (115-117) y los terpenos (103) (estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one y stigmasta-5,22-dien-3-ol) actúan inhibiendo la activación de NF- κ B, mientras que los flavonoides (vitexina) (110,118-120) y fenilpropanoides (ácido cinámico) (112-114) además de actuar inhibiendo la activación de NF- κ B también actúan sobre las vías de las MAPK (ERK, p38 y JNK) por lo que inhiben la activación de CREB y AP-1 (112,123,128) (Figura 15). En el caso de la vitexina, esta aumenta también la producción de IL-10 sin depender de eventos de transactivación por la activación de Nrf2 que lleva a la producción de HO-1 (hemo oxigenasa 1) que actúa sobre la vía de p38MAPK y MSK1/2 lo que lleva a la producción de dicha citocina (39,139,140). Esto lleva a la disminución de la producción de ON (que se observó como disminución de nitritos Figura 14) y citocinas proinflamatorias, y el aumento de la producción de citocina antiinflamatoria IL-10, lo que asemeja al cambio de un perfil M1 a uno similar a M2c (95, 141, 142) (Tabla 6) aunque que no produce TGF- β como este tipo de macrófagos (141,142) y asumimos que es por la presencia constante del LPS.

Por otro lado, a través de la activación de NF- κ B y AP-1, al incrementar la producción de interleucinas inflamatorias se estimula una mayor actividad fagocítica (la cual es otra característica de un macrófago activado), también el aumento de expresión de receptores entre ellos FcR (56,57) y mediante la vías de MAPK y PI3K se fomenta la polimerización de actina, lo cual facilita la endocitosis (58). Las moléculas que componen al rSe-HA al inhibir la activación de dichos factores de transcripción reducen esta actividad.

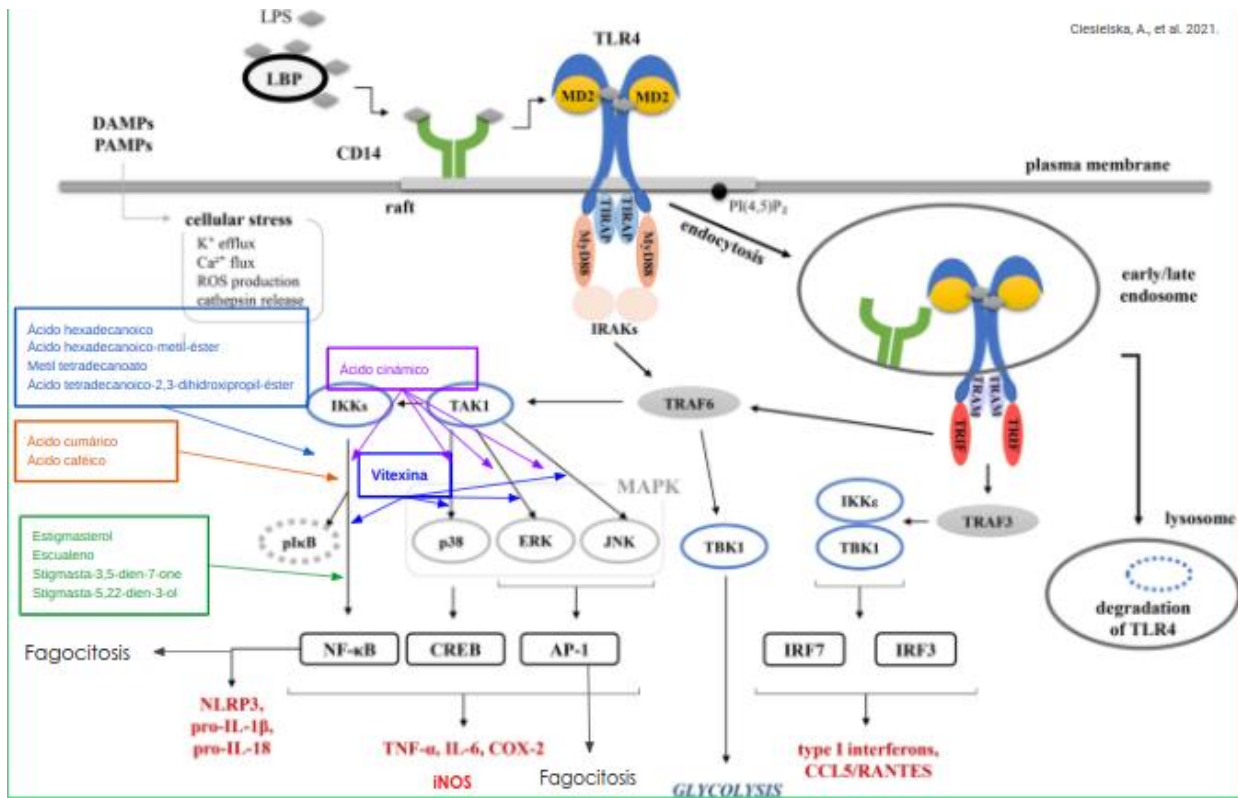


Figura 15. Vía de señalización de TLR4 activada por LPS. Tras la interacción entre LPS y TLR4 se da la formación de homodímeros por MD2, esto activa TIRAP y de ahí puede seguir la vía de MyD88/IRAKs o ser endocitado y seguir la vía de TRIF. La vía de TRIF activa TRAF6, IKK ξ y TBK1 los cuales fomentan la activación de IRF3 para que pueda formar homodímeros y trasladar al núcleo para unirse a la región del DNA encargada de fomentar la producción de interferones tipo I (entre ellos B). Por parte de la vía de MyD88 la cual activa IRAK2, TRAF6 y TAK1; a partir de ahí puede seguir el camino de NEMO e IKK α que se encargan de permitir la activación de NF- κ B para que este pueda trasladar al núcleo y ahí unirse a la región del DNA encargada de fomentar la producción de citocinas proinflamatorias. El otro camino es a partir de MKK3/6 activar p38 (que activa CREB para la producción de IL-10). NF κ B como las demás vías llevan a la transcripción de moléculas de potencial proinflamatorio como TNF- α , IL-6, COX-2 e iNOS; además de NF κ B participar en la producción de NLRP3 (que participa en la piroptosis por el inflammasoma), pro-IL-18 y pro-IL-1 β . La vía de TRIF puede de la misma forma llevar a la activación de TRAF6 o mediante TRAF3 activar IKK ϵ y TBK1 para la formación de IRF7 e IRF3 que trasloca al núcleo para la formación de interferones de tipo 1, y la quimiocina CCL5/RANTES. En este caso el endosoma posteriormente es degradado por lisosomas. El rSe-HA (0.75 ug/ml) actúa directamente sobre NF- κ B y AP-1 evitando su traslocación al núcleo y fomentando la actividad de CREB para la producción de citocinas antiinflamatorias. De entre las moléculas que componen al rSe-HA, los ácidos grasos (ácido hexadecanoico, ácido hexadecanoico-metil-éster, metil tetradecanoato y el ácido tetradecanoico-2,3-dihidroxi-propil-éster), los ácidos hidroxicinámicos (ácido cumárico y caféico), los terpenos (estigmasterol, escualeno, stigmasta-3,5-dien-7-one y stigmasta-5,22-dien-3-ol), los flavonoides (vitexina) y fenilpropanoides (ácido cinámico) actúan inhibiendo la activación de NF- κ B. Mientras que la vitexina y el ácido cinámico también actúan sobre las vías de las MAPK (ERK, p38 y JNK). Esto lleva a la generación de un ambiente inmunoregulador que permite la polarización del macrófago de un fenotipo inflamatorio a uno regulador.

En la Tabla 6 se muestran los diferentes fenotipos de los macrófagos por activación clásica y alternativa y sus citocinas producidas en el modelo empleado en este proyecto (reversión/competencia).

Tabla 6. Fenotipos de macrófagos y sus citocinas producidas en modelo conjunto de reversión/competencia

Citocina	TNF-α		IL-4	IL-6	IL-10		TGF-β		NO	Actividad fagocítica
Fenotipo										
M1	+		-	+	-		-		+	+
M2a	-		+	+	+		+		-	+
M2b	+		-	+	+		+		-	-
M2c	-		-	-	+		+		-	-
Dex	-		-	-	+		+		-	-
rSe-HA	-		-	-	+		-		-	-

11. CONCLUSIÓN

Tras el análisis de los resultados podemos concluir que el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* modula la producción de óxido nítrico, la fagocitosis y la producción de citocinas de macrófagos RAW 264.7 activados por LPS llevándolos a un perfil semejante a M2c.

12. PERSPECTIVAS

Tras lo anterior se tiene como perspectivas el continuar con la determinación del fenotipo de los macrófagos mediante citometría de flujo, valoración de probable efecto sobre enzimas COX por ensayo de inhibición, realizar nuevas evaluaciones sobre un modelo únicamente de reversión y evaluar la actividad del extracto *rSe-HA* sobre la activación de factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y CREB) y otras proteínas blanco (como p38 e IKK), con lo cual se podría establecer más específicamente el mecanismo de acción del extracto sobre la respuesta inflamatoria.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. *The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review*. Vet World. 2018;11(5):627–35.
2. Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A. *Acute Inflammation and Metabolism*. Inflammation. 2018;41(4):1115–27.
3. Lumeng CN, Saltiel AR. *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. J Clin Invest. 2011;121(6):2111–7.
4. Arulseivan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. *Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation*. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016.
5. Villalba Herrera EW. *Inflamación I*. Rev. Actual clínica. 2014;43(1):2261–4.
6. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM. *Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response*. Trends Immunol. 2019;40(3):212–27.
7. N. Serhan, Charles; A. Ward, Peter; W. Gilroy D. *Fundamentals of Inflammation*. First., Editor. Vol. 1. New York: Cambridge University Press; 2010. 1–489 p.
8. Contreras, V. *Función y disfunción endotelial*. Rev Mex Anestesiología. 2004;27(Suppl. 1).
9. M. Porth C. *Fundamentos de Fisiopatología*. Tercera Ed. González Quintanilla E, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 51–72 p.
10. Sugimoto, Michelle A.; Sousa, Lirlândia P.; Pinho, Vanessa; Perretti, Mauro; Teixeira, Mauro M. (2016). *Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?*. *Frontiers in Immunology*, 7(), –. doi:10.3389/fimmu.2016.00160
11. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. *Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation*. Prev Med (Baltim) [Internet]. 2012;54(Suppl.): S29–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.11.011>
12. Wang H, Ye J. *Regulation of energy balance by inflammation: Common theme in physiology and pathology*. Rev Endocr Metab Disord. 2015;16(1):47–54.
13. León-Pedroza JI, González-Tapia LA, del Olmo-Gil E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G, González-Chávez A. *Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: From the molecular evidence to the clinical practice*. Cirugía y Cir (English Ed. 2015;83(6):543–51.
14. Aravindhan V, Madhumitha H. *Metainflammation in Diabetic Coronary Artery Disease: Emerging Role of Innate and Adaptive Immune Responses*. J Diabetes Res. 2016;2016(1).
15. Kammoun HL, Kraakman MJ, Febbraio MA. *Adipose tissue inflammation in glucose metabolism*.

Rev Endocr Metab Disord. 2014;15(1):31–44.

16. Nasef NA, Mehta S, Ferguson LR. *Susceptibility to chronic inflammation: an update*. Arch Toxicol. 2017;91(3):1131–41.
17. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, et al. *Source of Chronic Inflammation in Aging*. Front Cardiovasc Med. 2018;5(February):1–5.
18. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. *Interleukin 1 α and the inflammatory process*. Nat Immunol. 2016;17(8):906–13.
19. McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, Wei XQ, Liew FY. *Interleukin 18: A pleiotropic participant in chronic inflammation*. Immunol Today. 2000;21(7):312–5.
20. Owen J, Punt J, Strandford S, Jones P. *Immunology Kuby*. Seventh. New York: W. H. Freeman and Company; 2013. 1–832 p.
21. Papadimitriou JM, Ashman RB. *Macrophages: Current views on their differentiation, structure, and function*. Ultrastruct Pathol. 1989;13(4):343–72.
22. Gordon S, Martinez-Pomares L. *Physiological roles of macrophages*. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2017;469(3–4):365–74.
23. Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C. *Macrophages in synovial inflammation*. Front Immunol. 2011;2(OCT):1–9.
24. Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE. *Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: Role of the macrophage*. Front Immunol. 2012;3(MAY):1–18.
25. Mohan C, Zhu J. *Toll-like receptor signaling pathways - Therapeutic opportunities*. Mediators Inflamm. 2010;2010.
26. Wang L xun, Zhang S xi, Wu H juan, Rong X lu, Guo J. *M2b macrophage polarization and its roles in diseases*. J Leukoc Biol. 2019;106(2):345–58.
27. Deng H, Sun Y, Zeng W, Li H, Guo M, Yang L, et al. *New Classification of Macrophages in Plaques: A Revolution*. Curr Atheroscler Rep. 2020;22(8).
28. Clària J, González-Pérez A, López-Vicario C, Rius B, Titos E. *New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and fatty liver disease: Modulation by endogenous omega-3 fatty acid-derived lipid mediators*. Front Immunol. 2011;2(OCT):1–8.
29. Lee KY. *M1 and M2 polarization of macrophages: a mini review*. Med Biol Sci Eng. 2019;2(1):1–5.
30. Liu YH, Ding Y, Gao CC, Li LS, Wang YX, Xu JD. *Functional macrophages and gastrointestinal disorders*. World J Gastroenterol. 2018;24(11):1181–95.
31. De Sousa, J.; Vasconcelos, P.; & Quaresma J. *Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and*

- tissue immune response of macrophages in infectious diseases*. Infect Drug Resist. 2019; 12:2589–611.
32. Oishi Y, & Manabe I. *Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases*. npj Aging Mech Dis [Internet]. 2016;2(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npjamd.2016.18>
 33. Romero Hurtado S, Iregui CA. *El Lipopolisacárido*. Rev Med Vet (Bogota). 2010;(19):37–45.
 34. Valverde, V. *Trabajo fin de grado: Señalización mediada por receptores tipo Toll: regulación y evasión*. 2017;1–20. Available from: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VICTOR FUENTES VALVERDE.pdf>
 35. Kitchens RL, Ulevitch RJ, Munford RS. *Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated Pathway*. J Exp Med. 1992;176(2):485–94.
 36. Bode JG, Ehling C, Häussinger D. *The macrophage response towards LPS and its control through the p38 MAPK-STAT3 axis*. Cell Signal [Internet]. 2012;24(6):1185–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.018>
 37. Mazgaen L, Gurung P. *Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems*. Int J Mol Sci. 2020;21(2).
 38. Nathan C. *Points of control in inflammation*. Nature. 2002 Dec 19-26; 420(6917) :846-52. doi: 10.1038/nature01320. PMID: 12490957.
 39. Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K. *TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling*. Cell. Mol. Life Sci. 78, 1233–1261 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
 40. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima S.; et al. *Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology. 2010;49(7):1215–28.
 41. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. *The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches*. Cell Oncol. 2020;43(1).
 42. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. *Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. J Cell Biochem. 2018;119(1):105–10.
 43. Zelová H, Hošek J. *TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances*. Inflamm Res. 2013;62(7):641–51.
 44. Dash, S.; Sahu, A.; Srivastava, A.; Chowdhury, R., & Mukherjee, S. (2020). *Exploring the extensive crosstalk between the antagonistic cytokines- TGF- \hat{I}^2 and TNF- \hat{I}^{\pm} in regulating cancer pathogenesis*. Cytokine, (), 155348–. doi:10.1016/j.cyto.2020.155348
 45. Kishimoto T, Kang S, Tanaka T. *IL-6: A New Era for the Treatment of Autoimmune Inflammatory*

- Diseases*. Innovative Medicine: Basic Research and Development. Tokyo: Springer; 2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500320/figure/ch11.Fig1/>
46. Rose-John, S., Winthrop, K., & Calabrese, L. (2017). *The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications*. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(7), 399–409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
 47. *IL-17 Signaling Pathway - Creative Diagnostics*. Creative Diagnostics. June 27, 2023. <https://www.creative-diagnostics.com/il-17-signaling-pathway.htm>
 48. Sies H, Jones DP. *Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents*. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020;21(7):363–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
 49. Tharmalingam S., Alhasawi A., Appanna V., et al. *Reactive Nitrogen Species (RNS)-resistant microbes: Adaptation and medical implications*. *Biol Chem*. 2017;398(11):1193–208.
 50. Lee M, Rey K, Besler K, et al. *Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase*. *Results Probl Cell Differ*. 2017; 62:181–207.
 51. Yang H, Villani RM, Wang H, et al. *The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy*. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):1–10.
 52. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, et al. *Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling*. *Circ Res*. 2018;122(6):877–902.
 53. Yu HH, Yang YH, Chiang BL. *Chronic Granulomatous Disease: A Comprehensive Review*. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;61(2):101–13.
 54. Wang, H; Ma, C; Sun-Waterhouse, D; et al. *Immunoregulatory polysaccharides from Apocynum venetum L. flowers stimulate phagocytosis and cytokine expression via activating the NF- κ B/MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells*, *Food Science and Human Wellness*, Vol. 11, Issue 4, 2022, Pp. 806-814. ISSN 2213-4530,
 55. Rojas, O; & Arce, P. (2003). *Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte*. *Bioquímica*, Vol. 28, Número 4, Pp. 19-28.
 56. Zhu, F.; Yue, W.; & Wang, Y. (2014). *The nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation is required for phagocytosis of staphylococcus aureus by RAW 264.7 cells*. *Experimental Cell Research*, 327(2), 256–263. doi:10.1016/j.yexcr.2014.04.018
 57. Marion, S.; Mazzolini, J.; Herit, F.; et al. (2012). *The NF- κ B Signaling Protein Bcl10 Regulates Actin Dynamics by Controlling AP1 and OCRL-Bearing Vesicles*. *Developmental Cell*, 23(5), 954–967. doi:10.1016/j.devcel.2012.09.021
 58. Lee, J.; Kim, D.; Kim, D.; et al. (2013). *Toll-Like Receptor 4-Linked Janus Kinase 2 Signaling*

- Contributes to Internalization of Brucella abortus by Macrophages. Infection and Immunity*, 81(7), 2448–2458. doi:10.1128/IAI.00403-13
59. Varin A, Gordon S. *Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology*. Immunobiology [Internet]. 2009;214(7):630–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.009>
60. Foey AD. *Macrophages — Masters of Immune Activation, Suppression and Deviation*. Immune Response Act. 2014.
61. Laban H. *Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates leukocyte infiltration, polarization and metabolism during vascular repair in the ischemic hindlimb* Dissertation der Naturwissenschaften der Goethe-Universität in Frankfurt am Main von Hebatullah Laban aus. 2018;(July).
62. Patrignani P, Patrono C. *Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs*. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2015;1851(4):422–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.016>
63. Bhattacharjee, A.; Shukla, M.; Yakubenko, V.; et al. (2013). *IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages*. *Free Radical Biology and Medicine*, 54(), 1–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.553
64. La Flamme, A. C., Kharkrang, M., Stone, S., et al. (2012). *Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4*. PLoS ONE, 7(10), e46989. doi: 10.1371/journal.pone.0046989
65. *IL-4 Signaling*. Genglobe. <https://geneglobe.qiagen.com/us/knowledge/pathways/il-4-signaling>
Consultada el 29 de junio de 2023 a las 14:25 hrs.
66. Rao, X., Hua, F., Zhang, L. et al. *Dual roles of interleukin-33 in cognitive function by regulating central nervous system inflammation*. J Transl Med 20, 369 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03570-w>
67. Conboy IM, Manoli D, Mhaiskar V, Jones PP. *Calcineurin and vacuolar-type H⁺-ATPase modulate macrophage effector functions*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 25;96(11):6324-9. doi: 10.1073/pnas.96.11.6324. PMID: 10339586; PMCID: PMC26880.
68. Bendickova, K.; Tidu, F.; Fric, J. (2017). *Calcineurin–NFAT signalling in myeloid leucocytes: new prospects and pitfalls in immunosuppressive therapy*. *EMBO Molecular Medicine*, (), e201707698–. doi:10.15252/emmm.201707698
69. Li-Weber, M., Krammer, P. *Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives*. Nat Rev Immunol 3, 534–543 (2003). <https://doi.org/10.1038/nri1128>
70. O'Farrell, A.-M., Liu, Y., Moore, et al. (1998), *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent*

pathways. *The EMBO Journal*, 17: 1006-1018. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1006>

71. Bode, J. G., Ehling, C., & Häussinger, D. (2012). *The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis*. *Cellular Signalling*, 24(6), 1185–1194. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.018
72. Hutchins, A.; Diez, D., & Miranda-Saavedra, D. *The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges*, Briefings in Functional Genomics, Volume 12, Issue 6, November 2013, Pages 489–498, <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt028>
73. Moore K., Malefyt R., Robert L, et al. *Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001;1(1):683–765. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>
74. Chiang BT, Liu YW, Chen BK, et al. *Direct interaction of C/EBP δ and Sp1 at the GC-enriched promoter region synergizes the IL-10 gene transcription in mouse macrophage*. *J Biomed Sci*. 2006;13(5):621–35.
75. Sanin DE, Prendergast CT, Mountford AP. *IL-10 production in macrophages is regulated by a TLR-driven CREB-mediated mechanism that is linked to genes involved in cell metabolism*. *J Immunol*. 2015;195(3):1218–32.
76. Cevey, Á., Penas, F., Alba, C.; et al. *IL-10/STAT3/SOCS3 axis is involved in the anti-inflammatory effect of benznidazole*. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1–13.
77. Porro, Chiara; Cianciulli, Antonia; Panaro, Maria Antonietta (2020). *The Regulatory Role of IL-10 in Neurodegenerative Diseases*. *Biomolecules*, 10(7), 1017–. doi:10.3390/biom10071017
78. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., et al. (2016). *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/7432797
79. Gratchev, A., *TGF- signalling in tumour associated macrophages*. *Immunobiology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.016>
80. Kumar V, K. Abbas A, Fausto N, C. Aster J. *Patología Estructural y funcional*. Octava. Fariña González, J.; Fernández-Aceñero MJ, editor. Barcelona, España; 2010. 43–78 p.
81. Fauci A, Kasper D., Braunwald E.; et al. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Décimo oct. Ciudad de México: McGraw Hill; 2012.
82. Ben-Zvi, I.; Livneh, A. *Chronic inflammation in FMF: Markers, risk factors, outcomes and therapy*. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2011;7(2):105–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.181>
83. Pahwa R, Goya A, Bansal P, Jialal I. *Chronic Inflammation*. Stat Pearls Publishing. 2020 [cited 2020 Jul 24]. Available from: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk493173#impact>
84. Ely B.; Clayton Z.; McCurdy C.; et al. *Meta-inflammation and cardiometabolic disease in*

- obesity: Can heat therapy help?* Temperature [Internet]. 2018;5(1):9–21. Available from: <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1384089>
85. Pessentheiner AR, Ducasa GM, Gordts PLSM. *Proteoglycans in Obesity-Associated Metabolic Dysfunction and Meta-Inflammation*. Front Immunol. 2020;11(May):1–18.
86. Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., et al. *A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly*. Aging Dis. 2018;9(1):143–50.
87. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective*. Biochem Pharmacol. 2020;180(July).
88. Goodman, L.; Gilman A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12a edición. San Diego, California: Mc Graw-Hill; 1941. 909–1099 p.
89. AEMPS. *Ficha técnica*. Barcelona, España; 2021.
90. Barnes PJ. *How corticosteroids control inflammation* Quintiles Prize Lecture 2005. Br J Pharmacol. 2006;148(3):245–54.
91. Jin Jeon Y, Hyuan Han S, Woo Lee Y, et al. *Inhibition of NF-KBRel nuclear translocation by dexamethasone mechanism for the inhibition of iNOS gene expression*. Biochem Mol Biol Int. 1998;45(3):3–8.
92. Vademecum V. *Dexametasona* [Internet]. Monografías Principio Activo. 2021 [cited 2021 Sep 17]. p. 1. Available from: <https://www.vademecum.es/principios-activos-dexametasona-h02ab02>
93. Reales, J. *Estudio de la respuesta de macrófagos murino y humanos frente a Candida albicans utilizando diversas técnicas proteómicas*. Memoria para optar al grado de doctor presentada por concha Gil García María Gloria. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
94. Yang, E., Yim, E., Song, G., et al. (2009). *Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts*. Interdisciplinary Toxicology, 2(4). doi:10.2478/v10102-009-0022-2
95. Arteaga Figueroa, L., Abarca-Vargas, R., García Alanis, C., & Petricevich, V. L. (2017). *Comparison between Peritoneal Macrophage Activation by Bougainvillea xbuttiana Extract and LPS and/or Interleukins*. BioMed Research International, 2017, 1–11. doi:10.1155/2017/4602952
96. Ramírez Hernández CC. *Estudio Biodirigido de las reuniones rSeC1R25 y rSeC1R28 obtenidas del extracto acetónico de la raíz de Sechium Edule Para el control de la inflamación y el estrés oxidante endotelial*. UAEM; 2019.
97. Cerecero R, Morales R, Torres I, Barrio T. *Conocimientos sobre fitofármacos en médicos de atención primaria del estado de Morelos*. Rev Med IMSS [Internet]. 2005;43(4):281–286. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/im054b.pdf>

98. Alvarado Ojeda ZA. *Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de raíz de Sechium edule estandarizado en ácido cinámico*. UAEM; 2019.
99. Rajasree RS, Sibi PI, Francis F, William H. *Phytochemicals of cucurbitaceae family – A review*. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2016;8(1):113–23.
100. Jamuna S KK and PS. *Phytochemical and pharmacological properties of certain medicinally important species of Cucurbitaceae family – a review*. J Res Biol. 2015;5(6):1835–49.
101. Saboo SS, Thorat PK, Tapadiya GG, Khadabadi SS. *Ancient and Recent Medicinal Uses of Cucurbitaceae Family*. International J Ther Appl. 2013; 9:11–9.
102. Akindele AJ, Oladimeji-Salami JA, Usuwah BA. *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Telfairia occidentalis Hydroethanolic Leaf Extract (Cucurbitaceae)*. J Med Food. 2015;18(10):1157–63.
103. Belay R, Makonnen E. *Anti-inflammatory activities of ethanol leaves extract and solvent fractions of Zehneria scabra (Cucurbitaceae) in rodents*. Asian J Nat Prod Biochem. 2020;18(1):42–56.
104. Adedapo A, Adewuyi T, Sofidiya M. *Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of Lagenaria breviflora (Cucurbitaceae) in laboratory animals*. Rev Biol Trop. 2013;61(1):281–90.
105. Hernández, J. *Evaluación del efecto de la fracción acetónica de la raíz de Sechium edule sobre el daño cognitivo asociado a hipocampo en ratones con síndrome metabólico*. Vol. 1. UAEM; 2018.
106. Lombardo Earl G. *Caracterización Farmacológica de los compuestos derivados del ácido cinámico de la raíz de Sechium edule jacq sw y su efecto sobre la disfunción endotelial*. UAM; 2014.
107. *Términos - Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. (n.d.). <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=chayote> Consultada el 27 de junio de 2023 a las 15:46 hrs.
108. Costet, A. *Estudio químico y actividad nefroprotectora del extracto hidroalcohólico estandarizado de la raíz de Sechium edule (Jacq sw)*. UAEM; 2020.
109. Trejo Moreno C. *Evaluación de la capacidad del extracto metanólico de la raíz de Sechium edule (chayote) para reparar el daño tisular y controlar la inflamación en el modelo murino de hipertensión*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2013.
110. Rosado-Pérez, J., Aguiñiga-Sánchez, I., Santiago-Osorio, E., et al. *Effect of Sechium edule var. nigrum spinosum (Chayote) on Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Markers in Older Adults with Metabolic Syndrome: An Exploratory Study*. Antioxidants. 2019;8(5):146.
111. Rolnik A, Olas B. *Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect*

- on human health. Nutrition [Internet]. 2020; 78:110788. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110788>
112. Abozaid OAR, Moawed FSM, Ahmed ESA, Ibrahim ZA. *Cinnamic acid nanoparticles modulate redox signal and inflammatory response in gamma irradiated rats suffering from acute pancreatitis*. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]. 2020;1866(11):165904. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165904>
113. Ruwizhi N, Aderibigbe BA. *Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy*. Int J Mol Sci. 2020;21(16):1–36.
114. Ibrahim EA, Moawed FSM, Moustafa EM. *Suppression of inflammatory cascades via novel cinnamic acid nanoparticles in acute hepatitis rat model*. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2020; 696:108658. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108658>
115. Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D. *Multi-target cinnamic acids for oxidative stress and inflammation: Design, synthesis, biological evaluation, and modeling studies*. Molecules. 2019;24(1).
116. Sabitha R, Nishi K, Gunasekaran V, et al. *P-Coumaric acid ameliorates ethanol-induced kidney injury by inhibiting inflammatory cytokine production and NF- κ B signaling in rats*. Asian Pac J Trop Biomed. 2019;9(5):188–95.
117. Zhu H, Liang QH, Xiong XG, et al. *Anti-Inflammatory Effects of p-Coumaric Acid, a Natural Compound of Oldenlandia diffusa, on Arthritis Model Rats*. Evidence-based Complement Altern Med. 2018;2018.
118. He M, Min JW, Kong WL, et al. *A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin*. Fitoterapia [Internet]. 2016; 115:74–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011>
119. Sun Z, Yan B, Yu WY, et al. *Vitexin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via the suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis and the activation of FOXO3a*. Exp Ther Med. 2016;12(3):1879–84.
120. Venturini CL, Macho A, Arunachalam K, et al. *Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma*. Biomed Pharmacotherapy [Internet]. 2018;97(2367):143–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.073>
121. Choi, H., Tran, P., Lee, J., et al. *Anti-inflammatory activity of caffeic acid derivatives isolated from the roots of Salvia miltiorrhiza Bunge*. Arch Pharm Res. 2018;41(1):64–70.
122. Zaitone SA, Ahmed E, Elsherbiny NM, et al. *Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy*. Pharmacol Reports [Internet]. 2019;71(1):32–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.08.004>

123. Armutcu F, Akyol S, Ustunsoy S, Turan FF. *Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review)*. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):1582–8.
124. Khan A, Ikram M, Hahm JR, Kim MO. *Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders*. *Antioxidants*. 2020;9(7):1–15.
125. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, et al. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models*. *Phyther Res*. 2015;29(3):323–31.
126. Samie A, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. *Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates testicular damage in diabetic rats via inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis*. *Life Sci* [Internet]. 2018; 210:132–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.074>
127. Munekazu I., Toshiyuki T., Mizuo M., Tomoyuki H. *Different Effects of Cinamic Acid on the O₂- generation by Guinea Pig Macrophages Stimulated with a Chemotactic Peptide and Immune Complex*. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 2002;(43):2091. Available from: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
128. Choi EY, Choe SH, Hyeon JY, et al. *Effect of caffeic acid phenethyl ester on Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of proinflammatory mediators in murine macrophages*. *J Periodontal Res*. 2015;50(6):737–47.
129. Oršolić N, Kunštić M, Kukulj M, et al. *Oxidative stress, polarization of macrophages and tumor angiogenesis: Efficacy of caffeic acid*. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016; 256:111–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.027>
130. Shaw OM, Hurst RD, Cooney J, et al. *Boysenberry, and apple juice concentrate reduced acute lung inflammation and increased M2 macrophage-associated cytokines in an acute mouse model of allergic airways disease*. *Food Sci Nutr*. 2021;9(3):1491–503.
131. Li N, Guo X, Li R, et al. *p-Coumaric acid regulates macrophage polarization in myocardial ischemia/reperfusion by promoting the expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase*. *Bioengineered*. 2021.
132. Sorgi C., de Campos Chaves Lamarque G., Verri M., et al. *Multifaceted effect of caffeic acid against Streptococcus mutans infection: microbicidal and immunomodulatory agent in macrophages*. *Arch Microbiol* [Internet]. 2021;203(6):2979–87. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02290-x>
133. FDA. *Generally Recognized as Safe (GRAS)* [Internet]. U. S. Food & Drug Administration. 2019

- [cited 2021 Oct 1]. p. 1. Available from: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
134. Agrocafta. *Fichas técnicas regionales de productos agroindustriales para asistencia técnica a PYMES*. 2008.
135. Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). *Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty*. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505–522. doi:10.1038/s41569-018-0064-2
136. Necela, B. M. (2004). *Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(3), 239–246. doi:10.1513/pats.200402-005ms
137. Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. *Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism*. *Scientific World Journal*. 2011; 11:2509–29.
138. Howes MJR. *Phytochemicals as anti-inflammatory nutraceuticals and phytopharmaceuticals* [Internet]. *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support*. Elsevier Inc.; 2017. 363–388 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00028-7>
139. Lee, T.-S., & Chau, L.-Y. (2002). *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. *Nature Medicine*, 8(3), 240–246. doi:10.1038/nm0302-240
140. Naito, Y., Takagi, T., & Higashimura, Y. (2014). *Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 564, 83–88. doi:10.1016/j.abb.2014.09.005
141. Oishi, S., Takano, R., Tamura, et al. (2016). *M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation*. *Immunology*, 149(3), 320–328. doi:10.1111/imm.12647
142. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., et al. (2018). *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. doi:10.1002/jcp.26429



Cuernavaca, Mor., 13 de septiembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **“Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS”**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Miguel Angel Corona Alarcón. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Gabriela Rosas Salgado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2023-09-18 10:59:57 | Firmante

eDc+3NSvdmw4uqK94o5kLv19ndIIdi6XospSiNQw7MHOQIr7GA3qhsDhpUIVAdJGRsToEe1m9plHAhi5LyYamNK6pkfv7kf8sgSuosf/7JsfuEusOb5E2akNJSW6YOqFya5IIMMLm
pDbOPo73qD+h9Xx1q/CA7nFjpEDsCgn8DhVdrQbMqMzwoKnt6T7oGgCj5UpgE6cRFTxih62+1E3gvNiZwGVoxYspaVfkA4NsbNDRVhiOU1EwhmPoEOgDnQRcinXRsaA8TL
m3WXAqPqGqVZwkef2RWvLKx8uX0UloyQ3rbqUV/ip4tHJRMgDzJXf72NVdl3JgLZWC7fSjhvw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[mj3wQvI7G](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/93xInGH7ILwZO3YTsvL7oVSI5imvNiz>





Cuernavaca, Mor., 13 de septiembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **“Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS”**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Miguel Angel Corona Alarcón. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-09-13 22:33:52 | Firmante

Nox7T43g/N6Lt4CfA+cmrNhxEsiUtaOewHK6O4HZzJX21YHsLdYk7fjffMEgSff8fBaJow6JJeGUsEmYvNWS+uzDhPxufXqeuypyu5LfXSIaywYc8ifLwMflfZhuAwg3vNlaYNutkQ7N7S5K6mHdGwB3krR3XmWyyHEtjwuXFSrWOWqCkIvX8ao+jwpZOlh+hUwHdfzpkvSaUrNpUiHfFAQKA00SqaIjnbhndHn2b+c2GtAbIX4EdEvSzETQzAwrYsoOruHtHUgkvEIZ7hgi6bquqLDbZjunkt0elJp+kO+13CDgSrAh1QFaAZzSzi4dQlgB5jSTv94qX5AS5cGIEQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[t07zdjMQc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8N6CWA2gzDzSooHqLlcmNmfd4TTuBatW>



Cuernavaca, Mor., 13 de septiembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **“Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS”**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Miguel Angel Corona Alarcón. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERARDO JOEL BARRITA CRUZ | Fecha:2023-09-18 11:45:05 | Firmante

GP4BjZkiUasVnBL6xpnKW7WLYgz+xtknUm1iVeXMwpYb5vLQSDmYc/Ral4PUfcGYIxlupJBKLFhHtsWMLaTPeVqvWgdOcExDCt3Qu9AmSu44eFPaAu+VQU9nA3Ov5K4Gd/y/a
GP9c2oJsXp9PSTL405z30ShKrFQ76tyQ39EYPMLRRJo+Y3R1MAETsuBwYNeTw+hP4cEgO0ci0NIF5P8/2GIJ+8PiiZ7e/+UqYTVoAdoPyagpg4l3rQ1BhYSLzy2K/zbKSBuN2r4C
k9VlwMe+4TcsxbNMf0pD70NsUaG2Hlca12/Z045VGnDrtgFqDoSf+rSrsEKRVShY8TWjhm27Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[H5FozOsSZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NojATSAZb4YA5xoW4YxA8tuA9o9Pkvb>





Cuernavaca, Mor., 13 de septiembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **“Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS”**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Miguel Angel Corona Alarcón. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Gladis Fragosó González



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GLADIS FRAGOSO GONZÁLEZ | Fecha:2023-09-13 16:52:37 | Firmante

aGQ5E2Nliiy1gMSHdz1fPJugZe9x9wxhV1VPWB6OKfcAZNBHDtwFIV8B9HjfkPfflDmMYaTXR53glxrr0prUg+zbr1EMyl/NEWwDeKvyjADB3v3gidgTAVeX2I4aEi6GnztalqG2RkA8irqypa4eYBNpqhVCo6fuTVQduzQdyi9/t6zhMqGTBOxgJOlvNzINRUTa7+jOwZ/3NqOVUYpV9SXRZkhwzTzwgpp85DQkyXHpbTY7LUcOuU9FekNza19Za1CkObQntFr8wNiN0HWani3QkqBZbQGz5yP+3d0nM4REyl6AwJWrF2p/VmSMBeqIrsy1D7pfr5nbWJjFDTvV3KDnQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



B6G3AlgdY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/k4G80CE4turvkXX0jh47xvlKm7c2D85l>



Cuernavaca, Mor., 13 de septiembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **“Modulación de la fagocitosis, producción de óxido nítrico y citocinas por el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS”**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Miguel Angel Corona Alarcón. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2023-09-13 18:41:19 | Firmante

S9Ccy455HQ9i6WL2Uj5qEtwV1fcvQeSjNEQCgipAwR0zw0sqSQtDOXJPWySsl78sjraTFhkUA22/eEe+58UU/AuwHFMHMaHE7ID7KH9SLEMG+gDuKvMBo/FPJNDfbD+zmdOv
EOF8iEk6TsguRBBwuekBBHA80Ejs6lokpl1DwAeDcQHL3xwAjNfcusSNVzHAXIS9CPbGFwGBFmdj/O5Y10MZ0ZIVIRAHttEaex/Oh07g3HI+gtRG4ehHrOEHk1qpGMIU0r3c6jzG
HdlU9rwgtn4Zk2Yqst7H7md24L7IIA5Td8IhiaT4JaDKskbVx6KwV0PowLfwau0Z2nlZfJ/JWQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[veRf7Lptm](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YBUcAfP2gWjmh749EzkyTT0S94PufxMo>

