

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS
DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO DE LA RAÍZ DE *Sechium edule*
(Jacq.) Sw. Y SU EFECTO SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. EN C. GALIA LOMBARDO EARL

Directores de tesis:

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

Asesora de tesis:

DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2014

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular "C", División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Miembro del
Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

Investigador Asociado "B", Centro de Investigación Biomédica del Sur,
IMSS. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

ASESORA DE TESIS

DR. GABRIELA ROSAS SALGADO

Profesor Investigador de Tiempo Completo Titular "A"
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la comisión del doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco y de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Unidad Cuajimalpa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO DE LA RAÍZ DE *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Y SU EFECTO SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL”**, que presentó la M. en C. Galia Lombardo Earl el día 30 de Junio del 2014.



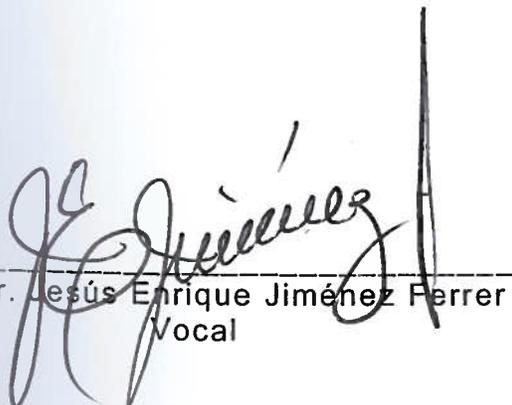
Dr. Rubén Román Ramos
Presidente



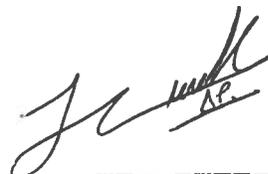
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Secretario

p.a. 

Dra. Gabriela Rosas Salgado
Vocal



Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Vocal



Dr. Julio Cesar Almanza Pérez
Vocal

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

La alumna del doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Galia Lombardo Earl, recibió Beca del CONACyT, del 01 de enero de 2010 hasta el 31 de diciembre de 2012, con Número de registro **202091**

La presente investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (SNI/32291/52834-M) FIS/IMSS/PROT/FP-2004/142, CONACyT (SALUD/113632).

El presente trabajo se llevó a cabo en:



Laboratorio de Fitofarmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. Antecedentes de Hipertensión Arterial Sistémica y Disfunción Endotelial.....	9
2.2. Participación de la Angiotensina II en la HAS y DE.....	10
2.3. Mecanismo de Acción de AGII.....	11
2.4. Importancia de la Células Endoteliales.....	12
2.5. Participación del Óxido Nítrico y de NADH/ NADPH oxidasas en el endotelio.....	14
2.6. Antecedentes de <i>Sechium edule</i> (Chayote).....	16
2.6.1. Botánica y Ecología.....	16
2.6.2. Antecedentes Etnobotánicos, Fitoquímicos y Farmacológicos.....	17
2.7. Compuestos derivados del Ácido Cinámico.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo General.....	23
6.2. Objetivos particulares.....	24
7. METODOLOGÍA.....	25
7.1. Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos antihipertensivos de las raíces de <i>S. edule</i>	25

7.1.1. Extracción de los compuestos activos.....	25
7.1.2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto con mayor contenido de compuestos polifenólicos.....	27
7.2. Evaluación del efecto farmacológico de los extractos activos sobre el daño orgánico provocado por hipertensión arterial crónica.....	28
7.2.1. Tratamientos.....	22
7.2.2. Modelo de hipertensión crónica inducido con AGII en ratones ICR.....	30
7.2.3. Obtención de tejidos a partir de ratones hembra ICR con hipertensión arterial crónica inducida con AGII.....	32
7.2.4. Determinación de interleucinas y TNF- α por ELISA en homogeneizados de riñón.....	32
7.2.5. Histopatología.....	33
7.2.6. Ensayo de espectrometría por fluorescencia de la producción de O ₂ ^{•-} aislado en riñones y aortas obtenidas de ratones con hipertensión.....	34
7.2.7. Ensayo de anillos de aorta aislada.....	35
7.3. Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1. Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos antihipertensivos de las raíces de <i>S. edule</i>	37
8.2. Modelo de hipertensión crónica inducido con AGII en ratones ICR.....	40
8.3. Determinación de interleucina y TNF- α por ELISA en homogeneizados de riñón.....	42
8.4. Histopatología.....	49
8.5. Ensayos en aorta aislada de rata.....	55

8.6. Ensayo de espectrometría por fluorescencia de la producción de O_2^- aislado en riñones y aortas obtenidas de ratones con hipertensión arterial.....	58
9. DISCUSIÓN.....	61
10. CONCLUSIONES.....	71
11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	72
12. LITERATURA CITADA.....	73
ANEXO.....	81

CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos empleados en los diferentes ensayos.....	29
Cuadro 2. Índices de detección de citocinas en riñón por el método de ELISA.....	44

FIGURAS

Figura 1. Registro en tiempo real de la determinación de presión arterial.....	31
Figura 2. Cromatograma del extracto SeRHA (línea azul) comparado con SeAce (línea negra); se leyeron a dos longitudes de onda, a 290 nm en el panel (a) y a 340 nm en el panel (b). En los paneles (c) y (d) se compararon las fracciones R14 (línea negra) y R17 (línea azul), leídos a una longitud de onda de 340 nm y 290 nm respectivamente.....	38
Figura 3. Cromatograma de masas de la fracción R14 (a) y su espectro de absorción de masas (b).....	39
Figura 4. Cromatograma del extracto SeAce (línea azul) comparado con un estándar de ácido cinámico (línea negra); se leyó a una longitud de onda de 280 nm.....	40
Figura 5. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo vehículo teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); células mesangiales (M); polo vascular (PV).....	50

Figura 6. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo AGII teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); polo vascular (PV); eritrocitos (E).....	50
Figura 7. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Losartán teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); células del epitelio parietal (EP); polo vascular (PV).....	51
Figura 8. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeAce teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); cápsula de Bowman (CB); polo vascular (PV); eritrocitos (E).....	51
Figura 9. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeMeOH teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); cápsula de Bowman (CB); eritrocitos (E).....	52
Figura 10. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Vehículo teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); células mesangiales (M); fibras de colágeno (C).....	53

Figura 11. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo AGII teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); células mesangiales(M); colágeno (C). Óvalos amarillos indican perdida de la estructura debido a que los contornos de las células se vuelven difusos y se aprecia depósitos de materia cicatricial como colágeno.....	53
Figura 12. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Losartán teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); polo vascular (PV); células mensagiales (M).....	54
Figura 13. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeAce teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); polo vascular (PV); células mesangiales (M).....	54
Figura 14. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeMeOH teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); macula densa (MD); polo vascular (PV); células mesangiales (M).....	55

GRÁFICAS

Gráfica 1. Presión arterial sistólica y diastólica en mmHg, de los diferentes tratamientos en el modelo de HAS crónica inducida por la administración de AGII (0.1mg/kg). los valores se expresan como la Media \pm DE. ANOVA post hoc de Tukey n=10. * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.

41

Gráfica 2. Determinación de la concentración tisular de IL-1b en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.

45

Gráfica 3. Determinación de la concentración tisular de TNF-a en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.

46

Gráfica 4. Determinación de la concentración tisular de IL-6 en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII

47

Gráfica 5. Determinación de la concentración tisular de IL-10 en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de

medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII. 48

Gráfica 6. Porcentaje de contracción del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata aislada estimuladas con concentraciones crecientes de AGII, con respecto al efecto máximo obtenido con KCl. Así como la evaluación del efecto vasorrelajante del extracto SeRHA estimulado con AGII. Se utilizó nifedipina como control positivo ya que es un bloqueador de los canales de calcio. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$, con una $n=10$ animales 57

Gráfica 7. Porcentaje de la contracción del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata estimulados con AGII, en presencia de concentraciones crecientes de CaCl_2 con respecto al efecto máximo obtenido con KCl. Así como el efecto modulador del extracto SeRHA sobre la contracción. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$, con una $n=10$ animales. 58

Gráfica 8. Resultados de anión superóxido por fluorimetría con DHE. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$. (*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Vehículo. (**) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo AGII 60

LISTA DE ABREVIATURAS

Enfermedades cardiovasculares	ECV
Hipertensión arterial sistémica	HAS
Diabetes mellitus tipo 2	DM2
Síndrome metabólico	SM
Disfunción endotelial	DE
Sistema renina – angiotensina – aldosterona	RAAS
Angiotensina II	AGII
Presión arterial	PA
Moléculas de adherencia intracelular-1	ICAM-1
Moléculas de adherencia celular vascular-1	VCAM-1
Proteína quimiotáctica de monocitos-1	MCP-1
NADPH oxidasa	NOX
Músculo liso vascular	MLV
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Receptor AT ₁ de AGII	rAT ₁
Guanosil trifosfato	GTP

Guanosil difosfato	GDP
Diacilglicerol	DAG
Inositol trifosfato	IP ₃
Calcio	Ca ⁺⁺
Protein-cinasa C	PKC
Fosfolipasa A	PLA
Ácido araquidónico	AA
Prostaglandinas	PG
Peroxinitrito	ONOO ^{•-}
Factores constrictores derivados del endotelio	EDCF
Factores relajantes derivados del endotelio	EDRF
Factores hiperpolarizantes derivados del endotelio	EDHF
Óxido nítrico	NO
Prostaciclina	PGI
Tromboxanos	TX
Óxido nítrico sintasa endotelial	eNOS
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS

Óxido nítrico sintasa neuronal	nNOS
Anión superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Factor Nuclear kappa de Células B	NF-kb
Factor de Necrosis Tumoral alfa	TNF-a
Ciclo – oxigenasa	COX
Lipoproteínas de baja densidad	LDL
Interleucinas	IL
Miligramo	Mg
Microgramo	mg
Gramo	G
Minuto	Min
Grados centígrados	°C
Milímetros de mercurio	mmHg
Solución tampón de fosfato salino	PBS
Phenylmethylsulfonyl fluoride	PMFS
Hora	H
Suero Fetal Bovino	SFB

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	ELISA
Acido etilén diamino tertracético	EDTA
Nicotín adenín dinucleótido	NADH
Nicotín adenín dinucleótido fosfato	NADPH
NADH/NADPH oxidasa	NOX
Dihidroetidio	DHE
Etidio	Eth
Milimolar	mM
Difenileneiodonium	DPI
Análisis de varianza	ANOVA
Microgramo por kilogramo	mg/Kg
Guanosín monofosfato cíclico	GMPc
Guanilato ciclasa soluble	GCs
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Enzima convertidora de angiotensina	ECA

RESUMEN

La hipertensión arterial sistémica es un padecimiento multifactorial que se asocia de manera estrecha con el síndrome metabólico en conjunto con la diabetes mellitus tipo 2 y la dislipidemia relacionadas a la obesidad. Cada una de estas fisiopatologías de manera independiente provocan disfunción endotelial, por lo que en el paciente diabético se genera disfunción endotelial que a su vez conduce a problemas cardiovasculares, principalmente la hipertensión arterial sistémica, de igual manera el paciente hipertenso puede llegar a generar diabetes mellitus tipo 2. El endotelio es una barrera protectora y moduladora que recubre a todo el sistema cardiovascular para mantener la homeostasis corporal, las células endoteliales controlan la presión arterial, regulan el tono y la permeabilidad vascular, el balance coagulación-fibrinólisis, la adhesión celular que conduce a la diapédesis de leucocitos estableciendo con ello el proceso inflamatorio, todo esto en condiciones de normalidad. Cuando este tejido se ve comprometido por alteraciones como la hipertensión, diabetes o dislipidemia se alteran sus funciones conllevando a la disfunción endotelial, que a su vez promueve o establece la conjunción del síndrome metabólico. Los medicamentos actuales para tratar la hipertensión arterial sistémica, por lo general actúan sobre un sólo mecanismo de acción, lo que deriva en una polifarmacia que generalmente no revierten o impiden la concluyente disfunción endotelial. Por lo tanto, es de gran importancia poder controlar no sólo a las enfermedades crónico degenerativas, sino también, poder disminuir las alteraciones y daños provocados por la disfunción endotelial. Debido a

esto, la búsqueda de tratamientos derivados de productos naturales es una alternativa en el control de estos padecimientos ya que su riqueza en compuestos activos puede actuar de manera sinérgica mediante diferentes mecanismos de acción.

La especie *Sechium edule* también conocida como Chayote, es una planta originaria de México, que ha sido empleada en la medicina tradicional para tratar afecciones vasculares y renales. Así mismo, en estudios farmacológicos y químicos se ha podido catalogar como un agente vasodilatador que contiene compuestos de tipo polifenólicos, los cuales se sabe tienen actividades diversas sobre el estrés oxidante, la inflamación y la hipertensión arterial, entre otros. Por lo que en este trabajo se realizó un estudio del efecto de los extractos de raíz de *Sechium edule* en un modelo de disfunción endotelial provocado por hipertensión arterial sistémica inducida con angiotensina II en el cual se investigaron los niveles de estrés oxidante, así como el estado pro-inflamatorio, la capacidad vasorrelajante en anillos aislados de rata donde, además se pudo aproximar a un posible modo de acción de estos extractos. Los resultados indican que el extracto SeAce redujo la presión arterial sistólica en un 26% y la diastólica en un 28 %, mientras que el extracto SeMeOH induce una reducción de un 27% para sistólica y 28% para la diastólica, con respecto al grupo con daño inducido por la administración por 10 semanas y a una dosis sub-efectiva de angiotensina II. En el ensayo de estrés oxidante se analizó en muestras de cerebro, riñón y aorta la producción de anión $O_2^{\cdot-}$ por medio de una prueba de fluorimetría con dihidroetidio en el cual se logró establecer que los

extractos de *S. edule* logran reducir de manera estadísticamente significativa los niveles de anión $O_2^{\cdot-}$ en cerebro, riñones y aorta respecto a los niveles presentados por el grupo control negativo de angiotensina II, así como para el grupo tratado con Losartán exceptuando en los resultados de aorta, la cual presentó los niveles más bajos de anión $O_2^{\cdot-}$, sin embargo en cerebro Losartán casi duplicó estos niveles por encima del grupo angiotensina II, esto puede estar dado por los productos derivados de la biotransformación a nivel cerebral del Losartán, siendo estos capaces de aumentar la producción del $O_2^{\cdot-}$. En el caso de los niveles de citocinas, el extracto SeMeOH provoca una disminución en la concentración de TNF- α en un 31%, de IL-1 β en un 9%, de IL-6 en un 23% y de IL-10 en un 18%, con respecto al incremento obtenido en el grupo angiotensina II. Por otro lado, en el análisis histológico de riñones aislados de animales con y sin tratamiento con extractos de *Sechium edule*, se pudo observar que los ratones que recibieron sólo angiotensina II, presentan un órgano dañado, con cambios tisulares evidentes. Este daño ocasionado por la angiotensina II, fue atenuado con el tratamiento derivado de *Sechium edule*. El ensayo de aorta aislada de rata contribuyó a proponer que esta planta es capaz de ejercer un efecto vasorelajante de músculo liso vascular, tras la administración del vasoconstrictor angiotensina II. La información que este trabajo arrojó es que los extractos de *Sechium edule* son capaces de antagonizar los efectos de AGII, probablemente por actuar sobre los receptores AT1 para esta hormona, lo cual se debe a la presencia de compuestos polifenólicos en los extractos evaluados, principalmente derivados del ácido cinámico.

ABSTRACT

Systemic hypertension is a multifactorial condition that is closely associated with metabolic syndrome in conjunction with diabetes mellitus type 2 and dyslipidemia related to obesity. Each of these pathophysiologies independently cause endothelial dysfunction, so that in the diabetic patients that generate endothelial dysfunction will lead to cardiovascular problems, mainly hypertension, likewise hypertensive patients can generate diabetes mellitus type 2. The endothelium is a protective barrier and modulator that covers the entire cardiovascular system in order to maintain body homeostasis, endothelial cells control blood pressure, regulating vascular tone and permeability, coagulation-fibrinolysis balance, cell adhesion, leading to the leukocyte diapedesis thereby establishing an inflammatory process, under normal conditions. When this tissue is compromised by disorders such as hypertension, diabetes or dyslipidemia its functions are altered leading to endothelial dysfunction, which in turn promotes the metabolic syndrome disorders. Medications today are for treating hypertension, usually act on a single mechanism of action, resulting in a polypharmacy, which generally do not reverse or prevent endothelial dysfunction conclusively. Therefore, it is significantly greater to control the degenerative effects of the diseases, reducing the alterations and damage caused by endothelial dysfunction. Because of this, the search for treatments derived from natural products is an alternative in the control of these diseases due to the richness in active compounds that can act synergistically through different mechanisms of action. The species *S. edule* also known as Chayote, is a plant native to

Mexico, which has been used in traditional medicine to treat vascular and renal disorders. Also chemical and pharmacological studies have been done, and are classified as a vasodilating agent containing polyphenolic compounds, which are known to have different activities like oxidative stress, inflammation, and hypertension, among others. The effect of the root extracts of *S. edule* was evaluated on a model of endothelial dysfunction caused by hypertension induced with angiotensin II (AGII), in which the levels of oxidative stress and the pro-inflammatory state were analysed, as well as the vasorelaxing ability that was performed on the isolated rat aorta ring model, which also could approach a possible model of action for these extracts. The results indicate that the extract SeAce reduced systolic blood pressure by 26% and diastolic by 28%, while the extract SeMeOH reduction them in order of 27% to 28% for systolic and diastolic respectively, compared to the damage group that was administered angiotensin II for 10 weeks at a sub-effective dose. In the oxidative stress study samples of brain, kidney and aorta were analysed for $O_2^{\bullet-}$ anion production thru a dihydroethidium fluorometry test in which it was possible to establish that extracts of *S. edule* statistically significant reduced $O_2^{\bullet-}$ anion levels in brain, kidneys and aorta compared to the levels shown by the negative control group (angiotensin II) and for the group treated with Losartan except in the aorta results, which presented the lowest levels of $O_2^{\bullet-}$ anion, however Losartan almost doubled these levels in brain above angiotensin II group, this can be due to the products of the biotransformation of Losartan in the brain, these being able to increase the production of $O_2^{\bullet-}$ anion. For cytokine levels, SeMeOH

extract causes a decrease in the concentration of TNF- α by 31%, IL-1 β by 9%, IL-6 in 23% and IL-10 in 18%, relative to the increase obtained in the angiotensin II group. Furthermore, in the histological analysis of the kidney from animals with and without angiotensin II treatment and with *S. edule* extracts, it was observed that mice that received only angiotensin II presented evident damaged of the organ with changes of the tissue structure. This damage caused by angiotensin II was attenuated with treatments derived from the *S. edule* extracts. Testing of isolated rat aorta contributed to propose that this plant is able to exert vasorelaxant effect of vascular smooth muscle following by the administration of vasoconstrictor angiotensin II. The information is this work showed that extracts of *S. edule* are able to antagonize the effects of angiotensin II, probably by acting on AT1 receptors for this hormone, which is due to the presence of polyphenolic compounds primarily cinnamic acid derivatives that are present in the extracts evaluated.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2009) y son provocadas por enfermedades crónicas degenerativas que constituyen factores de riesgo primarios como: hipertensión arterial sistémica (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, entre otras y por factores de riesgo secundarios, que se asocian a hábitos nocivos, como son dieta hipercalórica, sedentarismo, tabaquismo, estrés, etc (Paravicini *et al.*, 2008). Estos procesos fisiopatológicos asociados integran la constelación de padecimientos incluidos dentro del síndrome metabólico y la relación entre éstos hacen aún mayor la incidencia de las enfermedades cardiovasculares (Groundy, 2004; Malik *et al.*, 2004). La gran mayoría de las patologías que integran el síndrome metabólico provocan *per se* disfunción endotelial (DE) que es el factor detonante de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares (Lakka *et al.*, 2002). La DE es considerada la desregulación de la producción de los factores derivados del endotelio que pueden ser constrictores e hiperpolarizantes y provocan daño orgánico principalmente en la pared vascular. Este último vascular deriva en inflamación, trombosis, agregación plaquetaria, remodelamiento vascular y adhesión molecular que dan lugar a las enfermedades cardiovasculares (Kalinowski *et al.* 2004).

En la búsqueda de tratamientos para contrarrestar las patologías provocadas por la DE se ha incursionado farmacológica y

fitoquímicamente en el mundo de la herbolaria, en donde se han encontrado compuestos activos que presentan una eficacia farmacológica sobre éstas. Las sustancias activas más estudiadas en relación a estas patologías son los compuestos polifenólicos, principalmente los flavonoides entre otros (Curin *et al.*, 2005). Así como, compuestos menos complejos como son los derivados del ácido cinámico, entre ellos el ácido ferúlico, caféico, *p*-cumárico, etc. Este grupo de compuestos han sido estudiado con un enfoque dirigido a efectos antiinflamatorios y antioxidantes.

Existen antecedentes en la herbolaria mexicana sobre el uso del *Sechium edule* (Chayote) como tratamiento en afecciones vasculares y como diurético. En algunos estudios farmacológicos se ha comprobado su eficacia como vaso relajante. Los estudios fitoquímicos de esta planta han sido pocos, sin embargo en los frutos se encontraron compuestos glicosídicos, los cuales presentaron efectos antiinflamatorios sobre edema de pata posterior inducida con dextrano como agente flogístico (Salama *et al.*, 1987). También se han encontrado compuestos polifenólicos tipo flavonoides en la planta completa, como son apigenina y algunos derivados de ésta como son la vitexina y la vicenina (Siciliano *et al.*, 2004), estos compuestos han sido ya estudiados por su actividades antiinflamatorias y antioxidantes.

2. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes de Hipertensión Arterial Sistémica y Disfunción Endotelial

Existen algunas alteraciones fisiopatológicas que provocan las enfermedades cardiovasculares (ECV), como son: la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, aterogénesis, hipertensión arterial sistémica (HAS), entre otros. Cada uno de éstos de forma independiente provocan DE, que son todas las alteraciones de la fisiología del endotelio que ocasionan una descompensación de sus funciones. La HAS es provocada principalmente por una sobre-estimulación del sistema renina – angiotensina – aldosterona (RAAS)(Unger, 2002), con el consecuente incremento en los niveles de AGII que genera el daño orgánico derivado del estado pro-trombótico y pro-inflamatorio asociado al estrés oxidante tanto de las células vasculares como endoteliales, desencadenando los procesos que llevan a la DE (Gasparo, 2002).

La HAS es controlada por diversos medicamentos como son diuréticos, antagonistas de los receptores AT1, calcio antagonistas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), b bloqueadores entre otros, desafortunadamente estos medicamentos pueden presentar efectos secundarios adversos, descripción en Anexo 1.

2.2. Participación de la Angiotensina II en la HAS y DE

La función principal del RAAS es la de mantener la homeostasis en el sistema vascular, manteniendo el flujo sanguíneo y volumen plasmático por medio del balance de agua y sales corporales (Fyhrquist *et al.*, 2008). La AGII es una hormona multifuncional que regula el volumen plasmático y la presión arterial (PA) por su efecto vasoconstrictor, además de inducir factores de crecimiento. A nivel celular modula la contracción, el crecimiento, la apoptosis y diferenciación celular, además de promover la migración y depósitos celulares en la matriz extracelular (Touyz *et al.*, 2002). A nivel plasmático actúa como proinflamatorio por la activación de leucocitos, integrinas, interleucinas, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), etc. Además promueve la producción de factores de crecimiento (fibroblastos, transformante beta y derivado de las plaquetas), de esta manera contribuye al remodelamiento cardiovascular, también favorece la proliferación de células del músculo liso vascular (MLV), activa a los macrófagos incrementando su capacidad de adhesión a la pared vascular facilitando el desarrollo de la placa aterosclerótica (Santeliz *et al.*, 2008). Sobre las células endoteliales induce la activación de la enzima NADPH oxidasa (NOX) que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cai *et al.*, 2002).

2.3. Mecanismo de Acción de AGII

La actividad vasoconstrictora de la AGII es desencadenada cuando se une a su receptor (rAT_1) (Michel, 2004); la unión de AGII- AT_1 , genera la activación de una proteína G, por medio de un intercambio de GTP a GDP, resultando en la escisión de los complejos α y $\beta\gamma$ de la proteína G, con la consecuente activación por fosforilación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. (PLC) Esta última hidroliza fosfolípidos liberando dos compuestos: diacilglicerol (DAG) e inositol- trifosfato (IP_3). El IP_3 activa los canales de calcio del retículo endoplásmico (RE), provocando un aumento en la conductancia a Ca^{++} , que a su vez estimula la entrada de este desde el espacio extracelular por medio de canales específicos de Ca^{++} . El aumento de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ genera contracción del músculo liso vascular, aumentando la resistencia arterial periférica provocando un incremento a la PA (Michel, 2004; Touyz *et al.*, 2000). Por otro, lado la activación de DAG + $\uparrow[\text{Ca}^{++}]_i$ activa a la protein-cinasa C (PKC) que a su vez estimula a fosfolipasa A (PLA) de la membrana celular y provoca la liberación de ácido araquidónico (AA) (Griendling *et al.*, 1994), el cual es bio-transformado por ciclo-oxigenasa (COX) que a su vez desencadena una cascada de reacciones que termina con la producción de moléculas pro-inflamatorias como tromboxanos y prostaglandinas (PG). Bajo condiciones de estrés oxidante derivado de HAS crónica, el AA es transformado a PG de forma no-enzimática por peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) (Schildknecht *et al.*, 2009), lo que explica la condición deletérea del la

HAS crónica. De tal manera que la sobre estimulación de RAAS por la administración con dosis sub-efectivas de AGII por un largo periodo, se establece un estado de hipertensión derivado del DE, particularmente por el estrés oxidante generado y proceso inflamatorio generado.

2.4. Importancia de la Células Endoteliales

El endotelio es una monocapa de células que recubre todo el interior del sistema vascular, creando una barrera entre la pared vascular y la sangre circulante; éste tiene diversas funciones ya que funge como un órgano receptor – efector (Esper *et al.*, 2006). Sus principales funciones son las de regular el tono vascular, la permeabilidad vascular, el balance coagulación - fibrinólisis, adhesión celular que conduce a la diapédesis de leucocitos estableciendo con ello el proceso inflamatorio. También modula las funciones de otros tipos de células, como las del músculo liso vascular (MLV), plaquetas, leucocitos y macrófagos. Por lo que, se puede concluir que el principal compromiso del endotelio funcional es mantener estable la circulación sanguínea por el control de la reología de la sangre (Widlansky *et al.*, 2003).

Esto lo puede llevar a cabo, debido a que tiene la propiedad de producir de forma independiente sustancias para mantener la homeostasis de sus funciones que actúan como agonistas y antagonistas; como son los factores constrictores derivados del endotelio (EDCF), factores relajantes derivados del endotelio (EDRF) y factores

hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHF). Las células endoteliales son sensibles a los cambios en la síntesis de los EDRF, la respuesta que establecen son el aumento y liberación de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI); cuando el estímulo está dado por EDCF la respuesta de dichas células es, la síntesis y liberación de prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX) y la generación de ROS. La desregulación de la producción de estos factores provocan DE (Vanhoutte *et al.*, 2005).

El flujo sanguíneo es controlado por el tono vascular que a su vez depende del balance de las señales vasoconstrictoras y vasorrelajantes ya mencionadas en el párrafo anterior. La vasorrelajación dependiente de células endoteliales es por medio del NO que es un gas altamente reactivo con una vida media de unos cuantos segundos, el NO difunde libremente por la membrana celular e induce la vasorrelajación por medio de la estimulación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), con la formación subsecuente de guanósín monofosfato cíclico (GMPc), el cual activa a PKC y éste a su vez provoca la fosforilación de la cadena ligera de la miosina fosfatasa y por ende desactivando la cadena ligera de la miosina cinasa, causando así la relajación del MLV por medio de la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina (Vitiello *et al.*, 2014).

2.5. Participación del Óxido Nítrico y de NADH/ NADPH oxidasa en el endotelio

El principal EDRF es el óxido nítrico (NO) y es sintetizado a partir de la oxidación de L-arginina a L-citrulina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). De la NOS existen tres isoformas nNOS (neuronal), iNOS (inducible) y eNOS (endotelial); iNOS y eNOS están involucradas directamente en la síntesis de NO en el endotelio. La liberación de NO por eNOS produce vasorrelajación, disminuye la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared vascular (Guzik *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013). La iNOS se encuentra principalmente en macrófagos y es estimulada esencialmente por el incremento de citocinas, endotoxinas y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), produciendo una gran cantidad de NO que es tóxico para bacterias y células cancerígenas (Guzik *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando iNOS es activada en el endotelio suprime la actividad de eNOS, lo que provoca que esto genere anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en lugar de NO lo que conlleva al aumento del estrés oxidante y activación del proceso inflamatorio en el endotelio, derivando en las fisiopatologías asociadas a la DE como la hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, entre otros (Guzik *et al.*, 2003; Vanhoutte *et al.*, 2005).

El $O_2^{\cdot-}$ es una ROS que se produce en el endotelio por enzimas de membrana como NOX, xantina oxidasa y eNOS desacoplada entre otras.

Siendo NOX la principal vía de producción de $O_2^{\cdot-}$ en células endoteliales. NOX es una enzima unida a membrana que está formada por 6 subunidades, una unidad Rho y cinco unidades phox (gp91-^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}), p22^{phox} y p47^{phox} son fundamentales para el acoplamiento y la activación de NOX y son activadas por AGII (Cai *et.al.*, 2000; Fortuño *et.al.*, 2005; Zalba *et.al.*, 2000).

Bajo condiciones normales el anión $O_2^{\cdot-}$ modula la expresión del factor nuclear kappa de células B (NF- κ B), el cual activa la producción de citocinas como son las interleucinas y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (Gomolak *et al.*, 2014) y COX que promueven la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, provocando vasoconstricción y activación del proceso inflamatorio manteniendo así un equilibrio con el NO (Schieffer *et.al.*, 2000). Sin embargo, cuando hay alteraciones provocadas por los factores de riesgo y se pierde el equilibrio entre la síntesis del anión $O_2^{\cdot-}$ y el NO, incrementa el estrés oxidante, el anión $O_2^{\cdot-}$ reacciona con el NO produciendo ONOO $^{\cdot-}$ que es capaz de alterar el ADN, proteínas y lípidos potencialmente llevando a un daño celular. También el anión $O_2^{\cdot-}$ tiene la capacidad de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Li *et al.*, 2013), activando la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y quimioatrayentes como MCP-1, los cuales promueven la formación de células esponjosas (*foam cells*) que secretan citocinas pro-inflamatorias principalmente interleucinas (1 β , 6 y 10) y

TNF- α . También es transformado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) en peróxido de hidrógeno el cual produce remodelamiento vascular (Libby *et.a.l.*, 2002; Ushio-Fukai *et.al.*, 2008).

2.6. *Sechium edule* (Chayote)

2.6.1. Botánica y Ecología

El *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Chayote) es una planta herbácea originaria de México, crece en climas cálidos a templados, de los 500 a los 2000 m de altitud (Argueta *et.al.*, 1994; Lira, 1996; Lira *et.al.*, 1999). Es una planta enredadera trepadora de hojas acorazonadas que puede llegar a tener una longitud de 8 a 15 cm, las hojas jóvenes presentan pubescencia y las hojas más viejas son de textura áspera y fibrosa, presentan zarcillos para sujeción, sus flores son unisexuales, de color blanquecino-amarillo en forma de estrella, organizadas en racimos de 10 a 30 cm de largo, al igual que las hojas son pubescentes, el fruto es liso o con espinas, de forma ovoide o globosa y tiene una coloración verde pálido a verde oscuro, es carnoso cuando está tierno y al madurar la pulpa se vuelve fibrosa, su sabor es muy suave y delicado (insípida) y presenta una semilla suave y aplanada. Los tallos son largos y glabros, de una misma raíz se pueden formar muchos tallos. La planta crece de una sola raíz, la cual produce raíces adventicias de forma tuberosa y al igual que el fruto también es comestible (Argueta *et.al.*, 1994; Lira, 1996; Nee, 1993; Martínez, 1994).

2.6.2. Etnobotánica, química y farmacología.

En los antecedentes etnobotánicos de México se menciona el uso de *S. edule* para el tratamiento de distintas afecciones de origen reno-urinario, como son cálculos renales o de vejiga, para contrarrestar la inflamación de la uretra, así como disminuir el dolor y la dificultad al orinar y conjuntamente tratar los problemas de presión arterial alta, arterioesclerosis y várices. En el tratamiento de estas enfermedades es el fruto principalmente el que es utilizado, ya sea preparado en una decocción y administrado conjuntamente con el líquido del preparado en ayunas o también se prepara con otras plantas, en Quintana Roo, hacen un cocimiento del chayote junto con hojas de chaya, garbanzos, cabellos de elote y cebada, para aliviar problemas urinarios como inflamación del riñón y de la vejiga, en el Estado de México y Michoacán preparan el cocimiento de las hojas del chayote acompañado con pingüica y níspero (Argueta et.al., 1994; Lira, 1996).

La fitoquímica del *S. edule* ha sido poco estudiada, sin embargo, se han encontrado algunos metabolitos secundarios como son compuestos polifenólicos (flavonoides) y glicósidos de estigmasterol y sitosterol.

Salama *et al.* (1987) identificaron en frutos de *S. edule* compuestos glicosídicos como el estigmasterol- β -D-glucopiranósido y el β -sitosterol- β -D-glucopiranósido, los cuales presentaron efectos antiinflamatorios sobre el edema plantar inducido con dextrano.

Siciliano *et al.* (2004) identificaron en la planta completa ocho flavonoides. Fueron tres flavonoides C-glicosídicos y cinco O-glicosídicos, de los cuales la apigenina y luteolina fueron los más representativos. La cantidad total de estos compuestos fue diferente para cada parte de la planta seca, en hojas fue de 3.5 mg/g, seguido de la raíz con 3.0 mg/g y el menor rendimiento fue para tallos con 1.9 mg/g, en el fruto solo se encontraron trazas de los flavonoides. Las partes aéreas presentaron la mayoría de los flavonoides, tanto C- como O-glicosídicos, en las raíces el grupo más abundante fueron los C-glicosídicos caracterizado por apigenina (580 µg/g), vitexina (1.5 mg/g) y vicenina (1.4 mg/g).

Lozoya (1980) probó la actividad vasodilatadora de los extractos acuoso e hidroalcohólico de partes aéreas y semillas de *S. edule*. El proveniente de las partes aéreas presentó la mayor actividad en comparación con los otros extractos.

Gordon *et al.* (2000) probaron dos variedades de *S. edule* colectados en la Isla de Jamaica, los extractos hidrosolubles de los frutos fueron administraron en forma *i.v.* a ratas anestesiadas y midieron varios parámetros cardiovasculares como: frecuencia cardiaca, presión arterial y electrocardiograma (ECG). Todos los extractos probados produjeron una caída en la presión sanguínea con pequeños cambios en el electrocardiograma.

Lombardo (2006) reportó que el extracto hidroalcohólico de raíz de *S. edule* (colectado en el estado de Morelos, México) presentó efecto antihipertensivo. El extracto fue probado sobre dos modelos de antagonismo a AGII (*in vivo*); el modelo *in vivo* consistió en inducir hipertensión con AGII a ratas vagotomizadas, probando diferentes dosis del extracto, la dosis de 100 mg/kg presentó el mayor efecto hipotensor.

Lombardo (2008) a partir de raíces de *S. edule* obtenidos de plantas colectadas en el estado de Veracruz, México (con actividad antihipertensiva probada), y de raíces provenientes de plantas cultivadas en hidroponía, realizó la comparación fitoquímica de los extractos y fracciones con actividad antihipertensiva, contra extractos obtenidos de las plantas hidropónicas, las evaluaciones se realizaron por HPLC, en donde se identificó un grupo de compuestos, el cual estuvo presente tanto en los extractos de las plantas de Veracruz como de las cosechadas del cultivo de hidroponía, este grupo de compuestos presentaron un espectro de absorción de UV semejante a los de compuestos polifenólicos: apigenina, vitexina y vicenina como los identificados por Siciliano. Además, se probaron farmacológicamente e identificaron las fracciones más activas estableciendo que en éstas se encuentran los compuestos polifenólicos identificados y Calderone *et al.*, (2004) describieron que la apigenina y luteolina presentan efectos vasorrelajantes sobre anillos aislados de aorta de rata y Olszanecki *et al.*,

(2002), probaron camferol y apigenina, que inhibieron la actividad de iNOS promoviendo la síntesis de NO por eNOS.

2.7. Compuestos derivados del Ácido Cinámico.

Dentro de los polifenoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos son los principales representantes. Los ácidos fenólicos están representados por los ácidos cinámicos y sus derivados hidroxicinámicos. A partir de éstos se obtienen el ácido caféico, el ácido cumárico, el ácido ferúlico y el ácido clorogénico entre otros. Estos compuestos en particular han sido estudiados por su actividad antioxidante y antiinflamatoria (Marfella et al., 2014; Higuchi, 2014).

Los ácidos fenólicos en general contrarrestan a los radicales libres ya que son donadores de electrones o átomos de hidrogeno, pueden también suprimir la generación de los radicales libres, por la disminución en la oxidación o la inhibición de la formación de los radicales libres así como por desactivar sus especies reactivas o sus precursores. También tienen la capacidad de interrumpir cadenas de reacciones de lipoperoxidación (Higuchi, 2014; Marfella et al., 2014). dentro de los compuestos fenólicos encontramos a los derivados del ácido cinámico como son el ácido ferúlico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, entre otros. El ácido caféico es uno de los más comunes presente en este grupo de compuestos, que puede estar esterificado con ácido quínico para formar el ácido clorogénico el cual es muy abundante en el café, otro compuesto

importante es el ácido ferúlico. Algunos compuestos parecidos a los derivados del ácido cinámico como son el meta-metoxi catecol como la apocinina y la vainillina, este tipo de compuestos tienen la capacidad de inhibir la actividad de NOX, que es el principal productor de anión superóxido en la vasculatura, esto es importante porque algunos derivados del ácido cinámico también son compuestos de tipo meta-metoxi catecol, los cuales fueron probados en ensayos de actividad antioxidante y se encontró que este tipo de compuestos disminuyeron de manera estadísticamente significativa la actividad de NOX, así como la producción de anión $O_2^{\cdot-}$ en aorta aislada de ratas espontáneamente hipertensas (Suzuki *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial sistémica, forman parte de la constelación de complejas patologías que derivan en DE, que a su vez se desarrolla hacia las enfermedades cardiovasculares, principales causas de muerte en todo el mundo. Estas afecciones son controladas por medicamentos que por lo general presentan algún tipo de efecto secundario adverso aunado a que no intervienen en el control del daño provocado por la disfunción endotelial, por lo que es imperativo se sigan buscando métodos de tratamientos para estas enfermedades pero que además ayuden a controlar la DE, por actuar sobre los diferentes mecanismos de acción que participan en su desarrollo. En la búsqueda de compuestos nuevos para la fabricación de medicamentos, se ha recurrido a la herbolaria como fuente de compuestos activos que no solo puedan contrarrestar las enfermedades antes mencionadas si no que a su vez, a través de un mecanismo de sinergia puedan también controlar a la DE por medio de su capacidad antioxidante y anti-inflamatoria, entre otras. Este trabajo se enfoca al tratamiento de la hipertensión arterial sistémica asociada a las alteraciones provocadas por la disfunción endotelial, por lo que se trabajó con una planta que tiene antecedentes de disminuir la presión arterial, mejorar el daño por varices así como contrarrestar afecciones de vías urinarias, el *S. edule* es una planta que además puede ser considerada con Reconocido Generalmente como Seguro o GRAS por sus siglas en ingles (Generally Recognized as Safe), bajo los criterios de la FDA de U.S.A.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los extractos de *S. edule* tienen actividad inmunomoduladora y antioxidante sobre modelos de hipertensión crónica inducida con AGII?

5. HIPÓTESIS

Los extractos de raíz de *S. edule* controlan el efecto de la disfunción endotelial al disminuir los niveles de estrés oxidante por inhibición de la producción de anión superóxido derivada de NADH oxidasa activada por AGII, e interferir con el proceso inflamatorio desencadenado por la administración crónica de AGII.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar la actividad e interacción farmacológica de los compuestos polifenólicos de raíces de *S. edule* sobre un modelo *in vivo* de disfunción endotelial, por medio de la disminución de los niveles de anión superóxido, así como la modulación de los niveles de citocinas pro-inflamatorias.

6.2. Objetivos particulares

- 1) Realizar la caracterización química y la estandarización de los extractos de raíces de *S. edule*.
- 2) Evaluar el efecto antihipertensivo del extracto estandarizado en cinamatos de *S. edule* sobre la hipertensión arterial crónica inducida con AGII.
- 3) Evaluar la actividad inmunomoduladora de los extractos activos de *S. edule*, en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica inducida con AGII.
- 4) Evaluar el efecto de los extractos activos de *S. edule* sobre el estrés oxidante en riñones y aorta de ratones con hipertensión arterial crónica inducida con AGII.
- 5) Realizar una comparación histológica de los riñones con hipertensión generada por la administración diaria de AGII, con y sin tratamiento.
- 6) Medir el efecto vaso-relajante de músculo aislado de aorta de rata de los extractos de *S. edule* en la contracción inducida químicamente con AGII y KCl.

7. METODOLOGÍA

7.1. Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos antihipertensivos de las raíces de *S. edule*.

7.1.1. Extracción de los compuestos activos

El material vegetal se obtuvo en la comunidad de Tuxpanguillo, Veracruz (18° 47' 00.5'' latitud norte y 97° 00' 17.5'' longitud oeste, a 1721 m.s.n.m.), de los cultivares de la familia Tzopil.

Inicialmente se realizó una extracción hidroalcohólica 60:40 etanol/agua de la raíz de *S. edule* con la intención de tener un extracto con compuestos de diferentes polaridades. Se realizaron 3 maceraciones consecutivas del material vegetal (2.3 Kg) en una mezcla de etanol/agua en proporciones 60:40, este extracto se denominó como extracto de referencia SeRHA, el cual se utilizó para el ensayo de aorta aislada de rata. El rendimiento de este extracto fue de 4 %, equivalente a 92 g. A partir de este se realizó una separación con acetona y posteriormente con metanol y se llevó a fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, de la fracción de acetona obtenida, se obtuvieron a su vez las fracciones R14 y R17, con un rendimiento de 0.0041% (95.8 mg) y el 0.014% (339.7 mg), respectivamente, y se enviaron a análisis por HPLC-MS.

Debido a que este extracto y las fracciones tuvieron un rendimiento bajo, se decidió realizar un plan de extracción más específico buscando

un perfil químico semejante al de la fracción de acetona y las fracciones R14 y R17. Se propuso la siguiente metodología:

A partir de seis Kg de raíces que fueron secadas por liofilización, considerando que los componentes activos presentan polaridad media, se realizaron diferentes procesos de extracción por maceración de 24 horas x tres veces en la proporción de 3.3 L de disolvente por kilogramo de material vegetal seco. La primera se realizó con *n*-hexano lo que permitió eliminar los ácidos grasos y otros compuestos de baja polaridad. El material vegetal remanente fue sometido al segundo proceso de maceración con cloroformo, para eliminar esteroides y terpenos de baja polaridad. Para la obtención de los compuestos activos, el material vegetal remanente se maceró con acetona y finalmente con una mezcla de acetona/metanol en proporciones 70:30, siguiendo el proceso de extracción previamente indicado.

A los extractos obtenidos se les realizó un perfil químico por medio de cromatografía en capa fina (TLC), para identificar los diversos grupos de compuestos presentes en ellos. Se identificó que los extractos de cloroformo y acetona presentaban un perfil químico muy similar por lo que se agruparon. Posteriormente se sometieron a separación por columna abierta los extractos de cloroformo/acetona y el de Acetona/MeOH 70:30. Este nuevo método de extracción se comparó por TLC con el extracto de referencia y las fracciones de acetona y metanol, así como con las fracciones R14 y R17.

7.1.2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto con mayor contenido de compuestos polifenólicos

Se utilizaron procesos de extracción líquido/líquido. El primer fraccionamiento grueso se realizó por bipartición entre disolventes inmiscibles (agua/acetato de etilo). Se seleccionaron por TLC la fracción que presentó el mayor contenido de los compuestos polifenólicos. Esta fracción fue purificada mediante sucesivos procesos de separación cromatográfica en columna abierta, TLC preparativa y HPLC preparativa. Este proceso fue monitoreado por HPLC utilizando como referencia las mezcla de estándares de compuestos derivados del ácido cinámico.

El material vegetal, de raíz (*R*) se extrajo por maceración exhaustiva en etanol 60% a temperatura ambiente (SeRHA). El extracto se concentró por evaporación a temperatura y presión reducida, posteriormente fue secado por liofilización. El extracto en polvo se extrajo con acetona (SeAce) y posteriormente con metanol (SeMeOH). El extracto SeAce (2 g) fue el más activo farmacológicamente, por lo tanto fue fraccionado por cromatografía en columna. La columna (64 x 5 cm) se empacó con Silica-Gel 60 Merck (0.040 – 0.063 mm) y se eluyó contra un gradiente de cloroformo:metanol. Se obtuvieron 41 fracciones las cuales fueron evaluadas por cromatografía en placa fina (cromatofolio de sílica gel 60 F₂₄₅ Merck®) y se hicieron 20 reuniones de acuerdo a la similitud del perfil cromatográfico de las fracciones y fueron denominadas R1 hasta R20.

Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas por HPLC en un sistema de módulos (Waters 2595) acoplado con un detector PDA (Waters 996), y el software Empower Chromatographic Manager ver. 1 Waters®. La fase estacionaria correspondió a una columna Altima HP C18-HL Rocket (53 x 7 mm; 3 mm). La fase móvil consistió en un gradiente de H₂O-TFA 0.5% y CH₃CN:MeOH 1:1 a un flujo de 1 ml/min con un tiempo de corrida de 24 min, utilizando un detector de arreglo de fotodiodos una longitud de onda $\lambda = 310$ nm.

7.2. Evaluación de los extractos activos sobre el daño provocado por hipertensión arterial crónica.

7.2.1. Tratamientos

Los grupos experimentales fueron conformados por 10 animales cada uno. Los tratamientos se presentan en la Cuadro 1. Cada tratamiento fue administrado por vía oral, con excepción de AGII que su administración se realizó vía *i.p*, durante un periodo de 10 semanas, en el que todos los animales fueron aclimatados durante una semana a las condiciones del bioterio, de manera previa al inicio de los tratamientos. El manejo de los animales se realizó bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Cuadro 1. Tratamientos empleados en los diferentes ensayos.

Pruebas/Tx	Vehículo (SSI)	AGII (0.1 µg/kg)	Dosis 10 mg/kg del tratamiento + AGII (0.1 µg/kg)		
			Losartán	SeAce	SeMeOH
PA	✓	✓	✓	✓	✓
Estrés Oxidante	✓	✓	✓	✓	✓
Nivel de IL's	✓	✓	✓	✓	✓

El primer grupo (vehículo) solo se le administró solución salina isotónica (SSI) *v.o.* y por vía *i.p.* durante las 10 semanas de tratamiento, esto con la finalidad de someter a los animales de experimentación a un mismo esquema de manejo y manipulación. El grupo AGII, es al que se le administró SSI *v.o.* y AGII *i.p.*, el cual fue considerado el grupo control negativo o de daño.

Los otros grupos de animales con AGII, recibieron los tratamientos: Losartán® como control positivo. EL losartán es un compuesto sintético que se une de manera selectiva a los receptores AT1, provocando el bloqueo de cualquier acción de importancia fisiológica que pudiera llevar a cabo la AGII, independiente al origen o la vía de síntesis de ésta. El losartán solo se une de manera selectiva a los receptores AT1, y no se

une o bloquea a otros receptores hormonales o canales de iones importantes en la regulación cardiovascular. Tampoco participa en la inhibición o bloqueo de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)(PLM 2014). Los tratamientos SeAce y SeMeOH son extractos obtenidos a partir de la raíz de *S. edule*, ricos en compuestos derivados del ácido cinámico, y que son los tratamientos a evaluar en este trabajo de investigación.

7.2.2. Modelo de hipertensión crónica inducido con AGII en ratones ICR

Con base en el modelo de hipertensión renovascular de Goldblatt (Goldblatt *et al.*, 1934) que propone causar isquemia renal que promueve la sobreproducción de AGII por alteración de la RAAS. Por los que se propuso en este trabajo, utilizar la administración sub-efectiva de AGII, debido a que éste es el producto final de la RAAS.

El ensayo se realizo de la siguiente manera, se utilizaron ratones hembra de la cepa ICR, con un peso de 25 a 30 g; (n=10 por grupo), a los cuales se les indujo hipertensión crónica por la administración diaria *i.p.* de AGII (0.1 µg/Kg) durante diez semanas. La determinación de la PA de los animales experimentales se realizó bajo anestesia quirúrgica con una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico vía *i.p.*; a los ratones se les colocó un anillo insuflador en la base de la cola del ratón que consta de un transductor de pulso, el cual está en posición distal al insuflador. El anillo es inflado aproximadamente a 300 mmHg, durante este periodo es

cuando se detecta la presión sistólica, a continuación la presión del anillo es liberado lentamente y durante esta pérdida de presión en el insuflador el transductor la presión diastólica, ambas presiones fueron registradas en un equipo de adquisición de datos modelo LE 5002 de la marca Biopac - Panlab - LETICA.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la lectura de la PA, en la cual la PA sistólica (PAS) se registrara en el momento que desaparece el ruido arterial (punto 1) detectado por el transductor, la PA diastólica (PAD) se determina en el momento en que coincide la caída abrupta de la lectura de presión (punto 2) a la aparición del ruido arterial (punto3), el punto 4 sólo nos indica que el insuflador está en 0 mmHg.

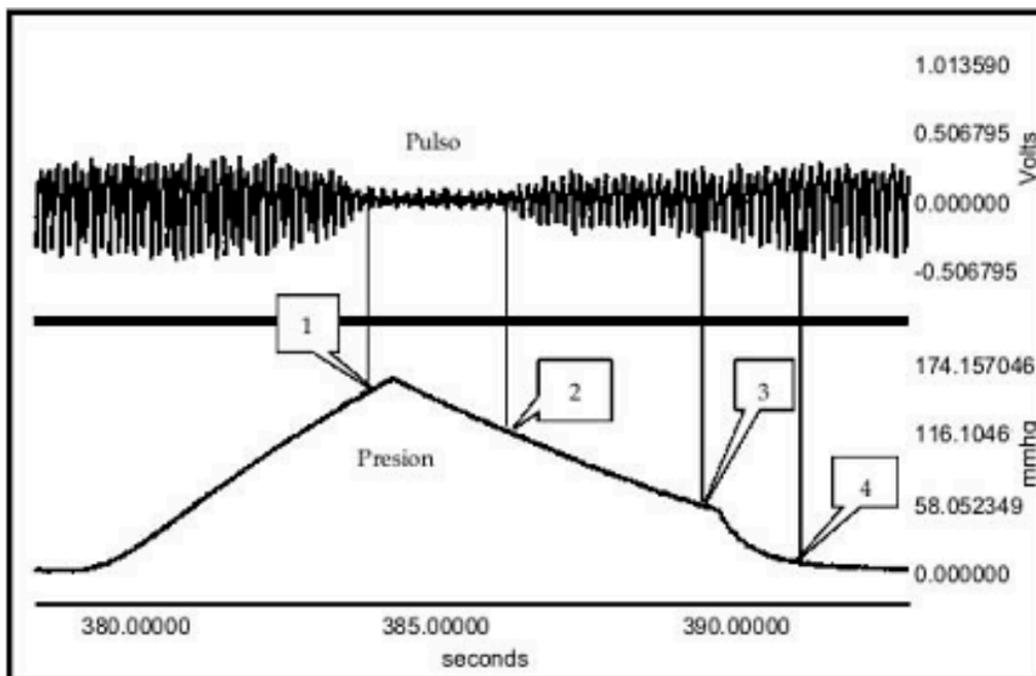


Figura 1. Registro en tiempo real de la determinación de presión arterial.

7.2.3. Obtención de tejidos a partir de ratones hembra ICR con hipertensión arterial crónica inducida con AGII.

Para la obtención de los tejidos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 60 mg/kg y perfundidos con una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) por vía intracardiaca para eliminar la totalidad de la sangre y se extrajeron la aorta abdominal y los riñones. Para la determinación de interleucinas, estos órganos fueron colocados en una solución de PBS – PMFS (por su siglas en inglés, floruro de fenil metil sulfonilo al 0.01%) y congeladas -20°C hasta su uso. Del total del grupo de animales en cada grupo, 3 de estos fueron destinados al estudio de histología, para este fin los riñones fueron entonces colocados en una solución de ácido pícrico-paraformaldehído al 4% durante 48 h para su fijación.

7.2.4. Cuantificación de citocinas por ELISA

Con la intención de conocer la actividad inmunomoduladora de los compuestos activos probados en el modelo de hipertensión crónica, se determinó la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-6, 10 y TNF- α en los homogeneizados obtenidos de los riñones. La determinación se realizó por el método de ELISA bajo las instrucciones del fabricante (BD OptEIA™). Para lo cual se sensibilizaron las placas con anticuerpos de captura que reconocen las diferentes citocinas, se bloquearon las placas con PBS + 1% Suero Fetal Bovino (SFB) y se aplicó la muestra problema

a la que se le determinó la presencia de las diferentes citocinas. Se incubaron con los tiempos establecidos en el manual de cada citocinas y se aplicó el anticuerpo de detección que reconoce a cada citocina de estudio y que está acoplado a una peroxidasa, nuevamente se deja incubar, al finalizar este tiempo se agrega el sustrato TMB que reacciona colorimétricamente con la peroxidasa acoplada al anticuerpo, para luego ser analizadas a una longitud de onda λ 450 nm a 37 °C en un lector de ELISA marca Stat Fax 2100. Los resultados se compararon con una curva patrón de la misma citocina realizada al mismo tiempo. Los Kits de citocinas fueron adquiridos de la marca BD OptEIA™ (BD Biosciences).

7.2.5. Histología de riñón.

Los ratones que se destinaron para la histología también fueron perfundidos con PBS, se obtuvieron los riñones que se incluyeron en parafina y se les realizaron cortes de 7 micrómetros, que se tiñeron con hematoxilina – eosina. También se realizaron tinciones de tricrómica de Masson, las muestras se analizaron con un microscopio Nikon adaptado a un sistema digital de captura y análisis de imágenes con el software Metamorph 6.

7.2.6. Espectrometría por fluorescencia de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en riñones y aortas de ratones con hipertensión.

Para realizar esta prueba se obtuvieron, el cerebro, la aorta y ambos riñones los cuales fueron molidos con un homogeneizador de vidrio en una solución tampón HEPES helada, que contenía 25mM HEPES, 1 mM (EDTA) y 0.1 mM PMSF. Posteriormente cada muestra se centrifugó a 6,000 g por 5 min a 4°C, los sobrenadantes fueron recuperados para su evaluación.

La espectrometría de fluorescencia de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en los tejidos se realizó por medio de la técnica propuesta por Satoh *et al.* 2005. En la cual se produce una oxidación fluorescente del Dihidroetidio (DHE) a Etidio (Eth). Esta reacción de oxidación fluorogénica del DHE a Eth se empleó para la cuantificación de $O_2^{\cdot-}$ tisular, las muestras (20 μ g) se incubaron con DHE (0.02 mM), ADN de testa de salmón (0.5 mg/ml) y los sustratos correspondientes para NADH/NADPH oxidasa (NOX), en una placa *microtiter*, esta fue colocada en obscuridad a 37°C por 30 min.

La fluorescencia generada por el complejo Eth-ADN se midió a una longitud de onda de 480 nm (excitación) y a 610 nm (emisión) por medio de un lector de microplacas de fluorescencia multimodal (Synergy HT; Biotek). Se empleó NADH (0.1mM) como sustrato en la mezcla de reacción. Un blanco sin muestra se utilizó para la medición de la fluorescencia por si sola y su nivel de fluorescencia fue restado de todas las muestras. Para confirmar la actividad de NOX se examinó el efecto

del inhibidor de NOX, cloruro de difenileneiodonio (DPI; 0.1 mM), sobre la intensidad de fluorescencia. La señal fluorescente de cada muestra se expresó como fluorescencia de DHE relativa al control.

7.2.7. Contracción de músculo liso de anillos de aorta aislada.

Para este ensayo se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague – Dawley albinas de aproximadamente 250 – 280 g de peso (Harlan), las cuales fueron sacrificadas por decapitación, para aislar la aorta torácica, la cual fue limpiada quitándoles el tejido graso y conectivo y a todas las aortas se les denudó de células endoteliales, por medio de un raspado mecánico suave y finalmente se obtuvieron anillos de aproximadamente 4 -5 mm de ancho. Los anillos se amarraron a ganchos de acero inoxidable con hilos de seda y cada anillo fue inmerso en un baño para órganos con 10 mL de solución tampón Krebs a 37°C y se oxigenaron con (O₂/CO₂, 95:5). Se ajustaron los anillos a una tensión de 2 g. Se registraron los cambios en tensión basal en un equipo Biopac Systems TSD 125c, equipado con un *software AcqKnowledge*.

Se les administró KCl (120 mM) para determinar la contracción máxima de cada aorta preparada. Sesenta minutos después de estabilizar el tejido, los anillos fueron estimulados con diferentes concentraciones de AGII (desde 1.00×10^{-10} hasta 1.00×10^{-6} M) por 10 min, se lavaron los anillos para remover el agente estimulante y se llevaron a estabilidad nuevamente por 30 min. El tejido se pre-incubó con SeRHA (150 µg/mL,

300 $\mu\text{g/mL}$, and 600 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente por 10 min, al cabo de este tiempo se estimularon nuevamente con AGII. El efecto de relajación se determinó por comparación entre la contracción máxima vascular antes y después de poner las muestras.

Para determinar si el efecto de los extractos derivados de *S. edule* se debe en parte a un posible antagonismo de los canales de Ca^{++} , el ensayo consistió en la evaluación de una curva de la concentración del calcio, induciendo vasoconstricción con AGII a una concentración específica (1×10^{-6} M) y con la actividad de SeRHA (200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, and 800 $\mu\text{g/mL}$); nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio, se empleó como control positivo.

7.3. Análisis estadístico

El Análisis estadístico para todas las pruebas farmacológicas se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de $p < 0.05\%$ y con una posprueba de Tukey, para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a utilizar, el análisis de los resultados se realizó con el software SPSS 13.1.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos antihipertensivos de las raíces de *S. edule*.

El extracto SeRHA y SeAce y las fracciones más activas R14 y R17 se analizaron por el método de HPLC y HPLC-MSPDA; los compuestos en cada uno de las muestras presentaron diferentes espectros UV relacionados con flavonas ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) y con una mayor presencia derivados de ácido cinámico ($\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$). La extracción con acetona permitió obtener un extracto de polaridad intermedia.

La comparación cromatográfica del extracto de referencia SeRHA con SeAce, la cual fue leída a 340nm (específico para vitexina y otros flavonoides relacionados) (Figura 2 (a)), permitió observar la pérdida de este tipo de compuestos en SeAce. Así como también, los compuestos más polares que salieron con el frente del disolvente, al hacer la comparación de estos mismos a una longitud de onda diferente de 290 nm (Figura 2 (b)), se puede apreciar un incremento en la concentración de los picos correspondientes a los tiempos de retención de 7 a 18 min en los que sobresalen picos de compuestos derivados de ácidos cinámicos. Esto se corroboró con las fracciones R14 y R17. Estas dos se compararon con el mismo método cromatográfico a una λ 290 nm, apreciándose el incremento de los picos con tiempos de retención de 7.21 y 8.04 min. En ambas fracciones se presenta el mismo espectro de absorción para ambos tiempos de retención en el pico 1 y 2 de la Figura 2 (c) y 2 (d),

respectivamente. El análisis del extracto de referencia SeRHA y la fracción 14 por HPLC-PDA-MS permitieron establecer que el pico con el tiempo de retención de 10.8 min corresponde a un metil éster de ácido cinámico (Figura 3 (a)).

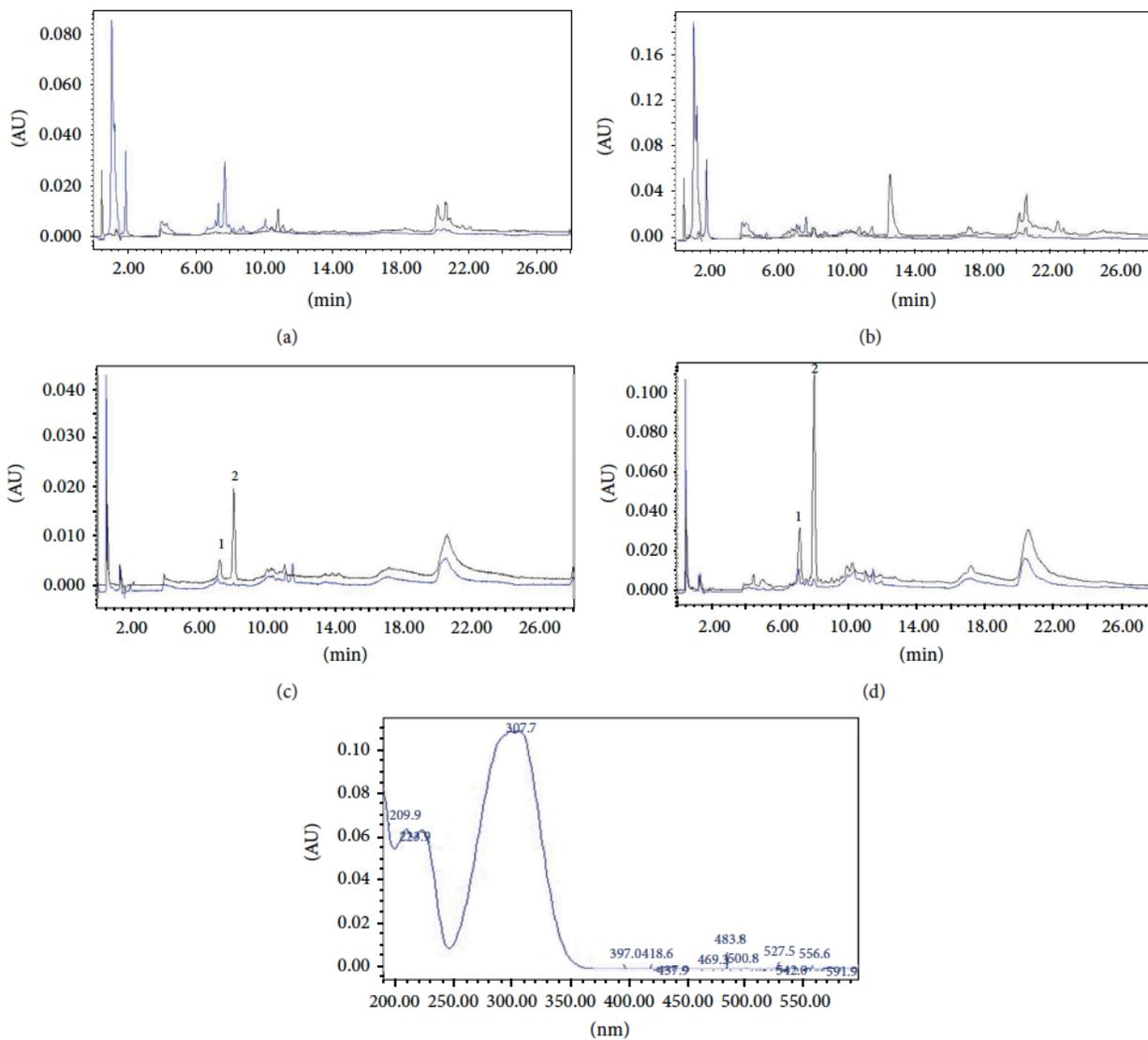


Figura 2. Cromatograma del extracto SeRHA (línea azul) comparado con SeAce (línea negra) **a)** 290 nm y **b)** 340 nm. En **c)** y **d)** se comparan las fracciones R14 (línea negra) y R17 (línea azul), a 340 nm y 290 nm respectivamente.

En este cromatograma se presentaron los picos 1 y 2 con tiempos de retención de 7.21 y 8.04 min. Donde el pico 2 correspondió al metil éster del ácido cinámico encontrado en el análisis de HPLC-PDA-MS representado por el pico 4 en la Figura 3 (a) y en la figura 3 (b) al pico 160.3 [M-2]⁺.

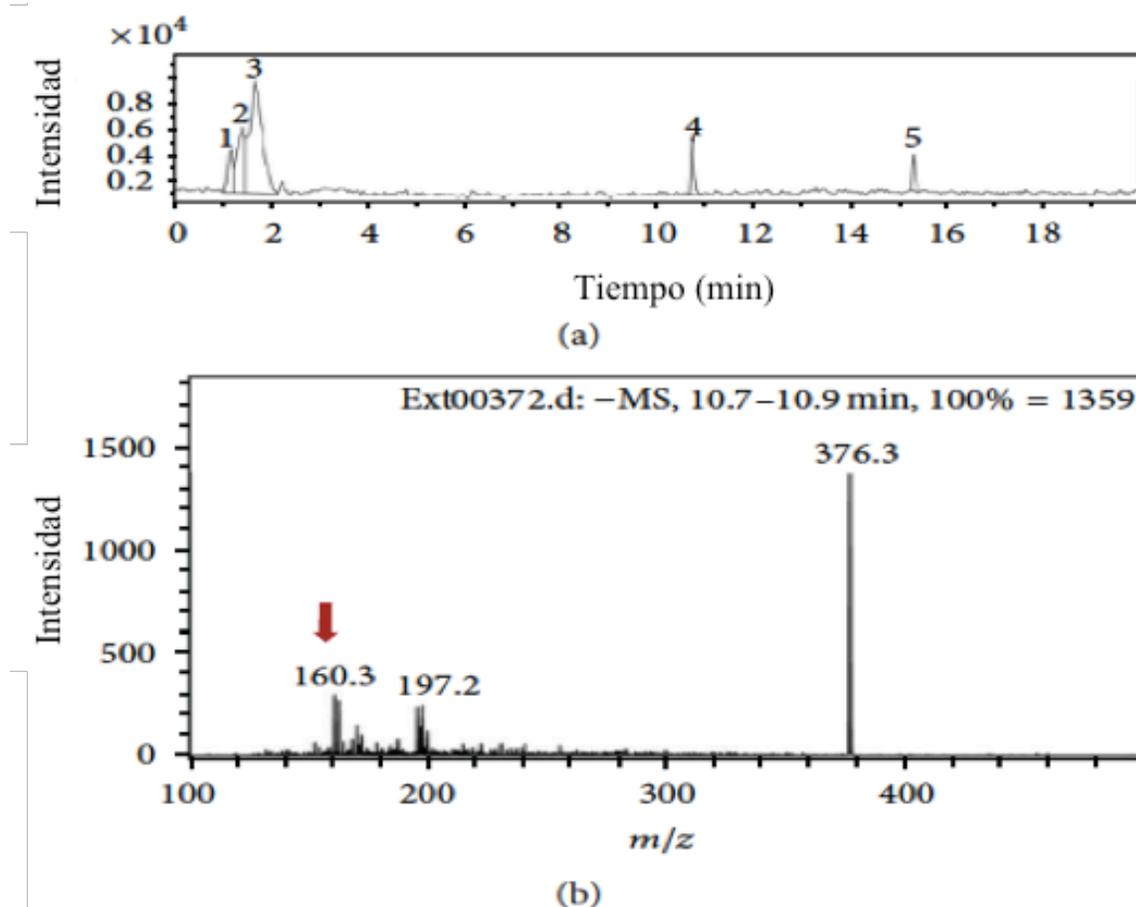


Figura 3. Cromatograma de masas de la fracción R14 (a) y su espectro de absorción de masas (b).

La Figura 4 es el cromatograma de la comparación del extracto SeAce con el estándar de ácido cinámico leído a $\lambda = 280$ nm, donde se aprecia que el extracto SeAce presenta como compuesto mayoritario al

ácido cinámico con un tiempo de retención de 13.8 min., el espectro de absorción del pico presente en el extracto SeAce es correspondiente con el del estándar de ácido cinámico.

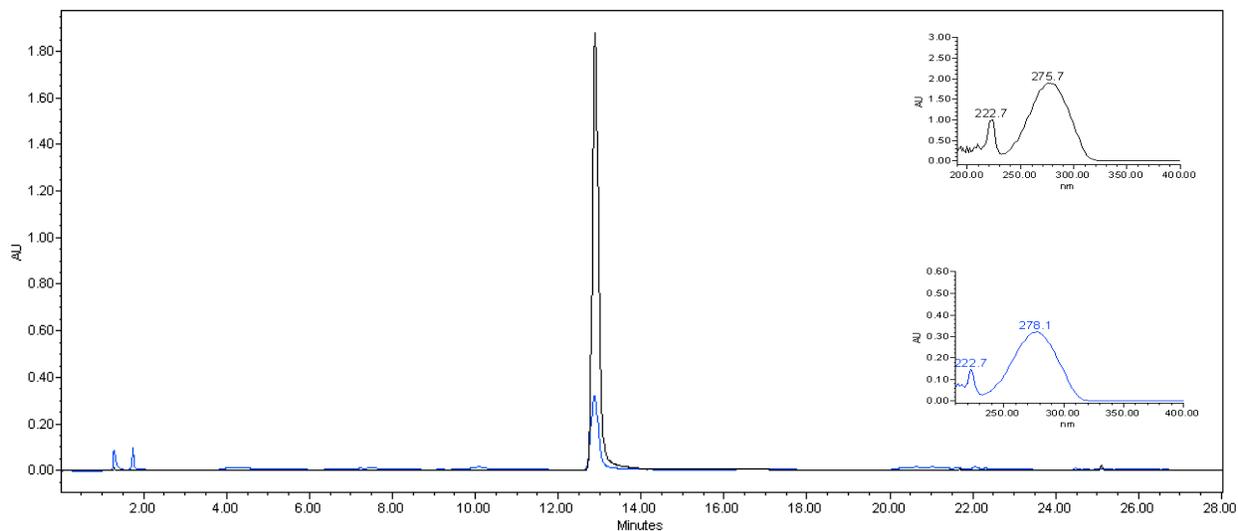
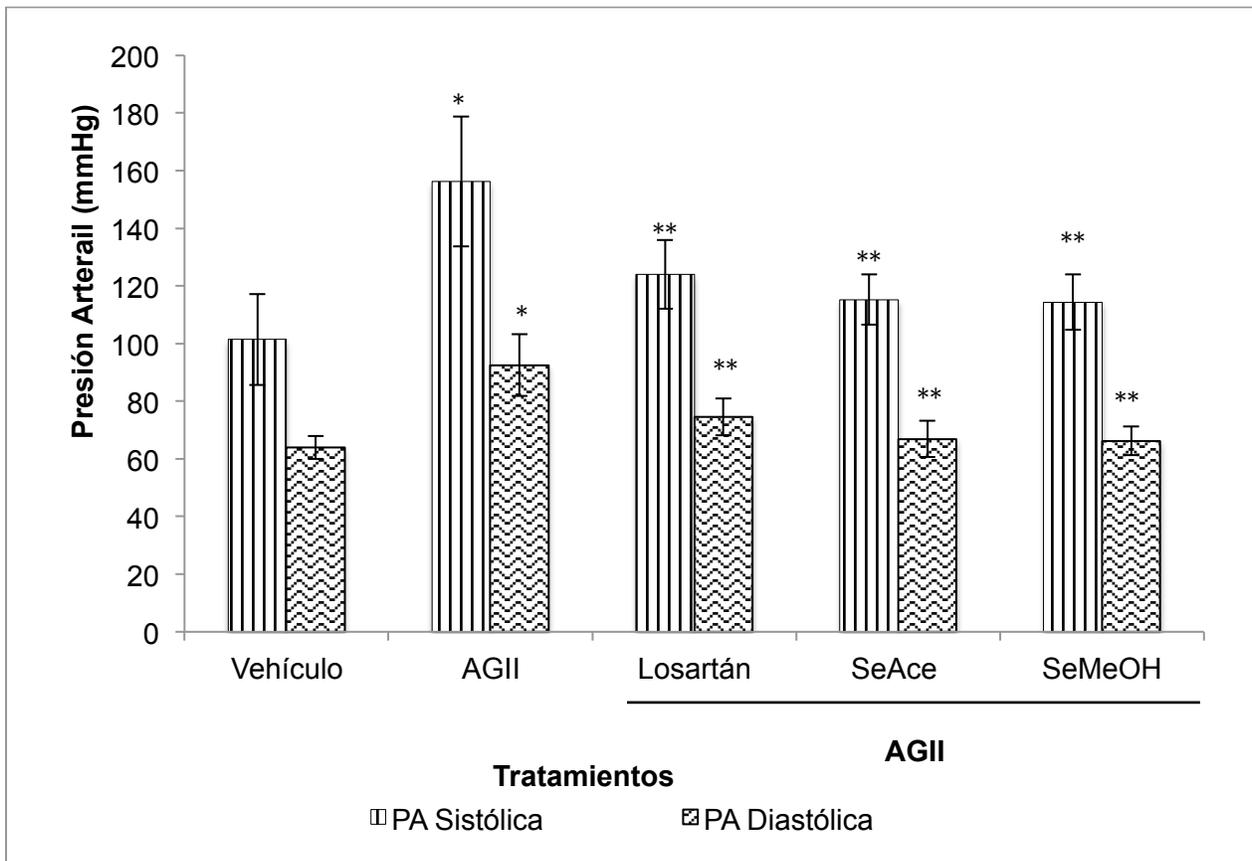


Figura 4. Cromatograma del extracto SeAce (línea azul) comparado con un estándar de ácido cinámico (línea negra); $\lambda = 280$ nm. Así mismo los espectros de absorción correspondientes.

8.2. Modelo de hipertensión crónica inducido con AGII en ratones ICR

En la gráfica 1, se presentan los resultados correspondientes al modelo de hipertensión crónica inducido con AGII. Se aprecia que el grupo basal (Vehículo) presenta en promedio una PA de 100/64 mmHg, donde el grupo control negativo (AGII) presenta un incremento estadísticamente significativo de la PA de 156/92 mmHg. Este incremento establece claramente una alteración fisiopatológica de hipertensión en el grupo AGII tras 10 semanas de la administración de este agonista.

En los grupos de animales que además de AGII (0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), recibieron o Losartán, o SeAce o SeMeOH, presentaron una disminución significativa de la PA, en donde el fármaco antagonista de AT1 mantiene una presión de 120/75 mmHg, el SeAce 115/67 mmHg y por último el SeMeOH de 114/66 mmHg. Estos resultados nos sugieren que los extractos presentan un efecto antihipertensivo al igual que Losartán, ya que logran controlar la PA aun bajo la administración sub-efectiva de AGII.



Gráfica 1. Presión arterial sistólica y diastólica en mmHg, de los diferentes tratamientos en el modelo de HAS crónica inducida por la administración de AGII (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) los valores se expresan como la Media \pm DE. ANOVA post hoc de Tukey $n=10$. * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.

Este ensayo fue necesario para establecer el funcionamiento del modelo basado en lo propuesto por Goldblatt *et al* (1933). En la cual se propone una administración sub-efectiva del agonista AGII por vía *i.p.* por un periodo de 10 semanas, al contrario del modelo de Goldblatt que propone una intervención quirúrgica donde se hace una constricción a las arterias renales por medio de prensar ligeramente ésta con una pinza, así generando un estado de isquemia renal bilateral.

8.3. Cuantificación citocinas por ELISA en riñón

En este ensayo se presentan los resultados correspondientes a la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias. Este estudio se realizó a partir de los animales de experimentación con hipertensión crónica establecida después de un periodo de 10 semanas de tratamiento con AGII (0.1 µg/Kg), al término de las 10 semanas los animales fueron puestos bajo anestesia quirúrgica y se les midió la PA. Posteriormente se perfundieron con PBS para eliminar cualquier residuo de sangre en los órganos; tras la perfusión se obtuvieron los riñones. Este órgano en particular es altamente vascularizado y tiene una participación importante en las alteraciones provocadas por la hipertensión crónica, algunas de las alteraciones que provoca esta enfermedad sobre los riñones es un proceso inflamatorio crónico, que conduce a una alteración del sistema renal en general. Las gráficas correspondientes a la cuantificación de citocinas que están presentadas como índices de detección, por lo que

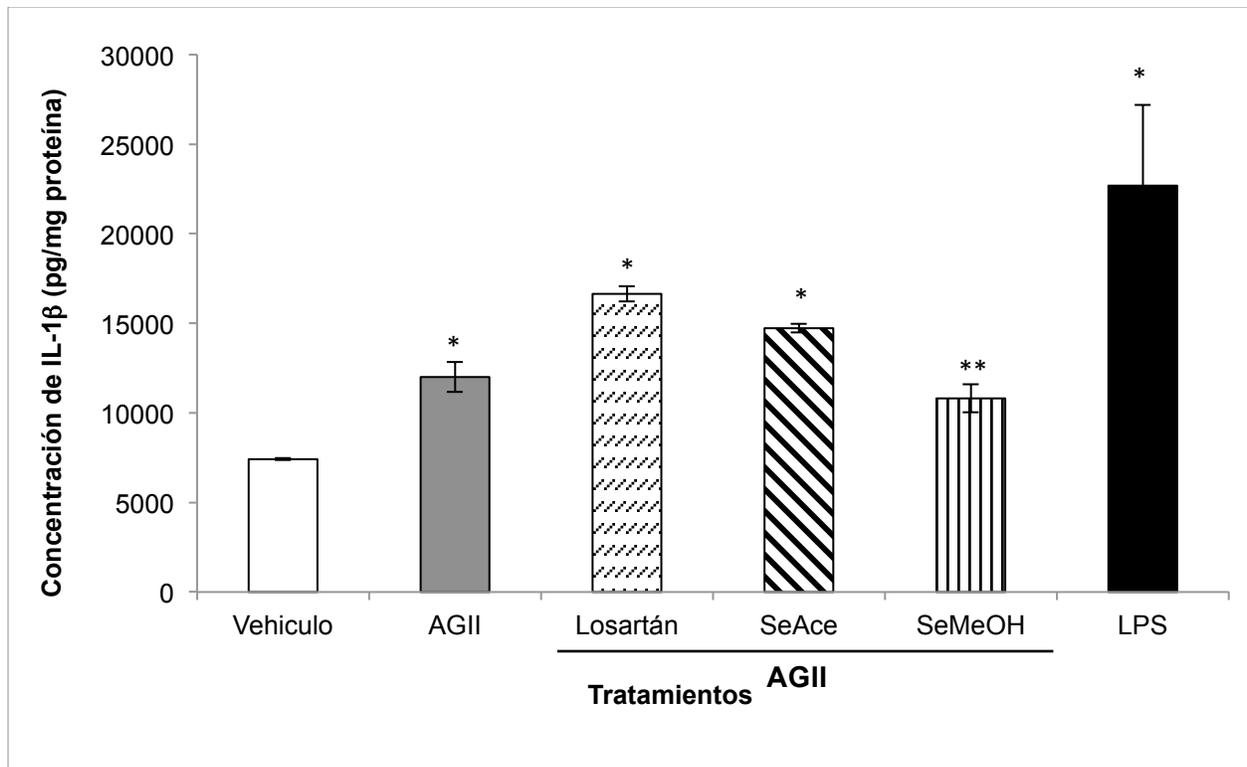
los valores correspondientes al grupo vehículo se representan con el valor de uno y los valores del resto de los tratamientos evaluados y, corresponde a cuantas veces por encima del vehículo incrementaron la cantidad de las citocinas. Se usó un grupo como control negativo el cual fue administrado con LPS, que son fragmentos provenientes de pared celular bacteriana que activa el estado pro-inflamatorio en los animales.

En las Gráficas 2 a 5 se presentan los resultados de la cuantificación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, respectivamente, así como en el cuadro 2. En las cuales el grupo AGII incrementó en cada una de ellas su concentración, indicando que AGII tras 10 semanas de ser administrado, logra establecer un estado pro-inflamatorio. Por otro lado, el grupo que fue tratado con Losartán incrementó la concentración de todas las citocinas con respecto a el grupo de AGII, indicando que este medicamento no controla el estado pro-inflamatorio que se desencadena por otras vías que no dependen de los receptores AT1 de AGII y como bien se ha mencionado AGII no sólo actúa por medio de este receptor sino por la activación de NOX y otras enzimas transmembranales que producen ROS tal como O₂^{•-} y ONOO⁻ que promueven la producción de PG y TX, que a su vez promueven el estado pro-inflamatorio vascular.

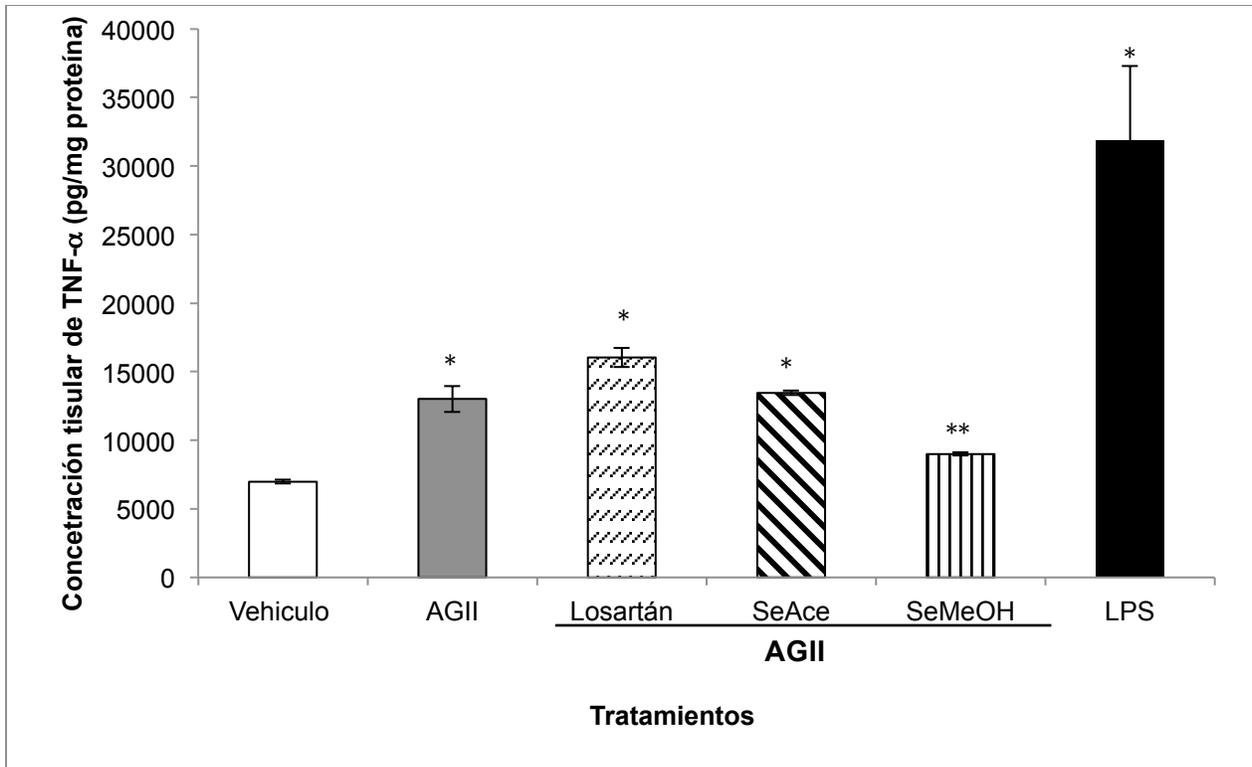
Cuadro 2. Índices de detección de citocinas en riñón por el método de ELISA

Tx	IL-1β	DE	TNF-α	DE	IL-6	DE	IL-10	DE
Vehículo	1	$\pm 1,2E-05$	1	$\pm 1,3E-05$	1	$\pm 2,8E-06$	1	$\pm 7,8E-05$
AGII	1,62*	$\pm 0,30$	1,87*	$\pm 0,32$	1,60*	$\pm 0,19$	1,39*	$\pm 0,26$
Losartán	2,24**	$\pm 0,22$	2,30**	$\pm 0,30$	1,83	$\pm 0,22$	1,91**	$\pm 0,12$
SeAce	1,99	$\pm 0,12$	1,93	$\pm 0,05$	1,63	$\pm 0,27$	1,49	$\pm 0,47$
SeMeOH	1,46	$\pm 0,23$	1,29**	$\pm 0,00$	1,24**	$\pm 0,10$	1,14**	$\pm 0,18$
LPS	3,06**	$\pm 1,29$	4,57**	$\pm 1,14$	1,59	$\pm 0,44$	2,64**	$\pm 0,95$

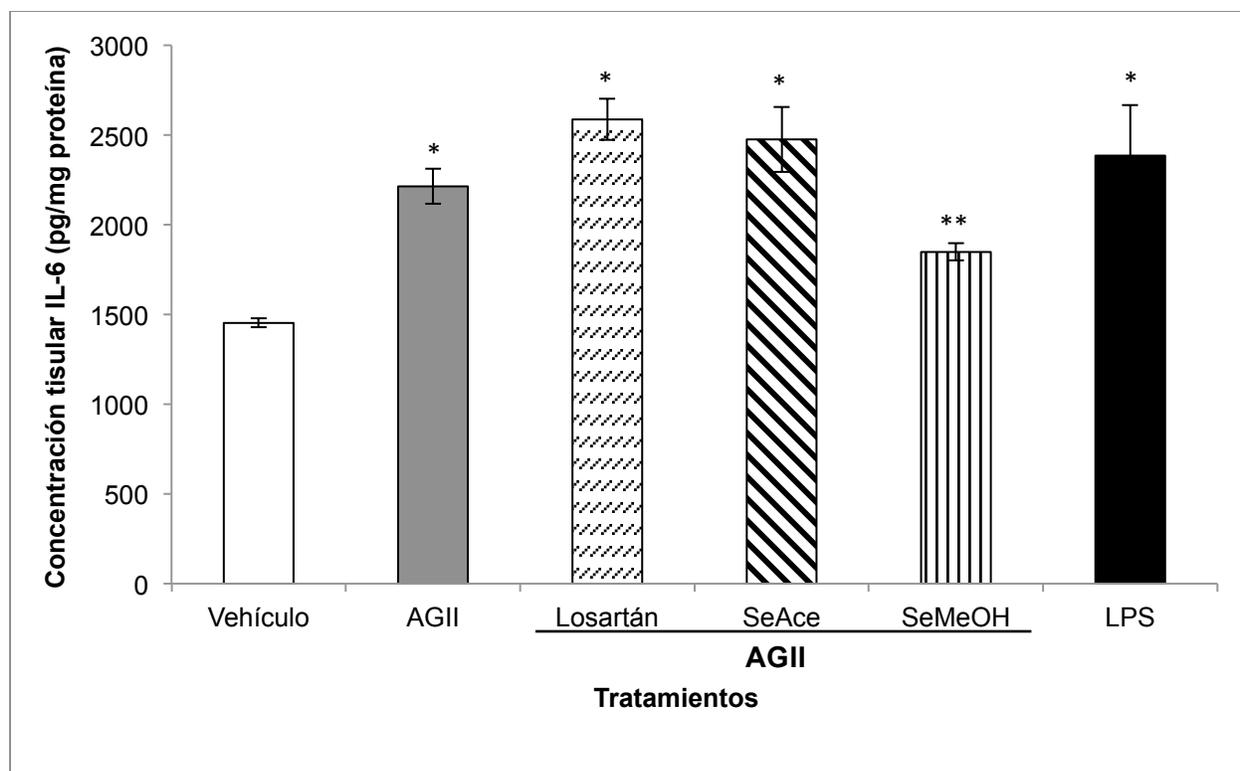
Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Vehículo. ** Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de AGII.



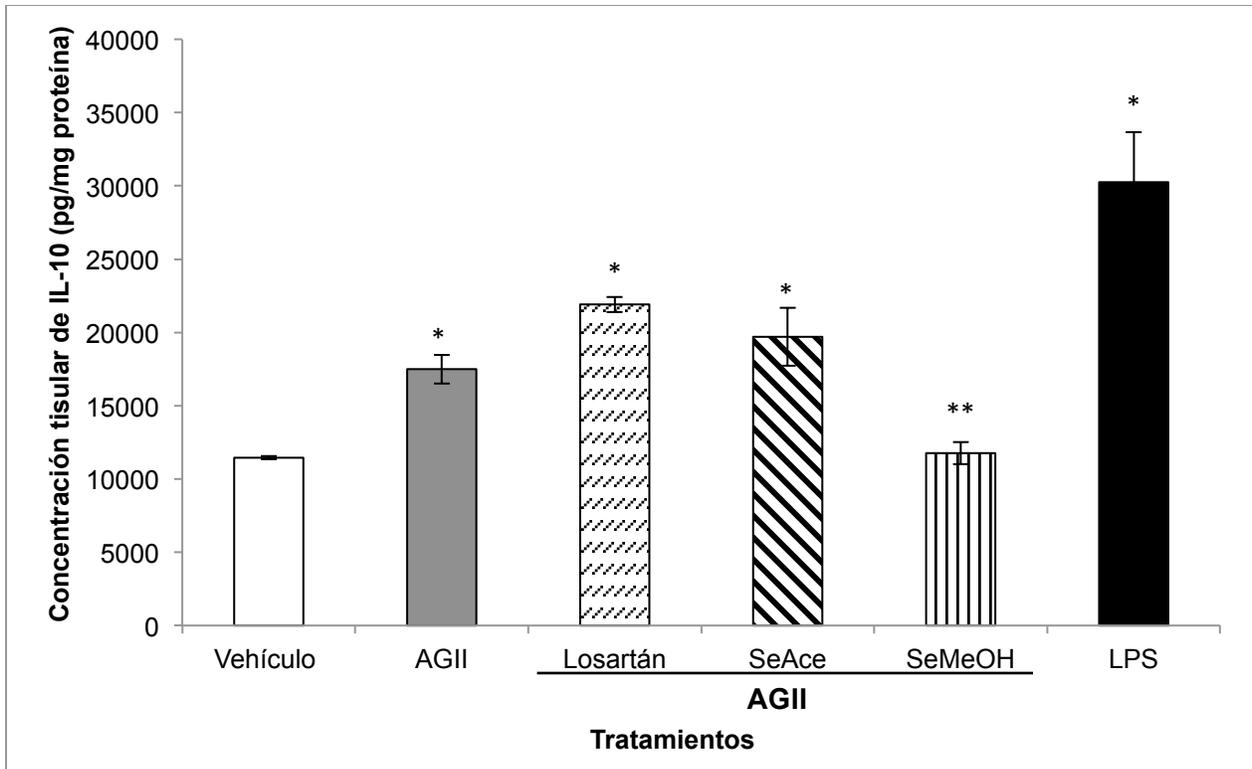
Gráfica 2. Determinación de la concentración tisular de IL-1 β en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.



Gráfica 3. Determinación de la concentración tisular de TNF- α en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.



Gráfica 4. Determinación de la concentración tisular de IL-6 en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII



Gráfica 5. Determinación de la concentración tisular de IL-10 en riñones de ratones con hipertensión arterial crónica. Se realizó una prueba de y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de * $p < 0.05$ con respecto al grupo Vehículo. ** $p < 0.05$ con respecto al grupo AGII.

*

8.4. Histopatología.

En las figuras 4 a 8 se presentan microfotografías de cortes de riñones obtenidos a partir de los animales con los diferentes tratamientos, a los riñones se les realizaron cortes de 7 micras que fueron teñidos con Hematoxilina – eosina (H-E). La H-E es una de las técnicas de tinción más empleada en la histología, la Hematoxilina tiñe de color morado oscuro y que actúa como una tinción básica (basofílica), la eosina a su vez tiñe de color rosa a rojo y funciona como una tinción ácida (acidofílica). La hematoxilina reacciona específicamente con los ácidos nucleicos (ADN y ARN), la eosina reacciona con proteínas del citoplasma y con una variedad de estructuras extracelulares. Dependiendo de los niveles de acidez o basicidad es la intensidad de tinción que llegan a tener los cortes histológicos (Leslie *et al*, 2001)

Estas microfotografías fueron tomadas de la zona de la corteza renal donde se encuentran los glomérulos y que esta altamente vascularizada ya que estas estructuras renales son las encargadas de filtrar los desechos del organismo para ser excretados en la orina. Por lo que, se realizó la histología para poder identificar si la administración crónica de AGII alteraba la integridad de este órgano como consecuencia subsecuente a las alteraciones provocadas por el estrés oxidante e inflamación causada por la DE.

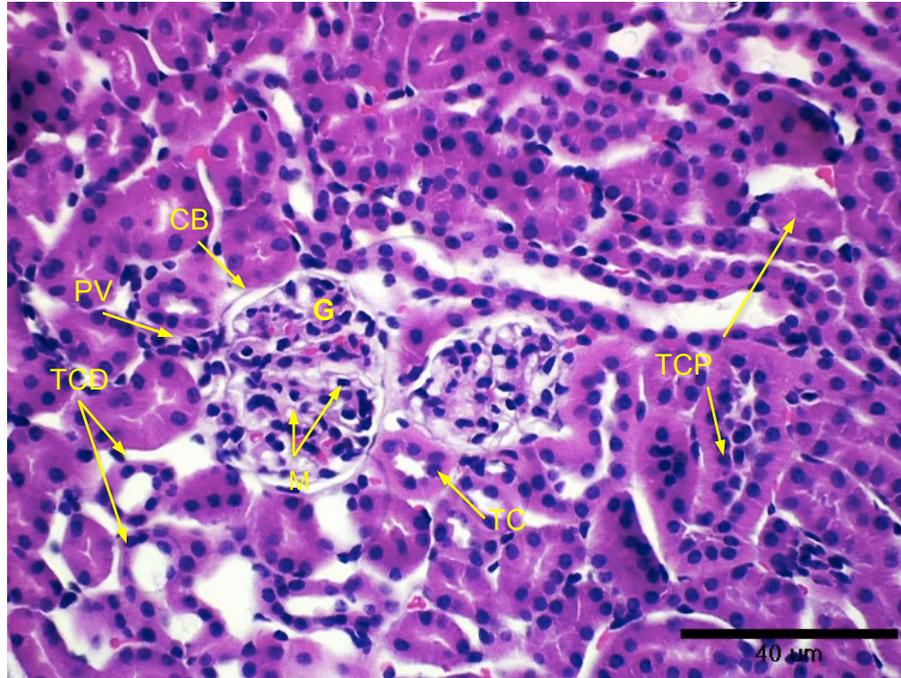


Figura 5. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo vehículo teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); células mesangiales (M); polo vascular (PV).

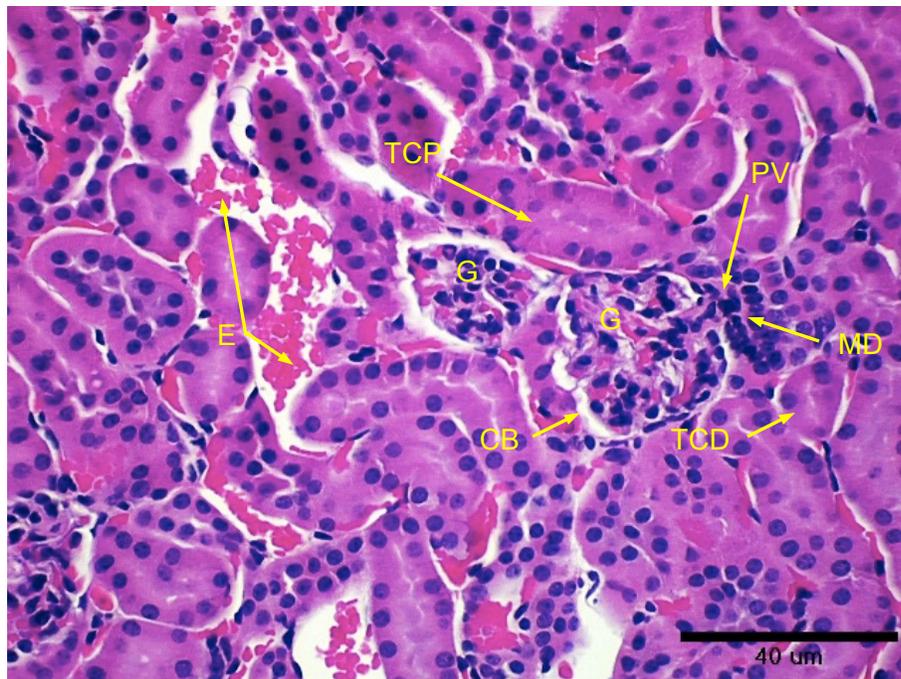


Figura 6. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo AGII teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); polo vascular (PV); eritrocitos (E).

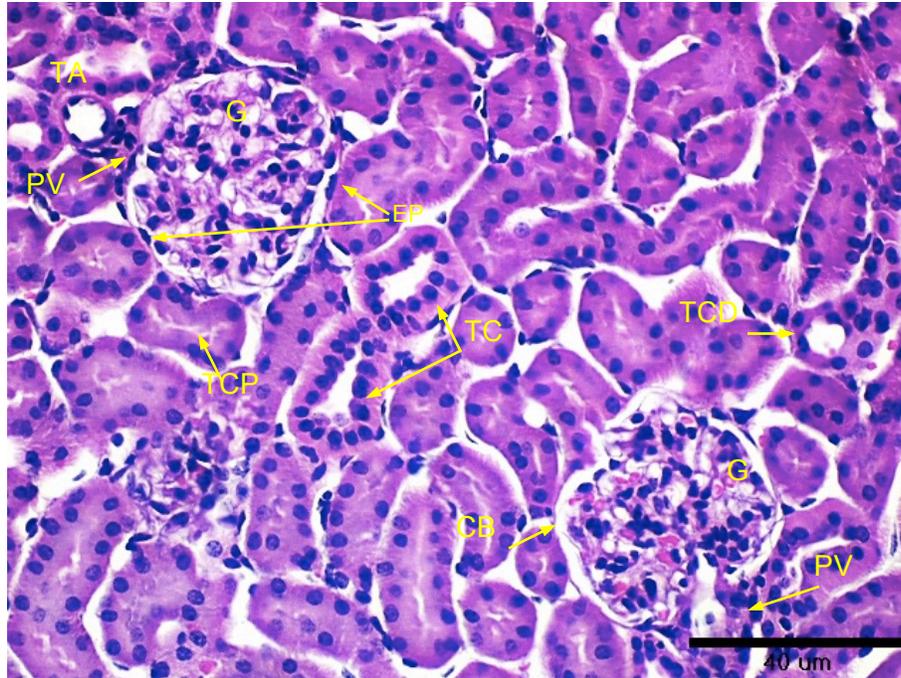


Figura 7. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Losartán teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); células del epitelio parietal (EP); polo vascular (PV).

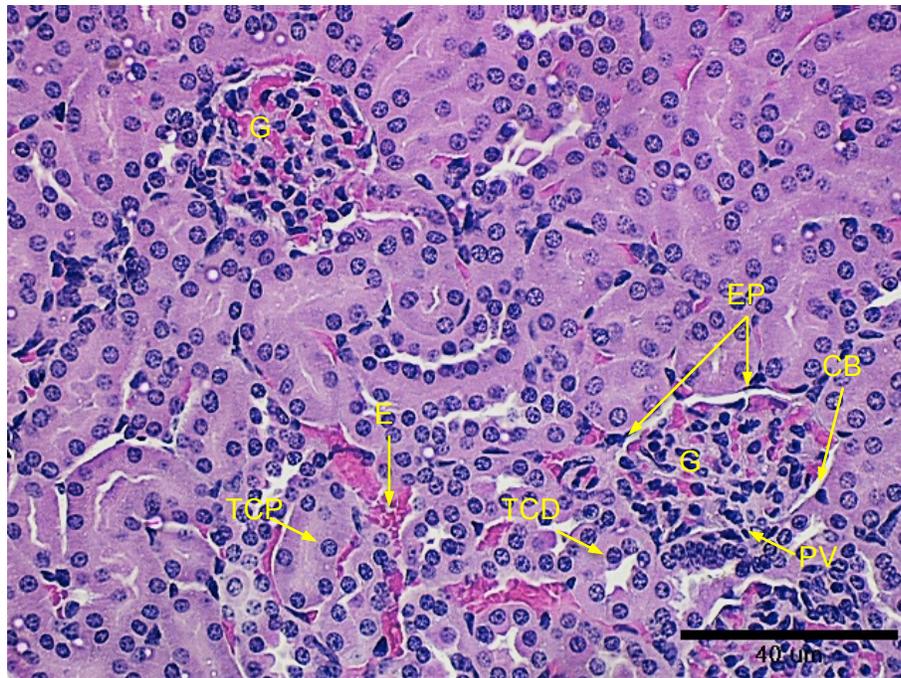


Figura 8. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeAce teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); cápsula de Bowman (CB); polo vascular (PV); eritrocitos (E) .

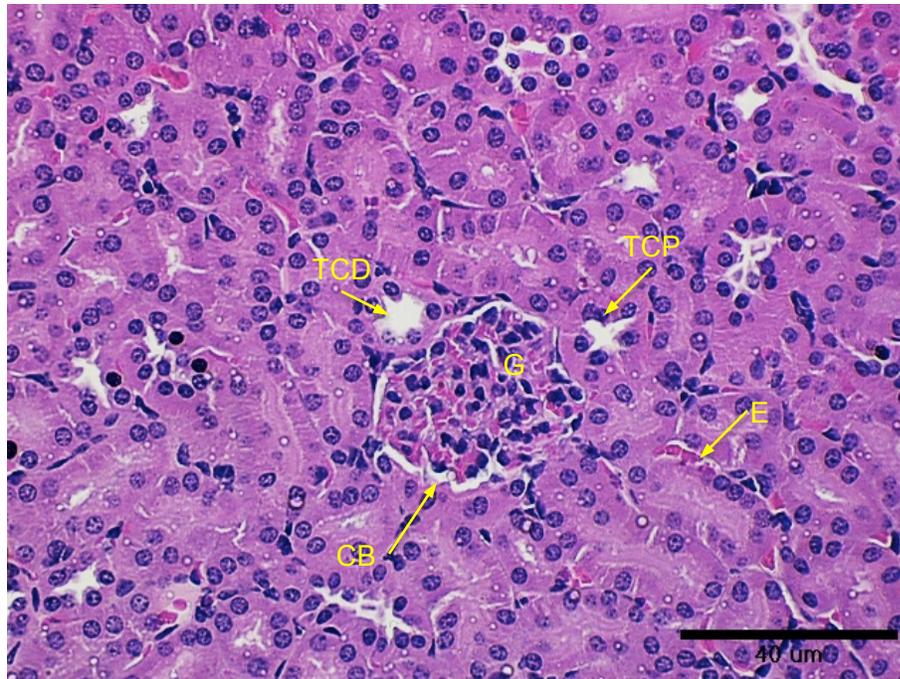


Figura 9. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeMeOH teñida con Hematoxilina Eosina, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulo contorneado proximal (TCP); Túbulo contorneado distal (TCD); cápsula de Bowman (CB); eritrocitos (E).

En las Figuras 9 a 13 se muestran las histologías correspondientes a la técnica de tinción de Tricrómica de Masson que diferencia al tejido conectivo del tejido muscular, en este caso la tinción que se genera es de color azul oscuro para los núcleos, de color rojo el tejido muscular, la queratina así como el citoplasma y de color azul claro el colágeno y el mucínogeno.

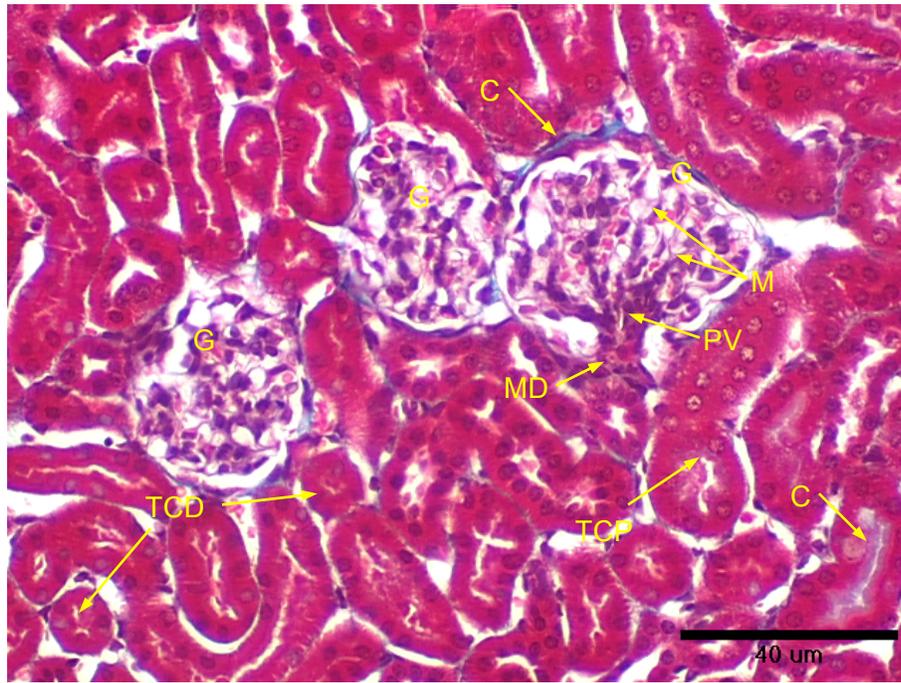


Figura 10. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Vehículo teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); células mesangiales (M); fibras de colágeno (C).

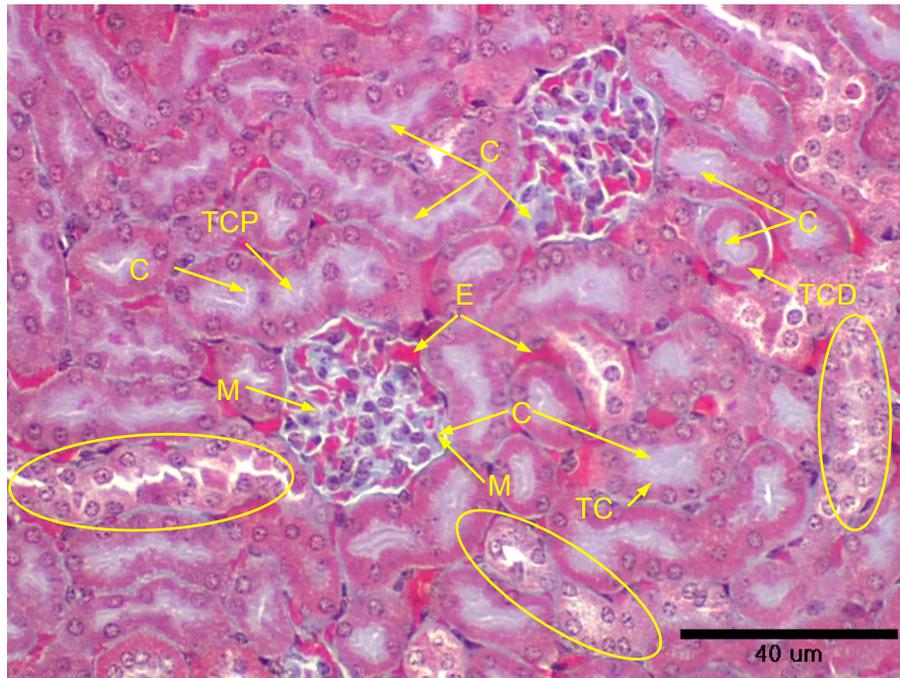


Figura 11. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo AGII teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); células mesangiales (M); colágeno (C). Óvalos amarillos indican pérdida de la estructura debido a que los contornos de las células se vuelven difusos y se aprecia depósitos de materia cicatricial como colágeno.

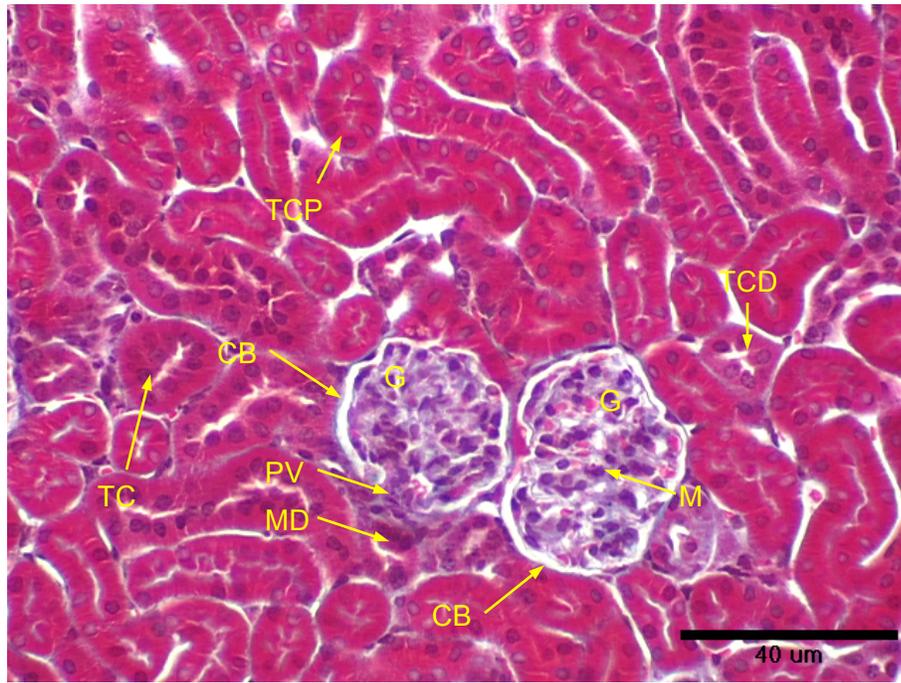


Figura 12. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo Losartán teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); polo vascular (PV); células mesangiales (M).

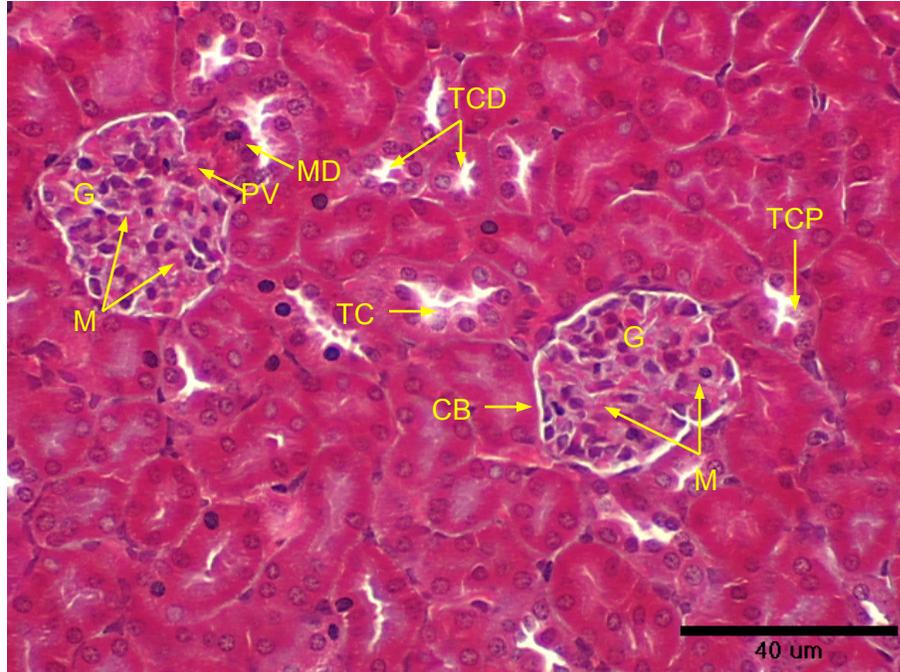


Figura 13. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeAce teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); polo vascular (PV); células mesangiales (M).

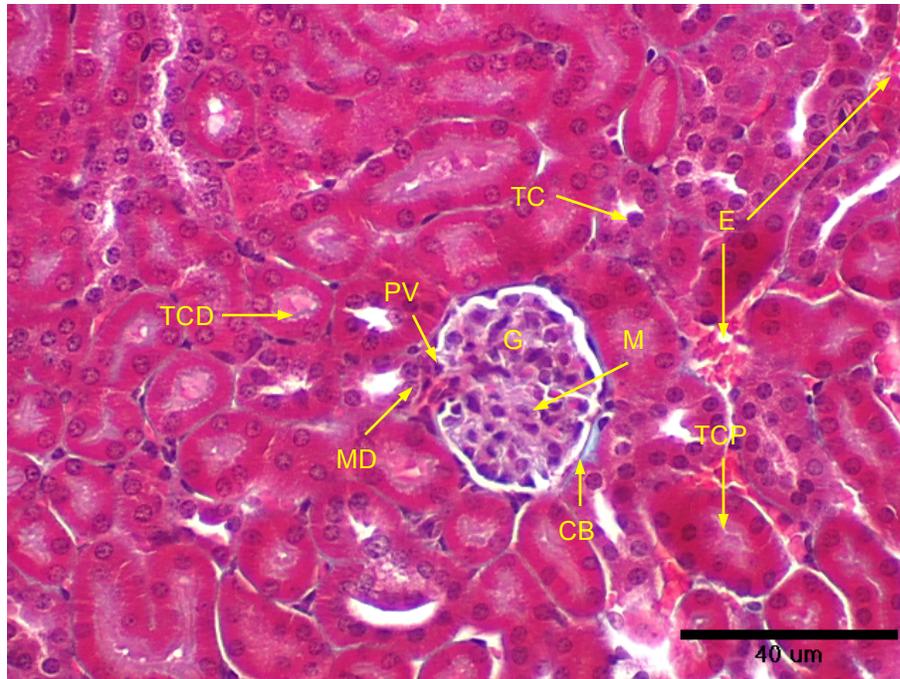


Figura 14. Micrografía 40X de la corteza renal del grupo SeMeOH teñida con Tricrómica de Masson, donde se aprecian: el glomérulo (G); Túbulos contorneados proximales (TCP); Túbulos contorneados distales (TCD); Túbulos colectores (TC); cápsula de Bowman (CB); mácula densa (MD); polo vascular (PV); células mesangiales (M)

8.5. Ensayos en aorta aislada de rata

En la Gráfica 6 se muestra el comportamiento de aorta aislada de rata sin células endoteliales, bajo dos condiciones de estimulación de la contracción del músculo liso vascular. Se reporta la contracción resultante, respecto a la contracción máxima generada por la administración de KCl. En esta gráfica se observa la contracción dependiente de la concentración de AGII (círculos sólidos), en la que se estableció un $E_{max} = 98\%$ y una $EC_{50} = 8.5 \times 10^{-9} M$, así como el efecto de diferentes concentraciones del extracto SeHA, que presentaron una disminución significativa en el valor de E_{max} . Los diamantes representan

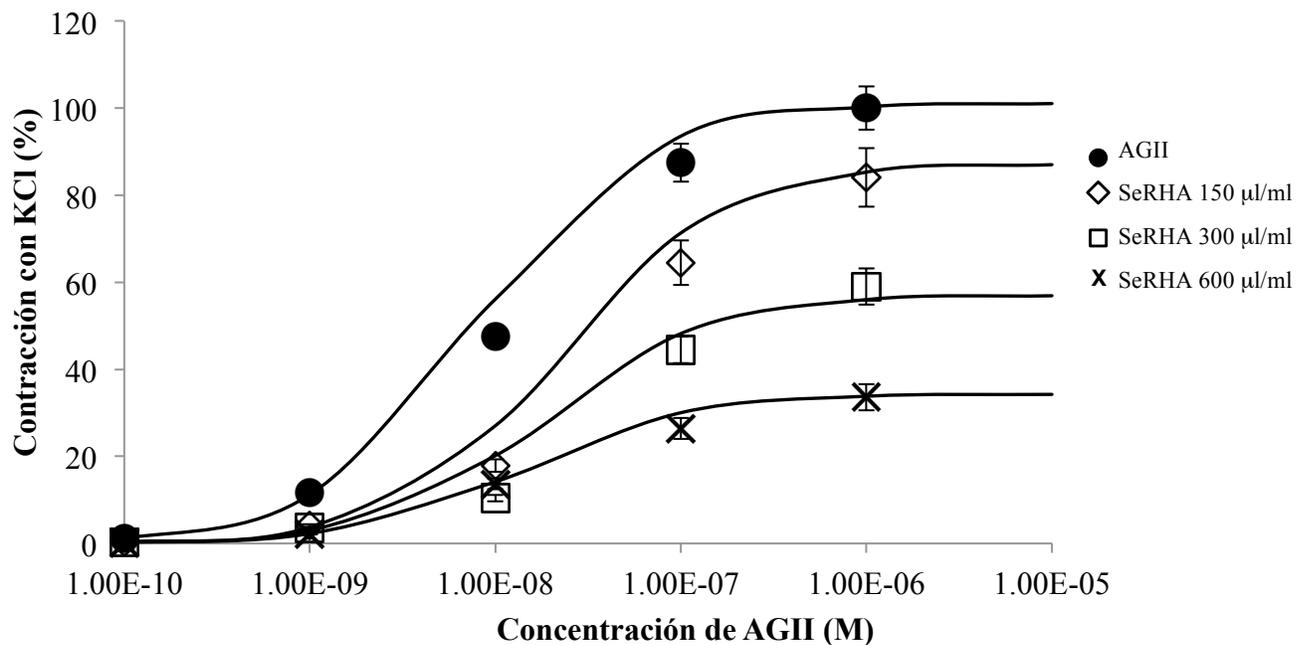
a la concentración de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ de SeHA con una disminución de 20% con respecto a la contracción obtenida con AGII sola.

En los cuadros vacíos se presentó el comportamiento de los anillos de aorta con 0.30 $\mu\text{g/ml}$ del SeRHA, la disminución de E_{max} fue de 50% con respecto a la AGII sola. La concentración máxima de SeRHA (0.60 $\mu\text{g/ml}$), provocó una disminución de la contracción de alrededor de 70%. Los valores de EC_{50} que se obtuvieron fueron de alrededor de 1.5×10^{-8} M de AGII, para las tres concentraciones de extracto.

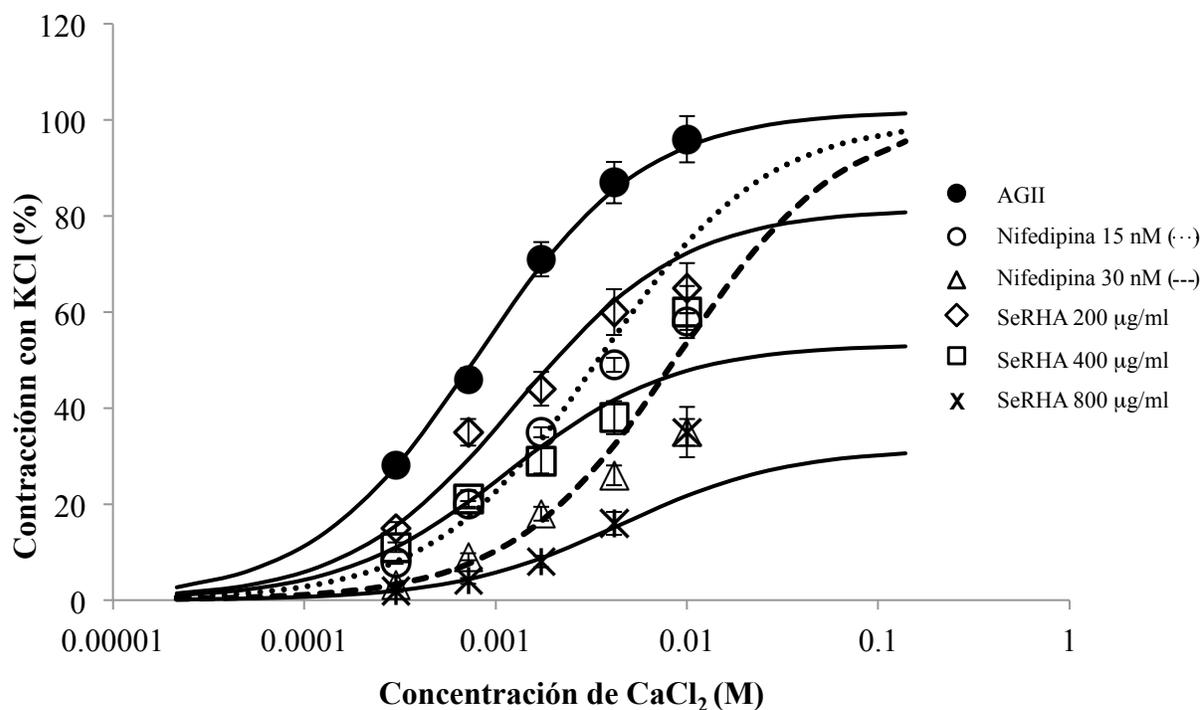
En la gráfica 7, se aprecia el comportamiento de los anillos de aorta sin CE, en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{++} y una concentración constante de AGII utilizada como agente desencadenante de la contracción del musculo liso vascular. La contracción mostró un comportamiento contráctil dependiente de la concentración Ca^{++} . El valor para AGII presentó una $E_{\text{max}} = 95 -98 \%$ y $EC_{50} = 0.0008$ M (círculos sólidos). Al momento de la administración de las diferentes concentraciones de SeRHA + AGII se presentó una disminución estadísticamente significativa de los valores de E_{max} , para SeRHA de 200 $\mu\text{g/ml}$ (diamante vacío) la disminución fue de 20-25% con respecto a la contracción obtenida con AGII sola y una CE_{50} de 0.001 M. Con SeRHA 400 $\mu\text{g/ml}$ (cuadro vacío) la disminución de E_{max} fue del 50% con respecto a la curva de AGII y su CE_{50} de 0.001 M. El efecto máximo fue de SeRHA 800 $\mu\text{g/ml}$ (cruces), provocando la disminución de la

contracción de alrededor del 80% y los valores de EC_{50} que se obtuvieron fueron de 0.003 M de Ca^{++} .

Estos resultados nos dirigen a proponer que el posible modo de acción está directamente relacionado con la modulación de la actividad del Ca^{++} , como el encargado de provocar la vaso constricción posterior a la administración de AGII, ya sea bloqueando canales de Ca^{++} , impidiendo que el Ca^{++} entre a la célula, o por el bloqueo de la interacción calcio-calmodulina.



Gráfica 6. Porcentaje de contracción del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata aislada estimuladas con concentraciones crecientes de AGII, con respecto al efecto máximo obtenido con KCl. Así como la evaluación del efecto vasorrelajante del extracto SeRHA estimulado con AGII. Se utilizó nifedipina como control positivo ya que es un bloqueador de los canales de calcio. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$, con una $n = 10$ animales

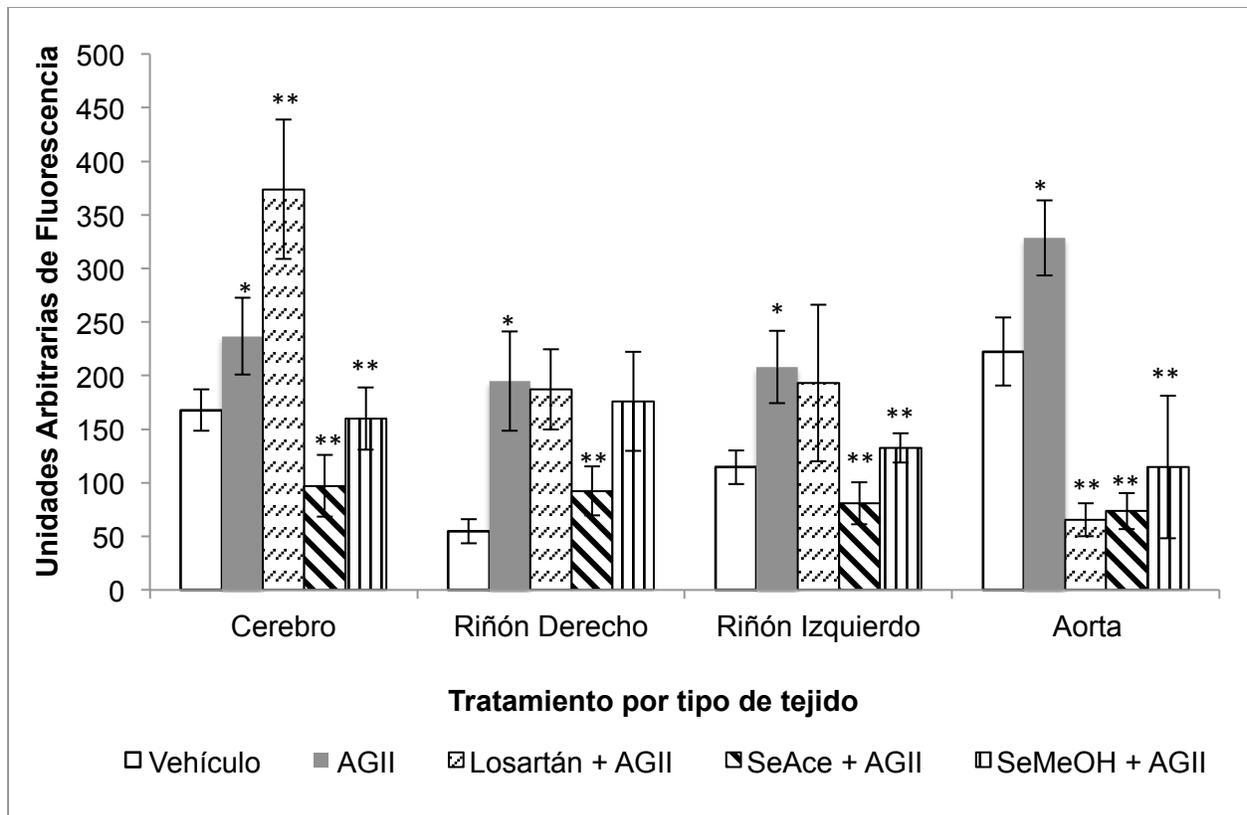


Gráfica 7. Porcentaje de la contracción del músculo liso vascular de anillos de aorta de rata estimulados con AGII, en presencia de concentraciones crecientes de CaCl_2 con respecto al efecto máximo obtenido con KCl. Así como el efecto modulador del extracto SeRHA sobre la contracción. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$, con una $n = 10$ animales.

8.6. Cuantificación de los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en cerebro, riñones y aortas de ratones con hipertensión arterial.

En la gráfica 8 se observa que la concentración del anión superóxido fue menor en el grupo basal (Vehículo) en todos los órganos muestreados. Siendo ambos riñones los que mostraron el menor nivel, en contraste de la aorta. Mostrando una diferencia en el comportamiento de la microvasculatura, vista en el primer caso respecto a la vasculatura mayor. El grupo de daño, que corresponde al tratamiento con AGII, fue

aorta la que mostró la mayor nivel de $O_2^{\cdot-}$, respecto a los riñones y el cerebro; en estos últimos el nivel de $O_2^{\cdot-}$ no mostró diferencia significativas entre ellos. Es destacable el hecho de que el tratamiento con Losartán no mostró capacidad de disminuir el nivel de $O_2^{\cdot-}$ en todos los órganos al comparar contra el control negativo, exceptuado el caso de la aorta, en donde si hubo una disminución importante. Además el caso del nivel de $O_2^{\cdot-}$ en cerebro fue mucho mayor cuando se administró losartán, es probable que los productos de biotransformación de este fármaco sea capaces de aumentar el estrés oxidante en este órgano. En el caso de los grupos tratados con los extractos de *S. edule*, se pudo observar que hubo una disminución significativa en el nivel de $O_2^{\cdot-}$, comparado contra el control negativo y el control positivo a excepción de lo observado en la aorta. Es noble que el extracto de acetona fue mas efectivo en el control del nivel de $O_2^{\cdot-}$ en todos los órganos comparado con el extracto de metanol.



Gráfica 8. Resultados de anión superóxido por fluorometría con DHE. Se realizó una prueba de ANOVA y una post prueba de Tukey con una diferencia de medias \pm DE con significancia de $p < 0.05$. (*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Vehículo. (**) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo AGII

9. DISCUSIÓN

La Hipertensión Arterial Sistémica es un padecimiento crónico degenerativo que por su etiología se ha considerado que es idiopática o secundaria a un padecimiento subyacente, tal es el ejemplo de la Diabetes Mellitus tipo 2. En donde podemos suponer que la Disfunción Endotelial es la alteración de la cual se origina la HAS. De tal forma que los padecimientos crónico degenerativos como DM2 y dislipidemia derivada de obesidad provocan HAS por la alteraciones que llevan a la DE (Paravicini *et al.*, 2008). Por ello también, que al ser la DE el origen de este tipo de HAS, se puede inferir que no se revertirá con sólo controlar la HAS.

Los mecanismos por los cuales se puede llegar a controlar o revertir la DE asociada a la HAS es por medio de la modulación del estrés oxidante así como del proceso pro-inflamatorio derivado de esta alteración (Li, 2013). Por lo que en este trabajo proponemos un modelo de HAS crónica basado en la primicia del modelo propuesto por Goldblatt (Goldblatt,1934); el cual constó de provocar una leve constricción de la arteria renal con una pinza o abrazadera ajustable para inducir un cuadro de isquemia renal, provocando la sobre-estimulación de RAAS, culminando en la producción exacerbada de AGII. Por lo que en una primer propuesta se administró por vía *i.v.* AGII, para generar la HAS de modo agudo (Lombardo, 2008). Lo anterior se basa en que se ha observado que la administración aguda de AGII provoca un incremento

transitorio de las cifras de presión arterial de entre un 25 y 35%, por un periodo de tiempo de hasta 300 segundos, estableciendo así el modelo agudo de HAS. En este trabajo, se diseñó un esquema de administración crónico de AGII, utilizando dosis sub-efectivas que no provocaran HAS inicialmente, pero que debido a su cronicidad se acumularan los daños que provocaron HAS crónica. Como se pudo comprobar a lo largo de los ensayos de este trabajo, el origen de la HAS fue por el proceso inflamatorio y oxidante provocado por la administración sub-efectiva de AGII, más que la vasoconstricción mediada por la estimulación de los receptores AT_1 de la células de músculo liso vascular, este efecto lo vemos claramente en el ensayo de HAS crónica mostrada en la Gráfica 1. Donde se presentan los resultados correspondientes a la administración sub-efectiva crónica de AGII, en la cual el grupo vehículo tras diez semanas de administración *i.p.* de SSI mantienen valores normales de PA de 100/62 mmHg (The Jackson Laboratory, 2014). Sin embargo, el grupo tratado solo con AGII presentó un incremento estadísticamente significativo con respecto al vehículo con una PA de 156/92 mmHg, indicando que el tratamiento de administración de dosis sub-efectivas de AGII *i.p.* de manera crónica logra el objetivo de provocar HAS. El grupo coadministrado con Losartán + AGII, mostró una modulación de la PA a la baja con una PA de 124/75 mmHg que corresponde a un 22% y 17% respectivamente, que es estadísticamente significativa con respecto al grupo AGII, esto es consistente con la actividad antagonista de los rAT_1

(PLM, 2014), controlando así la hipertensión provocada por la administración crónica de AGII en contraste al grupo control negativo. Sin embargo, los tratamientos SeAce y SeMeOH tuvieron un efecto todavía mayor sobre la modulación a la baja de la PA de lo que presentó Losartán, con valores de PA 115/67 y 114/66 mmHg respectivamente, que fue equivalente a que SeAce redujera la PAS en un 26% y la PAD en un 28 %, mientras que el extracto SeMeOH provocó una reducción de un 27% para PAS y 28% para PAD. Este efecto puede estar dado por la actividad sinérgica que logran tener estos extractos, ya que presentan compuestos derivados de ácido cinámico a los cuales se les han identificado actividades anti-inflamatorias y antioxidantes (Suzuki *et al.*, 2007; Higuchi, 2014; Marfella *et al.*, 2014). Aunque también, estos extractos han demostrado tener un efecto sobre los rAT_1 así como sobre la cadena de señalización que se desencadena a partir de la activación de este receptor.

Habrá que recordar que AGII al interactuar con rAT_1 , inicia una cadena de señalización donde se activa una proteína G que a su vez promueve la activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, subsecuentemente la fosfolipasa C que hidroliza a los fosfolípidos produciendo DAG e IP_3 . Este último activa a los canales de calcio del RE incrementando la concentración de Ca^{++} que a su vez promueve la entrada de Ca^{++} extracelular por canales específicos de Ca^{++} . Este incremento en Ca^{++} es el que genera la contracción del MLV ante un

estímulo agudo. En cambio la DE que conlleva a la HAS que está regulada por la participación de la AGII sobre la activación de NOX desencadenando un proceso de estrés oxidante por la sobre producción de $O_2^{\bullet-}$ (Li *et al.*, 2014). Como ya se ha descrito el $O_2^{\bullet-}$ es una de las ROS mas reactivas y que participa en la transformación del NO a $ONOO^{\bullet-}$ que transforma de manera no enzimática al AA en PG así como en TX (Vanhoutte *et al.*, 2005). Estos dos componentes están estrechamente relacionados con el proceso inflamatorio

Por lo que el estrés oxidante se considera una de las principales alteraciones provocadas por la HAS, que está estrechamente relacionada con la DE, en la cual el estado inflamatorio y el estrés oxidante son sus principales agentes de daño. El modelo que se utilizó para provocar hipertensión arterial crónica se basó en la primicia de la alteración de la RAAS, en donde la AGII es el agente primordial de la alteración. La AGII como ya ha sido expuesto anteriormente es un agente de regulación de la PA, sin embargo cuando hay una sobre producción o en este caso un incremento en la presencia de éste se generan alteraciones principalmente en el sistema reno-vascular. La AGII además de ser un potente vasoconstrictor que regula la PA también participa en la activación de la NOX, ésta es una enzima implicada en la formación de radicales libres en las células endoteliales. En el momento en que la NOX se activa y forma anión $O_2^{\bullet-}$ que consume y agota la disponibilidad de NO formando así peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$). El $ONOO^{\bullet-}$ a su vez tiene la

capacidad de transformar de manera no enzimática el AA y formar prostanoïdes como: prostaglandinas y tromboxanos, que participan en el proceso inflamatorio vascular, aunado a esto también son vasoconstrictores muy potentes y que junto con la disminución en la disponibilidad de NO, afectando así los efectos benéficos vasorrelajantes de esta molécula.

Para poder establecer y confirmar que la HAS provocada por la administración sub-efectiva de AGII no sólo fue por activación de los rAT1 y la cascada de señalización subsecuente, se hicieron cortes histológicos teñidos con hematoxilina – eosina y tricrómica de Masson. Así como también se hicieron ensayos de cuantificación de citocinas pro-inflamatorias en un órgano altamente vascularizado como es el riñón y pruebas de estrés oxidante en riñón, cerebro y aorta.

En las Figuras 5 a 9 se aprecian las fotomicrografías de los diferentes tratamientos teñidos con H-E, donde en el grupo Vehículo (figura 5) que solo fue administrado con SSI, se puede apreciar un glomérulo junto con los túbulos contorneados distales y proximales de manera definida sin presencia de daños o alteraciones como se ve en el tratamiento con AGII (figura 6), donde los glomérulos se ven deformes con pérdida de la forma de la capsula de Bowman y con infiltración de eritrocitos en la parte de los túbulos contorneados. El grupo con losartán (figura 7) presentan una integridad semejante a la del grupo Vehículo, sin embargo, los glomérulos se ven crecidos dentro de la cápsula de Bowman. En el grupo tratado con

SeAce (figura 8) se presenta ligera infiltración por eritrocitos junto a los túbulos contorneados, sin embargo el daño no es tan evidente como en el tratamiento de AGII. El tratamiento con SeMeOH (figura 9) es el que presentó el menor daño provocado por la AGII, por lo que este atenuó de manera eficiente las alteraciones derivadas de la administración crónica de AGII.

En las Figuras 10 a 14 se muestran las fotomicrografías de los diferentes tratamientos teñidos con tricrómica de Massón, las cuales muestran la formación de fibras de colágeno que se presentan en color azul, en la Figura 10 se aprecia que tanto los glomérulos y túbulos contorneados no presenta formación de colágeno a diferencia del grupo control negativo (Figura 11) que presentó dentro de los glomérulos y en la parte del lumen de los túbulos contorneados una deposición de colágeno que indicaría un proceso de cicatrización, que probablemente este asociado a el daño del proceso inflamatorio y oxidante desencadenado por la administración crónica de AGII, así mismo se aprecia que hay perdida estructural de algunos túbulos contorneados. Los tratamientos con los extractos se muestran en las figuras 13 y 14, donde hay una disminución en la presencia de colágeno indicando que estos extractos disminuyen el daño provocado por la AGII.

En el ensayo de cuantificación de citocinas se observó que el tratamiento con AGII provocó un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo vehículo, esto es consistente con lo reportado por

Xu *et al.* (2011), donde estudiaron la participación de la AGII en la modulación de la inflamación, la activación de moléculas de adhesión como VCAM-1 y de iNOS y su participación en el estrés oxidante. Los tratamientos de Losartán y SeAce no presentan diferencia alguna con el tratamiento de AGII (Gráficas 2 a5) . En el caso de Losartán como antagonista de los rAT1 no intervienen en el control de la inflamación que esta activada por otras vías como es la activación de NOX (PLM, 2014). El extracto SeAce tampoco intervino como se habría esperado, esto puede deberse a que este extracto no presenta los compuestos con actividad antiinflamatoria, lo que contrasta con los resultados de estrés oxidante ya que este mismo extracto si modula la producción de anión superóxido de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, el extracto SeMeOH baja los niveles de anión superóxido pero no tan eficientemente como SeAce. Lo que es interesante ya que SeMeOH modula a la baja tanto las interleucinas como a TNF- α .

En las Figuras 6 y 7 se presentan los resultados del ensayo de aorta aislada. En donde la acción vasoconstrictora de la AGII fue dependiente de la concentración de calcio, en este ensayo se observó que el incremento en calcio promovió una elevación en las contracciones de la aorta cuando se administró AGII a una sola concentración. Se empleó nifedipina como control farmacológico; ya que, específicamente bloquea los canales de calcio tipo L, como un antagonista competitivo (Shen *et al.*, 2000), en la entrada de calcio que puede ser por

despolarización o por acoplamiento de la respuesta del receptor (Godfraind *et al.*, 1983) que en este ensayo fue activado por AGII. El extracto SeRHA en comparación con nifedipina, respondió como un antagonista irreversible (también llamado antagonismo farmacológico), que modifica la curva de concentración respuesta hacia la baja, indicando que el agonista (en este caso AGII) ya no podrá provocar su efecto máximo a ninguna concentración. Las tres concentraciones utilizadas del extracto, no sólo inhibieron la contracción aórtica, también alteraron la EC_{50} como lo hace un antagonista competitivo (Weir, 2010).

Este comportamiento confirma el efecto antagonista de AGII, sin embargo podría también tener un efecto calcio antagonista. El extracto SeRHA puede que actúe bloqueando ya sea a los receptores de AGII o impidiendo la activación por este agonista del segundo mensajero, que promueve el flujo de calcio endoplasmático, que activa a su vez a los canales de calcio tipo L, permitiendo aún mayor entrada de calcio a la célula, donde forma complejos calcio-calmodulina que deriva en la contracción muscular (Guyton *et al.*, 2006; Perekh *et al.*, 2005), con estos resultados se demuestra la actividad vasorrelajante y antihipertensiva del extracto de *S. edule*.

En la gráfica 8 se muestra el efecto que se obtuvo por la administración de AGII durante las 10 semanas de tratamiento. Se obtuvieron de los animales de experimentación para esta prueba el cerebro, ambos riñones y la aorta. Se puede apreciar en cada uno de los

tejidos el incremento del anión superóxido en el grupo de AGII con respecto a el grupo vehículo. Interesantemente esperaríamos que el grupo de Losartán mostrara niveles bajos del anión superóxido, sin embargo, en cerebro y ambos riñones el losartán no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo AGII y solamente en las aortas presenta una regulación a la baja, ésta es la arteria mayor encargada de distribuir la sangre al organismo posterior al bombeo cardiaco. Por otro lado, en el riñón se encuentran conformado por microvasculatura que está conformada por arteriolas y capilares que se encargan de regular la PA por medio de la resistencia periférica y también se encargan de el intercambio de sustancias con los tejidos adyacentes, respectivamente (Guyton *et al.*, 2006). Por lo que la microvasculatura es más susceptible al efecto sub-crónico de AGII en comparación con la aorta. Los extractos SeAce y SeMeOH, presentaron una disminución estadísticamente significativa a la baja en los niveles de anión superóxido con respecto al grupo de AGII. De ambos extractos SeAce es el que presentó una mayor modulación en la producción de $O_2^{\bullet-}$ incluso manteniéndolo en niveles por debajo de los que presenta el grupo Vehículo en cerebro, riñón izquierdo y aorta. La modulación de los niveles a la baja de estos extractos nos indica que pueden tener propiedades antioxidantes o incluso de modulación de la activación de NOX, ya que los compuestos encontrados en estos extractos poseen una estructura meta-metoxi catecol como la apocinina (Suzuki *et al.* 2007; Marfella *et*

al., 2014; Higuchi, 2014) que es un inhibidor de NOX, Suzuki *et al.* (2007), probaron en un modelo de aorta de aislada de rata compuestos derivados del ácido cinámico y apocinina, donde establecieron que los compuestos cinámicos disminuyeron significativamente la actividad de NOX como la cantidad de anión superóxido.

10. CONCLUSIONES

- Los extractos de *S. edule* tienen un efecto antihipertensivo en un modelo crónico de HAS.
- Los compuestos activos presentes en los extractos de *S. edule* son derivados de ácido cinámico y poseen efectos antiinflamatorios y antioxidantes.
- Los extractos de *S. edule* presentan actividad antiinflamatoria a nivel renovascular en la producción de citocinas pro-inflamatorias.
- Los extractos de *S. edule* presentan actividad antioxidante, mediante la modulación de la producción de anión superóxido en MLV.

11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Determinar la participación de los extractos de *S. edule* sobre los factores moleculares participantes en las alteraciones provocadas por la disfunción endotelial.
- Determinar el efecto de los extractos de *S. edule* a diferentes concentraciones en las diferentes alteraciones fisiopatológicas derivadas de la disfunción endotelial.

12. LITERATURA CITADA

- Argueta V.A., Cano A.L., y Rodarte M.E. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista; México. I:393-394
- Bakris G. L., (2008). Combined Therapy With a Calcium Channel Blocker and an Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker. *Journal of Clinical Hypertension*; 10:27–32
- Bisognano J. D., McLaughlin T., Roberts, C. S. y Tang S. S., (2007). Calcium channel blockers, angiotensin receptor blockers, and angiotensin-converting enzyme inhibitors: Effectiveness in combination with diuretics or β -blockers for treating hypertension. *Vascular Health and Risk Management*; 3(5): 579–585.
- Böhm M., (2008). Treating to Protect: Current Cardiovascular Treatment Approaches and Remaining Needs. *The Medscape Journal of Medicine*. 2008; 10(Supp): S3.
- Cai H., Li Z., Dikalov S., Holland S. M., Hwang J., Jo H., Dudley S. C., Jr., y Harrison D. G., (2002). NAD(P)H Oxidase-derived Hydrogen Peroxide Mediates Endothelial Nitric Oxide Production in Response to Angiotensin II. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 50, pp. 48311–48317.
- Cai H., y Harrison D. G., (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*; 87; 840 - 844.
- Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi MC, y Martinotti E. (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 370(4):290
- Chobanian A. V., Bakris G. L., Black H. R., Cushman W. C., Green L. A.,

- Izzo J. L., Jones Jr, D. W., Materson B. J., Oparil S., Wrigth J. T. y Roccella E. J. (2003). Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Journal of american heart association*.
- Curin Y., y Andriantsitohaina R. (2005). Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological report*, 57 suppl 97-107.
- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM (2014) Facultad de Medicina UNAM. Liga visitada 6 Junio de 2014. (http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6)
- Esper R. J., Nordaby R. A., Vilariño J. O., Paragano A., Cacharrón J. L. y Machado R. A., (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology* 5:4 p.p. 1-18.
- Fortuño A., San José G., Moreno M. U., Díez J., y Zalba G., (2005) Oxidative stress and vascular remodeling. *Experimental Physiology* 90.4 pp 457–462 457.
- Fyhrquist F. y Saijonmaa O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* 264; 224–236 225.
- Gasparo M., (2002). Angiotensin II and Nitric Oxide Interaction. *Heart Failure Reviews*, 7, 347–358.
- Godfraind T., (1983). “Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries,” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 224 no. 2, pp. 443-450.
- Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R.F., y Summerville W.W., (1934). Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent evaluation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine*. 59:347–379.
- Gomolak J.R., Didion., S.P. (2014). A Role for Innate Immunity in the Development of Hypertension, *Medical Hypotheses*
- Gordon E.A., Guppy L.J., y Nelson M. (2000). The Antihypertensive Effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *The West Indian*

- Medical Journal; 49(1):27-31.
- Griendling K. K., Minieri C. A., Ollerenshaw J. D., y Alexander R. W., (1994). Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* Vol 74; 1141-1148.
- Groundy S. M., (2004). Ty, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(6):2595-2600
- Guyton A. C., y Hall J. E., (2006). *Textbook of medical physiology* 11th ed., Elsevier Saunders, China, pp. 914 – 915.
- Guzik T.J., Korbust R., y Adamek-Guzik T., (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 4, 469-487.
- Hardman J.G., Limbird L.E. y Gilman A.G., (2001). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Edition New York: McGraw-Hill. ISBN 0-07-135469-7. pp: 765-783.
- Higuchi M. (2014). Chapter 15 – Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative. Stress Wheat and Rice in Disease Prevention and Health. Benefits, risks and mechanisms of whole grains in health promotion. Academic Press is an imprint of Elsevier. Pages 181–199
- Kalinowski L., y Malinski T., (2004). Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 51 No. 2; 459–469.
- Lakka H. M., Laaksonen D.E., Lakka T.A., Niskanen L. K., Kumpusalo E., Tuomilehto J. y Salonen J. T., (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Journal of American Medical Association*. 288(21): 2709-2716.
- Leslie P. G., James L. H., (2001). *Texto atlas de histologia*. 2da edición McGRAW-HILL. USA. pp 2-3.
- Li H., Horke S., y Förstermann U., (2014). Oxidative stress in vascular

- disease and its pharmacological prevention. Trends in Pharmacological Sciences, Volume 34 , Issue 6 , 313 - 319
- Libby P., Ridker P. M. y Maseri A., (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*;105;1135-1143.
- Lira R. S. (1996). Chayote. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Italy.
- Lira R., Castrejon J., Zamudio S. y Rojas-Zenteno C., (1999). Propuesta de Ubicacion Taxonómica para los Chayotes Silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 49:47-61.
- Lombardo-Earl G., (2006). Determinación de la actividad antihipertensiva del extracto de *Sechium edule*. Evaluando el efecto antagonista de angiotensina II en modelos in vivo e in vitro. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.
- Lombardo-Earl G., (2008). Comparación fitoquímica entre raíces de *Sechium edule* con actividad antihipertensiva cultivadas en campo y raíces propagadas en hidroponía. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos –IPN. Yautepec, Morelos, México.
- Lozoya X., (1980). Mexican Medicinal Plants Used Treatment of Cardiovascular Diseases. *American Journal of Chinese Medicine* 1980. VII(1):86-95.
- Malik S., Wong N. D., Franklin S. S., Kamath T. V., L'Italien G. J., Pio J. R. y Williams G. R., (2004). Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in united states adults. *Circulation*. 110;1245-1250.
- Marfella R., D'Onofrio N., Sirangelo I., Rizzo M. R., Capoluongo M. C., Servillo L., Paolisso G., y Balestrieri M. L., (2014). Chapter 15 - Polyphenols, Oxidative Stress, and Vascular Damage in Diabetes. *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press

- is an imprint of Elsevier. Pages 145-156
- Martínez (1994). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económico. México. pp. 276.
- Mattson C. 1998. Pathophysiology. Concepts of alterea health states. Lippincott, E.U.A. Pp. 314-326, 363-384.
- Michel, J-B., (2004). Système rénine-angiotensine et remodelage vasculaire. Medecine sciences, vol. 20, n° 4, p. 409-413.
- Nee M., (1993) Cucurbitaceae. *Sechium edule*. Flora de Veracruz, 74, 89-90.
- Olszanecki R., Gebska A., Kozlovski VI. y Gryglewski RJ., (2002) Flavonoids and nitric oxide synthase. Journal Of Physiology And Pharmacology. 53:571-584.
- Organización Mundial de la Salud, (2009). Enfermedades cardiovasculares. Nota informativa N°317
- Paravicini T. M., Touyz R. M., (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. Diabetes Care 31 (Suppl. 2): S170–S180.
- Parekh A. B. and Putney Jr., J. W. (2005) “Store-Operated Calcium Channels,” *Physiological Reviews*, vol. 85, pp.757–810,
- Salama A.M., Achenbach H., Sánchez L.M. y Gutiérrez G.M., (1987). Isolation and identification of anti-inflammatory glycosides from the fruit of *Sechium edule*. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas16:15-16.
- Santeliz C.H., Romano E. L., González C. A. y Hernández H. H., (2008). El sistema renina – angiotensina – aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. Revista Mexicana de Cardiología. Vol. 19:1, 21-29
- Schieffer B., LuchtefeldM., Braun S., Hilfiker A., Hilfiker-Kleiner D. and Drexler H., (2000). Role of NAD(P)H Oxidase in Angiotensin II–Induced JAK/STAT Signaling and Cytokine Induction. Circulation Research;87;1195-1201
- Schildknecht S. y Ullrich V., (2009) Peroxynitrite as regulator of vascular

- prostanoid synthesis Archives of Biochemistry and Biophysics. 484: (2); 183-189.
- Shen J. B., Jiang B., And Pappano A. J., (2000) "Comparison of L-Type Calcium Channel Blockade by Nifedipine and/or Cadmium in Guinea Pig Ventricular Myocytes," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 294, no. 2, pp. 562–570,.
- Siciliano T., De Tommasi N., Morelli I. y Braca A., (2004). Study Of Flavonoids Of *Sechium Edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) Different Edible Organs By Liquid Chromatography Photodiode Array Mass Spectrometry. *Jurnal Of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 6510-6515
- Suzuki A., Yamamoto M., Jokura H., Fujii A., Tokimitsu I., Hase T., y Saito I., (2007). Ferulic Acid Restores Endothelium-Dependent Vasodilation in Aortas of Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*,; 20:508–513
- The Jackson Laboratory, Mouse Phenome Database. Ultima visita a la liga 7 Junio de 2014.
<http://phenome.jax.org/db/q?rtn=meas%2Fcatlister&req=Dcardiovascularqq4&mlistmode=measavg&x=11&y=16>.
- Touyz R. M. y Berry C., (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazillian journal of medical and biological research* 35:9 1001 – 1015
- Touyz R. M. y Schiffrin E.L., (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*. 52:639 – 672.
- Unger T., (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*; 89(2A):3A-9^a
- Ushio-Fukai M., Frey R. S., Fukai T. y Malik A. B., (2008). Reactive Oxygen Species and Endothelial Permeability. *Current Topics in*

Membranes, Volume 61 DOI: 10.1016/S1063-5823(08)00208-1

- Vanhoutte P. M., Feletou M., & Taddei S., (2005). Endothelium dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology* 144, 449–458.
- Vitiello L., Spoletini I., Gorini S., Pontecorvo L., Ferrari D., Ferraro E., Stabile E., Caprio M., La Sala A., (2014). Microvascular inflammation in atherosclerosis. *IJC Metabolic & Endocrine* 3 1–7
- Weir C.J., (2010). “Ion channels, receptors, agonists and antagonist,” *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, vo. 11, issue 9, pp. 377-383.
- Widlansky M. E., Gokce N., Keaney J. F., JR, Vita J. A., (2003). The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 42, No. 7.
- Xu S., Zhi H., Hou X., Jiang B. (2011). Angiotensin II modulates interleukin-1b-induced inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells via interfering with ERK-NF-kB crosstalk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410 543–548
- Zalba G., Beaumont F. J., San José G., Fortuño A., Fortuño M.A., Etayo J. C., Díez J., (2000). Vascular NADH/NADPH Oxidase Is Involved in Enhanced Superoxide Production in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*; 35; 1055-1061.

ANEXO

Anexo 1. Tratamientos para la HAS la descripción de los medicamentos y sus ventajas y desventajas.

Trat.	Medicamentos	Usos, mecanismos de acción y ventajas	Desventajas y contraindicaciones
Diuréticos	Tiazidas De asa Ahorradores de K ⁺	Son medicamentos de primera elección para el tratamiento de la HAS, costo accesible, efectivos, generalmente bien tolerados a dosis bajas y además de ser útiles en la prevención de eventos Cardiovasculares y cerebrovasculares. Su mayor utilidad está en el tratamiento de pacientes de ascendencia afroamericana, diabéticos, ancianos con hipertensión sistólica y en pacientes con insuficiencia cardiaca.	Los principales efectos colaterales son la disminución en los niveles de potasio que se corrige con diuréticos ahorradores de potasio o con suplementos de potasio. En segundo lugar está la disminución de la tolerancia a la glucosa. Tienen contraindicación relativa en pacientes con gota y dislipidemia.
Inhibidores de la ECA	Captopril Enalapril Lisinopril Remipril Benazepril Fosinopril	Tienen efecto vasodilatador, reducen la PA interfiriendo con la generación de angiotensina II e inhiben la degradación de bradiquinina, disminuyen las resistencias vasculares sin favorecer taquicardia. No interfieren en el metabolismo de la glucosa o de los lípidos. Reducen la morbi-mortalidad por insuficiencia cardiaca y retardan la progresión de nefropatía en pacientes diabéticos, especialmente en presencia de proteinuria.	Presentan un costo elevado. Su efecto colateral más común es la tos seca. Son menos efectivos en pacientes de ascendencia afroamericana. Están contraindicados en el embarazo, en hipercalemia y enfermedad renovascular bilateral.
Ant. de AGII	Losartán Telmisartán	Actúa en el sistema renina-angiotensina, no bloquea la degradación de bradiquinina por lo que no produce tos, su efecto hipotensor es similar al de los inhibidores de la ECA, o ligeramente mayor ya que bloquea la acción de la angiotensina a nivel de los receptores AT1. Son útiles en pacientes diabéticos con nefropatía y en pacientes con insuficiencia cardiaca.	Su desventaja es el costo.
Ca⁺⁺ ant.	Verapamil Diltiazem Nifedipina Felodipina Entre otros	Todos los subgrupos son efectivos y bien tolerados, tienen efecto vasodilatador, han demostrado su beneficio en la prevención de eventos cerebro vascular en el pacientes ancianos con hipertensión sistólica.	Están contraindicados en pacientes con bloqueo aurículoventricular
β-Bloq.	Propranolol Metoprolol	Su principal indicación es en pacientes con cardiopatía isquémica, taquiarritmias, embarazo y diabetes.	Están contraindicados a dosis altas en pacientes con insuficiencia cardiaca, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bradiarritmias y bloqueo aurículoventricular, dislipidemia, atletas o pacientes con actividad física intensa y los que tienen enfermedad arterial periférica. Son menos efectivos en pacientes de ascendencia afroamericana.
α-Bloq.	Prazosin Terazosin Doxazosin fenoxibenzamina fentolamina	Tienen efecto vasodilatador, son útiles en combinación con beta bloqueadores para el tratamiento de pacientes con feocromocitoma. Ofrece ventajas en pacientes dislipidémicos o con intolerancia a la glucosa así como pacientes con hipertrofia prostática.	Pueden producir hipotensión ortostática en la primera dosis, particularmente en pacientes ancianos
Otros	1) Acción central 2) Antiguos:	1) De reciente aparición en el mercado. 2) Están indicados, especialmente la metildopa, en el tratamiento de la HAS en el embarazo	Han sido desplazados por sus efectos colaterales Taquicardia, cefalea, retención de sodio y agua, etc.

Trat.= tratamientos; Ant.= antagonistas; Bloq.= bloqueadores

Fuentes: Mattson 1998; Goodman y Gilman 2001; Chobanian et al. 2003; Bisognano et la. 2007; Bakris 2008; Böhm et al. 2008

Research Article

Extracts and Fractions from Edible Roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with Antihypertensive Activity

**Galia Lombardo-Earl,^{1,2} Rubén Roman-Ramos,¹
Alejandro Zamilpa,² Maribel Herrera-Ruiz,² Gabriela Rosas-Salgado,³
Jaime Tortoriello,² and Enrique Jiménez-Ferrer²**

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

² Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), Argentina 1, Colonia Centro, 62790 Xochitepec, MOR, Mexico

³ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Calle Iztaccihuátl Esq. Leñeros S/N, Colonia Volcanes, 62350 Cuernavaca, MOR, Mexico

Correspondence should be addressed to Enrique Jiménez-Ferrer; enriqueferrer_mx@yahoo.com

Received 2 September 2013; Revised 2 March 2014; Accepted 11 March 2014; Published 9 April 2014

Academic Editor: José Luis Ríos

Copyright © 2014 Galia Lombardo-Earl et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sechium edule is traditionally used in Mexico as a therapeutic resource against renal diseases and to control high blood pressure. The purpose of this work is to evaluate the antihypertensive effect of the hydroalcoholic extract obtained from the roots of this plant, including its fractions and subfractions, on different hypertension models induced with angiotensin II (AG II). The hydroalcoholic extract was tested on an *in vitro* study of isolated aorta rings denuded of endothelial cells, using AG II as the agonist; this assay proved the vasorelaxant effect of this extract. Vagotomized rats were administered different doses of AG II as well as the Hydroalcoholic extract, which reduced blood pressure in 30 mmHg approximately; subsequently this extract was separated into two fractions (acetone and methanol) which were evaluated in the acute hypertension mouse model induced with AG II, where the acetone fraction was identified as the most effective one and was subsequently subfractioned using an open chromatographic column packed with silica gel. The subfractions were also evaluated in the acute hypertension model. Finally, the extract, fraction, and active subfraction were analyzed by MS-PDA-HPLC, identifying cinnamic derivative compounds like cinnamic acid methyl ester.

1. Introduction

Sechium edule (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae) is an endemic plant from Mexico known as chayote. It is originally from southern Mexico (states of Veracruz, Puebla, and Oaxaca) and was domesticated in the valleys of Oaxaca and Tehuacan, Puebla [1]. *S. edule* is cultivated for alimentary purposes, where the stems and fruits are mainly used, although the roots are specially appreciated in the east and southeast of Mexico [2]. The roots are described as a succulent fibrous tuber with a characteristic flavour [3]. Also, this plant is used in the Mexican traditional medicine; in Motozintla, Chiapas, the “Mam” indigenous community employs the chayote plant for treating symptoms such as severe headaches with ringing ears, nervousness, and anxiety, where a decoction of the

leaves is prepared for use as drinking water throughout the day [4]. Its use is also reported for the treatment of renal and urinary disorders, like bladder or kidney stones, inflammation of the urethra, and difficulty and pain when urinating, as well as high blood pressure, varicose veins, and venous insufficiency, among others [5, 6].

There has been little pharmacological research done on *S. edule*. These studies have reported the hypotensive activity of aqueous and hydroalcoholic extracts from aerial parts of the plant; the treatments were administered orally and intraperitoneally in rats and dogs, respectively [7, 8]. Other reports have indicated that the hydroalcoholic extract of fruits of two varieties of *S. edule*, which were administered intravenously in anaesthetized rats, produced effects on different cardiovascular parameters such as lowering blood

pressure and displaying changes on electrocardiographic (ECG) recordings [9]. Nonetheless, the action mechanisms by which these extracts act are not described. Phytochemical analysis has been done on the hydroalcoholic extracts of roots and aerial parts of *S. edule* plants collected in Italy, where chemical differences between the two plant organs were reported. The aerial parts contained a high concentration of luteolin glycosides, while the most significant concentration of apigenin derivatives (C-glycosidic and O-glycosidic bonds) was found in the root extract [10]. The aim of the current study was to evaluate the antihypertensive effect of *S. edule* root extract and fractions on two different murine models, in which the participation of the extracts as a calcium antagonist is proposed, as well as the possible modulation of AG II, together with the chemical identification of the active compounds implicated in the pharmacological activity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Extract Preparation. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. roots and aerial parts were collected in the community of Tuxpanguillo, Veracruz, Mexico (18°47'00.5" N and 97°00'17.5" W, 1721 meters above mean sea level), during the months of April and May. Plant material was identified by Abigail Aguilar-Contreras, M.S., and the IMSSM Herbarium Director (located in National Medical Center, Mexico City). Voucher specimens were stored for future reference (IMSSM-15549). The roots (R) were dehydrated by freeze-drying and ground in an electric mill (Pulvex) obtaining particles of <4 mm. An exhaustive maceration was conducted with ethanol/water (60 : 40) mix at room temperature, concentrated by evaporation at reduced pressure and controlled temperature, and finally dried by lyophilization, obtaining a hydroalcoholic root extract (SeRHA). After a pharmacological evaluation of this extract on vagotomized rats, it was submitted to a prechemical separation with acetone following with methanol, obtaining the acetone extract (SeRAce) and the methanol extract (SeRMeOH).

Based on the results obtained from the acute pharmacological evaluation, SeRAce (2 g) was then subjected to chemical separation by a chromatographic column (64 × 5 cm) packed with Silica-Gel 60 Merck (0040-0063 mm). The column was eluted against a gradient of chloroform : methanol. Forty-one fractions were obtained, which then were analysed by thin layer chromatography (silica gel on aluminium sheets 60 F245 Merck). Based on their chromatographic profile, 20 fractions were grouped and named R1 to R20; from these fractions, the eight most representative ones were evaluated on the acute hypertension mice model and two were characterized by HPLC, using HPLC module system (Waters 2595) coupled with a PDA detector (Waters 996) and Empower Chromatographic Manager software version 1 empower pro (Waters). The stationary phase corresponded to a column Altima HP C18-HL Rocket (53 × 7 mm; 3 μm). The mobile phase consisted of a gradient (Table 1) of 0.5% TFA : CH₃CN 1 : 1 at a rate flow of 1 mL/min for 24 min; using a photodiode detector array, the wavelengths were scanned at 250–600 nm and the main compounds were analyzed at 340 nm for flavonoids and at 290 nm for cinnamic derivatives.

TABLE 1: Process conditions for HPLC chromatographic characterization of the extracts of *S. edule*.

Time (min)	Flow	0.5% TFA (%)	CH ₃ CN (%)
0	1.00	100.0	0.0
1.00	1.00	100.0	0.0
2.00	1.00	90.0	10.0
4.00	1.00	90.0	10.0
5.00	1.00	80.0	20.0
7.00	1.00	80.0	20.0
8.00	1.00	70.0	30.0
14.00	1.00	70.0	30.0
15.00	1.00	60.0	40.0
18.00	1.00	60.0	40.0
19.00	1.00	20.0	80.0
22.00	1.00	20.0	80.0
23.00	1.00	0.0	100.0
26.00	1.00	0.0	100.0
27.00	1.00	100.0	0.0
28.00	1.00	100.0	0.0

The extracts and fractions were also analysed by MS-PDA-HPLC to identify the molecular weight of the active compounds. The method used was as follows: for the HPLC analysis, liquid chromatographer (Agilent 1200) with a visible-UV diode array detector (Waters model 2996) was used, with a column Zorbax Eclipse Plus C18 100 × 2.1 mm, 3.5 μm. The eluent used was acetonitrile and water/0.2% acetic acid, starting at 10 : 90 and at 30 min 90 : 10, respectively. The temperature for the column was 40°C with a flow rate of 0.2 mL/min; the results were read at 300 nm. MS was performed on an Esquire 6000, operating with negative ion polarity, ESI ionization mode, and negative current alternating ion.

2.2. Animals. Male Sprague-Dawley albino rats (250–280 g) and male ICR albino mice (30–36 g) from Harlan, Mexico City, were used. All animals were housed (8 per cage) and maintained under laboratory conditions: 25°C, a normal 12 h : 12 h light/dark schedule (lights on at 07:00 a.m.) with free access to water and food (pellets from Harlan rodent lab diet). The animals were given at least three weeks to adapt to the laboratory environment before experiments. All studies were carried out in accordance with the official Mexican regulation NOM-062-ZOO-1999 (technical specifications for production, care, and use of laboratory animals); the experimental protocol including the ethical aspects was authorized since December 14, 2010, by the Local Health Research Committee (IMSS, Registry number: R-2010-1701-62).

2.3. Angiotensin II Induced Hypertension in Vagotomized Rats. Rats were put under surgical anaesthesia with urethane (1.5 g/kg, *i.p.*), the cervical vagus nerve was cut, and the femoral vein was dissected in order to allow drug administration. Blood pressure (BP) was measured thought indirect blood pressure equipment (LE 5002 Storage Pressure

Meter, Biopac Systems MP 150). In all animals, hexamethonium chloride (ganglion-blocking agent) was administered at 0.1 g/kg *i.v.* dose. After BP stabilization, increasing dosages of AG II (0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were administered to establish a dose dependent curve. BP was recorded every 20 s for 8 min following each dose. After recording the baseline blood pressure, three doses of SeRHA were administered (50, 100, and 200 mg/kg *o.p.*). One hour later, BP was measured for a period of 5 min; immediately, AG II was injected *i.v.*, at the doses previously given, and BP was measured again.

2.4. Acute Hypertension Induced on Mice with AG II. Based on the acute high blood pressure model proposed by Jiménez-Ferrer et al. (2010) [11] to establish an acute model of hypertension on mice, it was necessary to determine which dose of AG II was enough to elevate SBP and DBP over the normal parameters (120/70 mmHg). A dose dependent curve was done (data not shown). The optimal dose defined was 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of AG II (Sigma) by *i.v.* administration. Subsequently a bioguided analysis was performed to define which extract (SeRHA, SeRAce, or SeRMeOH, 50 mg/kg, *o.p.*) exhibited a higher antihypertensive activity. The three extracts were administered by *o.p.*, one hour prior to the trial, as well as Losartan (10 mg/kg, *o.p.*) an AT₁ receptor antagonist of AG II that was used as the positive control. The experiment control group received isotonic saline solution (100 $\mu\text{L}/10\text{ g}$, *o.p.*). One hour after the treatments, under surgical anaesthesia (pentobarbital 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, *i.p.*), BP was monitored by a noninvasive BP detector (LE 5002 Storage Pressure Meter, Biopac Systems MP150); 8 BP lectures were taken to establish a base line, immediately after AG II was administered and the BP was registered again. At this point, the SeRAce extract was chosen for the chemical separation by chromatographic column. Representative fractions (R2, R5, R6, R8, R11, R14, R17, and R20) were also tested in this same model.

2.5. In Vitro Aorta Ring Assay. Rats were sacrificed by decapitation, the thoracic aorta was isolated, cleaned of fat and connective tissue, and all aortas were denuded of endothelium film by gentle mechanical procedure and, finally, cut into rings of about 4-5 mm of width. The rings were tied to stainless steel hooks with silk thread and immersed into 10 mL organ baths of Krebs solution at 37°C and oxygenated (O₂/CO₂, 95:5). A basal tension of 2 g was established for all tissues, and Biopac Systems TSD 125c equipped with AcqKnowledge software recorded changes in basal tension. KCl (120 mM) was administered to determine the maximum contraction of each prepared aorta.

Sixty min after stabilizing the tissue, rings were stimulated with different concentrations of AG II (from 1.00×10^{-10} to 1.00×10^{-6} M) for 10 min and then washed out to remove stimulant agent and stabilized for another 30 min. The tissues were preincubated with SeRHA (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. The relaxant effect was determined by comparison among maximum vascular contraction before and after addition of samples.

To determine the possible vasorelaxant mechanism (like calcium antagonism), It was evaluate the effect of calcium

TABLE 2: Effect produced on systolic and diastolic blood pressure of vagotomized rats by the administration of angiotensin II (*i.v.*).

AG II doses $\mu\text{g}/\text{kg}$ <i>i.v.</i>	Systolic pressure mmHg \pm SD	Diastolic pressure mmHg \pm S.D.
0.0	127.7 \pm 3.13	55.1 \pm 3.27
0.5	144.3 \pm 7.34*	70.33 \pm 6.15*
1.0	145.6 \pm 12.2*	78.3 \pm 9.30*
2.0	153.60 \pm 11.0*	85.5 \pm 15.4*

Data are presented as means \pm SD with $n = 7$. ANOVA and *post hoc* Bonferroni test. * $P < 0.05$ was compared to basal data (0.01 mg/kg AG II).

over AG II agonistic activity, the assay consisted of evaluating a calcium concentration curve inducing vasoconstriction with AG II at a specific concentration (1×10^{-6} M) and the activity of SeRHA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Nifedipine (calcium channel blocker) was employed as positive control.

2.6. Statistical Analysis. Statistical analysis was carried out with SPSS 11.0 and based on an analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. A significant difference was established with respect to control group when the P value was lower than 0.05.

3. Results

3.1. Effect of *S. edule* Root Extract on Vagotomized Rats with AG II Induced Hypertension. Blood pressure elevation on vagotomized rats was established by a dose dependent curve, as showed in Table 2.

The administration of the different dosages of SeRHA extract was capable of inhibiting the increment of BP when given the respective dose of AG II, the effect of which was preestablished in the dose dependent curve. Figure 1 indicates the differential of the decrement of the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) when given AG II. Once the highest dose of AG II (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) is administered in all three SeRHA treatments, there is a proportional drop in BP. In Figure 1(a) the 200 mg/kg dose of SeRHA showed a statistical difference when the 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AG II dose was administered, decreasing BP in 30 mmHg ($F(2.93) < 53.06$, $P < 0.05$) when compared with differential effect (de) induced with the lower dose of AG II (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and SeRHA (50 mg/kg). The behaviour of the hypotensive activity from the SeRHA 100 and 200 mg/kg dose was proportional to the administration of the AG II dose, making it a dose dependent drop in SBP, where BP dropped 24 mmHg, with a statistical difference of both groups of $F(2.93) < 152.96$, $P < 0.05$, when compared with differential effect (de) induced with the lower dose of AG II (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and SeRHA (50 mg/kg). This activity could be consistent with the modification of the cardiac output of the animals and this might be the cause why Lozoya et al. [7, 8] saw a modification on the ECG recordings when they tested the fruit and leaf extracts.

The modification of DBP is shown in Figure 1(b), where the three dosages of SeRHA produced an important effect

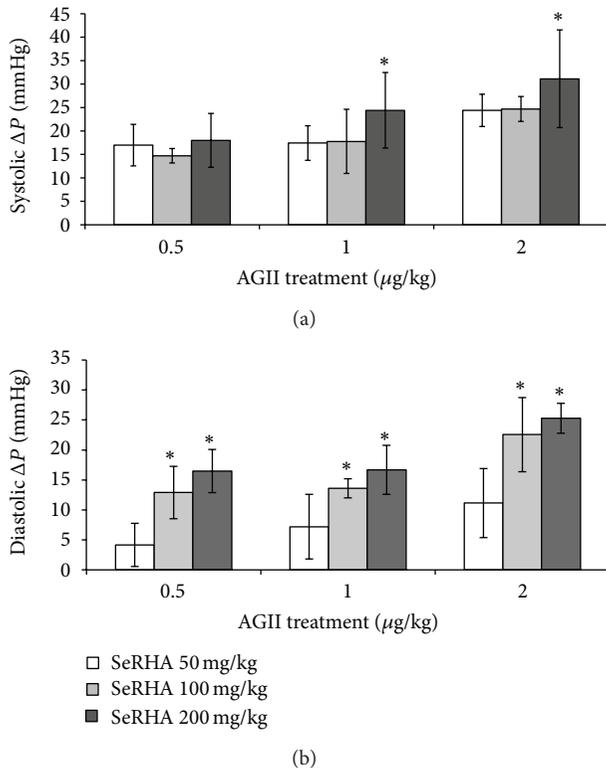


FIGURE 1: Antihypertensive activity of increasing doses (50, 100, and 200 mg/kg *i.p.*) of SerRHA, in vagotomized rats with ganglion blockage by hexamethonium chloride, pretreated with AG II *i.v.* Each bar represents the average of the differential of systolic (a) and diastolic (b) blood pressure with respect to the basal pressure, after AG II administration. ANOVA, *post hoc* Bonferroni **P* < 0.05, when compared to SerRHA 50 mg/kg represented in white bars (*n* = 6; mean ± SE).

preventing an increase in DBP when administered the different AG II doses. These results were more evident than those of SBP, since only the 100 and 200 mg/kg doses of SerRHA that were administered in all three AG II groups showed the most important hypotensive activity compared with the smallest dose of SerRHA and AG II that are exhibited as the white bars, as well as in the SBP results; the highest dose of AG II and of SerRHA had the most potent effect, with a fall of DBP of around 25 mmHg. The impairment of the increment of DBP by the SerRHA extract in this model might be associated with an AG II antagonist activity, due to the nature of this model, where one of the ways to block AG II effect would be the extract interacting with the AT₁ receptor for AG II, since the vagotomization and ganglionic blockage inhibit the BP control mechanisms in general, and the model is induced by intravenous injection of the agonistic AG II, leaving this mechanism of action as the most prominent to occur.

3.2. Ring Aorta Assay. Figures 2 and 3 show the behaviour of the isolated rat aortas without endothelial cells, under two conditions of stimulation of vascular smooth muscle. The resulting contraction is reported with regard to the maximum contraction produced by the administration of KCl.

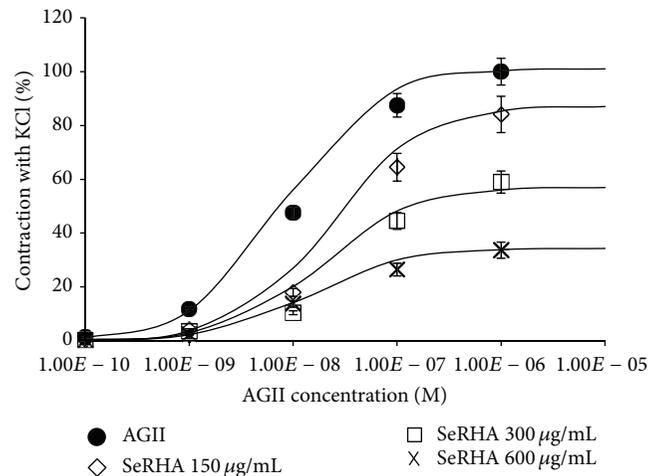


FIGURE 2: Percentages of the contraction of vascular smooth muscle of rat aorta rings stimulated with increasing concentrations of AG II, with respect to the maximum effect obtained with KCl, as well as the evaluation of the vasorelaxant effect of the SerRHA extract stimulated with AG II.

Figure 2 presents the aorta contraction curve dependent on the increasing concentration of AG II (•), with a $E_{max} = 98\%$ and a $EC_{50} = 8.5 \times 10^{-9}$ M. It also shows the effect of three doses of SerRHA + AG II, 150 μg/mL (◇), 300 μg/mL (□), and 600 μg/mL (×); all three extracts had a statistical difference with respect to AG II, where the first concentration of SerRHA had a decrease of 14% of E_{max} , the second one of 44% of E_{max} , and the highest concentration diminished the contraction 66% of E_{max} . The EC_{50} values for the three concentrations of SerRHA were with an average of 1.5×10^{-8} M.

Figure 3 shows the Ca^{++} concentration curve, stimulated with a constant concentration of AG II (1×10^{-6} M) (•). The contraction of the aorta was dependent on Ca^{++} concentration. The AG II E_{max} value was 98% of contraction with an $EC_{50} = 0.0008$ M. When SerRHA + AG II was administered, the resulting effect had a statistically significant decrease of E_{max} where SerRHA of 200 μg/mL (◇) decreased 20%, 400 μg/mL (□) decreased 48%, and finally the 800 μg/mL (×) concentrations produced a 69% contraction of the aorta with respect to AG II by itself; the values of EC_{50} obtained were of 0.003 M in average. In this experiment, Nifedipine was used as a positive control due to its calcium channel blocker effect.

3.3. Bioguided Fractioning of SerRHA, Using the Acute Hypertension Mice Model Induced with AG II. Having established the hypotensive activity of the SerRHA extract, it is important to identify which group of compounds is responsible for the biological activity. The extract was submitted to a chemical separation, and two fractions, SeRACE and SeRMeOH extracts, were obtained. The oral administration of the extract and fractions was able to reduce the blood pressure while administering AG II (1.0 μg/kg *i.v.*) (Figure 4). The most active fraction was SeRACE and the complete extract SerRHA, shown by statistical differences for SBP of $F(2.57) < 39.69$, $P < 0.05$, and for DBP of $F(2.57) < 126.76$, $P < 0.05$,

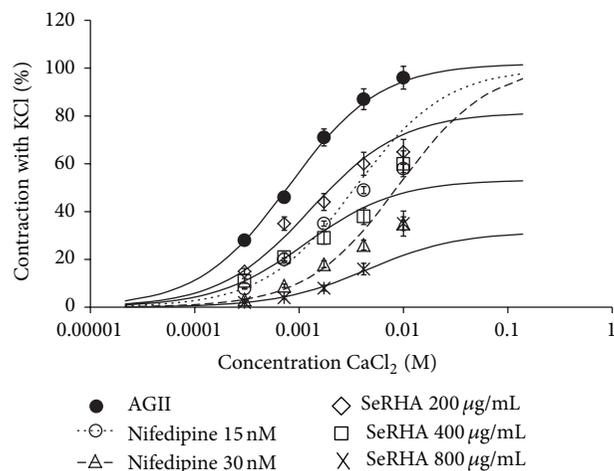


FIGURE 3: Percentages of the contraction of vascular smooth muscle of rat aorta rings stimulated with AG II, in presence of increasing concentrations of CaCl₂ with respect to the maximum effect obtained with KCl, as well as the modulating effect of SerRHA extract on the contraction. Nifedipine was used as a positive control due to its calcium channel blocker activity.

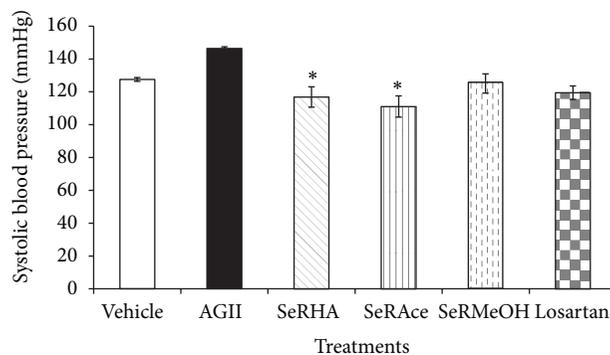
TABLE 3: Antihypertensive effect produced by losartan (10 mg/kg) and fractions (50 mg/kg) obtained from SerAce, on pretreated mice with AG II (1.0 μg/kg, *i.v.*).

Treatment	Systolic BP mmHg	Diastolic BP mmHg
Vehicle	127.51 ± 3.24	61.14 ± 6.74
AG II	146.40 ± 3.01	95.90 ± 8.01
R2	133.98 ± 15.86	86.3 ± 14.86
R5	122.61 ± 16.43	84.5 ± 18.08
R6	132.38 ± 17.87	93.03 ± 20.83
R8	138.01 ± 14.84	93.63 ± 13.98
R11	119.45 ± 19.85	82.07 ± 16.23
R14	109.21 ± 13.94*	68.88 ± 12.10*
R17	109.09 ± 8.73*	71.66 ± 14.53*
R20	122.55 ± 13.15	77.71 ± 10.97
Losartan	119.50 ± 11.73	77.45 ± 12.41

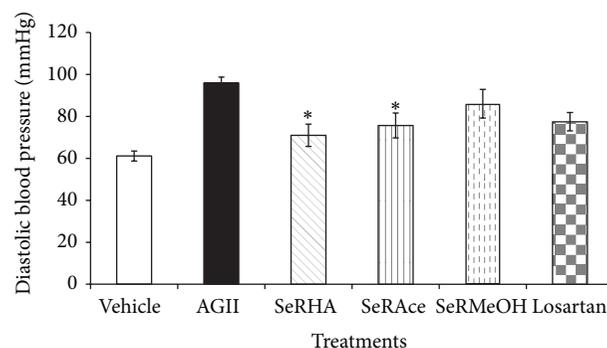
Data are presented as means ± SD with $n = 7$. ANOVA and *post hoc* Bonferroni test. * $P < 0.05$ is with respect to the negative control (AG II 1.0 μg/kg).

when compared to the negative control condition (AG II), with a critical decrease of SBP below the base line values, was established by the vehicle (ISS) group. Both Losartan and SerMeOH did not achieve significant differences in SBP and DBP compared with SerRHA and SerAce. Nevertheless, they lowered the BP when compared with the AG II group.

3.3.1. Antihypertensive Activity of SerAce Fractions. Based on the pharmacological activity of SerAce extract, it was selected for chemical separation by chromatographic column, from which eight fractions (R2; R5; R6; R8; R11; R14; R17; and R20) were chosen based on their chromatographic profile to be evaluated on the acute hypertension mice model (Table 3). Five of the eight fractions presented a decrease



(a)



(b)

FIGURE 4: Bioguided assay of *S. edule* extracts against AG II agonistic effect. ANOVA, *post hoc* Bonferroni * $P < 0.05$, when compared to the vehicle represented in white bars ($n = 6$; mean ± SE).

in BP when administered AG II; all five fractions had a significant hypotensive activity on SBP although not all of them had the same activity on DBP. Only two fractions (R14 and R17) were able to significantly decrease SBP ($F(2.11) < 92.92$; $P < 0.05$) and DBP ($F(2.11) < 41.18$; $P < 0.05$), with a net effect below the SBP of the ISS group and of the control group Losartan. The hypotensive activity of these extracts and fractions could be related to the phenolic compounds that were identified in the chemical characterization done through HPLC of the R14 and R17 fractions and SerRHA as well as for SerAce extracts.

3.4. Chemical Analysis. SerRHA, SerAce, and the most active fractions (R14 and R17) were analysed by HPLC and MS-PDA-HPLC; the compounds in each one displayed diverse UV spectra that can be related to flavones ($\lambda_{\max} = 340$ nm) and cinnamic acid derivatives ($\lambda_{\max} = 290$ nm).

The extraction made with acetone from SerRHA allowed us to obtain a less polar fraction that also presented the antihypertensive activity that was tested in the biological model used.

The chromatographic comparison of SerRHA extract with the fraction SerAcet that was read at 340 nm (specific for vitexin and other related flavonoids) (Figure 5(a)) allows observing the loss of this type of compounds in the fraction SerAcet as well as the more polar compounds that came out with the solvent front. When the comparison of these two

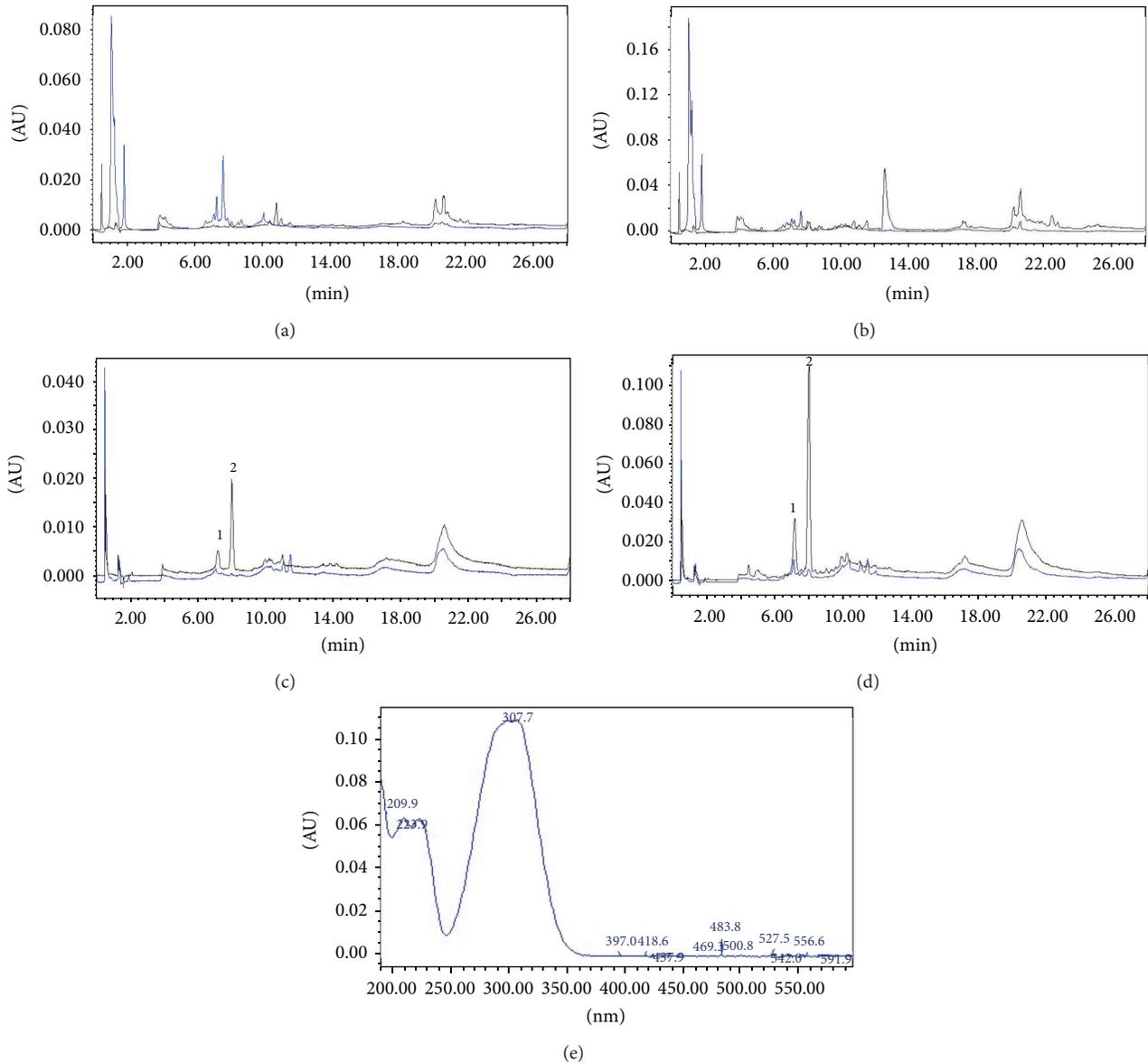


FIGURE 5: Chromatograms of SeRHA extract (blue line) compared with SeRAcet (black line); they were read at two length waves, panel (a) at 290 nm and panel (b) at 340 nm. Fractions R14 (black line) and R17 (blue line) represented in panels (c) and (d) read at 340 nm and 290 nm, respectively, show two peaks (1 and 2) with retention times of 7.21 and 8.04 min. Peak 2 corresponds to the cinnamic acid methyl ester that corresponds to the MS-PDA-HPLC analysis represented in Figure 6(a) peak 4 and Figure 6(b) peak 160.3.

was analysed at 290 nm (Figure 5(b)), It can be appreciated an increment in the concentration of the peaks present throughout minute 7 to 18 of the retention times of this fraction. The chemical separation of these fraction derived 20 fractions, from which two of them, R14 and R17 (at a dose of 50 mg/kg), presented significant statistical difference in the biological activity superior to Losartan. These fractions were compared in the chromatographic method at 290 nm, observing an increment in the peaks with retention time 7.21 and 8.04 min in both fractions having the same UV spectrum for both retention times, peak 1 and 2 from Figures 5(c) and 5(d), respectively. The MS-PDA-HPLC analysis from SeRHA and the Fraction 14 (Figure 6(a)) allowed establishing that

the peak with retention time of 10.8 min corresponds to a cinnamic acid methyl ester.

4. Discussion

Blood pressure is a mechanism that an organism has to maintain a constant irrigation of blood, for nutrient distribution and oxygenation of organs and tissues. It is regulated essentially throughout two factors, cardiac output (CO) and total peripheral resistance (TPR). The CO is the total amount of blood pumped in to the aorta each minute by the heart and the TPR or vascular resistance is the impediment to blood flow in a vessel. The pharmacological model used in

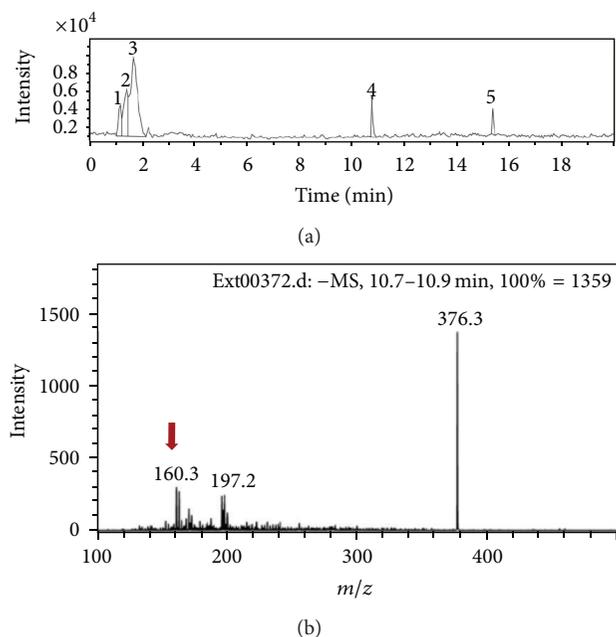


FIGURE 6: Mass chromatogram of fraction R14 (a) and its mass absorption spectrum (b).

this work has the purpose of simulating an alteration in the TPR, increasing blood pressure by the administration of AG II, and triggering a general vasoconstriction reaction. Drug discovery [12] describes this assay as an AG II antagonism model.

The vagotomization of the rats eliminates the cardiovascular reflexes, without interfering with the heart rate and normal blood pressure, allowing AG II to induce an increase of blood pressure, inciting an acute vasoconstriction when administered intravenously without any intervention of the sympathetic and parasympathetic response, which are responsible for the immediate homeostatic control of blood pressure. The ganglionic-blockade purpose is to block the transmission of nerve impulses through the autonomic ganglia [13], impairing the vasculature to compensate blood pressure when administered AG II or the extract evaluated.

The results obtained from this model allowed us not only to confirm the antihypertensive effect of this plant but also to identify the probable action mechanism. The extracts of *S. edule* may have an AG II antagonism activity. This action mechanism can be modulated through direct antagonism of the AG II receptor AT_1 or by the intervention on calcium fluxes activated by AG II, impeding the immediate vasoconstriction response to the *i.v.* administration of AG II.

In the isolated aorta assay AG II vasoconstriction action was dependent on Ca^{++} concentration, where it was observed that the increment in Ca^{++} promoted a rise of the contraction of the aorta when a single concentration of AG II was administered. Nifedipine was used as a pharmacological control; it specifically blocks L-type calcium channels as a competitive antagonist [14] on the calcium influx that can be through depolarization or by receptor-response coupling [15], which, in this assay, was triggered by AG II. The SeRHA

extract, in comparison to Nifedipine, responded as an irreversible antagonist (also called pharmacologic antagonist) that shifts the dose-response curve downward, indicating that the agonist can no longer exert maximal effect at any dose. All three concentrations of the extract that were tested not only inhibited the aorta contraction but also altered the EC_{50} as a competitive antagonist would do [16].

This behaviour confirms the AG II antagonist effect, although it could also have a calcium antagonist effect. The activity of SeRHA extract can be associated with an AG II receptor blocking action, as well as obstructing the second messenger system initiated by AG II, which promotes the efflux of sarcoplasmic calcium that activates the store operated channels (SOC) that allows more calcium to enter the cell and form a calcium-calmodulin complex That ends in vascular contraction [17, 18].

With these results, the antihypertensive and vasorelaxant activity of *S. edule* root extract were demonstrated; therefore, a chemical separation was carried out, obtaining a first fraction SeRAce, which was submitted to chemical separation and the most chemically relevant fractions obtained were analysed on the acute hypertensive model; two of them had the most pharmacological activity (R14 and R17) and were then analysed by HPLC as well as SeRHA and SeRAce. The chemical results allowed us to identify most polyphenolic compounds like flavonoids and phenylpropanoids. Vitexin was identified in SeRHA and SeRAce as well as coumaric and cinnamic acid; in contrast with the extracts, fractions R14 and R17 predominantly had coumaric and cinnamic acid. This information is relevant and consistent to the results obtained from the pharmacological experiments.

Polyphenolic compounds have a very wide and important biological activity regarding cardiovascular diseases. Mainly in the regulation of high blood pressure, recent studies are evoked on inflammation and ROS scavenging properties of this type of compounds [19–22]. Thus, there have been studies on flavonoids and cinnamic acid derivative on their calcium antagonism and vasorelaxant activity [23, 24].

Liew et al. [25] demonstrated that red wine polyphenols like resveratrol act as calcium channel antagonists lowering free intracellular Ca^{++} . Summanen et al. [23] presented that numerous simple phenolic compounds like cinnamic acid derivatives and flavonoids have a potent inhibition of Ca^{++} entry by high K^+ -evoked activity; the effects were comparable to those of verapamil. They presented an inhibitory activity against Ca^{++} entry similar to the one of another class of natural Ca^{++} channel antagonists, like furanocoumarins identified by Vuorela et al. [26]. Other studies of extracts of *Gentiana floribunda* that contained flavonoids and tannins among other compounds were effective for lowering blood pressure with a vasorelaxant effect, mediated by the inhibition of Ca^{++} influx via membranous calcium channels and its release from the intracellular stores [27].

The presence of cinnamic acid derivatives in the *S. edule* extracts and fractions could be responsible for the angiotensin II and calcium antagonist effect, which were established with the pharmacological assays, which are designed to identify a specific action mechanism. Cinnamic acid derivatives are a group of natural compounds that have

been studied in different antihypertensive models, mostly as anti-inflammatory and antioxidant activity, although these studies are based on chronic hypertension assays, which originate by the alterations of Ca^{++} fluxes in the vascular smooth muscle and on the renin—angiotensin—aldosterone system.

5. Conclusions

In conclusion the results obtained in this work demonstrate that *S. edule* extracts have an antihypertensive activity, which is consistent with the traditional use in Mexico. Thus, the phytochemical analysis was not precise on a specific compound and the richness in polyphenols opens a new range of inquiry for other action mechanisms of *S. edule* extracts related to inflammation and oxidative stress damage that is related to hypertension and endothelial dysfunction.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was partially supported by CONACyT México (SNI/32291/52834-M), IMSS México (FIS/IMSS/PROT/348), and CONACyT México (Salud/113632) Grants. This paper is taken in part from the Ph.D. of Galia Lombardo Earl (Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud) belonging to the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), with a Doctoral fellowship from CONACyT, México (Registry no. 208601/202091).

References

- [1] H. Pipitone, *Oaxaca Prehispánica*, CIDE (Centro de Investigación y Docencia Económica), México D.F., Mexico, 1st edition, 2006.
- [2] SAGARPA, “Breves monografías agrícolas,” 2005, <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Hortalizas/Chayote.html>.
- [3] C. Monroy-Ortiz and P. Castillo-España, *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, UAEM-CONABIO Cuernavaca, Morelos, México, 2nd edition, 2007.
- [4] Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&po=mam&te=Chayote&id=6407&clave_region=34.
- [5] V. A. Argueta, “*Sechium edule*,” in *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, A. L. Cano and M. E. Rodarte, Eds., pp. 393–394, Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, México D.F., Mexico, 1994.
- [6] R. Lira, J. Castrejon, S. Zamudio, and C. Rojas-Zenteno, “Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de Mexico,” *Acta Botanica Mexicana*, vol. 49, pp. 47–61, 1999.
- [7] X. Lozoya, “Mexican medicinal plants used for treatment of cardiovascular diseases,” *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 8, no. 1-2, pp. 86–95, 1980.
- [8] A. R. de Ribeiro, M. Fiuza, and F. de Barros, “Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 15, no. 3, pp. 261–269, 1986.
- [9] E. A. Gordon, L. J. Guppy, and M. Nelson, “The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*),” *The West Indian Medical Journal*, vol. 49, no. 1, pp. 27–31, 2000.
- [10] T. Siciliano, N. de Tommasi, I. Morelli, and A. Braca, “Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 21, pp. 6510–6515, 2004.
- [11] E. Jiménez-Ferrer, F. Hernández Badillo, M. González-Cortazar, J. Tortoriello, and M. Herrera-Ruiz, “Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, no. 2, pp. 340–346, 2010.
- [12] H. G. Vogel, *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, Springer, 2nd edition, 2002.
- [13] A. C. Guyton and J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Saunders, 11th edition, p. 760, 2006.
- [14] J.-B. Shen, B. Jiang, and A. J. Pappano, “Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes,” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 294, no. 2, pp. 562–570, 2000.
- [15] T. Godfraind, “Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries,” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 224, no. 2, pp. 443–450, 1983.
- [16] C. J. Weir, “Ion channels, receptors, agonists and antagonists,” *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, vol. 11, no. 9, pp. 377–383, 2010.
- [17] A. C. Guyton and J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Saunders, 11th edition, pp. 914–915, 2006.
- [18] A. B. Parekh and J. W. Putney Jr., “Store-operated calcium channels,” *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 2, pp. 757–810, 2005.
- [19] T. Schewe, Y. Steffen, and H. Sies, “How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 476, no. 2, pp. 102–106, 2008.
- [20] D. K. Maurya and T. P. A. Devasagayam, “Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3369–3373, 2010.
- [21] Y. Lee, D.-H. Shin, J.-H. Kim et al., “Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I κ B kinase inhibition are involved in NF κ B inhibitory effect: structural analysis for NF κ B inhibition,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 643, no. 1, pp. 21–28, 2010.
- [22] J. Chen, X. Chen, Y. Lei et al., “Vascular protective potential of the total flavanol glycosides from *Abacopteris penangiana* via modulating nuclear transcription factor- κ B signaling pathway and oxidative stress,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 136, no. 1, pp. 217–223, 2011.
- [23] J. Summanen, P. Vuorela, J.-P. Rauha et al., “Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca^{2+} fluxes in rat pituitary GH $_4$ C $_1$ cells,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 414, no. 2-3, pp. 125–133, 2001.
- [24] Y. Zhang, Y. Cao, Q. Wang, L. Zheng, J. Zhang, and L. He, “A potential calcium antagonist and its antihypertensive effects,” *Fitoterapia*, vol. 82, no. 7, pp. 988–996, 2011.

- [25] R. Liew, M. A. Stagg, K. T. MacLeod, and P. Collins, "The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes," *European Journal of Pharmacology*, vol. 519, no. 1-2, pp. 1-8, 2005.
- [26] H. Vuorela, P. Vuorela, K. Törnquist, and S. Alaranta, "Calcium channel blocking activity: screening methods for plant derived compounds," *Phytomedicine*, vol. 4, no. 2, pp. 167-181, 1997.
- [27] A. Khan, M. R. Mustafa, A. U. Khan, and D. D. Murugan, "Hypotensive effect of *Gentiana floribunda* is mediated through Ca^{++} antagonism pathway," *Complementary & Alternative Medicine*, vol. 12, article 121, 2012.