



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

TESIS:

"MECANISMO
DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO*
PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCIÓN
ENDOTELIAL"

Proyecto para:

OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN MEDICINA
MOLECULAR

QUE PRESENTA:

Med. Cir. Lilia Alejandra Altamirano Arenas

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gabriela Rosas Salgado

CODIRECTORA:

Dra. Celeste Trejo Moreno

Cuernavaca, Morelos, México, a Abril de 2026



**El presente trabajo se realizó en El Laboratorio de
Inflamación y Enfermedades Crónico-degenerativas de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del
Estado de Morelos (UAEM) (Cuernavaca, Morelos), bajo
la tutoría de la Dra. Gabriela Rosas Salgado y la
codirección de la Dra. Celeste Trejo Moreno**



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

**Lilia Alejandra Altamirano Arenas agradece el financiamiento de la Secretaría de
Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca de posgrado.**

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco profundamente a mi directora la Dra. Gabriela Rosas Salgado y codirectora de tesis la Dra. Celeste Trejo Moreno, por su guía, paciencia y valiosas aportaciones a lo largo de este trabajo. Su acompañamiento fue fundamental para el desarrollo de esta investigación y para mi formación académica.

A los miembros de mi comité revisor, por sus observaciones, tiempo y disposición, que enriquecieron significativamente este proyecto.

A mis profesores, por compartir sus conocimientos y motivarme a seguir creciendo en el ámbito científico.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, por su apoyo, colaboración y por hacer de este proceso una experiencia más llevadera.

A mi familia, por su amor incondicional, por confiar en mí y por ser siempre mi mayor fuente de motivación.

Finalmente, agradezco a todas las personas e instituciones que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA:

A mis padres, por su amor incondicional, su apoyo constante y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Este logro también es suyo.

A mi familia, por estar siempre presente, por sus palabras de aliento y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles.

A mis amigos, por acompañarme en este camino, por su comprensión y por hacer más ligero cada reto.

A mis profesores y mentores, por compartir su conocimiento, guiarme con paciencia e inspirarme a seguir creciendo profesional y personalmente.

Y a mí misma, por no rendirme, por enfrentar cada obstáculo y por demostrar que con dedicación y pasión los sueños se pueden alcanzar.

Índice

Abreviaturas:	6
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Endotelio	9
2.1.1 Funciones de endotelio	10
2.2 Disfunción endotelial	14
2.2.1 Estado prooxidante	14
2.2.2 Estado proinflamatorio	14
2.2.3 Vasoconstricción	15
2.2.4 Remodelación vascular	15
2.2.5 Estado protrombótico	16
2.3 Causas de la disfunción endotelial	17
2.3 Enfermedades asociada a la disfunción endotelial	17
2.4 Tratamiento de la disfunción endotelial.	18
3. Antecedentes	19
3.1 Taxonomía de <i>Sechium edule</i>	19
3.2 Etnobotánica de <i>Sechium edule</i>	19
3.3 Fitoquímica de <i>Sechium edule</i>	20
4. Justificación	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivo	22
7. Objetivos Particulares	22
8. Metodología	23
8.1 Cultivo de células endoteliales	23
8.2 Determinación de la viabilidad celular por ensayo de LDH	23
8.3 Determinación de la concentración efectiva por medio de la concentración de IL-6	24
8.3.1 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para la determinación de IL-6	25
8.4 Cultivo de células para determinación de ON	25
8.4.1 Prueba de Griess	26
8.5 Cuantificación de ROS	26
8.6 Determinación de la concentración del factor de von Willebrand por ELISA en sandwich	27
8.7 Evaluación in vitro del remodelado vascular	27
8.8. Histología	28
8.9 Western Blot	28
9. Análisis Estadístico	29
10. Resultados:	29
10.1 Determinación de la concentración efectiva del rSe-HA	29
10.1.1. Las concentraciones utilizadas para determinar la CE utilizadas para determinar la CE no afectan la viabilidad celular por ensayo de LDH	29

10.1.2. La concentración efectiva del rSe-HA es de 0.75 µg/mL	30
10.2 La concentración efectiva del rSe-HA aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico	31
10.3 La concentración efectiva del rSe-HA disminuye la producción de las especies reactivas de oxígeno.	33
10.4. La concentración efectiva del rSe-HA reduce la liberación del factor de von Willebrand.	35
10.5 La concentración efectiva del rSe-Ha revierte el estado proinflamatorio asociado a la disfunción endotelial	36
10.6. La concentración efectiva del rSe-Ha revierte el remodelado vascular.	37
11. Discusión	41
12. Conclusión	45
13. Perspectivas	46
14. Literatura Citada	46

Abreviaturas:

Ang II: Angiotensina II

BH4: tetrahidrobiopterina

Ca²⁺: calcio

CaM: calcio-calmodulina

CE: concentración efectiva

CMLV: Células del Músculo Liso Vascular

COX 2: Ciclooxigenasa 2

DE: Disfunción Endotelial

eNOS: NOS endotelial

EO: Estrés Oxidante

GMPc: Guanosín Monofosfato cíclico

GTP: Trifosfato de guanosina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HE: Hematoxilina-Eosina

HMEC-1: Células Endoteliales de Microvasculatura Humana

ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1

iNOS: NOS inducible

K⁺: potasio

LDH: Lactato Deshidrogenasa

MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos

MLCK: proteína cinasa de la miosina

NF-kB: Factor Nuclear Kappa B

nNOS: NOS neuronal

NOS: óxido nítrico sintetasa

O₂⁻: anión superóxido

O₂: oxígeno molecular

OH⁻: radical hidroxilo, así como

OHCl: Ácido hipocloroso

ON: Óxido Nítrico

ONOO⁻: peroxinitrito

PCR: Proteína C Reactiva

PKA: proteína cinasa A

PKG: Proteína Cinas dependiente de GMPc

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

rSe-HA: Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule*

sGC: Guanilato Ciclasa

TF: Factor Tisular

TFPT: Inhibidor de la Vía del Factor Tisular

VCAM: molécula de adhesión vascular

vWF: factor de Von Willebrand

1. Resumen

El endotelio vascular es el tejido que recubre el interior de los vasos sanguíneos y cumple funciones esenciales en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Regula el tono vascular mediante la liberación de óxido nítrico (ON) y otros mediadores vasoactivos, controla la coagulación y la fibrinólisis, modula las respuestas inflamatorias y participa en la proliferación y migración celular. La alteración de estas funciones conduce a la disfunción endotelial, caracterizada por una disminución en la biodisponibilidad de ON y un aumento de los procesos oxidativos, inflamatorios, trombóticos y proliferativos, los cuales favorecen el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares. A pesar de su relevancia clínica, la disfunción endotelial no cuenta con un tratamiento específico; actualmente, las estrategias terapéuticas se dirigen únicamente al control de las enfermedades relacionadas, sin abordar directamente el deterioro funcional del endotelio.

En este trabajo se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (rSe-HA) para controlar el estado prooxidante, proinflamatorio, protrombótico y proliferativo asociados a la disfunción endotelial in vitro. Se empleó un modelo de cultivo de células endoteliales humanas (HMEC-1) tratadas con angiotensina II, en las cuales se cuantificaron los niveles de ON, especies reactivas de oxígeno (ROS), factor de von Willebrand (vWF), IL-6 y la activación de NF- κ B. El extracto fue comparado con losartán como control farmacológico. Los resultados mostraron que, a diferencia del losartán, el rSe-HA logró incrementar la biodisponibilidad de ON y reducir la activación de NF- κ B, además de disminuir significativamente la producción de IL-6, la liberación del factor de von Willebrand y los niveles de ROS. Asimismo, se observó una mejora en el remodelado vascular, evidenciada por la reducción del grosor de la capa media y el aumento del área del lumen en anillos de aorta de ratas.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* contribuye a restaurar la función endotelial con una eficacia superior a la del control farmacológico, y podría representar una alternativa terapéutica potencial para el tratamiento de la disfunción endotelial y de alteraciones vasculares asociadas a la disfunción endotelial.

2. Introducción

2.1 Endotelio

El endotelio es la capa celular que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y está constituido por una monocapa de células endoteliales. Además de funcionar como una barrera física entre la sangre y la pared vascular, actualmente se reconoce como un órgano metabólicamente activo con funciones regulatorias fundamentales para la homeostasis cardiovascular. Entre sus principales actividades se encuentran la regulación del tono vascular, la coagulación, la inflamación y el intercambio de moléculas entre la circulación y los tejidos (Carvajal, 2017).

Las características estructurales y funcionales de las células endoteliales varían dependiendo del lecho vascular en el que se localizan. En las arterias, estas células presentan una disposición alineada con la dirección del flujo sanguíneo y poseen uniones intercelulares estrechas que les permiten soportar la presión y las fuerzas de cizallamiento ejercidas por la sangre circulante. En contraste, el endotelio venoso se encuentra sometido a menor presión y presenta una organización menos definida. Por otro lado, en los capilares pueden identificarse endotelios continuos, fenestrados o discontinuos, de acuerdo con las necesidades fisiológicas de cada tejido (Aird, 2007).

Debido a su actividad metabólica, las células endoteliales participan en la síntesis de múltiples mediadores vasoactivos y moléculas de señalización. La alteración de estas funciones favorece el desarrollo de procesos vasculares patológicos asociados a enfermedades cardiovasculares y metabólicas (González et al., 2009).

2.1.1 Funciones de endotelio

El endotelio participa activamente en la regulación del tono vascular, la adhesión de leucocitos y plaquetas, el control del crecimiento celular vascular, así como en los procesos de trombosis, fibrinólisis e inflamación (Verdejo París, 2007). En condiciones fisiológicas el endotelio previene la coagulación intravascular mediante la producción de moléculas como los glicosaminoglicanos, la antitrombina y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Además, produce y secreta óxido nítrico (ON) y prostaciclina, mediadores capaces de inhibir la activación y la agregación plaquetaria (González et al., 2009).

La regulación del tono vascular depende del equilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. El ON representa uno de los principales mediadores de la vasodilatación

producidos por el endotelio, mientras que moléculas como la endotelina-1, el tromboxano A₂ y la angiotensina II favorecen la vasoconstricción (Carvajal, 2017).

El ON en el endotelio vascular es sintetizado principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la cual utiliza L-arginina y oxígeno molecular como sustratos. La activación de esta enzima puede producirse mediante diferentes mecanismos de señalización, entre ellos la vía PI3K/AKT en donde AKT fosforila a la eNOS en el residuo de serina 1179 y/o el sistema calcio-calmodulina (CaM). El incremento de cal (Ca^{2+}) citosólico favorece su unión a la CaM, la formación del complejo calcio-calmodulina genera un cambio conformacional que le permite interactuar directamente con la eNOS, promoviendo su activación. Además de la activación directa mediada por el complejo calcio-calmodulina, la proteína cinasa A (PKA) participa en la regulación de la actividad de la eNOS. El incremento del calcio intracelular y de AMP cíclico (AMPc) favorece la activación de la PKA, la cual fosforila a la eNOS en residuos específicos de serina, principalmente Ser1177/Ser1179. Esta fosforilación incrementa la actividad catalítica de la enzima y favorece la producción de óxido nítrico. Una vez producido, el ON difunde hacia las células del músculo liso vascular, donde activa la guanilato ciclasa soluble y promueve la formación de GMPc, esta molécula activa la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), lo que disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular, promoviendo la relajación del músculo liso y la consecuente vasodilatación (Figura 1) (Chen et al., 2010; Meza et al., 2019; Miao et al., 2022; Xu et al., 2021)..

De manera fisiológica, el endotelio evita la adhesión plaquetaria y la formación de coágulos gracias a la acción del ON, que inhibe la agregación plaquetaria al activar la sGC en las plaquetas, lo que incrementa los niveles de cGMP y reduce la liberación de Ca^{2+} . Asimismo, las células endoteliales expresan TFPI, que limita la acción del factor tisular (TF) e inhibe la activación de los factores VII y X de la cascada de coagulación (Neubauer y Zieger, 2021).

El endotelio también posee funciones antiinflamatorias. El ON contribuye a reducir la expresión de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión al mantener la unión entre el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y su inhibidor I κ B, lo que evita su translocación al núcleo y, por tanto, la activación de la respuesta inflamatoria (González-Villalva et al., 2023).

Por último, el ON regula la proliferación de las CMLV al difundir a través de sus membranas y activar la sGC, lo que incrementa el GMPc y, por ende, la actividad de la PKG. Esta enzima inhibe la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), en particular la vía ERK (extracellular signal-regulated kinase), reduciendo la expresión de factores de transcripción y proteínas necesarias para la proliferación celular. Además, el ON

regula canales de potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}), promoviendo la hiperpolarización de la membrana y disminuyendo la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje, lo que limita las señales proliferativas (Domínguez y Ordoñez, 2020).

Las funciones del endotelio son la regulación del tono vascular, la adhesión de leucocitos y plaquetas, la regulación del crecimiento celular vascular, la regulación de la trombosis y fibrinólisis, así como de la inflamación (Verdejo París, 2007). Se encarga de prevenir la coagulación intravascular, produciendo moléculas de superficie como glicosaminoglicanos que actúan como cofactor antitrombina; la trombomodulina funciona como anticoagulante al unirse con trombina su actividad cambia de procoagulante a anticoagulante, el endotelio se encarga de la producción de del inhibidor de la vía del factor tisular, encargado de inhibir el complejo del factor tisular VIIa, así como de producir óxido nítrico y prostaciclina que funcionan como inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria (González et al., 2009).

La principal función del endotelio es la regulación del flujo sanguíneo, regulando el tono vascular mediante la producción de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (ON), prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio. El estado de vasoconstricción está mediado por la producción de endotelina-1, angiotensina II y tromboxano A₂. (Carvajal, 2017).

El ON es sintetizado por tres isoformas de las enzimas óxido nítrico sintetasa (NOS por sus siglas en inglés), NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS). La eNOS es la principal isoforma encargada de la producción del ON en la célula endotelial, para realizar la reacción requiere de L-arginina y oxígeno molecular (O_2) como sustrato, y ser fosforilada, esto puede ocurrir a través de dos vías, la vía PI3-AKT en donde AKT se encarga de fosforilar a la eNOS en su residuo de serina 1179 o a través de la activación calcio-calmodulina (CaM) y de proteína cinasa A (PKA) por aumento en el calcio intracelular (Ca^{2+}). La PKA fosforila la eNOS en el residuo Ser-1177/Ser-1179 y la proteína de choque térmico 90 (hsp90), una vez activada la enzima requiere del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) para catalizar la reacción que conduce a la producción de ON y L-citrulina (Figura 1). El ON que se produce en la célula endotelial difunde hacia las células del músculo liso vascular, generando la vasodilatación y la relajación de estas células al unirse a Guanilato Ciclasa (sGC), esto ocasiona que aumenten las concentraciones de Guanosin Monofosfato cíclico (GMPc), el GMPc activa la proteína cinasa dependiente de la cGMP (PKG)

disminuyendo la concentración de Ca^{2+} , causando la relajación del músculo liso y disminuyendo el tono vascular. (Meza et al., 2019). De forma normal el endotelio, no producen adherencia de plaquetas, ni la formación de coágulos, el ON se encarga de inhibir la adhesión y agregación plaquetaria al difundir hacia las plaquetas cercanas, donde activa la sGC, que convierte el trifosfato de guanosina (GTP) en cGMP, el aumento en cGMP previene la liberación de Ca^{2+} almacenado para la activación y agregación plaquetaria, las CE expresan un inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) que limita la acción del factor tisular (TF) e inhibe la activación de los factores de la cascada de coagulación VII y X que son mediados por el TF (Neubauer y Zieger, 2021).

El endotelio tiene efecto antiinflamatorio, el ON se encarga de reducir la expresión de mediadores de inflamación y moléculas de adhesión en las células endoteliales al mantener estable la unión entre el factor nuclear kappaB (NF- κ B) y su inhibidor I κ B, esta unión mantiene al NF- κ B secuestrado en el citoplasma del endotelio y se evita que transloca al núcleo, por lo que se evita la inflamación (González-Villalva et al., 2023).

El ON regula la proliferación de las células del músculo liso vascular (CMLV), este difunde a través de las membranas celulares y se une a la enzima sGC en las CMLV aumentando así la conversión de GTP a GMPc, el GMPc actúa como un segundo mensajero activando a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), esta fosforila y activa una serie de proteínas que inhiben la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), específicamente la vía de la ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Domínguez y Ordóñez, 2020; Xu et al., 2021). La inhibición de la vía MAPK/ERK reduce la expresión de factores de transcripción y proteínas necesarias para la proliferación celular, de igual forma el ON se encarga de la regulación de los Canales de Potasio y Calcio, el ON puede aumentar la actividad de los canales de potasio (K^+), lo que lleva a la hiperpolarización de la membrana celular reduciendo la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, la disminución de los niveles intracelulares de Ca^{2+} inhibe las vías de señalización que promueven la proliferación celular. (Domínguez y Ordoñez, 2020)

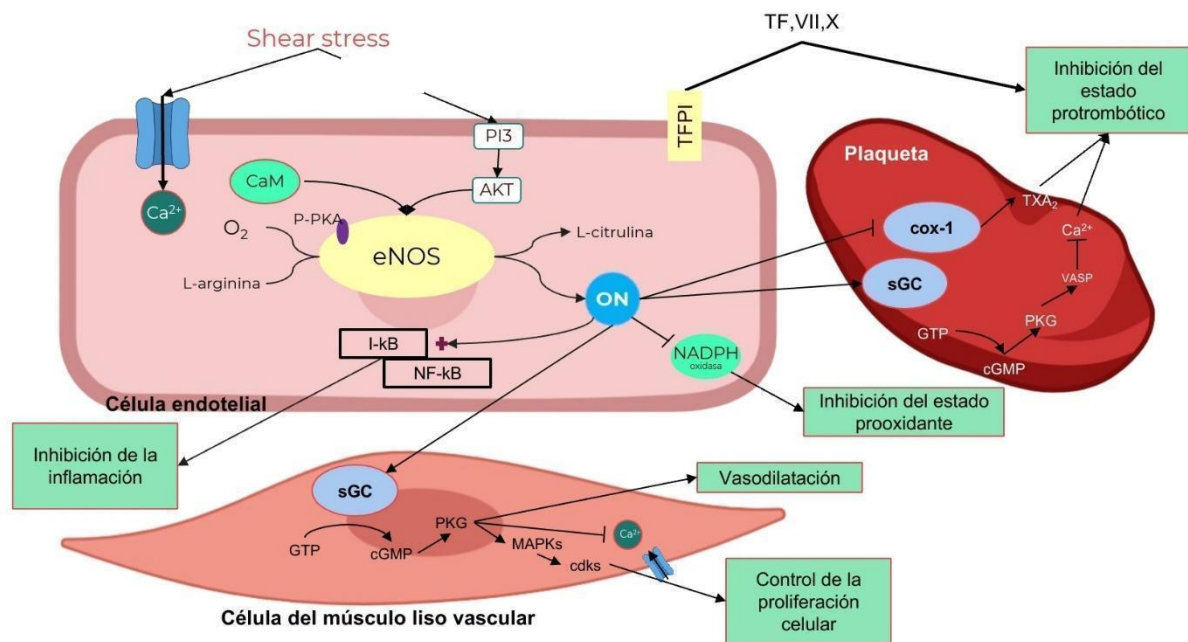


Figura 1. Efectos y síntesis de óxido nítrico.

El óxido nítrico (ON) es sintetizado a partir de un cambio en el endotelio, ocasionando que las concentraciones de calcio aumentan en la célula y activando así a la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) dependiente de calcio calmodulina (CaM) y de PKA que fosforila a la eNOS y La L-arginina y el oxígeno molecular (O_2) son transformados en ON y L-citrulina. La otra vía de activación para la producción de ON es la vía PI3K-AKT, se ha demostrado que AKT fosforila a la eNOS en su residuo de serina 1179 resultando así en la activación de esta enzima. Una vez que el ON es producido este difunde a través del endotelio hacia la célula del músculo liso vascular en donde se une al guanilato ciclasa, produciendo un incremento de concentraciones de GMPc. El GMPc, activa la proteínaquinasa dependiente de la cGMP, disminuyendo la concentración de calcio citosólico, causando la relajación del músculo liso y disminuyendo el tono vascular, el óxido nítrico siguiendo la misma vía actúa sobre la activación de las MAPKs y CDKs controlando la proliferación celular. Esta molécula se encarga de la regulación de la inflamación al mantener I κ B unido a NF- κ B e impedir su translocación al núcleo El ON inhibe la agregación plaquetaria a través del aumento de cGMP intracelular gracias a la activación del guanilato ciclasa. Este aumento de cGMP estimula a la enzima PKG, la cual tiene la capacidad de fosforilar varias proteínas plaquetarias. Los principales blancos de la señalización ON/cGMP son la VASP (del inglés Vasodilator-stimulated phosphoprotein), el receptor de tromboxano A2 y proteínas y receptores involucrados en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular. En particular, la fosforilación de VASP es un marcador importante ya que se correlaciona con la inhibición de la liberación intracelular de Ca^{2+} . Al reducir la concentración de este catión divalente, la presencia de ON inhibe la activación plaquetaria en varios niveles.

2.2 Disfunción endotelial

La disfunción endotelial es una alteración en la capacidad funcional del endotelio para mantener el equilibrio vascular (Badimón-Martínez, 2006). Este proceso se caracteriza por una menor biodisponibilidad de ON, aumento del estrés oxidante, así como de factores proinflamatorios y protrombóticos, además de la alteración en la vasorreactividad,

ocasionando un estado prooxidante, proinflamatorio, proliferativo y procoagulante (Carvajal, 2017).

2.2.1 Estado prooxidante

El estrés oxidante (EO) ocurre cuando el equilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes de la célula se ven afectados (Xu et al. 2021), por lo que hay mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH^\cdot$), así como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) y ácido hipocloroso ($HOCl$) (González et al, 2009). La mayoría de estas ROS están producidas por la enzima Nicotinamida Adenin Dinucleótido Fosfato Oxidasas (NADPH oxidasa) y por el desacoplamiento de la eNOS (Xu et al. 2021). Otras enzimas involucradas en este proceso son la xantino oxidasa, la ciclooxigenasa, glucosidasa y lipooxigenasa (González et al., 2009).

Los niveles elevados de ROS favorecen el estado prooxidante ya que oxidan moléculas como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas lo que las transforma en disfuncionales afectando la fisiología de la célula (Xu et al. 2021). Uno de los efectos mas importantes del estrés oxidante es la reducción de la biodisponibilidad del NO, lo que afecta de manera severa las funciones de la célula endotelial para mantener la homeostasia vascular, es decir, induce el estado proinflamatorio y protrombótico, la vasoconstricción y el remodelado vascular característicos de la disfunción endotelial (Carvajal, 2017).

2.2.2 Estado proinflamatorio

Este estado es producido en respuesta a condiciones adversas en las que las se encuentran las células endoteliales, como el estado oxidativo, ante esto las células se activan y producen interleucinas, quimiocinas, moléculas de adhesión intracelular como (ICAM-1), P-selectina, E-selectina, molécula de adhesión vascular (VCAM-1), factores de crecimiento y citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IL-6. La producción de ROS activa vías inflamatorias como el factor de transcripción NF- κ B promoviendo la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión y otros mediadores inflamatorios (figura 2). Las moléculas de adhesión son sobre expresadas en la superficie del endotelio y facilitan la adhesión y migración de leucocitos, las citocinas proinflamatorias amplifican la respuesta inflamatoria reforzando así este estado (Xu et al., 2021).

2.2.3 Vasoconstricción

El equilibrio entre la relajación y la constricción del vaso sanguíneo depende de la concentración de sustancias vasoconstrictoras como la Ang II, Endotelina y Tromboxano A2 y las vasodilatadoras como el ON, prostaglandinas y factor hiperpolarizante derivado del endotelio. De estas la más importante es el ON el cual es producido por la eNOS. Sin embargo, cuando hay un exceso de O_2^- , este se une a la eNOS y la desacopla, por lo que no se produce ON y en su lugar se generan más ROS potenciando el estado oxidante. Que se incrementa por la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$) en consecuencia a la unión del O_2^- a las moléculas de ON que hubieran estado presentes (Meza et al., 2019).

Dado que no hay ON que difunda hacia la CMLV, esta es incapaz de modular su estado contráctil, por lo que permanece en un estado de contracción contribuyendo a la disfunción endotelial, la Ang II además de ocasionar una menor disponibilidad de ON se une a su receptor en la VSMC y promueve la contracción de esta (Rincón. 2022).

2.2.4 Remodelación vascular

El remodelado vascular es un proceso estructural y funcional en la pared de los vasos sanguíneos que ocurre como respuesta a los cambios hemodinámicos y bioquímicos, en condiciones normales este proceso es adaptativo y bien regulado por las sustancias que secreta el endotelio principalmente el ON, sin embargo cuando durante la DE hay una reducción en la biodisponibilidad del ON y un aumento en las ROS lo que ocasiona que el remodelado vascular se vuelva patológico, promoviendo la hipertrofia de la pared vascular y rigidez arterial por un incremento en la proliferación de las célula del músculo liso vascular. Ocasionado por la inhibición de la vía de producción de GMPc, cuando disminuye el ON hay una reducción en el GMPc y por lo tanto no hay activación de la PKG, lo que permite la activación de vías proliferativas como MAPK/ERK, contribuyendo a la progresión de enfermedades cardiovasculares (figura 2) (Domínguez y Ordoñez, 2020)

2.2.5 Estado protrombótico

El endotelio en su estado fisiológico normal tiene propiedades que desfavorecen la coagulación y la activación de las plaquetas, esto debido a la producción de prostaciclina y de ON que al trabajar juntos actúan como antiagregante plaquetario (González et al., 2009). El ON inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria y por otro lado la prostaciclina es un inhibidor eficaz en la agregación plaquetaria (Carvajal, 2017). Cuando se produce la disfunción endotelial, las células pierden o disminuyen su capacidad para

modular la generación de trombos, y secretan moléculas de adhesión plaquetaria como en factor de Von Willebrand (vWF), fibronectina y trombospondina, así como factores de que favorecen la coagulación como en factor V (Badimón-Martínez, 2006).

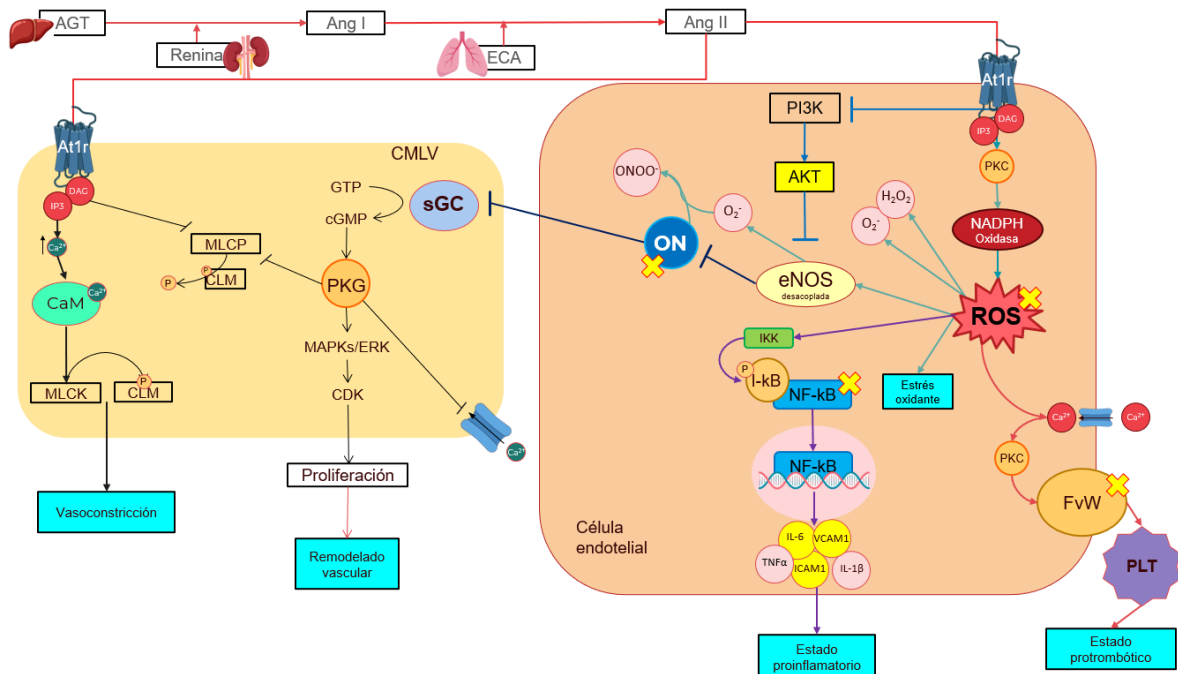


Figura 2: Disfunción endotelial secundaria al incremento en las concentraciones de Ang II. El angiotensinógeno es secretado por el hígado y escindido por la renina a angiotensina I y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se encarga de convertirla a su estado activo en angiotensina II, una vez esta se encuentra activa se une a su receptor de angiotensina (At1r) en la célula endotelial. El aumento en las concentraciones de Ang II ocasiona sé que active a la NADPH oxidasa a través de la PKC y se genere ROS sobre todo O_2^- , H_2O_2 lo que promueve un desacople de la eNOS y por lo tanto una menor síntesis de ON. Las ROS se encargan de generar un ambiente de estrés oxidante en la célula lo que favorece la activación de la vía de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) lo que desencadena la migración de factor NF-kB al núcleo y la producción de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1, selectinas), citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6) y moléculas como la proteína c reactiva (PCR) y ciclooxygenasa 2 (COX2) desencadenando un estado proinflamatorio. La baja disponibilidad del óxido nítrico desencadena que no pueda difundir hacia la célula del músculo liso vascular por lo tanto no haya vasodilatación de ésta. El aumento en las ROS ocasiona que haya un incremento En la entrada de Ca^{2+} a la célula activando PKC ocasionando a Unión de los cuerpos de Weibel-Palade a la membrana celular y por consiguiente la secreción del vWF y el reclutamiento plaquetario.

2.3 Causas de la disfunción endotelial

La disfunción endotelial es un estado en el cual las células endoteliales pierden la capacidad de mantener el equilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, así como de la función antiinflamatoria, antioxidante y antitrombótica. Este desequilibrio se caracteriza principalmente por una disminución en la biodisponibilidad del ON, se ha demostrado que los factores de riesgo cardiovascular como el tabaquismo, sobrepeso u obesidad,

hipercolesterolemia, diabetes mellitus y la hipertensión arterial están asociadas al desarrollo de la DE, estos factores están relacionado con un incremento en la producción de Ang II pues activan el sistema renina-angiotensina-aldosterona tanto de manera local como sistémica que ocasiona que hay una sobreproducción de ROS y por lo tanto una disminución en la biodisponibilidad de ON desarrollando así DE (Carvajal, 2017; Xu et al., 2021).

2.3 Enfermedades asociada a la disfunción endotelial

El endotelio es una parte importante en la conservación de la homeostasis vascular cuando ocurre la DE se presenta un desequilibrio en la producción de sustancias con acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras, este desequilibrio se debe a un deterioro en la producción y biodisponibilidad de factores vasodilatadores, principalmente el ON y a un aumento en la producción de sustancias constrictoras, de esta forma la disfunción endotelial está implicada en múltiples enfermedades como hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares como la enfermedad vascular cerebral, la enfermedad coronaria e insuficiencia cardiaca, así como la hipertensión pulmonar, la enfermedad renal, entre otras (Rey et al. 2020).

En la tabla se enlistan algunas enfermedades y su relación con la disfunción endotelial.

Patología	Relación con disfunción endotelial	Referencia
Ateroesclerosis	Menor disponibilidad de ON, expresión de moléculas de adhesión, reclutamiento de macrófagos para convertirse en células espumosas.	Xu et al.,2021
Insuficiencia cardiaca	Aumento en las concentraciones de PCR, ROS, niveles elevados de vWF, alteración en la vasoconstricción y vasodilatación de los vasos sanguíneos	Sanín y Buitrago., 2014
Hipertensión pulmonar	Alteración en la producción de agentes vasoactivos, aumento en el tono vascular y remodelado vascular.	Fonseca et al., 2005
Hipertensión arterial	Alteración en la síntesis y biodisponibilidad del óxido nítrico, se favorece el estado aterogénico y coagulante.	Rajendran et al., 2013
Diabetes Mellitus tipo 2	Aumento en el estrés oxidativo, liberación de citocinas proinflamatorias, activación de la proteína cinasa C	Storino et al., 2014
Insuficiencia renal crónica	Aumento en la concentración de vWF, trombomodulina, expresión de moléculas de adhesión, aumento de citocinas proinflamatorias	Baur et al., 2003

Tabla 1. Enfermedades relacionadas con la disfunción endotelial y su implicación en estas.

2.4 Tratamiento de la disfunción endotelial.

El tratamiento de la disfunción endotelial está encaminada a mejorar la función de endotelio, la primera meta del tratamiento es la prevención de factores de riesgo con la modificación del estilo de vida, el control dietético, ejercicio físico, control del peso, reducción del hábito tabáquico y alcohólico. Se ha demostrado que el ejercicio físico ayuda a mejorar el función endotelial, ya que el aumento del flujo sanguíneo incrementa la tensión en la pared vascular lo que aumenta la liberación de óxido nítrico; la reducción del peso corporal, mejora la función endotelial por reducción de citocinas proinflamatorias que se encuentran elevadas en procesos de obesidad y sobrepeso, el cese en el hábito tabáquico contribuye a una mayor secreción de óxido nítrico pues el tabaco ocasiona que haya una menor disponibilidad de esta (Hirata et al., 2010; Simón et al., 2001; Xu et al., 2021).

La terapia farmacológica más empleada está encaminada a la preservación de la función del endotelio y retrasar la progresión de la aterosclerosis, se emplean de forma activa estatinas para el tratamiento de la disfunción endotelial, se ha encontrado que el uso de estos fármacos durante 6 meses es capaz de mejorar las funciones de vasodilatación del endotelio, este fármaco aumenta la expresión de eNOS y reduce la síntesis de endotelina-1, provocando que haya un aumento en la liberación del ON. Los inhibidores del sistema renina-angiotensina como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, son fármacos que se ha visto producen una mejoría en la función endotelial, mediante la inhibición de la degradación de la bradiquinina y el aumento del ON, así como la disminución de los niveles de angiotensina II lo que provoca una menor producción de ROS y un aumento en la biodisponibilidad del ON (Yasunobu et al., 2010; Xu et al., 2021)

El losartán es un antagonista competitivo selectivo de los receptores AT1 de angiotensina, la angiotensina II es una hormona que causa vasoconstricción y promueve la inflamación, así como la proliferación de las células del músculo liso vascular, se ha demostrado que este fármaco aumenta la disponibilidad del ON en el endotelio favoreciendo la relajación de los vasos sanguíneos y mejorando el flujo sanguíneo (Al-Majed et al., 2015; Hirata et al., 2010; Watanabe et al., 2005).

Los antioxidantes como la vitamina C, vitamina E y el ácido alfa lipoico pueden ayudar a reducir el estrés oxidativo y mejorar la función endotelial, aunque su eficacia varía y debe ser evaluada caso por caso. Se pueden indicar medicamentos como la aspirina que al ser

antiagregantes plaquetarios pueden ser utilizados para reducir el riesgo de trombosis al mejorar la función endotelial. (Simón et al. 2001)

3. Antecedentes

3.1 Taxonomía de *Sechium edule*

Sechium edule comúnmente conocida como “chayote” es una planta nativa de México y expandida por Latinoamérica. Cultivada desde tiempos precolombinos por los Aztecas y Mayas, cuenta con una amplia diversidad biológica principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz. Perteneciente a la familia de las Cucurbitaceae, la especie *Sechium edule* ha sido clasificada con base en la variación morfológica de los frutos, en dos, los tipos I y tipo II, De acuerdo con Cruz-León (1985-86) la variedad tipo I podría ser el varadero antecesor de los chayotes domesticados, mientras que los tipos II el resultado de cruzamientos espontáneos de plantas silvestre con domesticados.

Reino: Plantae

División: Anthophyta

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitaceae

Género: *Sechium*

Especie: *Sechium edule*

3.2 Etnobotánica de *Sechium edule*

Se tiene conocimiento de que *Sechium edule* es utilizado en el sureste de México comúnmente para disolver cálculos renales y en la vejiga, así como antiinflamatorio en padecimientos urinarios. También se conoce el uso de esta planta para el tratamiento de problemas relacionados con la hipertensión arterial, aterosclerosis y varices, en el centro y sur de México, es empleado en algunos problemas digestivos como estreñimiento, dolor y parasitosis; otro uso que se le ha dado es como antipirético sobre todo en niños. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana).

3.3 Fitoquímica de *Sechium edule*

En 2014 Lombardo-Earl y colaboradores reportaron la presencia de ácido cinámico y ácido cumárico, que se ha demostrado tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

En 2020 Costet, identificó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y espectrofotometría de masas, los compuestos que contiene la raíz, son compuestos fenólicos como ácido cumárico y ácido cinámico, flavonoides como la apigenina y terpenos como el Metil tetradecanoato, Ácido hexadecanoico, metil éster, Ácido hexadecanoico, Escualeno, y Estigmasterol.

Compuesto		Función	Mecanismo de acción	Referencia
Ácidos Fenólicos	Ácido cumárico	Antioxidante y antiinflamatorio	Reduce especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, se le atribuye su efecto antiinflamatorio a su actividad sobre la inhibición de la vía de señalización NF-kB	Ruwizhi and Aderibigbe, 2020
	Ácido cinámico 1.36 mg/G de rSe-HA			
Flavonoides	Apigenina	Vasodilatador	Promueve la síntesis de ON al incrementar la actividad de la eNOS incrementando la producción de cGMP	Gutiérrez-Venegas 2018
Terpenos	Escualeno	Antioxidante	Disminuye la producción de ROS	Escusol, 2016
	Estigmasterol	Antiinflamatorio	Disminuye la liberación de citocinas proinflamatorias y COX-2, disminuyendo la expresión de NF-kB, inhibiendo la actividad de IKB.	Bakrim et al. (2022), Khan et al. (2020)
	Metil tetradecanoato	Actividad no relacionada con las características de la disfunción endotelial (inflamación, estrés oxidante, estado protrombótico, vasoconstricción, remodelado vascular)		
	Ácido hexadecanoico metil éster			
	Ácido hexadecanoico			

Tabla 2. Compuestos presentes en el rSe-HA y su actividad reportada sobre la disfunción endotelial

Se realizaron estudios sobre el efecto de la raíz de *Sechium edule* en un modelo de hipertensión arterial en ratas vagotomizadas inducido por la acción de Angiotensina II, se reportó que la administración de diferentes dosis de rSe-HA es capaz de inhibir en incremento de la presión arterial y ayuda a reducir la presión arterial a partir de la administración de 100 y 200 mg/kg, y esta fue proporcional a la administración de la dosis de Ang II. A partir de estos resultados proponen como probable mecanismo de acción que el extracto tiene actividad antagonista sobre la Ang II actuando sobre su receptor AT1 o sobre las concentraciones de calcio mediadas por la concentración de Ang II, impidiendo así la vasoconstricción. En 2018 Trejo y colaboradores estudiaron el efecto de la fracción acetónica de la raíz de *Sechium edule* en la prevención de patologías asociadas a la disfunción

endotelial en un modelo murino de disfunción endotelial inducido por la administración prolongada de Ang II, demostrando que esta fracción es capaz de controlar la disfunción endotelial y las patologías asociadas a esta como el daño renal y hepático gracias a los compuestos que lo conforman. El ácido cinámico, ácido cumárico y sus derivados poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, entre otras. Se ha descrito que los compuestos fenoles tienen la capacidad de capturar radicales libres y especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, se le atribuye su efecto inflamatorio a su actividad sobre la inhibición de la vía de señalización NF-kB. (Ruwizhi and Aderibigbe 2020). Se ha estudiado que los compuestos flavonoides poseen actividad antioxidante al secuestrar radicales libres, e inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno, se han realizado estudios en los que se demuestra que estos compuestos tienen la capacidad de incrementar el guanosín-monofosfato cíclico (cGMP) y regular la vía cGMP-óxido nítrico, así como promover una disminución en la actividad de NADPH-oxidasa que está relacionada con la alteración en la biodisponibilidad de los niveles de oxígeno, y la producción de ROS. (Gutiérrez-Venegas 2018).

4. Justificación

La disfunción endotelial, que es la pérdida de la capacidad del endotelio para regular sus funciones fisiológicas, representa un problema de salud importante a nivel mundial, pues es la base del desarrollo de enfermedades de alta prevalencia e incidencia como son las enfermedades cardiovasculares y se relaciona de manera directa con las enfermedades metabólicas, siendo estas, enfermedades con altos índices de mortalidad y morbilidad a nivel nacional y mundial. Aunque la DE es la causa de dichas enfermedades, no existe un tratamiento para el manejo de esta, sólo para el tratamiento individual de las patologías resultantes de la misma y control de los factores desencadenantes, pero no de forma específica para la disfunción endotelial.

Es por esto por lo que el desarrollo de tratamientos enfocados en la disfunción endotelial es necesario para el control de la afección de forma integral y de esta forma se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (rSe-HA) controla las diferentes características de la disfunción endotelial *in vitro*?

5. Hipótesis

- El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* aumenta la biodisponibilidad del ON a través de la activación de AKT, controla el estado prooxidante a través de la activación de enzimas antioxidantes y la reducción de radicales oxígenos, el proinflamatorio a través de evitar la activación de NF-kB; protrombótico a través de evitar la secreción del factor de von Willebrand; el proliferativo a través de aumentar la biodisponibilidad del ON en condiciones asociados a la disfunción endotelial, *in vitro*.

6. Objetivo

- Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* para controlar el estado prooxidante, proinflamatorio, protrombótico y proliferativo asociados a la disfunción endotelial, *in vitro*.

7. Objetivos Particulares

- Determinar la concentración efectiva del rSe-HA para contrarrestar la disfunción endotelial a través de la producción de IL-6
- Evaluar el efecto de la CE del extracto rSe-HA sobre la producción de óxido nítrico en células endoteliales disfuncionales.
- Evaluar el efecto de la CE del extracto rSe-HA sobre la producción de ROS como marcador de estrés oxidativo en células HMEC-1 disfuncionales.
- Determinar el efecto de la CE del extracto rSe-HA sobre el remodelado vascular *in vitro*.
- Determinar el efecto de la CE del extracto rSe-HA sobre la producción del factor von Willebrand en células endoteliales disfuncionales.
- Determinar el efecto de la CE del extracto rSe-HA sobre la activación de Akt, P65, en células endoteliales disfuncionales.

8. Metodología

8.1 Cultivo de células endoteliales

Las células endoteliales de microvasculatura humana 1 (HMEC-1) se cultivaron en frascos de cultivo de 75cm² en medio MCDB-131 suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 10 nM L-glutamina (Gibco®, 11105117), 1 µg/ml Hidrocortisona. Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura de 37°C y a 5% de CO². Cuando alcanzaron la confluencia del 90% las células se lavaron con PBS (140 mM de NaCl, 2 mM de KCl y 1.15 mM de K₂HPO₄) y se desprendieron con 2.5 ml de Tripsina 5% - Verseno 5% y se incubaron a 37°C por 5 min para terminar de desprenderse. Para detener la reacción se agregaron 7 ml de medio suplementado y se pasaron a un tubo estéril. Posterior a esto, el tubo se centrifugó a 1200 rpm y a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 1ml de medio MCDB-131 suplementado y se realizó conteo de viabilidad celular con azul-tripano. Las células se sembraron en las condiciones determinadas para cada procedimiento experimental.

8.2 Determinación de la viabilidad celular por ensayo de LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática estable presente en todas las células. La LDH es liberada al sobrenadante del cultivo celular cuando la membrana plasmática se daña. La actividad de esta enzima se puede cuantificar utilizando el NADH producido durante la conversión de lactato a piruvato para reducir un segundo compuesto en una reacción acoplada y obtener un producto con propiedades fácilmente cuantificables (Kumar P, et al. 2018). Para estos experimentos las células se cultivaron en medio MCDB-131 suplementado dos placas de 96 pozos a una densidad celular de 1×10^4 por pozo a 37°C con 5% CO₂. En la primera placa se evaluará el efecto de la Ang II sobre la viabilidad de las células endoteliales en las condiciones de cultivo a través del ensayo de LDH para lo cual las células se cultivaron durante 12h con 5 µM de Ang II, a excepción de las células control sin tratamiento. En la segunda placa, se evaluó el efecto de los tratamientos (Losartán (10 µM) y 0.18, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 µg/ml de rSe-HA) aunada a la Ang II (5 µM) sobre la viabilidad de las células endoteliales. Para lo cual, a los pozos que fueron incubados con Ang II previamente, se les aplicó los tratamientos descritos y se mantuvieron durante 12 horas más en las condiciones de cultivo descritas (Figura 3).

Para evaluar el efecto de las condiciones de cultivo de ambas placas, al terminar el tiempo de cultivo determinado, se recuperó el medio de cultivo y se almacenó hasta su utilización.

En una placa de 96 pozos se colocó el 50 μ L reactivo A (Buffer/tampón) del kit para la detección de LDH seguido de 50 μ L de muestra, se dejó incubar por 1 min y se le agregó 50 μ L por pozo del reactivo B (NADH), posterior a esto se leyó a 340 nm en un lector de placas de ELISA VersaMax (Molecular Device) a los minutos 1, 2 y 3.

Este procedimiento se realizó mínimo dos veces.

8.3 Determinación de la concentración efectiva por medio de la concentración de IL-6

Las células se cultivaron en placas de 24 pozos a una densidad celular de 1×10^5 en las condiciones descritas en la sección anterior. El parámetro que se utilizó para determinar la concentración efectiva 50 del rSe-HA, fue la producción de IL-6 en el medio de cultivo por ELISA. Para lo cual las células se cultivaron por 12 horas con Ang II, menos las células control, posterior a esto se recuperó el medio de cultivo de todos los pozos y se congeló a -80°C hasta su uso. A los pozos tratados con Ang II se les colocó las diferentes condiciones experimentales. A los pozos correspondientes al control farmacológico se le agregó (Losartán 10 μ M) y a los pozos experimentales, sobre las cuales se calculó la concentración efectiva del rSe-HA, se cultivaron con las concentraciones que previamente demostraron no causar muerte celular (0.18, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 μ g/ml) se incubaron por 12 horas más y se recuperó el medio de cultivo para determinar la concentración de IL-6.

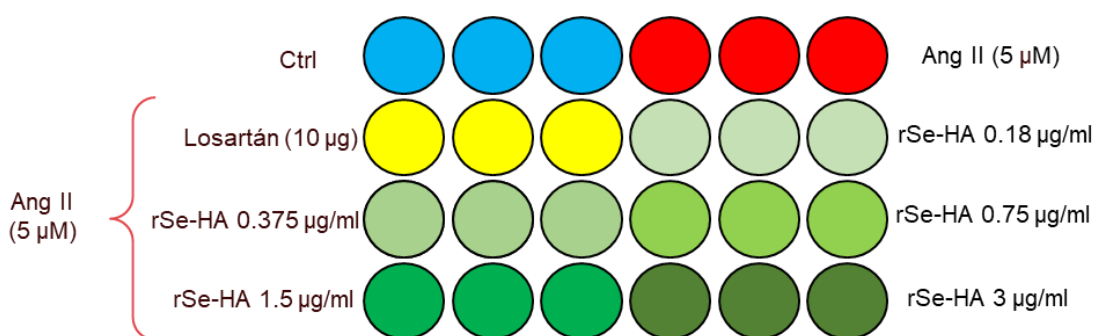


Figura 3: Condiciones de cultivo. Control negativo con células sin tratamiento ●, células tratadas con Ang II (5 μ M) ●, Células tratadas con Ang II (5 μ M) y Losartán (10 μ M) ●, células tratadas con Ang II (5 μ M) y con 0.18 ●, 0.375 ●, 0.75 ●, 1.5 ● y 3 ● μ g/ml de rSe-HA.

8.3.1 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para la determinación de IL-6

Se realizó la cuantificación de IL-6 humana utilizando un kit comercial (Biolegend) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se sensibilizó la placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura en buffer de carbonatos en una relación 1:250 y se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (Sigma, P1379) al 0.05%. Posteriormente se bloqueó con PBS-BSA al 1 % y se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora, transcurrido ese tiempo, se lavó las placas con PBS Tween 0.05% y se colocaron 100 µl/pozo de la curva estándar de IL-6 o de las muestras de medio recuperado de 12 y 24 horas de las condiciones descritas en el punto 8.5, se incubó a temperatura ambiente por dos horas. Concluidas las dos horas, la placa se lavó 5 veces y se agregó el anticuerpo de detección conjugado con la enzima HRP y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después la placa se lavó 7 veces y se colocó el sustrato TMB (Sigma, T0440), se dejó incubar a temperatura ambiente por treinta minutos en total oscuridad. Al finalizar la incubación se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2N y se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 450 nm.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Sigma, B6916), para ello, en placas de 96 pozos se colocaron 5 µl/pozo de las muestras de medio obtenidas del cultivo celular descrito en el punto 8.5 y se agregó el reactivo de Bradford se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos en total oscuridad y finalmente se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 595 nm. Finalmente, se determinaron las concentraciones de IL-6 y proteínas empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar correspondiente, considerando como adecuada una R²>0.98.

8.4 Cultivo de células para determinación de ON

Las células se cultivaron en las condiciones descritas en la sección anterior y el procedimiento fue el mismo, una caja para evaluar el efecto de la Ang II sobre la producción de ON y otra para evaluar el efecto de los tratamientos sobre este parámetro. Los grupos experimentales en este procedimiento son los mismos que se utilizaron en el anterior a excepción de que ya se cuenta con la concentración efectiva [0.75 µg/ml] del extracto rSe-HA (figura 4) Por otro lado, los tiempos de incubación, ya sea para evaluar el efecto de la Ang II

o los tratamientos sobre las células disfuncionales fue de 12 horas. Para la determinación de la concentración del ON se utilizó el medio de cultivo.

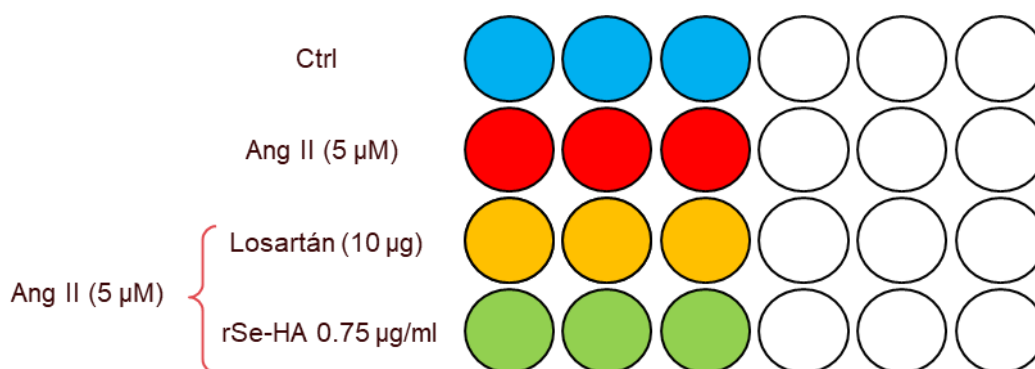


Figura 4 Condiciones de cultivo. Control negativo con células sin tratamiento ●, células tratadas con Ang II (5 µM) ●, Células tratadas con Ang II (5 µM) y Losartán (10 µg) ●, células tratadas con Ang II (5 µM) y con 0.75 µg/ml de rSe-HA.

8.4.1 Prueba de Griess

En placas de 96 pozos se colocaron 50 µL/pozo del medio de cultivo de células HMEC-1 en las condiciones descritas en la sección 8.4 y 50 µL/pozo de sulfanilamida al 1%. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente en constante agitación, posteriormente se agregó 50 µL/pozo de N-1-(naftil)etilendiamina al 0.1% y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en constante agitación. Al finalizar el tiempo se realizó la lectura en un lector de placas versaMax a 540 nm. Para determinar la concentración de ON se realizó una curva estándar y la ecuación lineal, considerando como adecuado una $R^2 > 0.98$.

Cuando menos, se realizaron dos repeticiones de este experimento.

8.5 Cuantificación de ROS

Las células se cultivaron en las condiciones descritas en la sección anterior y el procedimiento fue el mismo, una caja para evaluar el efecto de la Ang II sobre la producción de ON y otra para evaluar el efecto de los tratamientos sobre este parámetro. Los grupos experimentales en este procedimiento son los mismos que se utilizaron en el anterior (figura 4) Por otro lado, los tiempos de incubación, ya sea para evaluar el efecto de la Ang II o los tratamientos sobre las células disfuncionales fueron de 6 horas. 30 minutos antes de finalizar los cultivos se agregó 10 µM de dihidroetidio (DHE), posteriormente se les realizaron 3 lavados con PBS atemperado y se colocó medio fresco posterior a esto se analizaron en el

lector de placas multimodal con microscopio CYTATION 5 utilizando el software Gen5 (Biotek Instruments) a 20X.

8.6 Determinación de la concentración del factor de von Willebrand por ELISA en sandwich

Las células se cultivaron en las condiciones descritas en el punto 8.4 (figura 4). En placas de 96 pozos se sensibilizó con el anticuerpo de captura en buffer de carbonatos en una relación 1:250 y se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces de PBS-Tween 20 (Sigma, P1379) al 0.05%. Posteriormente se bloqueó con PBS-SFB al 5 % y se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora, transcurrido ese tiempo, se lavaron las placas con PBS Tween 0.05% y se colocaron 100 µl/pozo de las muestras de medio recuperado de 12 y 24 horas. Concluidas las dos horas, se agregó el anticuerpo de detección y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después la placa se lavó 7 veces y se colocó Anti IgG marcado con peroxidasa a una dilución 1:1000 con PBS, se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora. Al finalizar la incubación se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2 N y se realizó la lectura en un lector de placas VersaMax (Molecular Device) a 490 nm. Se determinaron las concentraciones de IL-6 empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R²>0.98.

8.7 Evaluación in vitro del remodelado vascular

Se utilizaron 12 ratas Wistar macho de 12 semanas de edad y se sacrificaron con CO₂. Posteriormente, se diseccionaron dentro de la campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad y se obtuvieron anillos de 4 mm de la arteria aorta. Los anillos se colocaron en placas de 24 pozos con 500µl de medio DMEM/F12 (Gibco, 11320033) suplementado con 10% SFB, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, 10 nM L-glutamina y 1 µg/ml Hidrocortisona. Por condición se colocaron 5 anillos de cada arteria. Las condiciones en las que se mantuvieron los tejidos fueron: sin tratamiento (control), con angiotensina II (80 µM) y con angiotensina II y tratamientos que son Losartán 10 µM (control farmacológico) y la CE50 rSe-HA [0.75 µg/mL] a 37°C con 5% CO₂ por 5 días. Pasado ese tiempo se retiró la mitad del medio y se colocaron 250 µl de medio suplemento fresco adicionado con angiotensina II (80,000 nM) y los tratamientos según los pozos correspondientes y se incubaron en las mismas condiciones por 4 días más. Transcurridos los 9 días, los anillos se

fijaron con formalina buffereada al 4% (PBS al 10% de formaldehído) y se incluyeron en parafina para ser procesadas para histología.

8.8. Histología

Las muestras de tejido se desparafinaron y se deshidrataron con alcoholes en concentraciones decrecientes iniciando con alcohol al 100% hasta llegar a agua destilada. Para la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) se agregó hematoxilina por 8 minutos, se lavó con agua destilada y se agregó eosina por 3 minutos. Para deshidratar el tejido se pasaron alcoholes con concentraciones ascendentes. Se agregó una gota de resina sobre el tejido y se colocó con un cubreobjetos, se dejó secar toda la noche y observó en el microscopio con aumento de 4 y 40 X.

Para la tinción de Tricómico de Masson se aplicó el buffer de Bouin durante 10 minutos a 37°C, posteriormente se lavó y aplicó hematoxilina de Wright durante 15 minutos, se lavó con agua común y, se aplicó la solución fucsina ácida-escarlata de Biebrich durante 15 minutos, se lavó y aplicó ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 minutos, se lavó, se añadió azul de anilina durante 10 minutos, se lavó, se agregó ácido acético glacial al 1% durante 1 minuto, se deshidrató en la estación de los alcoholes de concentración creciente hasta llegar al alcohol absoluto y se pasó por Xilol 100% 2 veces por 5 minutos, se montó con resina. Finalmente se dejó secar toda la noche y al día siguiente se observó en el microscopio Nikon (ECLIPSE 80i) y se analizó con el software MetaMorph 6.1.

8.9 Western Blot

Se cultivarán 2×10^6 células en cajas petri en las mismas condiciones descritas en el punto 8.4. Al término del cultivo, las células se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris-base 50 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 2 mM; Triton X-100 1%) con inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP, Roche) e inhibidores de proteasas (Thermo Scientific) por 15 min. Los lisados se centrifugaron a $15,000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. Las proteínas en el sobrenadante se cuantificaron mediante el método de Bradford. Veinte microgramos de proteína se desnaturalizaron por ebullición durante 5 minutos en Laemmli Sample Buffer, posteriormente se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 10% y se transfirió electrolíticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Merck) usando tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH 8,5, glicina 193

mM, metanol 20%). Las membranas se bloquearon durante 1 hora con PBS-BSA 2%. Después de eso, se incubaron durante la noche con anticuerpos anti-AKT, anti-p65 y anti- β -actina (Cell Signaling Technology), diluidos 1:1000 en PBS-BSA 1% - Tween 20 0.05%. Después las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (Santa Cruz) por 2 horas. Finalmente, las membranas se revelaron con SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Las bandas se analizaron usando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.) y la señal anti- β -actina se usó para la normalización de los datos.

9. Análisis Estadístico

Todos los parámetros obtenidos se compilaron en Excel, todos los datos se analizaron con el programa INSTAT, las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba ANOVA. Con un valor de significancia de $P \leq 0.05$.

10. Resultados:

10.1 Determinación de la concentración efectiva del rSe-HA

10.1.1. Las concentraciones utilizadas para determinar la CE utilizadas para determinar la CE no afectan la viabilidad celular por ensayo de LDH

Con el objetivo de determinar la concentración efectiva del rSe-HA que se utilizará a lo largo del proyecto experimental, se propusieron cinco concentraciones. En primer lugar, se evaluó la toxicidad de estas, así como de la concentración del control farmacológico y de la Ang II a través del ensayo de LDH. Para lo cual se cultivaron células HMEC-1 en diferentes condiciones: Sin tratamiento (control negativo), con DMSO (control de muerte), con Ang II [5 μ M] (control positivo) o con los diferentes tratamientos: Losartán 10 μ M (control farmacológico) o 0.18, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 μ g/ml de rSe-HA aunados a Ang II. Los resultados indican (figura 5) que ninguno de los tratamientos fue tóxico para las células comparadas con el grupo sin tratamiento, a excepción del DMSO que es el control de muerte que reduce al 50% las células vivas ($p < 0.05$). Lo que valida el uso de estas concentraciones para la determinación de la concentración efectiva.

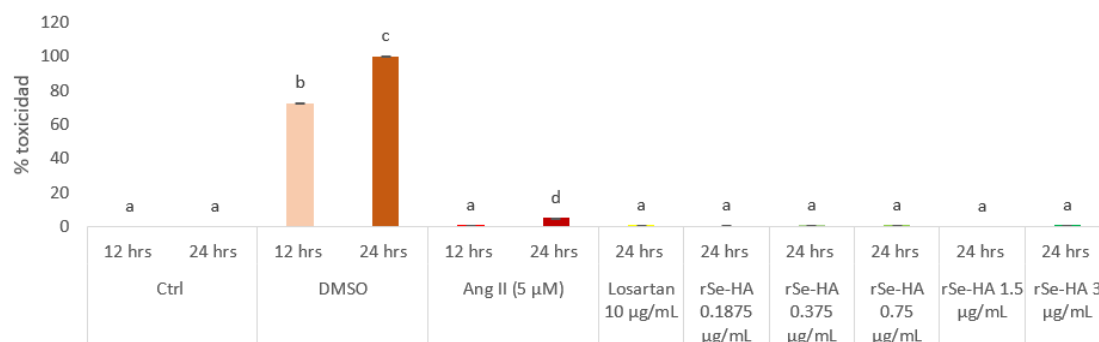


Figura 5. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular.

Ni las diferentes concentraciones del rSe-HA (0.18, 0.375, 0.75, 1.5, 3 µg/ml) ni los controles afectan la viabilidad de las células HMEC-1 con excepción del DMSO que redujo al 50% las células vivas. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer con un valor significativo de $P < 0.05$ (literales diferentes implican diferencias significativas, mientras que literales iguales implican que no hay diferencia significativa).

10.1.2. La concentración efectiva del rSe-HA es de 0.75 µg/mL

Una de las características principales de la disfunción endotelial es el estado proinflamatorio caracterizado por el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, por lo que la disminución de este parámetro permite la determinación de la concentración efectiva (CE) del extracto. Para lo cual se cultivaron células HMEC-1 estimuladas con Ang II [5 µM] durante 12 horas, posteriormente se les agregaron los diferentes tratamientos aunados a Ang II y se incubaron por otras 12 horas. En la figura 6 se observa que a las 12 hrs la Ang II aumentó significativamente ($P < 0.05$) la producción de IL-6 con respecto a los controles sin tratamiento y aunque disminuye a las 24 hrs sigue siendo significativamente ($P < 0.05$) alta con respecto a su respectivo control de tiempo sin tratamiento. Por otro lado, desde la concentración de 0.75 µg/ml del extracto hasta la más alta 3 µg/ml mostraron ser tan efectivas como el losartán [10 µM] ya que en 12 horas disminuyeron alrededor de 6 veces la concentración de este parámetro, pese a la presencia constante de Ang II, llevándolos a niveles parecidos a los del control sin tratamiento. Este resultado indica que la concentración efectiva del rSe-HA es de 0.75 µg/ml.

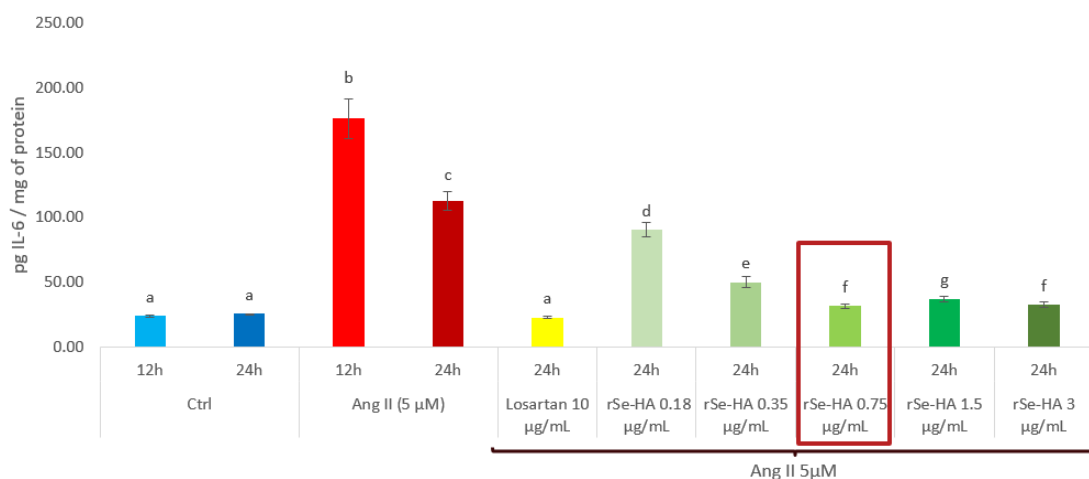


Figura 6. Efecto de las concentraciones del rSe-HA sobre la producción de IL-6 en células HMEC-1 disfuncionales

Se observa el efecto de los diferentes tratamientos sobre la producción de IL-6 (pg/mg de proteína) a las 12 horas previo a la aplicación de los tratamientos y 12 horas después de la aplicación de estos. Sin tx: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μM de Ang II, Losartán: células cultivadas con Ang II 5 μM y 10 μM de losartán, 0.18, 0.375, 0.75, 1.5 y 3 μg/ml son las concentraciones evaluadas del rSe-HA aunado a la Ang II 5 μM. ANOVA poshoc Tukey-Kramer. Literales iguales indican que no hay diferencia significativa entre grupos, literales diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

10.2 La concentración efectiva del rSe-HA aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico

La biodisponibilidad del óxido nítrico en la célula endotelial es esencial para la salud vascular, por lo que analizar la capacidad del extracto sobre este parámetro es de interés primario para este proyecto. Con el objetivo de evaluar la CE del rSe-HA sobre este parámetro, se cultivaron células endoteliales a las que se les indujo disfunción endotelial con Ang II (5 μM) durante 12 horas y posteriormente fueron tratadas con losartán y la CE [0.75 μg/mL] de rSe-HA por 12 horas más. Pasado ese tiempo se realizó el ensayo de Griess para la medición indirecta de óxido nítrico al medio de cultivo de las 12 y 24 horas experimentales. En la figura 7 se observa que la Ang II redujo de manera significativa los niveles de nitritos ($p < 0.05$) alrededor de un 9% desde las 12 hasta las 24 horas experimentales. El tratamiento con la CE del rSe-HA 0.75 μg/mL restableció los niveles de nitritos a valores comparables al del control sin tratamiento, mostrándose sin diferencias significativas respecto a este ($p > 0.05$) pese a la presencia constante de Ang II. Por otro lado, el control farmacológico si restableció el ON biodisponible sin embargo solo lo hizo un 4% siendo más eficiente el rSe-HA.

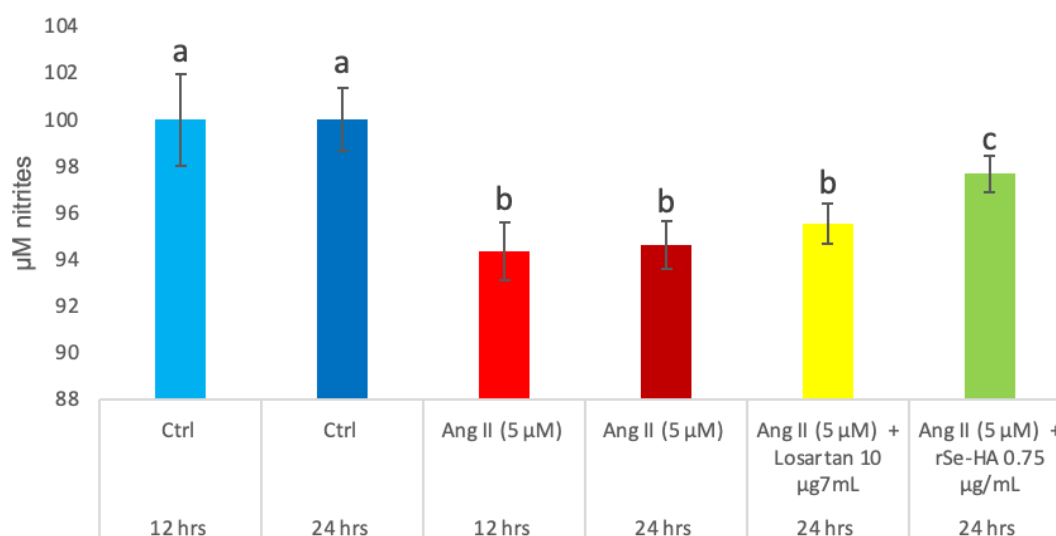


Figura 7. Efecto de la CE del rSe-HA sobre la biodisponibilidad de óxido nítrico en células endoteliales disfuncionales

Los niveles de nitritos se midieron como un indicador indirecto de la producción de óxido nítrico por el ensayo de Griess. El tratamiento con Ang II redujo significativamente la concentración de nitritos en comparación con el control sin tratamiento (Ctrl), mientras rSe-HA 0.75 μg/mL restauró los niveles de nitritos a valores similares al control sin tratamiento. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μM de Ang II, Ang II (5 μM) + Losartán: células cultivadas con Ang II 5 μM y 10 μM de losartán, Ang II (5 μM) + 0.75 μg/ml células cultivadas con Ang II 5 μM y 0.75 μg/ml del rSe-HA. ANOVA, Tuckey Kramer. Letras distintas (a, b) indican diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0.05$)

La vía de señalización PI3K/AKT/eNOS es un mecanismo clave en la regulación de la función endotelial y la homeostasis vascular. La activación de la PI3K conduce a la fosforilación y activación de AKT, una vez activada, AKT fosforila a la eNOS, promoviendo la producción de ON.

La activación de la vía de AKT se evaluó mediante la detección de la proteína fosforilada AKT por Western blot. Para esto se cultivaron células endoteliales a las que se les indujo disfunción endotelial con Ang II (5 μM) durante 6 horas y posteriormente fueron tratadas con losartán y la CE [0.75 μg/mL] de rSe-HA por 6 horas más. Pasado ese tiempo se realizó el western blot para la determinación de la proteína.

En la figura 8 se observa que la estimulación con Ang II (5 μM) disminuyó significativamente los niveles de p-AKT en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

En contraste, el tratamiento con rSe-HA en presencia de Ang II produjo un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de p-AKT, restaurándolos a valores comparables e incluso ligeramente superiores al grupo control. Este efecto sugiere una capacidad relevante de rSe-HA para contrarrestar

la inhibición inducida por Ang II sobre la vía de AKT. De manera similar, el tratamiento con losartán también revirtió la disminución de p-AKT inducida por Ang II.

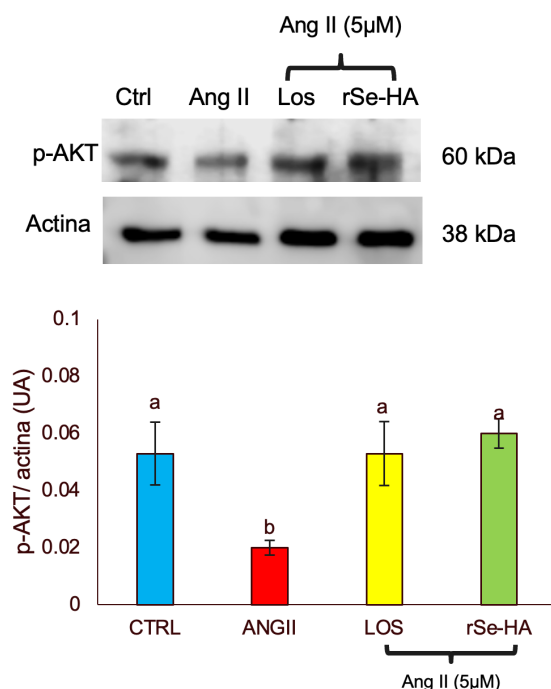


Figura 8. Efecto de la concentración efectiva del rSe-HA sobre la biodisponibilidad del óxido nítrico. Las células se trataron por 6 horas con Ang II y posteriormente con Ang II o Ang II más los tratamientos. El tratamiento con Ang II disminuyó significativamente la expresión de p-AKT en comparación con el grupo control (Ctrl). El tratamiento con el extracto CE rSe-HA o losartan aumentó significativamente los niveles de p-AKT, alcanzando valores comparables al control. Los datos se expresan como unidades arbitrarias (UA) normalizadas con β -actina. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μ M de Ang II, Los + Ang II: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 10 μ M de losartán, rSe-HA 0.75 μ g/ml + Ang II: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 0.75 μ g/ml del rSe-HA. Literales diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). ANOVA, Tuckey Kramer.

10.3 La concentración efectiva del rSe-HA disminuye la producción de las especies reactivas de oxígeno.

Uno de los mecanismos clave por los cuales Ang II induce daño endotelial es a través del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como por ejemplo a través de la activación de NADPH oxidasa en células endoteliales. Con el objetivo de evaluar si la concentración efectiva del rSe-HA ayudaba a la disminución de ROS, se cultivaron células endoteliales a las que se les indujo disfunción endotelial con Ang II (5 μ M) por 6 horas y se les aplicó tratamiento con losartán y la CE [0.75 μ g/mL] del rSe-HA durante otras 6 horas, terminado este tiempo se midió por DHE la concentración de ROS. En la figura 9 y 10 se observa que a las 6 horas de tratamiento la Ang II indujo un incremento significativo del 26% en comparación con el control sin tratamiento. A las 12 horas, este valor sólo disminuyó un

5%, manteniéndose significativamente ($p < 0.05$) alto con respecto al control de ese tiempo. La CE rSe-HA se mostró tan eficiente como el losartán, ya que pese al incremento inducido por la Ang II a las 6 horas, al final del tiempo experimental los tratamientos llevaron este parámetro al nivel del grupo control sin tratamiento no obstante la presencia constante de Ang II.

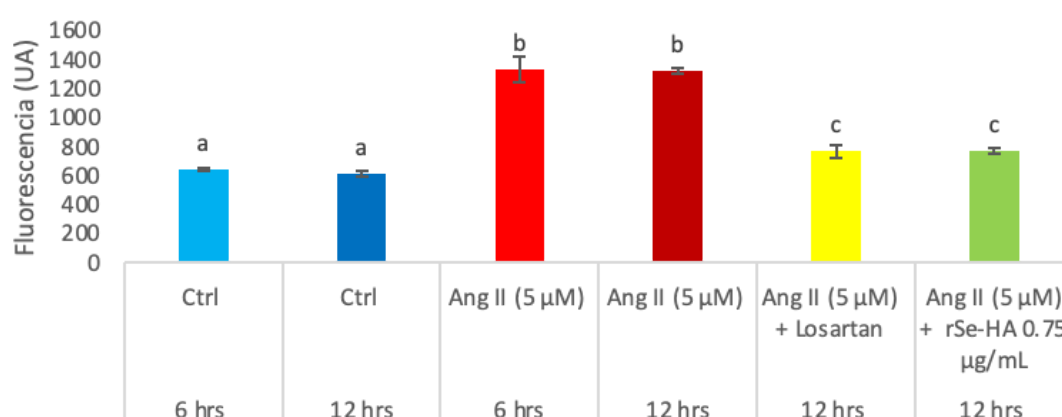


Figura 9. Producción de ROS en HMEC-1 disfuncionales por Ang II

Las células fueron estimuladas con Angiotensina II (Ang II) por 6 horas y posteriormente tratadas por otras 6 horas con los diferentes tratamientos. Los valores se expresan como intensidad de fluorescencia de ROS a las 6 y 12 horas experimentales. Los grupos control (Ctrl 6 h y 12 h) mostraron niveles basales de ROS. El tratamiento con Ang II incrementó significativamente la producción de ROS en comparación con los controles. El tratamiento con Losartán o rSe-HA revirtió este efecto, reduciendo los niveles de ROS a valores comparables al control. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 µM de Ang II, Ang II (5 µM) + Losartán: células cultivadas con Ang II 5 µM y 10 µM de losartán, Ang II (5 µM) + 0.75 µg/ml células cultivadas con Ang II 5 µM y 0.75 µg/ml del rSe-HA. ANOVA, Tuckey Kramer. Letras distintas (a, b) indican diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0.05$)

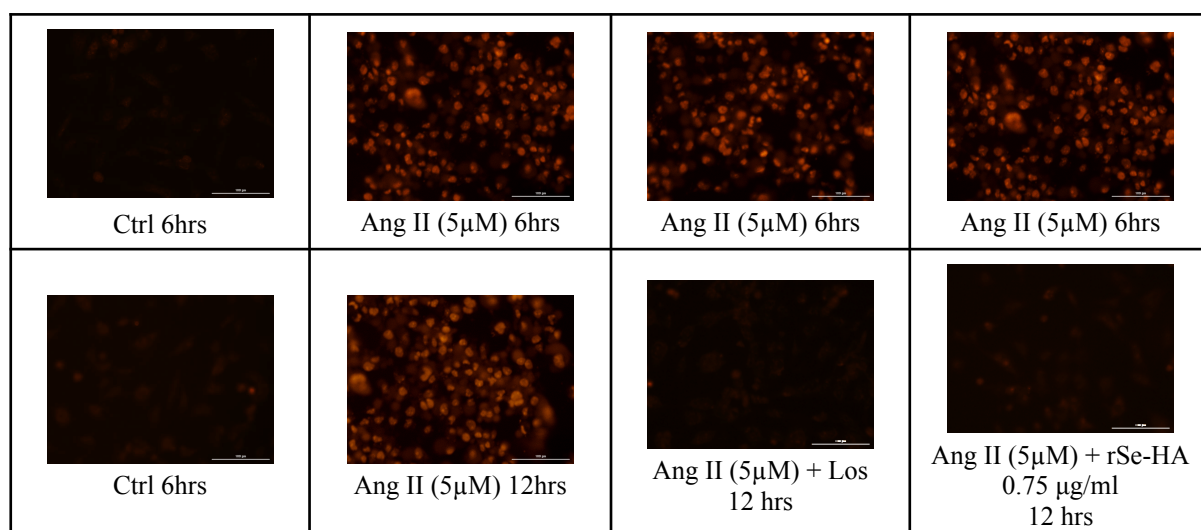


Figura 10: Micrografías de células HMEC-1 teñidas con DHE para la detección de especies reactivas de oxígeno. Las células fueron tratadas con Angiotensina II (Ang II, 5 µM) durante 6 horas y posteriormente tratadas con Losartán (10 µM), y la concentración efectiva del rSe-HA (0.75 µg/ml). Se incluyen grupos controles (Ctrl) los cuales no tienen ningún

tratamiento. El aumento en la fluorescencia roja indica una mayor producción de ROS intracelular. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μ M de Ang II, Ang II (5 μ M) + Losartán: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 10 μ M de losartán, Ang II (5 μ M) + 0.75 μ g/ml células cultivadas con Ang II 5 μ M y 0.75 μ g/ml del rSe-HA.

10.4. La concentración efectiva del rSe-HA reduce la liberación del factor de von Willebrand.

El vWF de manera normal se produce y almacena en los cuerpos de Weibel-Paule en las células endoteliales y cuando el endotelio se daña se libera y aumenta su concentración sérica iniciando la activación de la cascada de coagulación (Avdonin et al., 2021). Cuando el endotelio es disfuncional, se incrementa la producción y liberación de dicho factor, lo que lleva al endotelio al estado protrombótico (Xu et al. 2021). Con la intención de evaluar si el extracto revierte dicho parámetro, se cultivaron células endoteliales con Ang II por 12 horas para inducir disfunción, pasado ese tiempo se recuperó el medio de cultivo para determinar la concentración del vWF por ELISA y se cambió por medio nuevo con rSe-HA (0.75 μ g/mL) o losartán (10 μ g/mL) manteniendo el estímulo de Ang II. Pasadas 12 horas se recuperó el medio y también se le cuantificó la concentración del vWF por ELISA.

En la figura 10 se muestra que el tratamiento con Ang II durante 12 horas induce el incremento significativo ($p < 0.05$) de casi 3 veces la concentración de este factor con respecto al control. De manera interesante, a las 24 horas se observó que en todas las condiciones la concentración del factor disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con respecto a la concentración de las 12 horas, y la mayor disminución se observó en las células tratadas con rSe-HA o losartán pese a la presencia constante de Ang II, es decir, mientras que las células tratadas solo con Ang II disminuyeron la concentración del vWF solo un 25% con respecto a las 12 horas, las células tratadas con Ang II más el rSe-HA o losartán lo disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con respecto a lo observado a las 12 horas. Este resultado indica que rSe-HA es tan eficiente como el losartán para disminuir el estado protrombótico inducido por la Ang II.

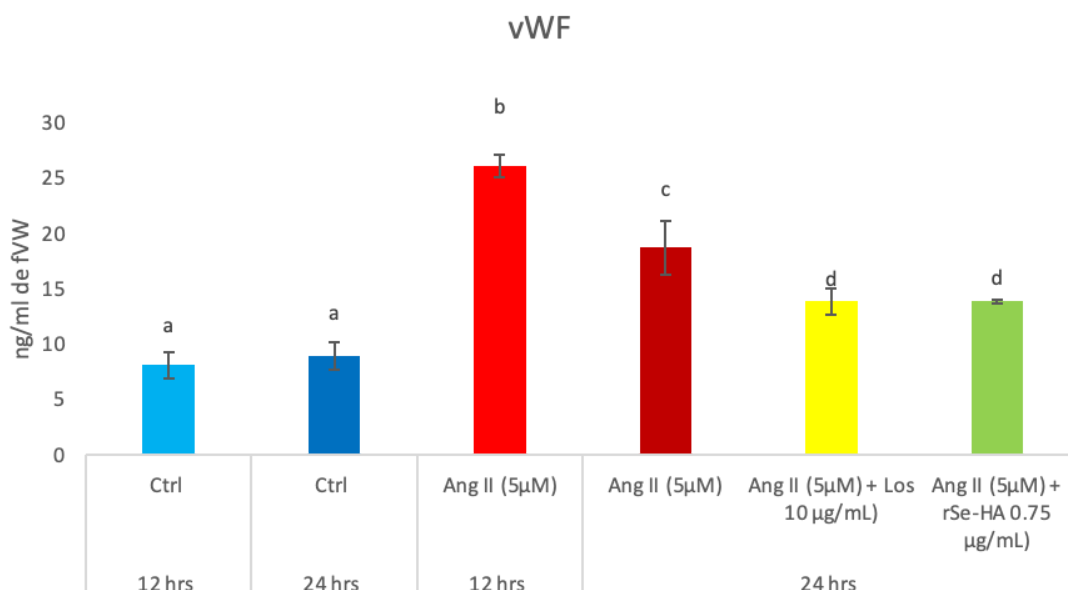


Figura. 10. Efecto del extracto CE rSe-HA sobre la liberación del factor de von Willebrand (vWF) inducida por angiotensina II en células endoteliales.

Las concentraciones de vWF se determinaron en los sobrenadantes de cultivo a las 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. El grupo tratado con Ang II (5 µM) incrementó significativamente en la liberación de vWF en comparación con el control. Los tratamientos con losartán (10 µg/mL) o con el extracto CE rSe-HA (0.75 µg/mL) redujeron significativamente los niveles de vWF inducidos por Ang II, llevándolos casi como el control sin tratamiento. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 µM de Ang II, Ang II (5 µM) + Losartán: células cultivadas con Ang II 5 µM y 10 µM de losartán, Ang II (5 µM) + 0.75 µg/ml: células cultivadas con Ang II 5 µM y 0.75 µg/ml del rSe-HA. ANOVA, Tuckey Kramer. literales distintas (a, b, c, d) indican diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0.05$)

10.5 La concentración efectiva del rSe-Ha revierte el estado proinflamatorio asociado a la disfunción endotelial

El NF-κB es un complejo proteico que actúa como un regulador central en la respuesta inflamatoria. En condiciones fisiológicas, NF-κB se mantiene inactivo en el citoplasma al estar unido a su inhibidor (IκB). Sin embargo, ante estímulos como la Ang II, el estrés oxidante o las citocinas, presentes durante la DE, el IκB se fosforila y degrada por acción de IKK, permitiendo la translocación del complejo NF-κB al núcleo, donde promueve la transcripción de genes asociados a la inflamación, el estrés oxidativo retroalimentando a la DE (Xu et al. 2021).

Con la intención de evaluar el efecto del extracto sobre la activación de NF-κB se cultivaron células endoteliales a las que se les indujo DE por 6 hrs con Ang II, posterior a esto se cambió el medio y se aplicó medio fresco con Ang II o con Ang II más los tratamientos. El p65 fue detectado por Western blot a las 12 horas de cultivo. En la figura 11 se observa que

las células tratadas con Ang II incrementan significativamente ($p < 0.05$) la expresión de IKK y por lo tanto de p65 en comparación con el grupo control, lo que indica la activación de NF- κ B inducida por este estímulo, efecto que no fue contrarrestado por el losartán. Por el contrario, el tratamiento con el extracto CE rSe-HA redujo significativamente ($p < 0.05$) la expresión de IKK/p65 en comparación con el grupo Ang II, alcanzando valores similares al control. Estos resultados indican que el extracto CE rSe-HA inhibe la activación de NF- κ B inducida por la angiotensina II, lo que podría contribuir a la reducción del proceso inflamatorio asociado a la disfunción endotelial.

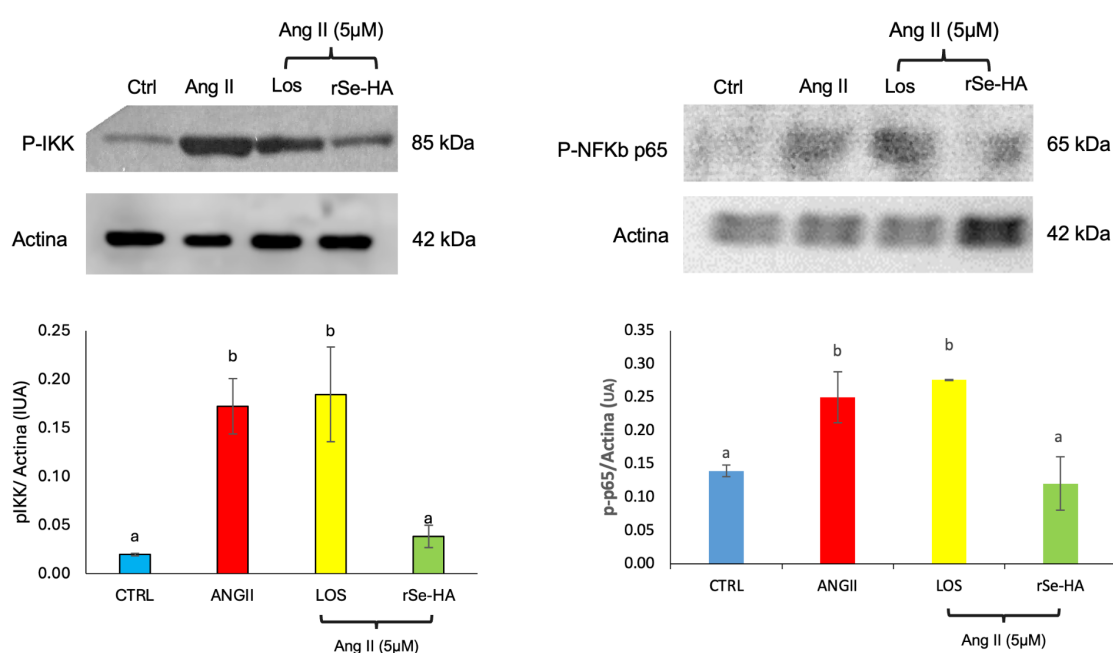


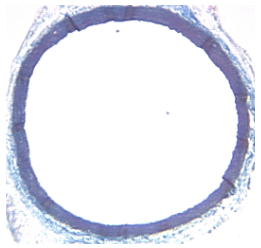
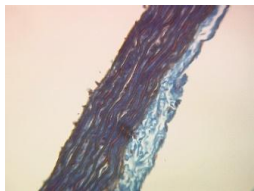
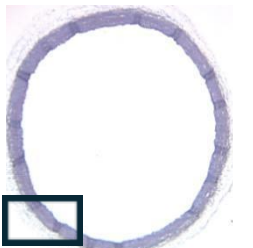
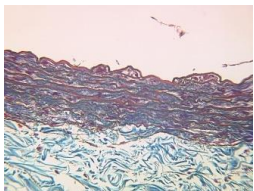
Figura 11. La activación de NF- κ B se evaluó mediante la expresión de su subunidad IKK/p65 por Western blot. Las células se trataron por 6 horas con Ang II y posteriormente con Ang II o Ang II más los tratamientos. El tratamiento con Ang II incrementó significativamente la expresión de IKK y por lo tanto de p65 en comparación con el grupo control (Ctrl). El tratamiento con losartán no modificó significativamente la expresión de IKK/p65 respecto al grupo Ang II. En contraste, el tratamiento con el extracto CE rSe-HA redujo significativamente los niveles de IKK/p65, alcanzando valores comparables al control. Los datos se expresan como unidades arbitrarias (UA) normalizadas con β -actina. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μ M de Ang II, Los + Ang II: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 10 μ M de losartán, rSe-HA 0.75 μ g/ml + Ang II: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 0.75 μ g/ml del rSe-HA. Literales diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). ANOVA, Tuckey Kramer.

10.6. La concentración efectiva del rSe-Ha revierte el remodelado vascular.

El remodelado vascular implica que la estructura del vaso se altere, ya que aumenta la capa media por lo que disminuye el lumen (Domínguez y Ordoñez 2020). Con el objetivo de evaluar el efecto de la CE [0.75 μ g/mL] del rSe-HA sobre este proceso *in vitro*, se cultivaron anillos de aorta de ratas Wistar en diferentes condiciones: medio solo (Figura 10 A-D) o con

Ang II durante 5 días (Figura 10 E-H), momento en el que, por un lado, se recuperó la mitad del número de anillos de cada condición (que se procesaron para técnica histológica) y por otro, a los anillos restantes de cada condición, se le aplicó de nuevo Ang II más los diferentes tratamientos; Solo Ang II, Ang II más losartán (Fig. 10 I-L) o Ang II más la CE rSe-HA (Fig. 10 M-O) durante 4 días más. Al finalizar este tiempo, se recuperaron y se procesaron los de 5 y 9 días por técnica histológica. Con el programa Metamorph (6.1) se midió el grosor de la media (Figura 11A), el área del lumen (figura 11B), el área total (Figura 8C) y se calculó la relación media/lumen (Figura 11D). En la figura 10 se muestran micrografías de cortes histológicos de las arterias aorta de los diferentes grupos experimentales (4x y 40x) a los 5 y 9 días.

En la figura 11 se observa que el cultivo de las aortas con Ang II durante 5 días modificó el área de la media (incremento del 20%) y del lumen (disminución 15%), así como la relación media/lumen (incrementa 28%) de manera significativa ($P < 0.05$). El tratamiento con la CE rSe-HA y el losartán revierte el efecto de la ANGII regresando el grosor de la media al nivel del control sin tratamiento, con respecto al lumen, tanto la CE rSe-HA como el losartán fueron eficientes, siendo que el primero aumentó un 5% más que el losartán este parámetro. También la relación media/lumen regresa al nivel del grupo control pese a la presencia constante de la ANGII. Por otro lado, el área total sólo se modifica en las aortas tratadas con la CE rSe-HA manteniéndose igual que los demás grupos.

	5 días (4x)	5 días (40x)	9 días (4x)	9 días (40x)
Control	 A	 B	 C	 D

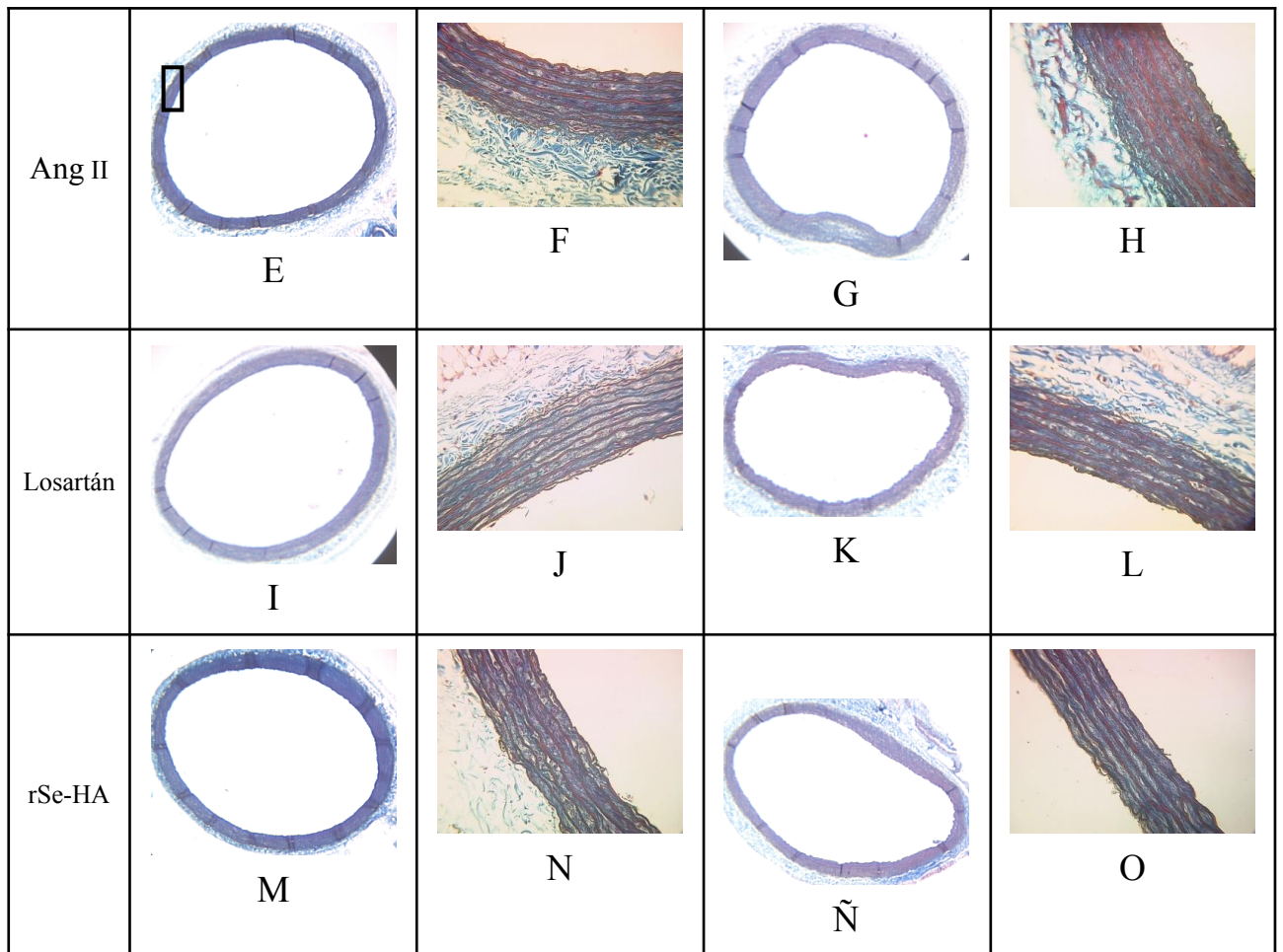
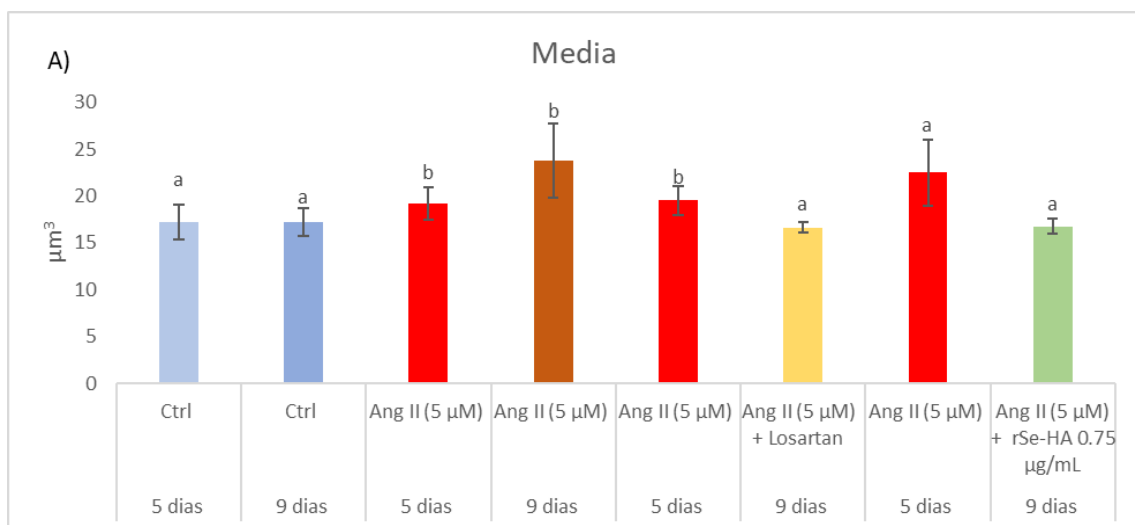


Figura 10. Efecto de la Concentración Efectiva del rSe-HA sobre remodelado vascular

Cortes histológicos (5 micras) transversales de arteria aorta de rata, tinción de Tricromico de Masson a 4X y 40X. Control: Arterias sin tratamiento A, B: día 5 C, D: día 9; E, F, I, J, M, N: Arterias tratadas con Ang II (80μM) a los 5 días; G, H: Ang II (80μM) a los 9 días; K, L: Ang II (80μM) + Losartán (10μM) del día 5 al día 9; Ñ, O: arterias tratadas con Ang II (80μM) + rSe-HA (0.75μg/ml).



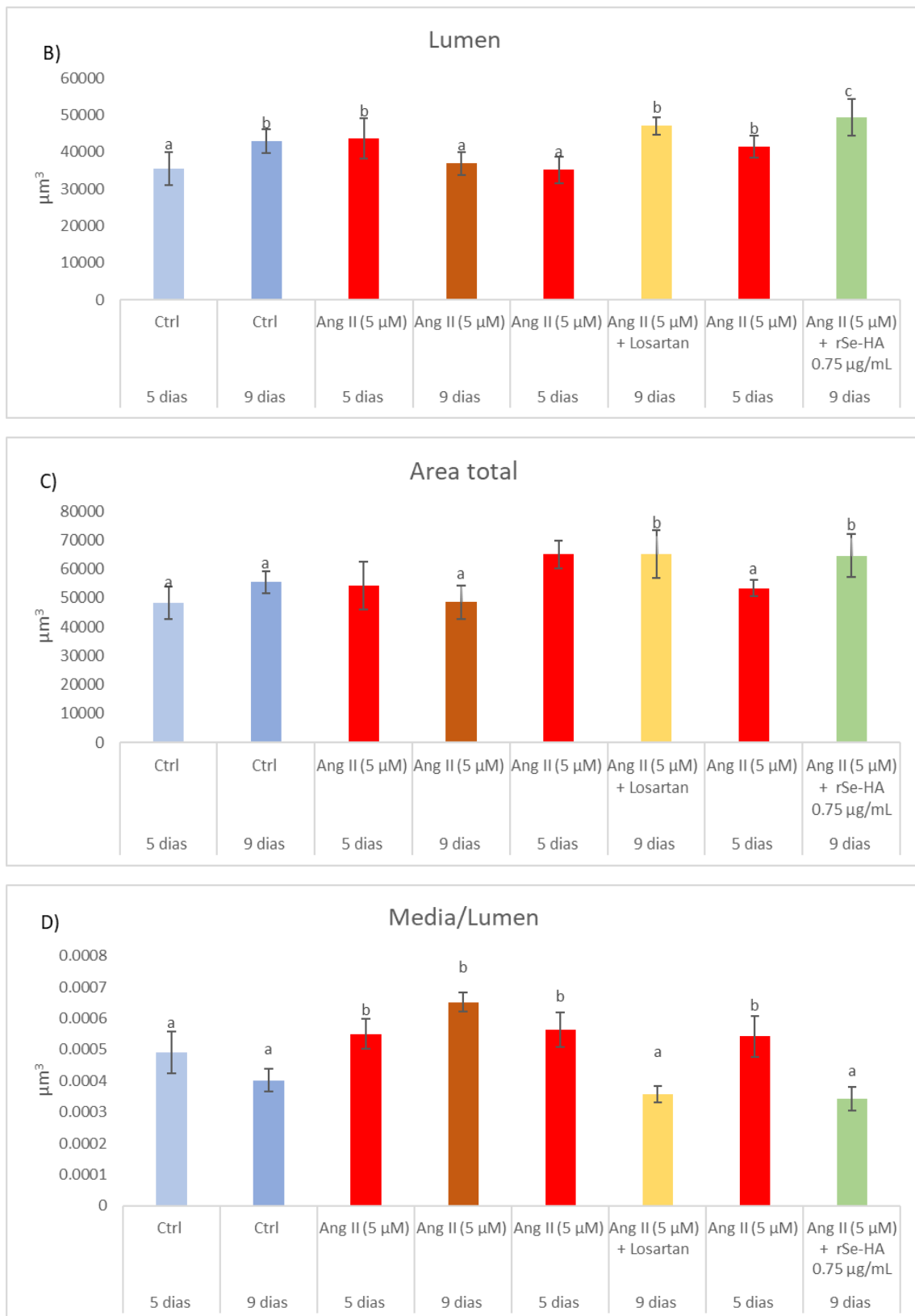


Figura 12. Efecto de Concentración Efectiva del rSe-HA sobre el área total, grosor de la capa media, lumen, y su relación.

Los cortes histológicos de las arterias fueron analizados con el programa Metamorph 6.1. Se midió el área del lumen(A); el grosor de la media (B); el área total (C); y se calculó la relación media/lumen (D). Los experimentos se realizaron con una N=3. Ctrl: células sin tratamiento, Ang II: células tratadas con 5 μ M de Ang II, Ang II (5 μ M) + Losartán: células cultivadas con Ang II 5 μ M y 10 μ M de losartán, Ang II (5 μ M) + 0.75 μ g/ml células cultivadas con Ang II 5 μ M y 0.75 μ g/ml del rSe-HA. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA y Tukey y literales diferentes implica una diferencia significativa entre los grupos comparados con una $P \leq 0.05$.

11. Discusión

El endotelio vascular tiene como función principal regular el flujo y la perfusión sanguínea y por lo tanto mantener el equilibrio hemodinámico (Carvajal, 2017). Las células endoteliales son las encargadas de mantener la homeostasis vascular mediante la síntesis y liberación de moléculas vasoactivas como el ON, por lo que se regula el tono y remodelado vascular, así como la regulación de la coagulación y fibrinólisis, (González et al, 2009). No existe un tratamiento farmacológico para la DE, solo el manejo de los factores que predisponen su padecimiento, algunos estudios experimentales y clínicos han demostrado que diversos fármacos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II, los antagonistas de los receptores de la angiotensina II, antioxidantes, betabloqueadores, las estatinas, etc. ejercen efectos protectores sobre el endotelio vascular sin embargo el mecanismo por el cual actúan es diferente para cada uno y el uso de estos fármacos no está enfocado en el tratamiento de la DE es por esto que se siguen buscando tratamientos más específicos para el manejo de la DE, los extractos de plantas medicinales han demostrado ser eficientes en el manejo de las patologías asociadas a la DE por lo que los fitomedicamentos al estar compuestos por múltiples moléculas pueden actuar sobre muchos blancos terapéuticos, por lo que pueden ser una opción en el manejo de la DE.

La CE del extracto, recuperó la biodisponibilidad del ON pese a la presencia constante de la Ang II como se observa en la figura 7 esto se puede deber a que, como se muestra en la figura 12, moléculas como el ácido cinámico, ácido cumárico y escualeno actúan sobre las ROS que son los causantes del estado prooxidante responsable de desacoplar a la eNOS. También se ha reportado que la apigenina y el ácido cinámico actúan sobre la vía de PI3/AKT/eNOS a través de estimular un aumento en la concentración de calcio citosólico, lo que favorece la fosforilación de eNOS en Ser (1179), así como actúa directamente sobre la fosforilación de eNOS lo que favorece que haya un aumento en la producción de ON por lo que inhibe su efecto (Chen CC et al. 2010). La importancia del AT1R en la inducción del estado

prooxidante, que a su vez lleva al estado proinflamatorio (Watanabe et al. 2005), se hace evidente en la figura 8 en donde se observa que el losartán (molécula antagonista de la Ang II, porque se acopla al receptor AT1 evitando que la AGII se una a él y ejerza su efecto) (Al-Majed AR, et al. 2015) evita el estado prooxidante por lo que lleva a que se reduzca la producción de ROS llevándolas al nivel de las células sin tratamiento, sin embargo, no fue tan eficiente para restaurar la biodisponibilidad de ON, crítico para la salud vascular. Mientras que el rSe-HA si lo logró. Cuando al Ang II se une a su receptor SE ACTIVA la activación de PKC que se encarga de fosforilar a la NADPH oxidasa, por lo que se genera ion superóxido y peróxido de hidrógeno (González et al, 2009). La acción de esta enzima, pese a la unión de la Ang II al receptor, es inhibida por la apigenina que, por un lado, inhibe la actividad de la enzima y por otro, induce la producción de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), como lo demostró Clayton y colaboradores (2021) en arterias de rata *in vitro* en un modelo de disfunción endotelial inducido por altas concentraciones de glucosa. El losartán al unirse al AT1R, evita la acción del receptor para activar a la NADPH oxidasa, pero no tiene actividad antioxidante por lo que no puede capturar a los radicales oxígenos ya producidos para evitar que capturen al ON que se pudiera generar y es incapaz de generar enzimas antioxidantes (figura 7). En la composición del extracto se encuentran moléculas como el ácido cinámico y el ácido cumárico que actúan como donadores de electrones o de átomos de hidrógeno lo que estabiliza a los radicales oxígenos evitando su efecto tóxico (Kose y Kocasari, 2022; Roychoudhury et al., 2021), lo que lo hace más eficiente que el losartán. La actividad antioxidante del ácido cumárico ha sido demostrada en diversos estudios *in vitro*. En células endoteliales humanas cultivadas, ejerció un efecto protector frente al estrés oxidativo provocado por concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos libres (Lee et al., 2009). De manera similar, se ha reportado que este compuesto es capaz de reducir el estrés oxidativo en queratinocitos sometidos a radiación ultravioleta (Seok et al., 2015). El escualeno también actúa sobre los ROS, sólo que, de diferente manera, ya que esta molécula es un triterpeno insaturado, que utiliza las insaturaciones para atrapar a los radicales (Bidooki et al. 2022). En comparación con el losartán, las capacidades de estas moléculas en conjunto restauran de manera más eficiente la biodisponibilidad del ON regresando a la célula a un estado saludable y normal como se muestra en la figura 7.

Con respecto a la actividad antiinflamatoria, en sí mismo, el hecho de que ya no haya ROS libres, ya no induce la activación del NF- κ B, que es el factor de transcripción base, junto con AP1 para iniciar la transcripción de genes proinflamatorios (Liu et al. 2017). La activación de

esta molécula es el blanco de moléculas como el ácido cinámico y cumárico, que se ha demostrado que evitan la activación del NFkB, ya que ambos al unirse a la IKK evitan que fosforile a IKB y que por lo tanto no se active NF-kB (Roychoudhury et al., 2021; Safaeian et al., 2024). Por otro lado, el tratamiento con Losartán también tuvo un efecto inhibitor significativo sobre la producción de IL-6 pese a la presencia de la ANGII, lo que se debe a que evitó la producción de ROS y con ello la activación de NFkB interrumpiendo la cascada proinflamatoria dependiente de AT1R (Yamaura et al. 2022).

El estado protrombótico de la disfunción endotelial se produce cuando el endotelio no es capaz de mantener un equilibrio entre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes, esto principalmente desencadenado por una disminución en la biodisponibilidad del ON y el incremento en los ROS que favorecen la liberación del vWF, el cual facilita la adhesión de plaquetas al endotelio dañado. Cuando la Ang II induce daño endotelial promueve la secreción del vWF a través de mecanismos mediados por el estrés oxidante y señalización proinflamatoria dependiente de NF-kB. El tratamiento con el rSe-HA produjo una disminución significativa en la secreción de vWF a las 24 horas pese a tener el estímulo constante de la Ang II, alcanzando valores comparables a los observados con losartán. El ON puede mediar la inhibición de la secreción del vWF por retroalimentación ya sea bloqueando el proceso de fusión gránulo-membrana o inhibiendo la movilización del calcio desde los depósitos intracelulares, por lo tanto, un aumento en la biodisponibilidad del óxido nítrico evita que se libere la misma cantidad que con la Ang II (Avdonin et al., 2021). Este resultado sugiere que el rSe-HA ejerce un efecto protector endotelial, posiblemente a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios presentes en los compuestos del extracto que contrarrestan la activación inducida por Ang II.

El ácido cinámico y la apigenina actúan sobre 2 cinasas clave en esta patología, como lo es la PI3K y la MAPK, la primera en la célula endotelial y la segunda en la célula del músculo liso vascular (Safaeian et al. 2024; Kwon H, et al. 2015). Cuando la ANGII es parte de los inductores de DE, esta molécula se une a al AT1R, que a su vez inhibe a PI3K cuya actividad es crítica para la formación de ON, ya que activa a AKT quien a su vez activa a la eNOS quien es la responsable de la producción de ON a partir de arginina (Xu et al. 2021). Tanto el ácido cinámico como la apigenina favorecen la fosforilación de PI3K esto está demostrado en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y en un modelo murino de

diabetes (Safaeian et al. 2024; Miao et al., 2022), pese a la presencia de ANGII, lo que lleva a que la vía se realice correctamente para la formación de ON favoreciendo así a su biodisponibilidad. La MAPK es la responsable del remodelado vascular entre otras muchas otras funciones, ya que, cuando se fosforila activa a ERK1/2, JNK y p38 que son factores de transcripción importantes para la proliferación de las células del músculo liso vascular y para la activación del NFkB. La fosforilación de MAPK es inhibida por el ON, pero también por el ácido cinámico. Esta molécula inhibe a MAPK por lo que el efecto es semejante al del ON evitando el remodelado vascular (Kwon H, et al. 2015) y la activación del factor de transcripción proinflamatorio.

El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* es rico en ácido cinámico (1.35 mg/g), lo que permite estandarizar este resultado para futuras réplicas, es decir, la estandarización permite repetir la huella vegetal del extracto con base en esta concentración, que en este caso es de 0.0010125 µg/ml de ácido cinámico en la concentración de 0.75 µg/ml.

Los extractos de plantas están compuestos por una amplia variedad de metabolitos secundarios, como ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, etc. Los cuales pueden actuar de manera sinérgica para potenciar su efecto terapéutico y reducir efectos adversos que pueden presentarse en los fármacos tradicionales.

A pesar de que el compuesto mayoritario del rSe-HA es el ácido cinámico, su efecto no se debe únicamente a este, sino a la interacción de las moléculas que lo conforman.

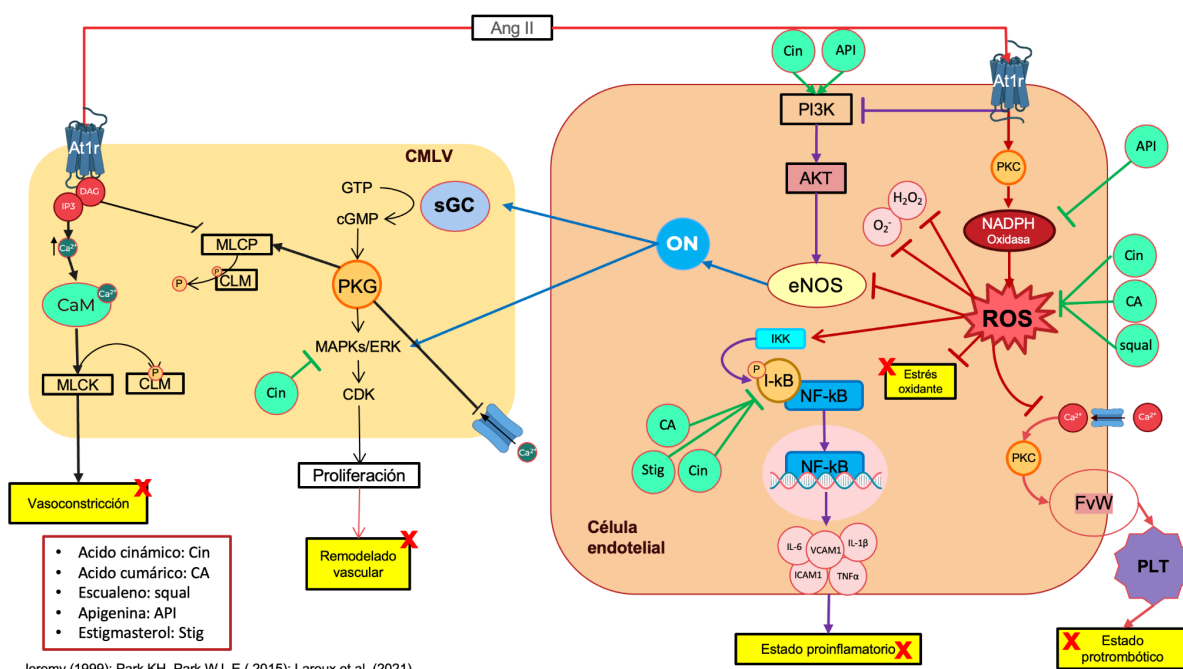


Figura 12: Acción de las moléculas presentes en el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* sobre la disfunción endotelial

La Ang II, generada por acción secuencial de la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), actúa principalmente a través del receptor AT1r. En el CMLV, induce vasoconstricción mediante la vía MLCK/miosina y contribuye a la proliferación y remodelado vascular a través de las vías GMPc/PKG y MAPK. En la célula endotelial, promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía NADPH oxidasa, lo que genera estrés oxidante, activación del factor de transcripción NF-κB y favorece estados proinflamatorios y protrombóticos.

Los compuestos presentes en el rSe-HA como el ácido cinámico (Cin), ácido cumárico (CA), apigenina (API) y escualeno (Squa) actúan como moduladores negativos de estas rutas patológicas. Estos compuestos exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y vasodilatadoras. El ácido cinámico y el ácido cumárico inhiben la producción de ROS y la activación de NF-κB; la apigenina bloquea la activación de PKC y NADPH oxidasa, y favorece la vía de eNOS; mientras que el escualeno protege frente al daño oxidativo y la inflamación. En conjunto, estos agentes naturales contribuyen a mantener la función endotelial y contrarrestan los efectos deletéreos de la Ang II.

12. Conclusión

La concentración efectiva del extracto hidroalcohólico de raíz de *Sechium edule* (rSe-HA) revierte de manera integral los procesos asociados a la disfunción endotelial inducida, al aumentar la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) mediante la activación de AKT. Este incremento de ON favorece la reducción del estado prooxidante al activar enzimas antioxidantes y disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que a su vez evita la activación de NF-κB y la subsecuente producción de citocinas proinflamatorias como IL-6. De este modo, el extracto atenúa el estado proinflamatorio, reduce el fenotipo protrombótico al impedir la secreción del factor de von Willebrand, y limita la proliferación celular asociada al remodelado vascular, logrando el restablecimiento de la relación media/lumen. En conjunto, estos hallazgos indican que el rSe-HA ejerce efectos

antioxidantes, antiinflamatorios, antitrombóticos y antiproliferativos que contribuyen a normalizar la función endotelial *in vitro*.

13. Perspectivas

- Evaluar el rSe-HA en fase clínica para pacientes con Hipertensión Arterial.

14. Literatura Citada

1. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean Medical Science*. 2015;30(9):1213.
2. Carvajal Carlos. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med. leg. Costa Rica* 2017; 34(2): 90-100.
3. Gonzalez MN, Saleche FM, Toro L.C, Michea LA. Función y disfunción endotelial *Revista Médica Clínica las Condes*. 2009; 20(3): 154-160
4. Verdejo París Juan. Función endotelial. *Arch. Cardiol. Méx*. 2006; 76(Suppl 2): 164-169.
5. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología Suplementos* 2006;6(1):21A-30A.
6. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, et al. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological Reviews* 2021;73(3):924-67.
7. Gonzalez Piña R, Landinez Martínez D. Epidemiología, etiología y clasificación de la enfermedad vascular cerebral. *Archivos de Medicina*. 2016;16(2):495-507.
8. Arias Rodríguez FD, Benalcázar-Domínguez SA, Bustamante-Sandoval BR Esparza-Portilla JI, López-Andrango AE, Maza-Zambrano GT et al . Diagnóstico y tratamiento de enfermedad vascular periférica. *Revisión bibliográfica. Angiología*. 2022; 74(6): 292-304.
9. Laparra-Escareño H y cols. Epidemiología de la EAP en México. *Rev Mex Angiol* 2019;47(2):96-101
10. <https://www.gob.mx/salud/prensa/490-cada-ano-220-mil-personas-fallecen-debido-a-enfermedades-del-corazon#:~:text=En%20M%C3%A9xico%2C%20cerca%20de%2020,elevado%20y%20diabetes%20no%20controlada>.
11. <https://www.gob.mx/salud/prensa/531-en2021-ictus-o-enfermedad-vascular-cerebral-ocasiono-mas-de-37-mil-decesos-en-mexico>
12. Sánchez-Arias AG, Bobadilla-Serrano ME, Dimas-Altamirano B, et al. Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel. *Rev Mex Cardiol*. 2016;27 (Suplemento: 3):98-102.
13. Carretero Colomer M. Cardiopatía coronaria: Tratamiento con inhibidores selectivos de la absorción del colesterol. *Offarm*. 2005; 24(2):110-11
14. Alexánderson-Rosas E, Calleja-Torres R, et al. El impacto de la detección de disfunción endotelial en la aterosclerosis: estudio mediante tomografía por emisión de positrones. *Archivos de Cardiología de México*. 2010; 80(1): 36-40
15. Yasunobu Hirata, MD, Daisuke Nagata, MD, Etsu Suzuki, MD, Hirokai Nishimatsu, MD, Jun-ichi Suzuki, MD, Royozo Nagai, MD. Diagnosis and Treatment of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int. Heart J*. 2010; 51: 1-6

16. Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):5712.
17. Gutiérrez-Venegas G. Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2018; 56(1) 94-101.
18. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007; 100:174–90.
19. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial dysfunction: Is there a Hyperglycemia-Induced imbalance of NOX and NOS? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3775.
20. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell & Tissue Research/Cell and Tissue Research* 2021;387(3):391–8.
21. Irribarra V, Germain A, Cuevas A, Faúndez L, Valdés G. Disfunción endotelial como alteración primaria en las patologías vasculares. *Revista Médica De Chile*. 2000;128(6). Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000000600014
22. World Health Organization: WHO. Enfermedades cardiovasculares. 2021. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
23. González RT, Savón MLM, Travieso PSM, et al. Disfunción endotelial en una etapa precoz del diagnóstico de hipertensión arterial. *Rev cubana med*. 2020;59 (2):1-13.
24. Lahera V, Cediel E, de las Heras N, Vázquez-Pérez S, Sanz-Rosa D, Vázquez-Cruz B y Cachofeiro V. Alteraciones del endotelio en la hipertensión. *Nefrología*. 2003;23(4):3-58
25. Cobos S Leonardo. Endotelial e hipertensión arterial. *An. Fac. med*. 2014; 75(4): 345-350.
26. Partida L, Hernández E. La función del endotelio en la migraña. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2010;11(3):212-217
27. Fonseca JCC, Balzano CDM, De León RS. Disfunción endotelial en la hipertensión pulmonar. *Archivos De Bronconeumología*. 2005;41(7):389–92.
28. Storino MA, Contreras MA, Rojano J, Serrano R, Nouel A. Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: un viaje hacia el daño endotelial. *Revista Colombiana de Cardiología/Revista Colombiana de Cardiología* 2014;21(6):392-8.
29. Rincón Ríos T. LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL: UNA VISIÓN AMPLIADA. *Enferm. investig*. 2022;7(2):1-4
30. Domínguez JAV, Ordoñez JRS. Factores moleculares implicados en insuficiencia cardíaca. *Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas*. 2020;39(4)
31. Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Revista Española De Cardiología*. 2001;54(2):211-217.
32. González-Villalva, Adriana, Morales-Ricárdez, Guadalupe, Rojas-Lemus, Marcela, Bizarro-Nevares, Patricia, López-Valdez, Nelly, Ustarroz-Cano, Martha, García-Peláez, María Isabel, Cervantes-Valencia, María Eugenia, Mendoza-Martínez, Shamir, Salgado-Hernández, José Ángel, Casarrubias-Tabarez, Brenda, & Fortoul van der Goes, Teresa I. (2023). El endotelio sano y su disfunción en el riesgo cardiovascular. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 66(6), 37-52. Epub 01 de marzo de 2024. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2023.66.6.07>

33. Yazdi M, Nafari A, Azadpour M, Alaei M, Moradi FH, Choghakhori R, et al. Protective Effects of Cinnamic Acid Against Hyperglycemia Induced Oxidative Stress and Inflammation in HepG2 Cells. PubMed [Internet]. 1 de abril de 2023;12(1):1-12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37724158>
34. Alvarado-Ojeda ZA, Zamilpa A, Costet-Mejia A, Méndez-Martínez M, Trejo-Moreno C, Jiménez-Ferrer JE, et al. Hydroalcoholic extract from *Sechium edule* (Jacq.) S.w. root reverses oleic acid-induced steatosis and insulin resistance in vitro. Heliyon [Internet]. 1 de enero de 2024;10(2):e24567. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24567>
35. Singh, JP, K. Selvendiran, SM Banu, R. Padmavathi y D. Sakthisekaran. 2004. Función protectora de la apigenina en el estado de la peroxidación lipídica y la defensa antioxidante contra la hepatocarcinogénesis en ratas albinas Wistar. *Phytomedicine* 11(4): 309–314.
36. Wang J, Liu YT, Xiao L, Zhu L, Wang Q, Yan T. Anti-Inflammatory Effects of Apigenin in Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Acute Lung Injury by Suppressing COX-2 and NF-κB Pathway. *Inflammation* [Internet]. 23 de junio de 2014;37(6):2085-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9942-x>
37. Sova M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. Mini-Reviews In Medicinal Chemistry [Internet]. 1 de mayo de 2012;12(8):749-67. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/138955712801264792>
38. Kwon H, Lee JJ, Lee JH, Cho WK, Gu MJ, Lee KJ, et al. Cinnamon and its Components Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Up-Regulating Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *The American Journal Of Chinese Medicine* [Internet]. 1 de enero de 2015;43(04):621-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1142/s0192415x1550038x>
39. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research* [Internet]. 18 de febrero de 2016;118(4):620-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/circresaha.115.306301>
40. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal Of Vascular Medicine* [Internet]. 1 de enero de 2012;2012:1-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2012/918267>
41. De las Heras Polo B. A new therapeutic strategy in NLRP3 inflammasome – mediated inflammatory diseases. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* [Internet]. 31 de diciembre de 2022;88(88(05)):501-12. Disponible en: <https://doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.05.17>
42. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* 1 de junio de 2018;2018(6):pdb.prot095497. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
43. Kose SBE, Kocasari FS. Protective effect of cinnamic acid on orthophenylphenol-induced oxidative stress in rats. PubMed [Internet]. 1 de junio de 2022;13(2):187-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35919855>
44. Safaeian L, Asghari-Varzaneh M, Alavi SS, Halvaei-Varnousfaderani M, Laher I. Cardiovascular protective effects of cinnamic acid as a natural phenolic acid: a review. *Archives Of Physiology And Biochemistry* [Internet]. 5 de agosto de 2024;1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13813455.2024.2387694>
45. Lee SJ, Mun GI, An SM, Boo YC. Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose

- plus arachidonic acid. BMB Reports [Internet]. 2009 Sep 30;42(9):561–7. Available from: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2009.42.9.561>
46. Peng J, Zheng TT, Liang Y, Duan LF, Zhang YD, Wang LJ, et al. p-Coumaric Acid Protects Human Lens Epithelial Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis by MAPK Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2018 Jan 1;2018(1). Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/8549052>
 47. Seok JK, Kwak JY, Seo HH, Suh HJ, Boo YC. Effects of bambusae caulis in taeniam extract on the UVB-induced cell death, oxidative stress and matrix metalloproteinase 1 expression in keratinocytes. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* [Internet]. 2015 Mar 31;41(1):9–20. Available from: <https://doi.org/10.15230/scsk.2015.41.1.9>
 48. Clayton, Z. S., Hutton, D. A., Brunt, V. E., VanDongen, N. S., Ziemba, B. P., Casso, A. G., Greenberg, N. T., Mercer, A. N., Rossman, M. J., Campisi, J., Melov, S., & Seals, D. R. (2021). Apigenin restores endothelial function by ameliorating oxidative stress, reverses aortic stiffening, and mitigates vascular inflammation with aging. *AJP Heart and Circulatory Physiology*, 321(1), H185–H196. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00118.2021>
 49. Miao, L., Cheong, M. S., Zhou, C., Farag, M., Cheang, W. S., & Xiao, J. (2022). Apigenin alleviates diabetic endothelial dysfunction through activating AMPK/PI3K/Akt/eNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Food Frontiers*, 4(1), 420–431. <https://doi.org/10.1002/fft2.192>
 50. Bidooki SH, Alejo T, Sánchez-Marco J, Martínez-Beamonte R, Abuobeid R, Burillo JC, et al. Squalene Loaded Nanoparticles Effectively Protect Hepatic AML12 Cell Lines against Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in a TXNDC5-Dependent Way. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Mar 18;11(3):581. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox11030581>
 51. Al-Majed AR, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartán: perfil completo. *Perfiles Metodología Relacionada con Excipación de Sustancias Farmacéuticas*. 2015; 40 :159-94.
 52. Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium. *Hypertension* [Internet]. 2005 Jan 4;45(2):163–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.hyp.0000153321.13792.b9>
 53. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [Internet]. 2017 Jul 14;2(1). Available from: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723>
 54. Yamaura K, Nelson AL, Nishimura H, Rutledge JC, Ravuri SK, Bahney C, et al. The effects of losartan or angiotensin II receptor antagonists on cartilage: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage* [Internet]. 2022 Dec 28;31(4):435–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458422009669#fig2>
 55. Avdonin, P. P., Tsvetaeva, N. V., Goncharov, N. V., Rybakova, E. Y., Trufanov, S. K., Tsitrina, A. A., & Avdonin, P. V. (2021). Von Willebrand Factor in Health and Disease. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series a Membrane and Cell Biology*, 15(3), 201–218. <https://doi.org/10.1134/s1990747821040036>
 56. Chen CC, Ke WH, Ceng LH, Hsieh CW, Wung BS. Calcium- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin. *Life Sci*. 2010;87(23-26):743–9. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.014.
 57. Avdonin, P. P., Tsvetaeva, N. V., Goncharov, N. V., Rybakova, E. Y., Trufanov, S. K., Tsitrina, A. A., & Avdonin, P. V. (2021). Von Willebrand Factor in Health and

Disease. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series a Membrane and Cell Biology*, 15(3), 201–218. <https://doi.org/10.1134/s1990747821040036>



Cuernavaca, Morelos, 23 de abril de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"MECANISMO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lilia Alejandra Altamirano Arenas. 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 con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERARDO JOEL BARRITA CRUZ | Fecha:2026-04-27 17:36:11 | FIRMANTE

1b9TkqOERq8rugCS/k3ugZhhsOE6Erc3198Fatw5lnOylL3SjVI1Qbjio8FEfluDOtFmg5rDh0oe9v+YHLDLPzpq3qaiVW+hxmR/GzxNr2b/q+UjhCizEvgayTCsn2WeSpCiCjKc9ON84Oszj4ziZDvN389vi6x1Ts9WT/FHltFrIP8hhCpv7Jx9CGmJQ2fGcJss+DPBYm9Tp12MNemulKsV4gRx07R6KTi0ETifdWqN2ktus7+VvfaeBI8bFmgMTzxpYVW9AivmLEbEXQAY0Mgd1ZYCIT/mMHVj+BZIs2vmP1n/sAW5AOx8hLiNaPSGCUnia4ogQiVtQirSVQj0xA==

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



5IBvD6zFb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hFlz2z1UYkzoj6wKAIDmrVJb3QGBDWUc>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 23 de abril de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"MECANISMO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lilia Alejandra Altamirano Arenas. 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. Fernando Roger Esquivel Guadarrama





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2026-04-28 10:44:21 | FIRMANTE

bBy2txq7pxJfIS+plfoEP7l4oM4OpsAlicR4xWmZ6OecAKIYRSS8nDDmZEhVuvSHwPcPJlduae2hkkS/Xo6NclxQeR4SZW8l7zcSKNyNt1DYzFp4f4Ijv4SdiaCG3AT5cD3o73GSOt7GERLjD7hixlsfZiIqcYCyE3xEkFezcxnmPm4QiWoOr58RyJ3EysWnw5iicY6zA8hu4LyTVEOnlPJtoaeq0LwYgHIO266SaK5UO6s+XhRh/bWoY6/pf1TVGTrlylcoWJ6EE7za+YCTv7OMzTHPk/QN85m8KnflvtMasXEnDbZ+Y4sAaO1ddUzg506HqSVutXuepeO6+Vo9w==

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



RndG1aljD

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/p4SzMLyUpCcdvb6aFSBHGAeh4Q9NW9AI>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 23 de abril de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"MECANISMO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lilia Alejandra Altamirano Arenas. 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. Gabriela Rosas Salgado





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2026-04-24 14:27:47 | FIRMANTE

PLBdwdpOrugJgfRvsTFQAKPnZ4RKc9BBc6KzR107dWkBDHItIKMXdA9TXaOmXG/OOGVb98HmUod9aKQYh5tmUIR6xRYs0TSlu4slalaXASv7f9FxAkpGkTNzp7FG9BP21s86
YTv92U1up4t+peHt4KNmGM/vxsi3F52zoJ05pYWW+Rk7vXjR4H1DA9++e0EmoFQjzPLnqEA0izdtmT2sL2SCG876/Q8hVBbLu2FqXjxh9fpS6iJ3zMmuNB/yviqxZR19NFHGvtA+a
WVCRbBhpe+mJJom78NAsA/rCwVtEbPBCu1D1jR8GNquK4hh7+hPVMdjlKuv2plJojBOSDy9TA==

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



QwLO9BIzs

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YvcUUymBi9mGsDDva62yqs3VckTi829R>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 23 de abril de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"MECANISMO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lilia Alejandra Altamirano Arenas. 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. Mario Ernesto Cruz Muñoz





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2026-04-23 15:57:17 | FIRMANTE

G1MWdaouP2lQUA9xQz2XK4wRe5K5s6RExe9FWXsIE9v1C1aq5tXucIk2HWO9epLhH/h1JRxtJ7U1O AQ6iad6xDvNwhDx/Xx7ukXv8yc4zlXyzT6scglFVMWBUXmy19ayQPdk
yLFn01+2hyYe8fCgpmoiHRndxQ/ZImWFB6gDdORnDeHrhulD8wuaERVFIvdDs++/q8JRQuChIEYWMwiD6eYCTXG/supF/qaqWTPRfGqn/YW4DOJpvL1wGDky5D+8Kb68YoEw
FRnT6LPzqeml5BziiCH82V4UzMEM7GSFUV47X+6UG/vErbdxwHxlzqlmO6G2SiVtRGaWlaynb0fyQ==

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



2JVYLbzZm

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DEhyYltzmLS6idWExfgJfPrLC7uwZGAI>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 23 de abril de 2026.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **"MECANISMO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *Sechium Edule* EN UN MODELO *IN VITRO* PARA EL CONTROL DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL"**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lilia Alejandra Altamirano Arenas. 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. Maribel Lucila Herrera Ruiz





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ | Fecha:2026-04-24 08:58:33 | FIRMANTE

QKKvqpsn/4ze/0cL1w+BfL/O74GYUivmc/cTXxbUstWgEK/BqBgmhDkLh4dN69jHx6aBtJoRDA46Z7K5IVbGSQrUzBKCoHN+jBbplSY6MA5SWRhtSTFe3cmNNYOWVciyoX3A/Bk9NP5bwWEbSt1TvAgbSFCXiyRb46mESnSkoXXxF8MhBDVhh2xAkS6Audv8UhzAr4RvB7xRtCjUI+Ti3rtfm0ctKq1/lbkmDC8qmWug5FzrLP0u4BRjYtkQEcofn2LxWcOCSfKN/iFJxouHFVbL8r3Yj7cdvner/k/kvc8N0HTer4bhc+laCi4S4s/N0i7CL7oqaeqG4LOVAaRXA==

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



SXr2kGUoC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SbOqRDgP1vzEFD8px62NdBPRjsWt46wG>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029