



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**EFFECTO HEPATOPROTECTOR  
"in vivo" DE EXTRACTOS DE  
*Sechium P. Browne***

GUADALUPE GÓMEZ GARCÍA

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Guadalupe Gómez García, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. R.Marcos Soto Hernández, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

EFEECTO HEPATOPROTECTOR "in vivo" DE EXTRACTOS DE Sechium P. Browne

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 08 de Febrero de 2019



Firma del  
Alumno (a)




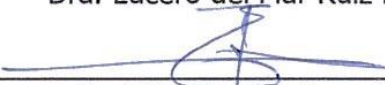



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Efecto hepatoprotector “in vivo” de extractos de *Sechium P. Browne***, realizada por la alumna: **Guadalupe Gómez García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)	 _____
	Dr. Ramón Marcos Soto Hernández
DIRECTOR (A)	 _____
	Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez
ASESOR (A)	 _____
	Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas
ASESOR (A)	 _____
	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
ASESOR (A)	 _____
	Dr. Jorge Cadena Íñiguez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019

# EFFECTO HEPATOPROTECTOR “*in vivo*” DE EXTRACTOS DE

## *Sechium P. Browne*

Guadalupe Gómez García, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

### RESUMEN

*Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae), es una especie vegetal comestible originaria de Mesoamérica. El Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM) ha caracterizado doce grupos varietales entre los cuales se ha observado una importante actividad biológica diferencial en células tumorales principalmente en el grupo varietal *nigrum spinosum* y algunos híbridos. Además se ha reportado que los frutos de *Sechium edule* presenta propiedades diuréticas, cardioprotectoras, anti-inflamatorias y actividad hepatoprotectora. Desafortunadamente los autores no especifican el grupo varietal con el que se desarrolló la investigación incluyendo la actividad hepatoprotectora. Por lo que este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto hepatoprotector del extracto en metanol del fruto de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y el híbrido de *Sechium* HD-Víctor. Para ello, los extractos en metanol de ambos genotipos fueron analizados por cromatografía en capa fina (CF) y cromatografía de alta resolución (HPLC) para la detección de flavonoides, ácidos fenólicos y cucurbitacinas. Además, ratones machos y hembras de la cepa CD-1 fueron tratados con dosis de 0 a 5000 mg•kg<sup>-1</sup> de cada extracto y se obtuvo la dosis letal media (LD<sub>50</sub>), además se estableció el modelo de daño hepático con tetracloruro de carbono CCl<sub>4</sub>, para estudiar efecto hepatoprotector de ambos extractos, los cuales se administraron durante 15 días. Al término del tratamiento se evaluó el índice hepático, conteo hemático, y parámetros indicativos de daño hepático como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA). Los resultados revelaron la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y cucurbitacinas por cromatografía en capa fina (CF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); además, se corroboró la LD<sub>50</sub> para *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* la cual fue mayor a 5000 mg•kg<sup>-1</sup> para machos y hembras, mientras que para el híbrido

HD-Víctor fue de  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para ambos sexos. Por otro lado, los ratones sanos tratados con extractos, no mostraron alteraciones en los parámetros hematológicos e indicadores de daño hepático, mientras que los ratones con lesión hepática mostraron elevación de las enzimas hepáticas, lo que confirma el daño hepático, por el contrario a los que se les administró extracto, muestran reducción de las enzimas hepáticas, esto confirma el efecto hepatoprotector de los frutos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y aporta que el híbrido de *Sechium* HD-Víctor también presenta protección al hígado.

**Palabras clave:** lesión hepática, fitoquímica, híbrido HD-Víctor

# HEPATOPROTECTIVE EFFECT "*in vivo*" OF EXTRACTS OF

## *Sechium P. Browne*

Guadalupe Gómez García, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

### ABSTRACT

*Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae), is an edible vegetable species native to Mesoamerica. The Interdisciplinary Research Group in *Sechium edule* in Mexico (GISeM) has characterized twelve varietal groups among which an important differential biological activity has been observed in tumor cells mainly in the varietal group *nigrum spinosum* and some hybrids. It has also been reported that *Sechium edule* has diuretic, cardioprotective, anti-inflammatory and hepatoprotective properties. Unfortunately the authors do not specify the varietal group with which the research was developed. Therefore, this work aimed to evaluate the hepatoprotective effect of the methanol extract of the *Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum* and the *Sechium* HD-Victor hybrid. To this end, the methanol extracts of both genotypes were analyzed by thin layer chromatography (CF) and high resolution chromatography (HPLC) for the detection of flavonoids, phenolic acids and cucurbitacins. In addition, male and female mice of strain CD-1 were treated with doses of 0 to 5000 mg • kg<sup>-1</sup> of each extract and the mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) was obtained, in addition the model of liver damage was established with tetrachloride of carbon CCl<sub>4</sub>, to study the hepatoprotective effect of both extracts, which were administered during 15 days. At the end of the treatment, the hepatic index, blood count, and parameters indicative of liver damage such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (FA) were evaluated. The results revealed the presence of flavonoids, phenolic acids and cucurbitacins by CF and HPLC; In addition, the LD<sub>50</sub> was corroborated for *Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum* which was higher than 5000 mg • kg<sup>-1</sup> for males and females, while for the HD-Victor hybrid it was 500 mg • kg<sup>-1</sup> for both sexes. On the other hand, the healthy mice treated with extracts did not show alterations in the hematological parameters and indicators of liver damage, while the mice with liver injury

showed elevation of the liver enzymes, which confirms the liver damage, on the contrary to the that they were administered extract, show reduction of liver enzymes, this confirms the hepatoprotective effect of the fruits of *Sechium edule* varietal group *nigrum spinosum* and contributes that the hybrid of *Sechium* HD-Victor also presents protection to the liver.

**Key words:** hepatic injury, phytochemistry, HD-Victor hybrid

## APOYOS FINANCIEROS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y en el laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección del Dr. R. Marcos Soto Hernández y la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez. Con el apoyo financiero del programa de Apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN221017, Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM) y el apoyo de beca para los estudios de Maestría CONACyT 791840.



## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, por la enseñanza y confianza depositadas en mí y por brindarme la oportunidad de trabajar en el Proyecto de *Sechium* bajo su dirección.

Al Dr. Marcos Soto Hernández, quien siempre me brindo su asesoría y apoyo en el trabajo de investigación, Además de brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio de fitoquímica.

Al Dr. Jorge Cadena Iñiguez y a la Dra. Ma. Lourdes Arévalo Galarza quienes me brindaron su asesoría y apoyo y con sus acertadas y oportunas propuestas, no solo enriquecieron este trabajo si no que hicieron que fuera posible.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio y a la Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas, por ser mis asesores en este proyecto y por guiarme y brindarme su apoyo y enseñanza.

Al M en C. Víctor M. Cisneros Solano, curador del Banco de Germoplasma de *Sechium*, CRUO-UACH-GISeM, quien me facilitó el material vegetal para el desarrollo del proyecto.

A la MVZ. Adriana Altamirano Bautista y al MVZ. Román Hernández Meza, responsables del bioterio, FES-Zaragoza, UNAM, gracias por todo su trabajo para mantener a los animales de experimentación en óptimas condiciones.

Al M en C. Rubén San Miguel Chávez, por todo su apoyo técnico brindado en el HPLC.

A la Dra. Rocío Rivera Martínez, quien siempre me brindó su asesoría, apoyo y amistad a lo largo de este proyecto.

Al M en C. Luis A. Martínez Jiménez, por siempre brindarme su apoyo, amistad y compañía.

A la Dra. Sandra Salazar Aguilar, Por la asesoría y apoyo brindado en la parte final de este proyecto y por brindarme su amistad.

Al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez, por facilitarme el equipo y permitirme trabajar las pruebas bioquímicas en su laboratorio y a la Dra. Juana Rosado Pérez, por el apoyo brindado.

A todos los integrantes del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia por el apoyo brindado y por hacer ameno cada día de trabajo.

## DEDICATORIA

A mis padres Pablo Gómez de la Rosa y María Teresa García Martínez, quienes con su paciencia, enseñanza, comprensión y apoyo incondicional hicieron que este trabajo fuera posible.

A mi hermana Paola Gómez García, que ha sido guía y ejemplo a seguir, gracias por toda la confianza, paciencia y enorme apoyo brindado en todo este trayecto.

A mi hermano Oscar Edgar Gómez García y a mi cuñada Catalina Sánchez Nájera por su invaluable amistad y apoyo durante todo este proyecto y sobre todo gracias por traer al mundo a mis dos grandes fortalezas Evelyn y Giselle quienes hacen que cada día sea grato, y me enseñan el valor de la amistad.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE CUADROS .....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
2.1 Modelo de lesión hepática .....	2
2.1.1 La hepatitis aguda y crónica inducida por tetracloruro de carbono (CCl <sub>4</sub> ).....	2
2.2. Funcionamiento hepático .....	3
2.3 Especies Reactivas de Oxígeno .....	6
2.3.1 Compuestos Antioxidantes .....	8
2.4 Marcadores de Funcionamiento Hepático.....	9
2.5 Metabolitos en las plantas.....	11
2.5.1 Las plantas como alternativa terapéutica .....	14
2.6. Genero Sechium .....	15
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4 HIPÓTESIS.....	17
5 OBJETIVO GENERAL.....	18
5.1 Objetivos particulares .....	18
6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1 Material biológico .....	19
6.2 Extracción .....	19
6.3 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). .....	20
6.4 Preparación del extracto .....	21
6.5 Manejo de ratones .....	21
6.6 Tratamiento de ratones para obtener la dosis letal media (LD <sub>50</sub> ).....	21
6.7 Tratamiento de ratones modelo de daño hepático .....	21
6.7.1 Recolección de muestras de sangre.....	22
6.7.2 Glucosa .....	22

6.7.3 Urea.....	23
6.7.4 Creatinina .....	23
6.7.5 Ácido úrico .....	23
6.7.6 Aspartato aminotransferasa (AST) .....	24
6.7.7 Alanina aminotrasferasa (ALT) .....	24
6.7.8 Fosfatasa alcalina (ALP).....	24
6.7.9 Determinación de Índice hepático.....	24
6.7.10 Análisis estadístico .....	25
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
7.1 Obtención de extractos vegetales .....	26
7.2 Identificación de metabolitos secundarios.....	27
7.3 Supervivencia de ratones tratados respecto a ratones sanos.....	30
7.4 Determinación de la dosis letal media (LD <sub>50</sub> ) del híbrido HD-Víctor.....	32
7.5 Efecto de los extractos de <i>nigrum spinosum</i> y HD-Víctor sobre el índice hepático de ratones sanos .....	33
7.6 Efecto del extracto de <i>nigrum spinosum</i> e híbrido HD-Víctor sobre parámetros hematológicos en sangre de ratones sanos .....	34
7.7 Efecto del extracto de <i>nigrum spinosum</i> sobre parámetros indicadores de funcionamiento hepático en ratones sanos.....	37
7.8 Efecto del extracto de frutos <i>nigrum spinosum</i> e híbrido HD-Víctor sobre el índice hepático en un modelo murino de daño hepático .....	40
7.9 Efecto del extracto de <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i> e híbrido HD-Víctor sobre enzimas indicadoras de funcionamiento hepático en un modelo murino de daño hepático.....	43
8 CONCLUSIONES .....	51
9 BIBLIOGRAFÍA.....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Vías del metabolismo secundario de las plantas que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos, y terpenoides. También se muestra su relación con el metabolismo primario (Tomado de Taíz, 2006)..... 13
- Figura 2. A: Frutos de *Sechium edule var. nigrum spinosum*. B: Frutos del híbrido intraespecífico HD-Víctor, obtenido por cruzamiento entre *Sechium compositum x Sechium edule var. nigrum xalapensis*..... 19
- Figura 3. Cromatogramas A: Flavonoides. C-D: Cucurbitacinas y ácidos fenólicos presentes en el extracto del híbrido HD-Víctor..... 27
- Figura 4. Supervivencia de ratones hembra (n=10) tratados vía intraperitoneal con diferentes dosis de extracto del híbrido HD-Víctor, evaluados a las 24 h post-tratamiento. Grafica de Kaplan Meier. .... 31
- Figura 5. Supervivencia de ratones machos (n=10) tratados vía intraperitoneal con diferentes dosis de extracto del híbrido HD-Víctor, evaluados a las 24 h post-tratamiento. Gráfica de Kaplan Meier..... 32
- Figura 6. Índice hepático de ratones hembras y machos sin inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con extracto en metanol de *nigrum spinosum* con dosis de 1000 mg kg<sup>-1</sup>, e híbrido HD-Víctor con 125 mg Kg<sup>-1</sup>. n = 6, ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05)..... 34
- Figura 7. Índice hepático de ratones hembras y machos con inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule nigrum spinosum*. n = 6. Promedios ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05). .... 41
- Figura 8. Índice hepático de ratones hembras y machos con inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con dosis de 8, 50, 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05). .... 42

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Rendimiento en peso seco y extracto de *Sechium edule var. nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor, a partir de frutos en madurez hortícola. .... 26
- Cuadro 2. Parámetros hematológicos de ratones hembras sanas tratadas con con dosis de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *nigrum spinosum* y 125 mg·kg<sup>-1</sup>de HD-Víctor. n = 6. Promedios ±error estándar. a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico.\*Diferencia significativa (Tukey p<0.05). .... 35
- Cuadro 3. Parámetros hematológicos de ratones machos sanos tratados con con dosis de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *nigrum spinosum* y 125 mg·kg<sup>-1</sup>de extracto de HD-Víctor. n (6). Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico ..... 36
- Cuadro 4. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras sanas tratadas con 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *S. edule var. nigrum spinosum* y con 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto de HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico..... 38
- Cuadro 5. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos sanos tratadas con 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *S. edule var. nigrum spinosum* y con 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto de HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico..... 39
- Cuadro 6. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras con inducción de daño hepático, tratadas con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*. n = 6, se presentan promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = Ácido gálico. .... 45

- Cuadro 7. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras con inducción de daño hepático, tratadas con dosis de 8, 50 y 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido de *Sechium* HD-Víctor. n = 6, se presentan promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico..... 46
- Cuadro 8. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos con inducción de daño hepático, tratados con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico. .... 48
- Cuadro 9. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos con inducción de daño hepático, tratados con dosis de 8, 50 y 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico.. 49



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT), tales como las de hígado, representan 38 millones de defunciones cada año a nivel mundial. El 75% de éstas se producen en los países de ingresos bajos (WHO, 2014), y México ocupa el quinto lugar de defunciones por enfermedades hepáticas reportando 35,718 muertes anuales (INEGI, 2017). Los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades hepáticas es el consumo excesivo de alcohol y grasa, exposición a tóxicos como el arsénico, parásitos y virus (Bustíos *et al.*, 2007). Actualmente para la lesión de hígado no hay tratamientos definidos, en los casos severos del padecimiento el tratamiento es el trasplante (O`shea *et al.*, 2010). A este respecto, se han buscado alternativas en la medicina para su tratamiento, usando por ejemplo especies vegetales entre otros recursos biológicos. En la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta (Kumar, 2004). Como algunos medicamentos antitumorales vinblastina, irinotecan, paclitaxele hipoglucemiantes como la metformina (Loraine y Mendoza., 2010). En cuanto a la lesión hepática las opciones de tratamiento alternativo incluyen silimarina, la cual es el ingrediente activo de *Silybum marianum* también llamado cardo mariano, que protege a los pacientes debido a sus propiedades antioxidantes(O`shea *et al.*, 2010). Otra especie vegetal que se ha reportado como hepatoprotector es *Sechium edule* también conocido como chayote, cuyos frutos por su alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y cucurbitacinas presenta también actividad antiinflamatoria, diurética (Salama *et al.*, 1986) antioxidante, antidiabética, nefroprotectora,cardioprotectora (Mayti *et al.*, 2013; Firdous *et al.*, 2012; Neereja *et al.*, 2015) y antitumoral (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; GISEM, 2008).Sin embargo, la mayoría de los autores no mencionan el grupo varietal de *Sechium edule* al cual corresponden dichas propiedades,por lo que este trabajo tiene como objetivo evaluar si *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y el híbrido de *Sechium* HD-Víctor presentan actividad hepatoprotectora.

## **2 REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Modelo de lesión hepática**

#### **2.1.1 La hepatitis aguda y crónica inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).**

El tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es un líquido altamente tóxico utilizado principalmente en la fabricación de diclorodifluorometano, se utilizaba como refrigerante y propelente, y está contenido en extintores de incendios y en removedores de manchas. En ratones, una sola administración oral de CCl<sub>4</sub> desencadena una lesión hepática aguda, y es un modelo ampliamente estudiado de hepatotoxicidad aguda. La molécula hepatotóxica (CCl<sub>4</sub>) activa los citocromos (CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2) para formar un triclorometilo (CCl<sub>3</sub>) que reacciona con oxígeno para formar una especie de oxígeno altamente reactivo (ROS) que inicia la peroxidación lipídica, la lesión hepática mitocondrial dependiente y la degeneración de grasa (la especie altamente reactiva llamada peroxi triclorometilo (CCl<sub>3</sub>OO\*), e inicia la peroxidación lipídica y la desnaturalización de ácidos grasos poliinsaturados). Como resultado, la permeabilidad de la mitocondria, el retículo endoplásmico y de la membrana plasmática se pierden con la desregulación del Ca<sup>++</sup> en las células que conduce a la muerte celular. Además, la toxicidad de (CCl<sub>4</sub>) conduce a hipometilación de los componentes celulares y daño hepático (Weber *et al.*, 2003).

La lesión hepática inducida por CCl<sub>4</sub> provoca exceso de citocinas y quimiocinas que dan como resultado necrosis del hepatocito (Ramaiah *et al.*, 2007). Además se ha demostrado en ratones que la deficiencia de IL-6 aumenta la inflamación y la lesión hepática, provocando así, una recuperación retrasada después del daño por (CCl<sub>4</sub>), lo que sugiere que IL-6 tiene un papel protector del hígado mediante la regulación negativa de la metaloproteinas-2 de matriz (MMP-2) (Bansal *et al.*, 2005). Por otro lado, en lesiones inducidas por (CCl<sub>4</sub>) la deficiencia de IL-10 conduce a extensa fibrosis hepática e infiltración neutrofílica (Louis *et al.*, 1998). Las células NKT en hígado (iNKT) son cruciales en este modelo de lesión hepática, debido a que estas células protegen al órgano del daño al limitar la infiltración de neutrófilos (Ramaiah *et al.*, 2007). Los

ratones con deficiencia de células iNKT ( $J\alpha$ -18 knockout) son más susceptibles a la lesión e inflamación hepática aguda (Lisbone *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2009). En este modelo de lesión las células Kupffer (CK) juegan un papel vital en ratones, ya que la depleción de KC protege de la necrosis hepática inducida por (CCl<sub>4</sub>) y reducción de la producción de IL-6. (Kiso *et al.*, 2012). Por último, otro estudio demostró que este modelo de hepatitis dependía de la actividad de las KC a través del TNF- $\alpha$  y el ligando FasL (Sato *et al.*, 2014). La muerte necrótica de los hepatocitos inducida por concavalina A (ConA) se acompaña de la liberación de las aminotransferasas (ALT y AST) del citoplasma de los hepatocitos a la sangre, infiltración inflamatoria en el hígado que consiste en neutrófilos, macrófagos y células T. Las moléculas efectoras citotóxicas y sus receptores desempeñan un papel clave en el desarrollo de muerte de células hepáticas inducida por ConA. Entre estas moléculas, el sistema de perforina-granzima es esencial para la hepatitis ConA junto con la inducción de moléculas de adhesión intracelular y la afluencia de IFN- $\gamma$  (Watanabe *et al.*, 1996). En este tipo de hepatitis, la producción de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  por las células T activadas es esencial para la lesión hepática.

## **2.2. Funcionamiento hepático**

El hígado es un órgano fundamental, y juega un papel crucial en la absorción de nutrientes del tracto gastrointestinal, almacenamiento de nutrientes, metabolismo, homeostasis, desintoxicación, regulación y tolerancia inmune, síntesis de bilis, proteínas séricas, factores de coagulación y proteínas del complemento del sistema inmune. El hígado concentra muchos antígenos circulantes y toxinas de origen intestinal por lo que el hígado debe tener un mecanismo inmunológico robusto para enfrentar la exposición constante a posibles daños, así, el hígado es considerado como un órgano especialmente inmunológico debido a su enriquecida población de células inmunes residentes, tales como células asesinas naturales (NK), células NKT (llamadas formalmente células pit), células de Kupffer (KC, macrófagos residentes de hígado), células dendríticas (DC), células estrelladas hepáticas (HSC), células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC), células linfoides innatas (ILC), células B, células T y

células de linaje mieloide (Heymann y Tacke, 2016). Los ILC se clasifican claramente como ILC1, ILC2 e ILC3 dependiendo de la producción de citocinas y factores de transcripción implicados en su desarrollo y función. ILC1s producen interferón (IFN- $\gamma$ ) y son dependientes del factor de transcripción T-bet, ILC2s secretan citocinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y anfiregulina y requieren GATA3, e ILC3s producen IL-17 e IL-22 dependiente de la regulación ROR $\gamma$ t (Sonnenberg y Artis, 2015).

El hígado es un órgano con funciones inmunológicas, y debe evitar las reacciones inmunitarias contra antígenos inocuos (tolerancia inmune), y también debe combatir los agentes infecciosos (virus, bacterias, parásitos), para ello, debe inducir respuestas inmunes efectivas (Erhardt y Tiegs, 2010; Karimi *et al.*, 2015). Estas funciones están reguladas y controladas por las células inmunes residentes del hígado al secretar mediadores químicos, tales como quimiocinas (para quimiotaxis, reclutamiento de células inmunes) y citocinas (funciones pro inflamatorias y antiinflamatorias) colectivamente llamado como "microambiente".

Las lesiones hepáticas agudas están moduladas por la interacción de las células inmunitarias, citocinas y células hepáticas parenquimatosas, debido principalmente a que las respuestas inmunes exacerbadas producen inflamación hepática. La hepatitis aguda se define por la muerte de células hepáticas, el desorden celular y la infiltración de células inmunes en el hígado. El tipo de antígeno, la reacción inmunológica, las vías de muerte celular o el modo de muerte de las células hepáticas, determinan el destino del hígado o la inmunopatogenia de las enfermedades hepáticas (aguda frente a crónica) con distintos mecanismos de la enfermedad (Ciocca *et al.*, 2016). Los hepatocitos expresan receptores de muerte, tales como Fas (CD95), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TNFR1 y TNFR2 en su superficie, y las células inmunitarias expresan ligandos de muerte como FasL, TRAIL y TNF- $\alpha$  (Malhi *et al.*, 2010). La interacción de estos ligandos de muerte y receptores de diferentes enfermedades del hígado conduce a la muerte de células hepáticas (apoptosis, necrosis o necroptosis). La apoptosis es un tipo de muerte celular altamente organizada y controlada genéticamente mediada

por distintas vías, extrínseca (dependiente del receptor de muerte) e intrínseca (mitocondrial / dependiente de la liberación de citocromo c). Las características clave de muerte celular apoptótica son: La formación de vesículas en la membrana (presentan contenido celular), contracción de la célula, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, mientras que la necrosis se caracteriza por oncosis (hinchazón), la formación de vesículas de membrana plasmática (desprovistas de orgánulos) y la ruptura de la membrana plasmática acompañada de la liberación completa de constituyentes celulares en el entorno extracelular (Galluzzi *et al.*, 2012).

La necroptosis es una nueva vía de muerte celular en la patología hepática. El término "necrosis programada" o "necroptosis" se describió como una forma de muerte celular mediada por la proteína cinasa interactiva (RIPK) que interactúa con el receptor de muerte, activada por los receptores del factor de necrosistumoral, Fas y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) (Chan *et al.*, 2003). La vía de necroptosis es iniciada por receptores de TNF que dependen principalmente de la activación de RIPK1 / RIPK3, y se identifica como un mecanismo de muerte celular de "respaldo" de apoptosis. La necroptosis está marcada por hinchazón de células y orgánulos, formación extensa de vacuolas intracelulares y ruptura rápida de la membrana plasmática (Vandenabeele *et al.*, 2010).

El hígado, debido a sus múltiples funciones bioquímicas tiene un papel central en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, en la síntesis y degradación de las proteínas plasmáticas y en el almacenamiento de vitaminas y metales (Baynes *et al.*, 2004a). El apropiado almacenamiento y liberación de energía durante los estados de alimentación y ayuno son esenciales para la sobrevivencia, y son controlados principalmente por la acción de la insulina, hormona peptídica de 5.8 KDa secretada por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos o de Langerhans, en respuesta a niveles elevados de carbohidratos en circulación. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo, por ello, en el hígado se favorece su almacenamiento e inhiben su

producción. Además, la insulina regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos, proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/ desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Estas cinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula (Santiel *et al.*, 2001; Avruch, 1998; Reyes *et al.*, 2008).

### **2.3 Especies Reactivas de Oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen a partir de oxígeno molecular como resultado del metabolismo celular normal. Las ROS se pueden dividir en dos grupos: radicales libres y no radicales. Las moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que dan reactividad a la molécula se llaman radicales libres. Cuando dos radicales libres comparten sus electrones no apareados, se crean formas no radicales. Los tres principales ROS que son de importancia fisiológica son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), El radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El anión superóxido se forma mediante la adición de un electrón al oxígeno molecular (Miller *et al.*, 1990). Este proceso está mediado por la nicotina adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H] oxidasa o xantina oxidasa o por el sistema mitocondrial de transporte de electrones. El sitio principal para producir aniones superóxido es la mitocondria, la maquinaria de la célula para producir trifosfato de adenosina. Normalmente los electrones se transfieren a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para la reducción de oxígeno a agua, pero aproximadamente entre 1-3% de todos los electrones se filtran del sistema y producen superóxido. La NAD(P)H oxidasa se encuentra en los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos. Tras la fagocitosis, estas células producen una explosión de superóxido que conduce a la actividad bactericida. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno por la acción de las superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1). El peróxido de hidrógeno se difunde fácilmente a través de la membrana plasmática, y también es producido por la

xantina oxidasa, la aminoácido oxidasa y la NAD(P)H oxidasa (Dupuy *et al.*, 1991; Granger, 1988) y en los peroxisomas por consumo de oxígeno molecular en las reacciones metabólicas. En una sucesión de reacciones llamadas reacciones de Haber-Weiss y Fenton, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede generar radical hidroxilo en presencia de metales de transición, tales como el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ , o anión superóxido respectivamente (Liochev *et al.*, 2002). El radical hidroxilo es el ROS más reactivo y puede dañar las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. También puede iniciar la peroxidación de lípidos tomando un electrón de ácidos grasos poliinsaturados. Las enzimas granulocíticas amplían aún más la reactividad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la peroxidasa eosinófila y la mieloperoxidasa (MPO). En los neutrófilos activados, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es consumido por MPO. En presencia de ion cloruro, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se convierte en ácido hipocloroso (HClO). El HClO es altamente oxidativo y juega un papel importante en la destrucción de los patógenos en las vías respiratorias (Klebanoff, 2005). Sin embargo, el HClO también puede reaccionar con el ADN e inducir interacciones ADN-proteína y producir productos de oxidación de pirimidina y agregar cloruro a las bases del ADN (Whiteman *et al.*, 1997; Kulcharyk y Heinecke, 2001). La eosinófila peroxidasa y la MPO también contribuye al estrés oxidativo mediante la modificación de proteínas por halogenaciones, nitración y enlaces cruzados de proteínas a través de radicales tirosilo (Brennan *et al.*, 2002; Van Dalen *et al.*, 2000). Otros radicales libres derivados del oxígeno son los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). La forma más simple de éstos es el radical hidroperoxilo ( $\text{HOO}\cdot$ ) y tiene un papel en la peroxidación de ácidos grasos. Los radicales libres pueden desencadenar reacciones en la cadena de peroxidación de lípidos al extraer un átomo de hidrógeno de un carbono de cadena lateral para generar un radical lipídico. El radical lipídico reacciona con el oxígeno para producir un radical peroxilo; el cual inicia una reacción en cadena y transforma los ácidos grasos poliinsaturados en hidroperóxidos lipídicos. Los hidroperóxidos lipídicos son muy inestables y se descomponen fácilmente en productos secundarios, como los aldehídos (como el 4-hidroxi-2,3-nonenal) y los malondialdehídos (MDA). Los isoprostanos son otro grupo de productos de la peroxidación lipídica que se generan a través de la peroxidación del ácido araquidónico y también se ha encontrado que están elevados en el plasma y en los condensados respiratorios de los asmáticos (Wood *et al.*, 2000;

Montuschi *et al.*, 1999). La peroxidación de los lípidos perturba la integridad de las membranas celulares y conduce a la reorganización de estructura de la membrana.

### 2.3.1 Compuestos Antioxidantes

El cuerpo humano está equipado con una variedad de antioxidantes que sirven para contrarrestar el efecto de los oxidantes. Para todos los propósitos prácticos, estos se pueden dividir en dos categorías: enzimática y no enzimática. Los principales antioxidantes enzimáticos de los pulmones son superóxido dismutasa SOD (EC 1.15.1.11), catalasa (EC 1.11.1.6) y glutatión peroxidasa GSH-Px (EC 1.11.1.9). Además de estas enzimas principales, otros antioxidantes, incluida la hemooxigenasa-1 (EC 1.14.99.3) y las proteínas redox, como las tioredoxinas (TRX, EC 1.8.4.10), las peroxiredoxinas (PRX, EC 1.11.1.15) y las glutaredoxinas. Dado que el superóxido dismutasa es la ROS primaria producida a partir de una variedad de fuentes, su dismutación por parte de SOD es de primordial importancia para cada célula. Las tres formas de SOD, es decir, CuZnSOD, Mn-SOD y EC-SOD, se expresan ampliamente en el pulmón humano. Mn-SOD se localiza en la matriz de mitocondrias. La EC-SOD se localiza principalmente en la matriz extracelular, especialmente en áreas que contienen altas cantidades de fibras de colágeno tipo I y alrededor de los vasos pulmonares y sistémicos. También se ha detectado en el epitelio bronquial, el epitelio alveolar y los macrófagos alveolares (Kinnula y Crapo, 2003; Kinnula, 2005). En general, se piensa que CuZnSOD y Mn-SOD actúan como eliminadores masivos de radicales superóxido. El nivel relativamente alto de EC-SOD en pulmón con su unión específica a los componentes de la matriz extracelular, puede representar un componente fundamental de la protección de la matriz pulmonar. El  $H_2O_2$  que se produce por la acción de los SOD o la acción de las oxidasas, como la xantina oxidasa se reduce a agua por catalasa y el GSH-Px. La catalasa existe como un tetramero compuesto por cuatro monómeros idénticos, cada uno de los cuales contiene un grupo hemo en el sitio activo. La degradación de  $H_2O_2$  se logra mediante la conversión entre dos conformaciones de catalasa-ferricatalase (hierro coordinado a agua) y compuesto I (hierro con un átomo de oxígeno). La catalasa también se une a NADPH como un equivalente reductor para prevenir la inactivación oxidativa de la enzima (formación del



compuesto II) por el  $H_2O_2$ , ya que se reduce a agua (Kirkman *et al.*, 1999). Enzimas en el ciclo redox responsables de la reducción de  $H_2O_2$  y de hidroperóxidos de lípidos (generados como resultado de la peroxidación lipídica de la membrana) incluyen el GSH-Pxs (Flohe, 1988). Los GSH-Pxs son una familia de enzimas tetraméricas que contienen el aminoácido único selenocisteína dentro de los sitios activos y utilizan tioles de bajo peso molecular, tales como el GSH, para reducir el  $H_2O_2$  y los peróxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes.

Se han descrito cuatro GSHPx, codificados por diferentes genes: GSHPx-1 (GSH-Px celular) es ubicuo y reduce el  $H_2O_2$  y los peróxidos de ácidos grasos, pero no los lípidos de peroxilo esterificados. Los lípidos esterificados se reducen por GSH-Px-4 unido a la membrana (Hidroperóxido de fosfolípido GSH-Px), que puede utilizar varios tioles diferentes de bajo peso molecular como equivalentes reductores GSH-Px-2 (GSH-Px gastrointestinal) que se localiza en células epiteliales gastrointestinales donde sirve para reducir los peróxidos de la dieta (Chu *et al.*, 1993). GSH-Px-3 (GSH-Px extracelular) es el único miembro de la familia GSH-Px que reside en el compartimento extracelular y se cree que es una de las enzimas antioxidantes extracelulares más importantes en los mamíferos. De estos, el GSH-Px extracelular se investiga más ampliamente en el pulmón humano (Comhair *et al.*, 2001). Además, la eliminación de  $H_2O_2$  está estrechamente relacionada con varias enzimas que contienen tiol, por ejemplo, TRXs (TRX1 y TRX2), reductasas de tiorredoxina (EC 1.8.1.9) (TRR), PRX (que son las peroxidases de tiorredoxina) y glutaredoxinas (Gromer *et al.*, 2004).

## **2.4 Marcadores de Funcionamiento Hepático**

En el metabolismo de los aminoácidos, los grupos amino de la  $\alpha$ -aminoácido que constituyen las proteínas se eliminan durante la degradación oxidativa. Pueden ser utilizados para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados, o pueden ser excretados (Álvarez-Martínez, 2005). La eliminación de los grupos  $\alpha$ -amino está catalizada por enzimas denominadas transaminasas, las cuales realizan reacciones de transaminación, esto es, de transferencia de los grupos amino al

carbono  $\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato, dejando un cetoácido análogo. En esta reacción se desamina el aminoácido y se amina el  $\alpha$ -cetoglutarato, por lo que no hay pérdida de grupos amino. (Nelson *et al.*, 2005).

La aspartato aminotransferasa (AST), es una enzima bilocular pues se encuentra localizada tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial, ampliamente distribuida en músculo esquelético, riñón, cerebro y principalmente en hígado y corazón, donde está en mayor concentración. Cualquier alteración en estos tejidos, se verá reflejado en un aumento en el torrente circulatorio de esta enzima, y será directamente proporcional al daño tisular. En pacientes con afecciones hepáticas se observan las mayores elevaciones de AST, sobre todo en casos de hepatitis con necrosis (Doñate *et al.*, 2000; Baynes *et al.*, 2004b).

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima unilocular que tiene como única localización el citoplasma, su mayor actividad la presenta en el tejido hepático y la menor en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos. Por lo tanto, la destrucción o cambio en la permeabilidad de membrana celular provoca la liberación de ALT a la circulación sanguínea. Su aumento se debe principalmente a alteraciones hepática como colestiasis, hepatitis tóxicas o virales. Los niveles séricos de ALT, muestran variaciones nocturnas y pueden cambiar día con día, así como por efecto del ejercicio (Siest *et al.*, 1975).

Cualquier lesión del hígado que produzca histólisis y necrosis causa la liberación de enzimas, entre ellas la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). La medición de estas enzimas hepáticas en suero se usa para evaluar la extensión del daño hepático y para diferenciar la patología hepatocelular (funcional) de la obstructiva (mecánica). La vida media de las enzimas hepáticas es de 63 h para ALT y 18 h para AST (Reichling *et al.*, 1988).

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima ampliamente distribuida en varios tejidos incluyendo el hígado, hueso, riñón, intestino y la placenta, cada uno de estos sitios contiene una isoenzima diferente, estas se encargan de hidrolizar los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino. En el hígado se encuentra en la superficie

canalicular y por tanto es un marcador de disfunción. La actividad sérica de fosfatasa alcalina ósea, en condiciones normales, alcanza su mayor actividad en los niños en edad de crecimiento (llegando a triplicar los niveles del adulto) debido a que esta isoenzima se localiza en los osteoblastos (relacionados con la calcificación y formación de estructuras óseas). También se produce al final del primer trimestre del embarazo, a expensas de la isoenzima placentaria que en este período alcanza niveles máximos (aproximadamente el doble de los valores normales). Entre las patologías que afectan la actividad sérica de fosfatasa alcalina, se pueden citar: carcinomas metastásicos en hígado y en hueso (productores de enzima), colestasis biliar, fenómenos osteoblásticos, trastornos de malabsorción acompañados de lesiones ulcerosas, lesiones en vías de reparación tales como infarto agudo de miocardio, infarto pulmonar o renal y en la cirrosis (Daza *et al.*, 2008).

Por último la bilirrubina es un tetrapirrol producto catabólico del grupo hemo, aproximadamente 75% deriva de la hemoglobina de los eritrocitos viejos que son fagocitados por células mononucleares provenientes de médula ósea (Baynes *et al.*, 2004b). La estructura en anillo del grupo hemo se escinde oxidativamente para formar biliverdina por la hemooxigenasa (un citocromo), y a su vez, la biliverdina es reducida enzimáticamente a bilirrubina, que finalmente es excretada en la bilis. El incremento de la bilirrubina en plasma (hiperbilirrubinemia) indica anomalías hepáticas, tales como la bilirrubina total: aumento de hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas; y la bilirrubina directa, que indica colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas (Kaplan *et al.*, 1984).

## **2.5 Metabolitos en las plantas**

Las plantas son una fuente importante para aislar compuestos bioactivos para uso directo, o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y menor toxicidad. En la

actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta (Kumar, 2004).

Las plantas en su defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, producen metabolitos secundarios (MS), muchos de los cuales actúan contra la herbívora, y pueden presentar actividad antimicrobiana, antioxidante y otras. Los MS son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas al ambiente, sino también, favorecen el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, atracción de insectos polinizadores, dispersores de las semillas y frutos.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999).

Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, ciclo de Krebs o vía del shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de MS puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también metabolitos que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, por ejemplo, a través de su redistribución por xilema y floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999).

La biosíntesis y el almacenamiento de MS, o de sus precursores, ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; por ejemplo, esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas, tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999). De acuerdo a Croteau *et al.* (2000), los metabolitos

secundarios se dividen en tres grupos; los terpenoides, compuestos fenólicos, y los compuestos nitrogenados o alcaloides (Figura 1).

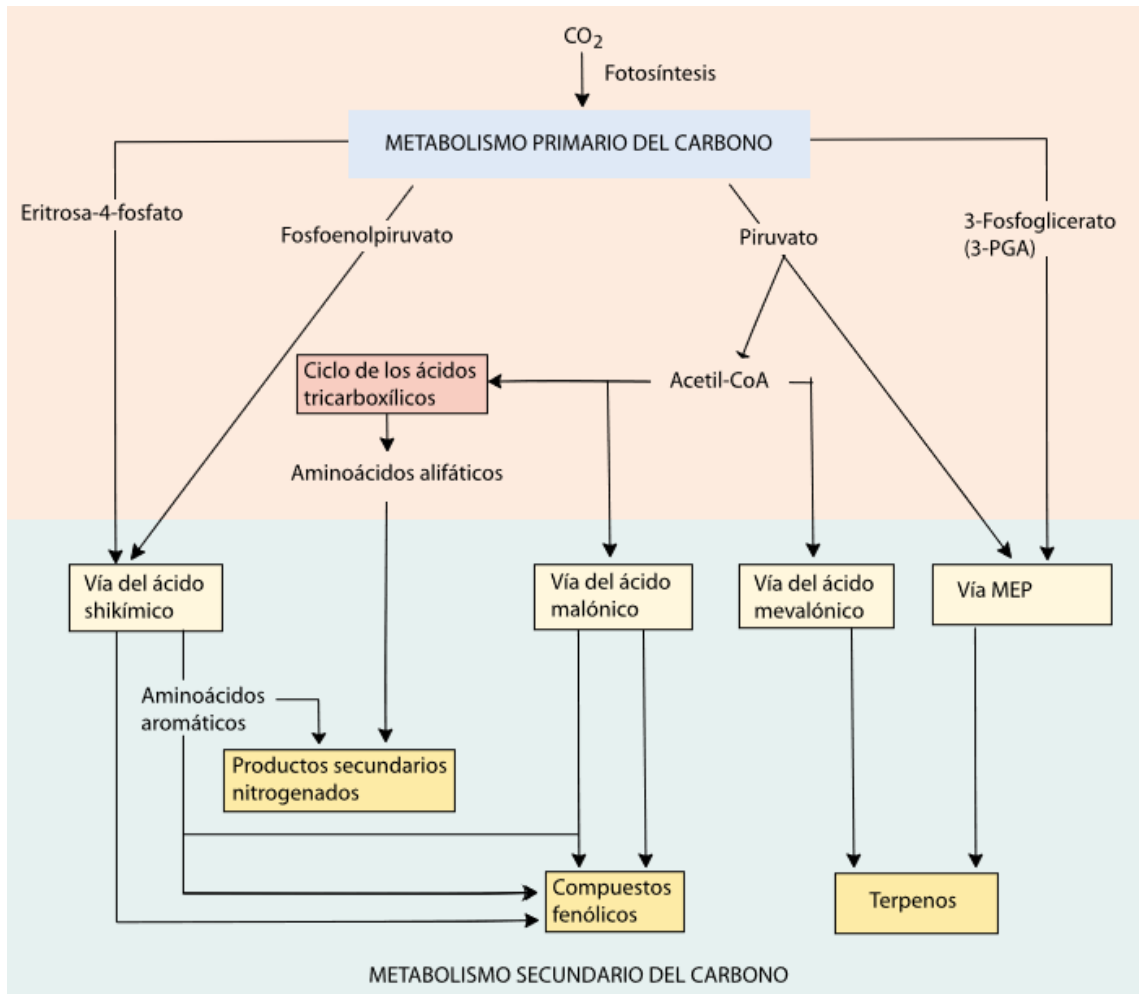


Figura 1 Vías del metabolismo secundario de las plantas que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos, y terpenoides. También se muestra su relación con el metabolismo primario (Tomado de Taíz, 2006).

Todos los **terpenoides**, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25000 metabolitos secundarios, se derivan del compuesto IPP (Isopentenil difosfato) que se forma en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de

metabolitos con actividad biológica importante (Threlfall, 1971). Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. Unos pocos, como los que forman los aceites esenciales, están restringidos a algunas plantas. Los **compuestos fenólicos**, tales como los fenilpropanoides y sus derivados, incluyen más de 8000 compuestos conocidos, y están formados por la vía del ácido shikímico, o por la vía del malonato/acetato. Los **compuestos nitrogenados o alcaloides**, suman cerca de 12000 compuestos que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen gran diversidad de estructuras químicas (Robinson, 2012). Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina.

### **2.5.1 Las plantas como alternativa terapéutica**

Durante siglos, el uso de plantas con propiedades medicinales ha sido una opción para recuperar y mantener la salud, aproximadamente 80% de la población mundial depende de las plantas y sus componentes activos, los cuales se aplican directamente, o después de ser sintetizadas o modificadas para tener una óptima actividad farmacológica (Balunas *et al.*, 2005; Setzer *et al.*, 2003; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos, por ejemplo, son fitoquímicos naturales derivados principalmente de la fenilalanina y menos a menudo de la tirosina, y están ampliamente presentes en los alimentos y los nutracéuticos (Shaadi, 2004). Químicamente, tienen una estructura diversa, pero pueden definirse como sustancias que poseen al menos un anillo aromático que lleva, uno o más grupos hidroxilo. De acuerdo con el número de anillos aromáticos hidroxilados y el tipo funcional, los compuestos fenólicos se pueden clasificar simplemente como ácidos fenólicos, polifenoles, o monofenoles. Sin embargo, también existe una gran variedad de derivados fenólicos que incluyen fenoles simples, fenilpropanoides, derivados de ácido benzoico, flavonoides y estilbenos en plantas y alimentos. Además, muchos compuestos fenólicos se polimerizan en moléculas más grandes, tales como los taninos condensados (proantocianidinas), lignanos y ligninas (Weng y Yen, 2012).

## 2.6. Genero *Sechium*

Un grupo de plantas importantes por sus cualidades alimenticias, son las cucurbitáceas, y de entre ellas, resalta el género *Sechium* P. Browne, endémico de Mesoamérica, región donde México, posee la mayor parte de las especies. El género esta constituido por las especies silvestres, *S. chinantlense* Lira & F. Chiang, *S. compositum* (Donn. Sm.)C. Jeffrey, *S. hintonii* (Paul. G. Wilson) C. Jeffrey, *S. talamancense* (Wunderlin) C. Jeffrey, *S. panamense* (Wunderlin) Lira & F. Chiang, *S. pittieri* (Cogn.) C. Jeffrey, *S. venosum* (L.D. Gómez) Lira & F. Chiang y *S. villosum* (Wunderlin) C. Jeffrey, y dos cultivadas; *Sechium tacaco* (Pittier) C. Jeffrey, y *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Lira, 1996). Con distribución de México hasta Panamá (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007).

De las especies cultivadas, la de mayor importancia es *S. edule*, principalmente por su valor alimenticio, y se conocen popularmente como chayotes. En general las especies de *Sechium*, son plantas trepadoras, perennes y monoicas. Los frutos crecen bien Individualmente o en parejas en un pedúnculo compartido, son carnosos o carnosofibrosos, puede tener crestas longitudinales o surcos, y diferentes formas (globosa, ovoide, subovoide, piriforme). Los colores van desde el verde oscuro hasta verde claro (Lira *et al.*, 1999), y se registran frutos de sabor amargo, neutro y ligeramente dulce (Cadena *et al.*, 2007). Por sus fuertes rasgos de domesticación y de especialización adaptativa al ambiente, *S. edule* registra la variación biológica más diversa, la cual, y a través de estudios morfoestructurales, bioquímicos y genéticos, se ha clasificado en grupos varietales (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007; 2008; 2011; Avendaño, 2010), denominados *S. edule var. albus minor*, *var. albus dulcis*, *var. albus levis*, *var. albus espinosum*, *var. nigrum minor*, *var. nigrum conus*, *var. nigrum levis*, *var. nigrum xalapensis*, *var. nigrum espinosum*, *var. nigrum máxima*, *var. virens levis*, y *var. amarus sylvestris*.

Los frutos y semillas de chayote son ricos en varios aminoácidos importantes, tales como el ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina y valina. (Lira, 1996; Salama *et al.*, 1986; Flores, 1989). Ocho flavonoides, incluyendo tres C-glicosilo y cinco O-glicosil flavonas (Siciliano *et al.*, 2004; Salazar-Aguilar *et al.*, 2017), además de 20 giberelinas identificadas en extractos de sus semillas (Albone *et al.*, 1984). Las hojas se han utilizado en el tratamiento de la arteriosclerosis e hipertensión, y para disolver los cálculos renales (Kamble *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2000; Abdelnour *et al.*, 2002). Recientemente se ha reportado que el extracto en etanol de los frutos de *S. edule* administrado a ratas Wistar a las cuales se les indujo diabetes con aloxano (fármaco que daña las células beta-pancreáticas), presenta actividad hipoglucemiante (Maity *et al.* 2013). Por otro lado Firdous *et al.*, (2012) reporta que diferentes fracciones del extracto en etanol de los frutos de *S. edule* administrado a ratas Wistar a las que se les indujo daño hepático mediante CCl<sub>4</sub> disminuyen la concentración de enzimas indicadoras de lesión hepática (ALT, AST y FA). Mientras que Neereja (2015) describe la actividad cardioprotectora de los extractos en etanol de los frutos de *S. edule* los cuales administró previamente a ratas Wistar a las que indujo infarto al miocardio con isoproterenol, los cortes histológicos mostraron menor daño en el tejido cardíaco de los ratones tratados con chayote.

Dada la variación biológica del complejo infraespecífico de *S. edule*, se presume que tengan actividad biológica diferencial, por ejemplo, Cadena-Iñiguez *et al.* (2013) registraron en ocho variedades efecto citotóxico diferencial en diferentes líneas celulares de cáncer, destacando que los grupos varietales (*albus dulcis*, *albus levis*, *amarus silvestris*, *nigrum spinosum* y *nigrum xalapensis*) inhiben la línea celular leucémica monocítica de ratón p388 y células de fibrosarcoma pulmonar de ratón L929, mientras que *nigrum spinosum* mostró un efecto antiproliferativo contra las células de la línea celular de cáncer cervical humano HeLa y L-929, de igual forma inhibe la viabilidad de WEHI-3 (línea celular leucémica mielomonocítica de ratón) (Aguñiga-Sánchez, 2013). Finalmente Parra *et al.*, (2018) reportó diferencias en cuanto al perfil antioxidante de tres variedades de *S. edule* donde se destaca que la variedad 845 muestra el mejor perfil antioxidante *in vitro*, sin embargo el mismo estudio mostro en



ratas Sprague Dawley, que la variedad 853 en las dosis más altas regula la peroxidación lipídica.

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es conocido que altos niveles de radicales libres, crean estrés oxidativo, lo que conduce a una variedad de productos bioquímicos en forma de radicales que provocan lesiones fisiológicas y con frecuencia genera deterioro metabólico y muerte celular (Beckman, 1998). El consumo de productos alimenticios que contienen antioxidantes en particular, flavonoides y polifenoles, es favorable para la salud humana (Cao *et al.*, 1996; Pulido *et al.*, 2000), ya que pueden proteger el cuerpo de los radicales libres y retrasan el progreso de muchas enfermedades incluyendo las crónicas. Además, muchas funciones biológicas, como antimutagenicidad, antitumoral y antienvjecimiento, provienen de dicha propiedad antioxidante (Cook y Samman, 1996; Ramos *et al.*, 2003; Yen y Chen, 1995; Yen *et al.*, 2001). Se ha descrito que los compuestos fenólicos pueden proteger al hígado del efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluso que frutos de *Sechium edule* tiene actividad hepatoprotectora (Firdous *et al.*, 2012), sin embargo, no se señala cuál de los 12 grupos varietales conocidos es el empleado en estos estudios. El grupo de Investigación en *Sechium edule* en México (GISEM), además de los 12 grupos varietales, ha generado híbridos, entre ellos el híbrido de *Sechium* HD-Víctor. Se ha descrito que *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* contiene flavonoides y ácidos fenólicos, pero se desconoce si este genotipo o el híbrido de *Sechium* HD-Víctor puedan presentar algún efecto hepatoprotector en ratones con inducción de daño hepático.

### **4 HIPÓTESIS**

El hígado como principal órgano del metabolismo está en constante exposición a especies reactivas de oxígeno. Debido a que los compuestos fenólicos contenidos en

*Sechium* presentan alta actividad antioxidante, se espera que los extractos en metanol de los frutos de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* y el híbrido de *Sechium* HD-Víctor ejerzan un efecto hepatoprotector.

## 5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto en metanol de los genotipos *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor, a partir de frutos en madurez hortícola.

### 5.1 Objetivos particulares

- Obtener extractos en metanol de frutos de los genotipos *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor, y confirmar el contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y cucurbitacinas por HPLC presentes.
- Evaluar el efecto hepatoprotector de los extractos en metanol de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor, contrastado con un reconocido hepatoprotector como el ácido gálico, mediante concentraciones séricas de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA).
- Evaluar índice hepático de ratones tratados con extracto en metanol de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor o ácido gálico.
- Evaluar parámetros hematológicos de ratones tratados con extracto en metanol de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor o ácido gálico.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

Se utilizaron frutos frescos en madurez hortícola ( $18 \pm 2$  días después de anthesis) (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007), de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, e híbrido HD-Víctor (Figura 2), procedentes del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium* en México. Los frutos fueron cosechados en el año 2011. Las condiciones ambientales y de suelo, fueron homogéneas para ambos genotipos, y responden a las reportadas por Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011). Los frutos se lavaron, secaron, pesaron y cortaron en hojuelas incluyendo exocarpo, mesocarpo, espinas y semilla. Posteriormente fue secado a 40°C en un horno con circulación de aire (BLUE-M, Electronic Company/Blue Island, Illinois, USA) hasta deshidratación completa. Finalmente, los frutos secos fueron molidos a un tamaño de partícula de 2 mm.

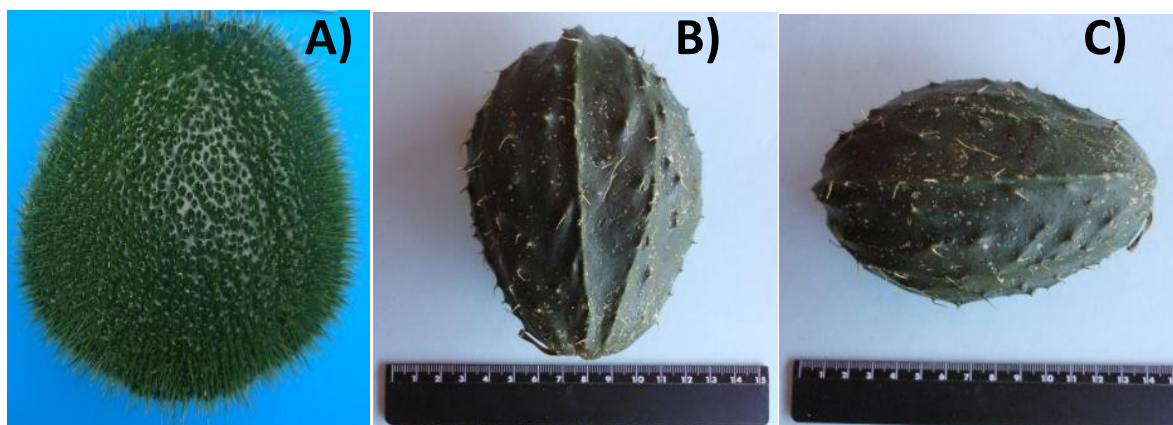


Figura 2. A: Frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. B: Frutos del híbrido intraespecífico HD-Víctor, obtenido por cruzamiento entre *Sechium compositum* x *Sechium edule* var. *nigrum xalapensis*.

### 6.2 Extracción

El peso del fruto fresco inicial fue de 80 kg para *nigrum spinosum* y 15 kg para HD-Víctor. Una vez seco el material vegetal, se obtuvieron rendimientos en base seca de 5.24 kg y 1.56 kg respectivamente de cada genotipo. Se realizó una extracción química discontinua para cada uno con una muestra de 1.5 kg del material molido macerado en

metanol a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), después de este tiempo se hizo cambio de solvente, para ello se filtró con papel whatman No.1 y se evaporó en un rotaevaporador (IKA® RV10, automático/BUCHI R-114 Equipan, S.A. de C.V., Switzerland) a  $45^\circ\text{C}$  para concentrar y recuperar el extracto. Este procedimiento se repitió aproximadamente 25 veces hasta que el solvente no mostró color (Che *et al.*, 1985; Afifi *et al.*, 1999; Cadena-Iñiguez, 2005). Los extractos obtenidos se mantuvieron en frascos ámbar a temperatura ambiente.

### **6.3 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).**

Se pesaron 40 mg de cada extracto y se diluyeron en 2 mL de metanol grado HPLC (Sigma-Aldrich, USA), los cuales fueron filtrados por una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millipore Irlanda) y puestos en viales de HPLC. Las muestras se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para cada extracto y cada grupo de metabolitos. Las cucurbitacinas fueron analizadas en una Columna Symmetry Shield C18 ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ) (Waters, España), por análisis Isocrático, en disolventes agua: metanol: acetonitrilo (50:30:20); flujo  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; presión 179 bares; temperatura  $25^\circ\text{C}$ , volumen de inyección:  $20 \mu\text{L}$ ;  $\lambda_1$  235 nm,  $\lambda_2$  254 nm y tiempo de análisis 60 min. Se usó como estándares de referencia cucurbitacina E, I, B y D (Sigma-Aldrich, USA). En el caso de los ácidos fenólicos se analizaron en una columna Nucleosil 100 A<sup>o</sup> ( $125 \times 4.0 \text{ nm}$ ) Hawlet Packard. En un sistema binario A: H<sub>2</sub>O pH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) B: ACN (acetonitrilo). Flujo  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; presión 106 bares, temperatura  $30^\circ\text{C}$ ; volumen de inyección:  $20 \mu\text{L}$ ;  $\lambda_1$  280 nm, tiempo de análisis 30 min. Los estándares fueron el ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *p*- hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido vainílico, ácido clorogénico y ácido siríngico. En el caso de los flavonoides, primero se hizo una hidrólisis de las muestras, se incubaron a  $70^\circ\text{C}$  por una hora y se dejaron enfriar para realizar el análisis en una columna Hypersyl ODC ( $125 \times 40 \text{ mm}$ ) Hawlet Packard, en un sistema binario A: H<sub>2</sub>O PH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) B: ACN (acetonitrilo). Flujo  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; presión 106 bares; volumen de inyección  $5 \mu\text{L}$ :  $\lambda_1$  316 nm,  $\lambda_2$  365 nm y  $\lambda_3$  254 nm a temperatura

30°C y tiempo de análisis de 25 min. Los estándares utilizados fueron rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, floretina, apigenina y galangina.

#### **6.4 Preparación del extracto**

Los extractos obtenidos bajo las condiciones descritas, fueron pesados y disueltos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), para ser esterilizados por luz UV 280 nm durante 20 min y almacenados a 4°C hasta su administración.

#### **6.5 Manejo de ratones**

Ratones (*Mus musculus* L.) de la cepa CD-1 hembras y machos de 2 a 3 meses de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, fueron utilizados, y se mantuvieron con un ciclo de luz oscuridad de 12 h, temperatura promedio de 22°C, agua estéril y alimento estándar. Los bioensayos se realizaron bajo las condiciones de bioterio establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

#### **6.6 Tratamiento de ratones para obtener la dosis letal media (LD<sub>50</sub>)**

Ratones hembras y machos (n=6 ratones por dosis) fueron tratados por vía intraperitoneal con los extractos de ambos genotipos de *Sechium*, con una sola administración a dosis de 0, 8, 16, 40, 60, 160, 400, 600, 1600, 2900 y 5000 mg kg<sup>-1</sup>, tal como lo establece Lorke, (1983) para determinar la dosis letal media, se dio un seguimiento continuo por 24 h en las que se evaluó la supervivencia, sistemas visibles como piloerección, espasmos musculares, diarrea y postración. Posteriormente se mantuvieron en condiciones normales durante 7 d para evaluar su comportamiento.

#### **6.7 Tratamiento de ratones modelo de daño hepático**

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa CD/1 (n= 6 por tratamiento). Para el establecimiento del daño hepático, fueron tratados por vía subdérmica con

tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) al 10 % en PBS por 10 d cada 24 h, posteriormente se les administró vía intraperitoneal el extracto en metanol de ambos genotipos de *Sechium* bajo el siguiente esquema: Ratones sanos: basal (ratones sin tratamiento), vehículo (PBS), ácido gálico ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), extracto en metanol de *nigrum spinosum* ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y extracto en metanol de HD-Víctor.

Ratones con inducción de daño hepático: basal (ratones sin tratamiento), Control (ratones con  $\text{CCl}_4$ ), Vehículo ( $\text{CCl}_4$ + PBS), *nigrum spinosum* ( $\text{CCl}_4$  + 250, 500 y 1000  $\text{mg kg}^{-1}$ ), y para el híbrido HD-Víctor ( $\text{CCl}_4$  + 8, 50, 125  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y como control de hepatoprotección ácido gálico ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cada 48 h durante 20 días.

### **6.7.1 Recolección de muestras de sangre**

Al término del tratamiento (15 días), y 24 h después de la última dosis, los ratones fueron anestesiados con  $6.3 \text{ mg kg}^{-1}$  pentobarbital sódico (PISA, México) administrado vía intraperitoneal, una vez sedados se realizó la extracción de sangre por plexo axilar y se recolectó la sangre en tubos vacutainer con gel de separación (BD, USA) y tubos con heparina sódica (BD,USA); después de la recolecta los tubos con gel de separación se incubaron durante 10 min a 2000 rpm para separar el suero del paquete globular, el suero fue recuperado para analizar glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA), mediante un analizador automático de bioquímica clínica (Selectra junior ). El tubo con heparina sódica fue analizado por un contador hematológico automatizado Micros ABX 89, para el análisis de glóbulos blancos totales (WCB), glóbulos rojos totales (RCB), Hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), hemoglobina corpuscular media (HCMC), volumen corpuscular medio (VCM), plaquetas (PLT), así como el conteo diferencial de linfocitos, granulocitos y monocitos.

### **6.7.2 Glucosa**

Con estuche comercial para la determinación de glucosa (método de la glucosa oxidasa, Randox laboratorios Ltd, UK, GL 2614). Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de suero y se mezcló con 1 mL de RX6 (ver Anexo) incubando por 5 min a  $37^\circ\text{C}$  y se leyó a 500 nm.

La glucosa se determina después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El  $H_2O_2$  formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina rojo-violeta (Kumar *et al.*, 2005; Diré *et al.*, 2006; Diré *et al.*, 2007a).

### **6.7.3 Urea**

Estuche comercial para la determinación de urea (Randox Laboratorios Ltd, Uk UR 107). Se tomaron 10  $\mu$ L de suero y se mezcló con 1 mL de RX1 (ver Anexo) se leyeron a 600 nm. El método se basa en la ureasa-Berthelot modificado donde iones amonio producidos por acción enzimática, reaccionan con salicilato e hipoclorito sódico para formar un complejo verde (Patton *et al.*, 1977; Mansour *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005).

### **6.7.4 Creatinina**

Estuche comercial para la determinación de creatinina (Randox Laboratorios CR510). Se tomaron 200  $\mu$ L de suero y se mezcló con 2 mL de RX2 (ver anexo) se leyó a la absorbancia "A1" a 490-510 nm a los 30 s. Exactamente después de 2 min se tomó una segunda lectura la absorbancia "A2" a la misma longitud de onda. La creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo de color amarillo, en cantidad proporcional a la concentración de creatinina (Bartels *et al.*, 1972; Mansour *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

### **6.7.5 Ácido úrico**

Estuche comercial para la determinación de ácido úrico. Método enzimático colorimétrico (Randox laboratorios Ltd. UK UA 230). Se tomaron 20  $\mu$ L de suero y se mezcló con 1 mL de RX3 (ver Anexo) se leyó a 520nm. El ácido úrico presente en la muestra se cataliza por la uricasa en alantoina y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual a su vez oxida al ácido 3,5-dicloro-2-hiroxibencenosulfónico y la 4-aminofenazona para formar un compuesto de quinoneimina de color rojo violeta (Kumar *et al.*, 2005; Diré *et al.*, 2007b).

### 6.7.6 Aspartato aminotransferasa (AST)

Estuche comercial para la determinación de AST (Randox laboratorios Ltd, UK, AS 1202). Se tomaron 100 µL de suero y se mezcló con 1 mL de RX7 (ver Anexo) se leyó a 340 nm al tiempo cero y al cabo de 1, 2 y 3 min. AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α-oxoglutarato con formación de glutamato y oxaloacetato. El oxaloacetato es reducido a malato en presencia de deshidrogenasa NADH (método cinético UV. IFCC) (IFCCSC, 1980; Kumar *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

### 6.7.7 Alanina aminotrasferasa (ALT)

Estuche comercial para la determinación de ALT (Randox laboratorios Ltd, UK, AL 1200). Se tomaron 100 µL de suero y se mezcló con 1 mL de RX8 (ver anexo) se leyó a 340 nm al tiempo cero y a los 1, 2 y 3 min. ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α-oxoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato es reducido a lactato en presencia de deshidrogenasa NADH (método cinético UV. IFCC) (IFCCSC, 1980; Kumar *et al.*, 2005; Karadeniz *et al.*, 2011).

### 6.7.8 Fosfatasa alcalina (ALP)

Estuche comercial para la determinación de a fosfatasa alcalina (ALP) (Randox laboratorios Ltd, UK, AP 542). Se tomaron 10 µL de suero y se mezcló con 0.50 mL de RX9 (ver anexo) se leyó a 405 nm al tiempo cero y a los 1, 2 y 3 min. La ALP cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina.

### 6.7.9 Determinación de Índice hepático

Previamente al sacrificio, los ratones fueron pesados y el valor fue registrado, posteriormente se extrajo el hígado se pesó y se calculó el índice hepático, como el cociente del peso del órgano entre el peso corporal.



#### **6.7.10 Análisis estadístico**

Se realizaron tres experimentos independientes. Se calcularon las medias descriptivas de los datos cuantitativos (media, desviación estándar), y se realizó un análisis de comparación de medias a través de la prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%, seguido de una prueba de rangos múltiples Tukey  $p < 0.05$ . Para el análisis se utilizará el paquete estadístico SPSS. La supervivencia fue reportada con graficas Kaplan-Meier y la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) se calculó mediante un análisis Probit, se usó el paquete estadístico SPSS 18.0

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención de extractos vegetales

El rendimiento del extracto fue mayor en los frutos de HD-Víctor de 14.8%, mientras que para frutos de *nigrum spinosum* se registró un rendimiento de 6.65%, debido principalmente a menor contenido de agua y mayor de porcentaje de materia seca en HD-Víctor (Cuadro 1). Uno de los progenitores del híbrido es *S. compositum*, el cual ha registrado rendimientos de hasta 8.60% (Aguñiga-Sánchez, 2013), otros genotipos, tal como Perla Negra®, cuyos parentales son *S. edule* var. *nigrum minor* y *S. edule* var. *amarus sylvestris* registró un rendimiento de 7.48 % (Salazar-Aguilar *et al.*, 2017), mientras que el híbrido H-387 (*S. edule* var. *virens levis* y *S. edule* var. *amarus sylvestris*) fue de 7.59% (Aguñiga-Sánchez, 2017). El hecho de que los híbridos presenten mayor rendimiento que los progenitores, se puede deber al vigor híbrido producto de la heterosis, donde un carácter en la progenie se ve más fortalecido teniendo como base los límites de expresión manifestado por sus progenitores (May *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Rendimiento en peso seco y extracto de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor, a partir de frutos en madurez hortícola.

Variable	<i>S. edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i>	HD-Víctor
Peso fresco (kg)	80	15
Peso seco (kg)	5.24	1.56
Agua (%)	93.44	89.60
Rendimiento de materia seca (%)	6.55	10.40
Rendimiento del extracto (%)	6.65	14.8

## 7.2 Identificación de metabolitos secundarios

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del extracto de HD-Víctor, mostró presencia de flavonoides (Figura 3 A-B) cucurbitacinas y ácidos fenólicos (Figura 3 C-D). En el grupo de flavonoides se identificó a rutina, miricetina, quercetina, narigenina, galangina y apigenina, mientras que los ácidos fenólicos se registraron al ácido gálico, clorogénico, siríngico, vainílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y *p*-cumarínico, además de presencia de cucurbitacinas D, I, B, y E.

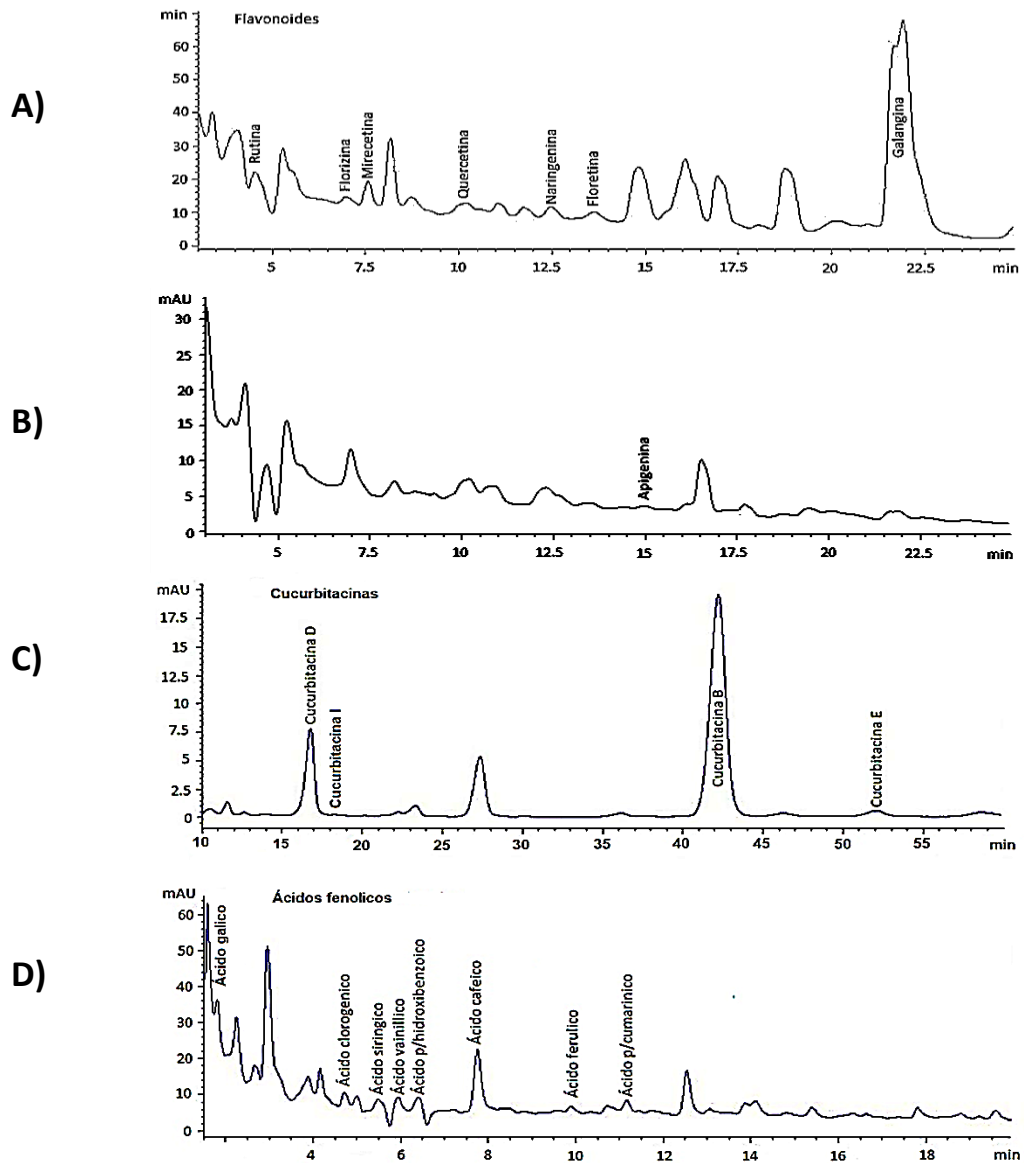


Figura 3. Cromatogramas A: Flavonoides. C-D: Cucurbitacinas y ácidos fenólicos presentes en el extracto del híbrido HD-Víctor.

En la composición fitoquímica de *nigrum spinosum*, se reporta la presencia de las cucurbitacinas B, D e I, además de compuestos fenólicos, tales como el ácido gálico, clorogénico, vainílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico y *p*-cumarico, además de los flavonoides florizidina, naringenina, floretina y apigenina (Aguñiga-Sánchez *et al.*, 2017). Otro genotipo de *S. edule*, como Perla Negra, registró un contenido de cucurbitacinas D, I, B, y E, además de rutina, mirecetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina y apigenina (Salazar-Aguilar *et al.*, 2017). De forma semejante, el híbrido H-387 registró cucurbitacinas D, I, B, y E, además de rutina, florizidina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina y apigenina, resaltando, por ejemplo, que en las tres variantes mejoradas (HD-Víctor, Perla Negra y H-387) se identificaron las cucurbitacinas B y E, mientras que *S. edule var. nigrum spinosum*, una especie domesticada no registró cucurbitacina E, lo cual puede sugerir que la heterosis puede mejorar ciertas características nutracéuticas (Escorcía *et al.*, 2010), toda vez que las cucurbitacinas B y E han demostrado capacidad antioxidante y la eliminación de radicales libres de los glucósidos de éstas, lo cual sugiere un potencial prometedor de los glucósidos de cucurbitacina en la prevención de enfermedades humanas que involucran radicales libres y daño oxidativo, tal como la lesión hepática (Tannin *et al.*, 2007). Los rendimientos en cuanto a flavonoides para rutina, mirecetina, quercetina, naringenina, galangina, apigenina fueron de 4.7007, 4.4065, 0.9730, 13.7577, 302.55 y 1.1306 mg·kg<sup>-1</sup> respectivamente, haciendo un total de 327.5196mgg<sup>-1</sup>. Dentro de los ácidos fenólicos se cuantificaron para los ácidos gálico, clorogénico, siringico, vainílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y *p*-cumarinico, las cantidades de 0.048, 8.9478, 0.3388, 0.5598, 0.4887, 1.3117, 0.1380 y 0.0477 mg g<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que para las cucurbitacinas D, I, B, y E, el contenido fue de 7.7201, 0.0086, 5.9089, 0.3283 mg g<sup>-1</sup> respectivamente, haciendo un total de éstas últimas de 48.1441 mg g<sup>-1</sup>.

Aguñiga-Sánchez, 2017, reportó para *nigrum spinosum* concentraciones de florizidina, naringenina, floretina y apigenina de 0.005, 1.556, 0.018 y 0.290 mg g<sup>-1</sup> respectivamente de extracto, mientras que en el híbrido H-387®, se encontraron; rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina y apigenina con concentraciones de 1.273, 0.0168, 0.889, 0.005, 3.304, 4.616, 21.940 y 0.362 mg g<sup>-1</sup> de extracto, respectivamente. Otro genotipo importante de *S. edule*, Perla Negra®

Salazar-Aguilar *et al.* (2017) registró presencia de rutina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina y apigenina con concentraciones de 0.00034, 0.00185, 0.00025, 0.00226, 0.00472, 0.00043 y 0.00018 mg g<sup>-1</sup>.

Al comparar los frutos de híbridos se observa que las concentraciones son menores en el cultivar perla negra y similares a *nigrum spinosum*, mientras que los híbridos H-387 y HD-Víctor, tienen mayor diversidad y concentración de flavonoides en sus frutos, resaltando que HD-Víctor registra concentraciones diez veces mayores que H-387. Esto es relevante debido a que los flavonoides registran actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. Datos de ensayos *in vitro*, indican que los flavonoides pueden modular la respuesta inflamatoria, interfiriendo en las principales vías de señalización intracelular (es decir, NFκB, MAPK) y disminuyendo la producción de interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) (Elberry *et al.*, 2014). Los flavonoides también presentan actividad antioxidante y antibacteriana, varios flavonoides, incluyendo apigenina, galangina, flavona y gluconidos de flavonol, isoflavonas, flavanonas y chalconas, con una potente actividad antibacteriana, la cual podría deberse a interacciones moleculares que inducen la inactivación de proteínas microbianas, como las adhesinas o proteínas de transporte de membrana, alterando la permeabilidad e interfiriendo con el crecimiento celular (Cardona *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). En cuanto la actividad antioxidante los mecanismos pueden incluir la supresión de la formación de ROS (por inhibición de enzimas o por quelación de elementos traza involucrados en la generación de radicales libres), barrido de ROS y regulación positiva o protección de las defensas antioxidante (Mishra *et al.*, 2013; Halliwell y Gutteridge, 2015). La acción de los flavonoides involucra la mayoría de los mecanismos mencionados anteriormente, la quercetina en particular es conocida por sus propiedades quelantes y de estabilización del hierro (Van Acker *et al.*, 1996).

Las concentraciones de ácido gálico, clorogénico, vainílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico y *p*-cumarínico (0.072, 0.823, 0.032, 0.020, 0.091 y 0.032 mg g<sup>-1</sup> de extracto, respectivamente) descritas para *nigrum spinosum* y ácido gálico, clorogénico, siringico, vainílico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y *p*-cumarínico (0.056, 4.224, 0.016, 0.087, 0.084, 0.187, 0.064 y 0.029 mg g<sup>-1</sup> de extracto, respectivamente) para el híbrido

H-387 y perla negra (Aguñiga-Sánchez, 2017), evidencian que el híbrido HD-Víctor tiene mayor concentración de ácidos fenólicos reportados en la literatura (Watanabe *et al.*, 2011), en particular del ácido cafeico, ferúlico y clorogénico, para quienes se ha descrito actividad antioxidante (Zavaleta *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2007).

Finalmente, las concentraciones descritas para el extracto de *nigrum spinosum* de cucurbitacinas; D, I y B (0.127, 0.013 y 1.008 mg g<sup>-1</sup> de extracto, respectivamente), para H-387® D, I, B y E (1.162, 0.088, 1.631 y 0.424 mg g<sup>-1</sup>de extracto, respectivamente) (Aguñiga-Sánchez, 2017), y para Perla Negra® D, I, B y E (0.00137, 0.00935, 0.0098 y 0.0040) (Salazar-Aguilar *et al.*, 2017). Al comparar los híbridos observamos que HD-Víctor tiene mayor concentración en cucurbitacina D y B mientras que en la concentración de cucurbitacina E es mayor en H387 y la cucurbitacina I es mayor en Perla Negra®. Aun cuando las cucurbitacinas B, D e I son extremadamente tóxicas (Setzer *et al.*, 2003), es posible sugerir que la dosis puede ser la diferencia, ya que las cucurbitacinas identificadas en los frutos de los híbridos y en *nigrum spinosum*, han registrado actividad citotóxica y antitumoral (Alghasham *et al.*, 2013; Kapoor *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2013; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; Aguñiga-Sánchez *et al.*, 2015; 2017).

### **7.3 Supervivencia de ratones tratados respecto a ratones sanos**

Estudios previos ya han reportado la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de *nigrum spinosum* (Aguñiga-Sánchez *et al.*, 2017), por lo que en este trabajo se confirmó la dosis mayor a 5000 mg kg<sup>-1</sup> para ratones machos y hembras de la cepa CD-1; mientras que para el extracto de HD-Víctor administrado a hembras vía intraperitoneal, mostró síntomas, tales como postración, espasmos musculares y piloerección en las dosis más altas, y los decesos se registraron desde la primera y hasta las 6 h post-administración para las dosis de 5000, 2900 y 1600 mg kg<sup>-1</sup>, observando 100% de decesos, mientras que entre la dosis de 600 y 400 mg kg<sup>-1</sup>, se registró 50% de decesos entre 2 y 24 h, y finalmente todas las dosis menores a 160 mg kg<sup>-1</sup> sobrevivieron hasta 24 h después de administrar el extracto (Figura 4). En el caso de los machos tratados con el extracto de HD-Víctor, mostraron los mismos síntomas y se registró el 100% de los decesos en las dosis de

5000, 2900 y 1600 mg kg<sup>-1</sup>, registrándose desde la primera hora y hasta las 24 h después del tratamiento. La LD<sub>50</sub> se obtuvo en el rango de entre 600 y 400 mg kg<sup>-1</sup>, registrando 50% de decesos desde la segunda y hasta las 24 h (Figura 5), y por último los machos que fueron tratadas con dosis menores a 160 mg kg<sup>-1</sup>, registraron supervivencia por 24 h después del tratamiento.

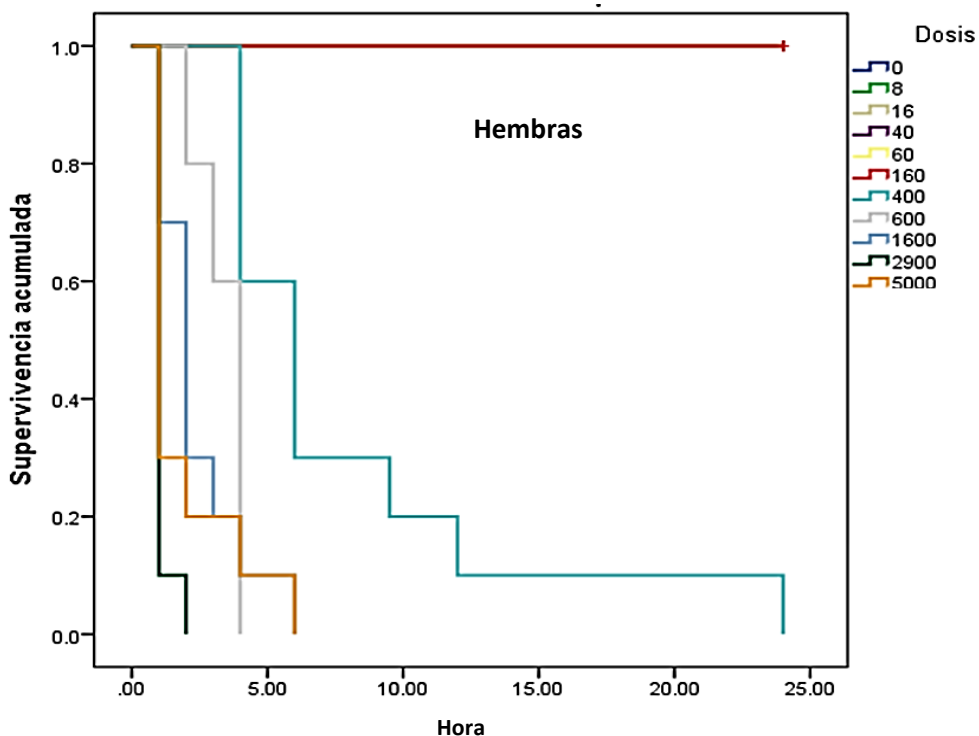


Figura 4. Supervivencia de ratones hembra (n=10) tratados vía intraperitoneal con diferentes dosis de extracto del híbrido HD-Víctor, evaluados a las 24 h post-tratamiento. Grafica de Kaplan Meier.

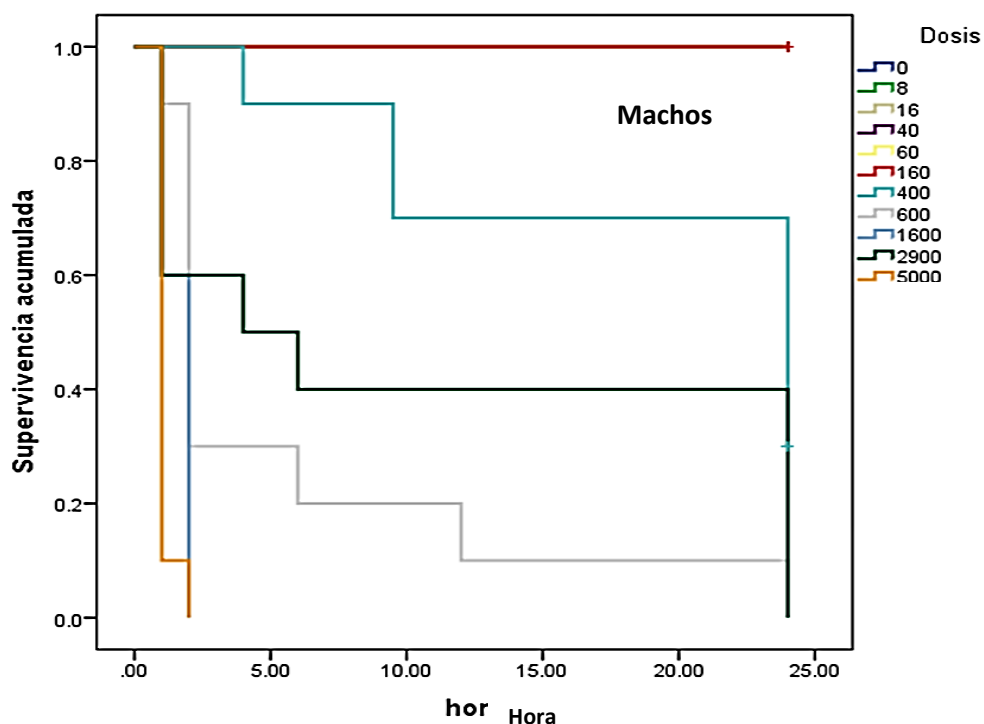


Figura 5. Supervivencia de ratones machos (n=10) tratados vía intraperitoneal con diferentes dosis de extracto del híbrido HD-Víctor, evaluados a las 24 h post-tratamiento. Gráfica de Kaplan Meier

Este ensayo tuvo el propósito de probar la toxicidad aguda, y obtener información sobre la actividad biológica de un químico y conocer su mecanismo de acción. La información sobre toxicidad sistémica aguda generada por la prueba se utiliza en la identificación de peligros y la gestión de riesgos en el contexto de producción, manejo y uso de productos químicos (Jiménez *et al.*, 2009).

#### 7.4 Determinación de la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) del híbrido HD-Víctor

La dosis letal media (LD<sub>50</sub>) se calculó a partir de la relación que existe entre la intensidad del estímulo y la mortalidad que los ratones registraron en los experimentos, (análisis Probit) para ello se trabajó con dosis de (0, 8, 16, 40, 60, 160, 400, 600, 1600, 2900 y 5000 mg kg<sup>-1</sup>) del extracto del híbrido HD-Víctor administrado vía intraperitoneal, dicho cálculo corroboró la LD<sub>50</sub> del extracto de *S. edule* var. *nigrum spinosum* (>5000 mg·kg<sup>-1</sup>) para ratones hembras de la cepa CD<sup>-1</sup> y para el híbrido HD-



Víctor fue de 500.14 mg kg<sup>-1</sup> para hembras y 517.68 mg kg<sup>-1</sup> para machos. Según los rangos de toxicidad de Deichman (1966), una dosis de 50 a 500 mg kg<sup>-1</sup> vía oral y cutánea es considerada moderadamente tóxica, dosis más bajas entre 1 y 50 mg kg<sup>-1</sup> se consideran altamente tóxicas y dosis más altas entre (0.5 a 5 g kg<sup>-1</sup>) se consideran ligeramente tóxico (Jiménez *et al.*, 2009).

### **7.5 Efecto de los extractos de *nigrum spinosum* y HD-Víctor sobre el índice hepático de ratones sanos**

Uno de los parámetros para evaluar toxicidad es el índice hepático, el cual es una relación entre el peso del hígado y el peso del ratón, relación que puede indicar la pérdida de tejido hepático que es una característica de la cirrosis. Para evaluar el Índice hepático se trataron durante 10 d cada 24 h, ratones hembras y machos de 2 a 3 meses de edad de la cepa CD-1. Siguiendo las indicaciones de la OMS en la que indica trabajar con dosis menores a la LD<sub>50</sub>, se aplicó la LD<sub>12.5</sub> de los extractos de *nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor, correspondiendo a 1000 y 125 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente y ácido gálico como control positivo de hepatoprotección (50 mg kg<sup>-1</sup>) (Aniya, 2018). Los resultados muestran que los extractos de *nigrum spinosum* y de HD-Víctor no producen alteraciones en el índice hepático de ratones hembras y machos sanos tratados vía intraperitoneal (Figura 6), lo que sugiere que no generan daño al hígado.

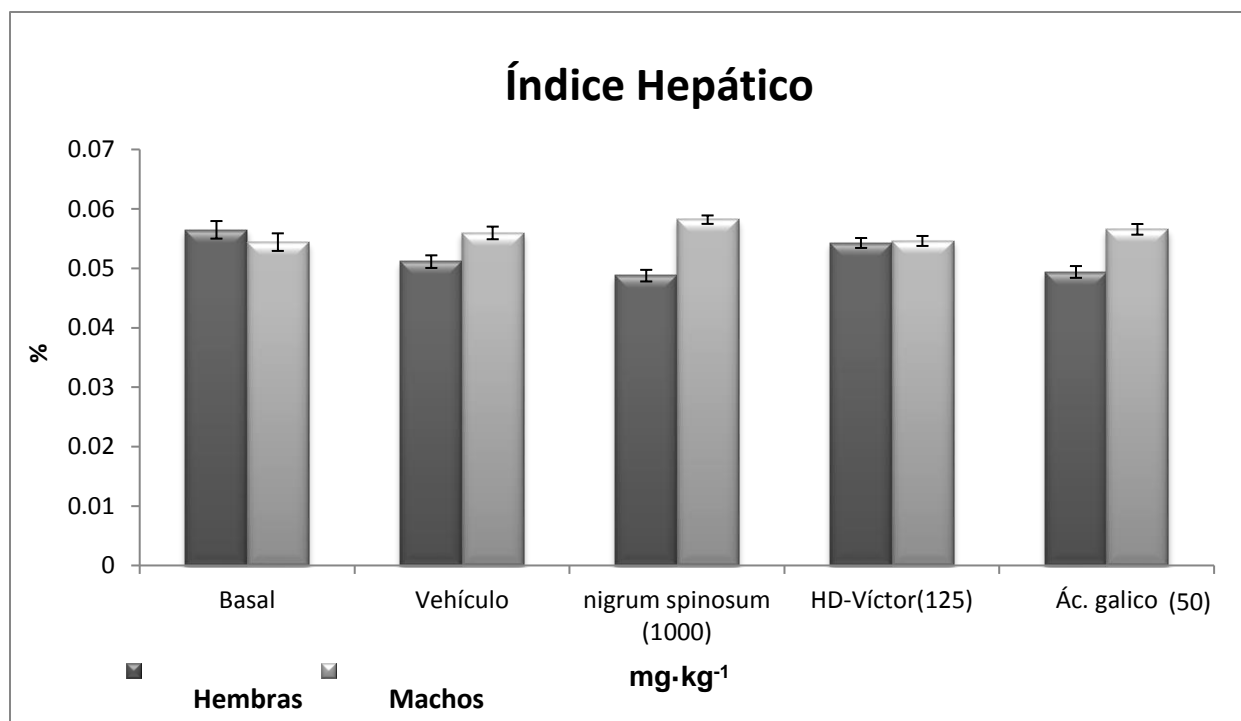


Figura 6. Índice hepático de ratones hembras y machos sin inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con extracto en metanol de *nigrum spinosum* con dosis de 1000 mg kg<sup>-1</sup>, e híbrido HD-Víctor con 125 mg Kg<sup>-1</sup>. n = 6, ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05).

### 7.6 Efecto del extracto de *nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor sobre parámetros hematológicos en sangre de ratones sanos

Es conocido que los parámetros hematológicos son indicadores de citotoxicidad (Wintrobe *et al.*, 2009), por lo que en este trabajo se evaluó si los extractos de *nigrum spinosum* y de HD-Víctor inducían alteraciones. Las hembras y machos tratados con dosis de 1000 mg kg<sup>-1</sup> y 125 mg kg<sup>-1</sup> del extracto de *nigrum spinosum* y HD-Víctor respectivamente no mostraron alteraciones significativas en los parámetros hematológicos (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Parámetros hematológicos de ratones hembras sanas tratadas con con dosis de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *nigrum spinosum* y 125 mgkg<sup>-1</sup>de HD-Víctor. n = 6. Promedios ±error estándar. a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico.\*Diferencia significativa (Tukey p<0.05).

Ratones hembras sanas	Basal	Vehículo	<i>nigrum spinosum</i> (1000 mgkg <sup>-1</sup> )	HD-Víctor (125 mg kg <sup>-1</sup> )	Ácido gálico
WBC(10 <sup>6</sup> .mm <sup>3</sup> )	5.1 ± 0.4	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.6 ± 0.4	5.4 ± 0.5
RBC(10 <sup>6</sup> .mm <sup>3</sup> )	6.6 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.0 ± 0.3	7.0 ± 0.4	6.6 ± 0.3
Hb (g·dl <sup>-1</sup> )	16.7 ± 1.1	14.7 ± 0.3	15.0 ± 0.5 a	14.1 ± 0.7	13.3 ± 0.4
Hct (%)	31.8 ± 0.9	33.5 ± 0.8	33.9 ± 1.3	30.9 ± 1.6	30.6 ± 1.2
VCM (mm <sup>3</sup> )	45.6 ± 0.6	45.0 ± 0.76	47.4 ± 1.0	45.3 ± 0.5	44.7 ± 0.6
HCM (pg)	23.4 ± 0.9	20.0 ± 0.2	20.8 ± 0.1	20.3 ± 0.2	19.8 ± 0.4
PLT (mm <sup>3</sup> )	241.7 ±17.6	230.3 ±67	320.0 ± 32.8	295.2 ± 54.0	319.3 ± 48.2
LINF (10 <sup>3</sup> )	3.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	4.7 ± 0.3
MONO (10 <sup>3</sup> )	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
GRAN (10 <sup>3</sup> )	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.6 ± 0.08	0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.03

(WCB) glóbulos blancos totales, (RCB) glóbulos rojos totales, (Hb) Hemoglobina, Hct) hematocrito, (HCMC), hemoglobina corpuscular media, (VCM) volumen corpuscular medio, (PLT) plaquetas.

Cuadro 3. Parámetros hematológicos de ratones machos sanos tratados con con dosis de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *nigrum spinosum* y 125 mg·kg<sup>-1</sup>de extracto de HD-Víctor. n (6). Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico

<b>Ratones Machos Sanos</b>	<b>Basal</b>	<b>Vehículo</b>	<b><i>nigrum spinosum</i> (1000 mg·kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>HD-Víctor (125mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ácido gálico</b>
<b>WBC(10<sup>6</sup>·mm<sup>3</sup>)</b>	6.13 ± 0.41	5.46 ± 0.59	5.79 ± 0.67	4.71 ± 0.35	5.43 ± 0.47
<b>RBC(10<sup>6</sup>·mm<sup>3</sup>)</b>	6.69 ± 0.25	7.19 ± 0.17	7.52 ± 0.28	7.48 ± 0.36	6.65 ± 0.23
<b>Hb (g·dl<sup>-1</sup>)</b>	14.05 ± 1.64	14.66 ± 0.28	15.03 ± 0.47	14.21 ± 0.62	13.56 ± 0.32
<b>Hct (%)</b>	31.68 ± 1.28	32.82 ± 0.43	34.51 ± 1.53	31.36 ± 1.77	31.96 ± 1.10
<b>VCM (mm<sup>3</sup>)</b>	46.25 ± 0.77	45.00 ± 0.76	46.50 ± 0.79	45.63 ± 0.49	44.67 ± 0.62
<b>HCM(pg)</b>	18.95 ± 1.64	20.02 ± 0.16	20.63 ± 0.12	20.50 ± 0.20	19.69 ± 0.19
<b>PLT (mm<sup>3</sup>)</b>	238.4 ± 17.5	346.4 ± 55.6	348.7 ± 33.1	295.2 ± 53.9	319.3 ± 48.2
<b>LINF(10<sup>3</sup>)</b>	4.37 ± 0.41	3.29 ± 0.26	3.96 ± 0.37	3.16 ± 0.22	4.68 ± 0.26
<b>MONO(10<sup>3</sup>)</b>	0.87 ± 0.11	0.88 ± 0.14	0.93 ± 0.11	1.04 ± 0.13	0.87 ± 0.06
<b>GRAN(10<sup>3</sup>)</b>	0.67 ± 0.13	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.11	0.49 ± 0.08	0.43 ± 0.04

Parámetros hematológicos: (WCB) glóbulos blancos totales, (RCB) glóbulos rojos totales, (Hb) Hemoglobina, Hct) hematocrito, (HCMC), hemoglobina corpuscular media, (VCM) volumen corpuscular medio, (PLT) plaquetas.

### **7.7 Efecto del extracto de *nigrum spinosum* sobre parámetros indicadores de funcionamiento hepático en ratones sanos**

Para confirmar que los extractos de los frutos de *Sechium* no generan daño al hígado se evaluaron las concentraciones de 1000 mg kg<sup>-1</sup> y 125 mg kg<sup>-1</sup> del extracto de *nigrum spinosum* y HD-Víctor respectivamente por vía intraperitoneal a machos y hembras de 2 a 3 meses de edad de la cepa CD-1. Los resultados mostraron que ningún tratamiento alteró los niveles de las enzimas indicadoras de daño hepático ALT, AST o fosfatasa. Por otro lado, la creatinina que es un indicador de daño renal no mostró alteraciones al igual que el ácido úrico, metabolito de desecho del metabolismo de las purinas; y finalmente, la urea se registró disminuida en ambos extractos con respecto al basal. Lo que se observa es una disminución significativa de glucosa en hembras para ambos extractos, mientras que en machos solo lo registró el híbrido. En relación a la urea, se observó una reducción significativa en las hembras tratadas con los extractos (Cuadro 5). El AST, ALT y Fosfatasa alcalina corresponden al perfil de enzimas indicadoras de funcionamiento hepático (Kew, 2000), el hecho de que ALT y fosfatasa alcalina no muestren alteraciones con respecto al basal para ambos extractos, corrobora que éstos no generan lesiones al hígado por lo que se pueden considerar inocuos (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras sanas tratadas con 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *S. edule* var. *nigrum spinosum* y con 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto de HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico.

Ratones hembras sanas					
Variable	Basal	Vehículo	<i>nigrum spinosum</i> (1000 mgkg <sup>-1</sup> )	HD-Víctor (125 mg kg <sup>-1</sup> )	Ácido gálico
Glucosa (mg/dL)	135.2 ± 4.3	137.8 ± 3.7	122.3 ± 1.5a,b	108.2 ± 3.0 a,b	133.0 ± 6.2
AST (UI)	345.4 ± 9.7	375.3 ± 15.8	415.8 ± 34.5	469.0 ± 41.3	404.3 ± 26.3
ALT (UI)	137.3 ± 5.1	140.8 ± 6.6	106.0 ± 6.3	103.6 ± 7.8	117.5 ± 5.4
Fosfatasa (UI)	66.6 ± 5.2	56.7 ± 6.1	57.7 ± 10.4	46.2 ± 5.1	47.0 ± 6.3
Creatinina (mg/dL)	0.7 ± 0.02	0.8 ± 0.04	0.7 ± 0.02	0.7 ± 0.02	0.7 ± 0.02
Urea (mg/dL)	56.0 ± 2.7	51.6 ± 3.4	43.4 ± 2.7 a	37.8 ± 1.7 a,b	47.9 ± 2.0
Ácido Úrico (mg/dL)	5.9 ± 0.4 b	6.4 ± 0.5	3.0 ± 0.6	5.4 ± 0.4	3.5 ± 0.5

Cuadro 5. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos sanos tratadas con 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *S. edule* var. *nigrum spinosum* y con 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto de HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal, b= vehículo, c= ácido gálico.

Ratones machos sanos					
Variable	Basal	Vehículo	<i>nigrum spinosum</i> (1000 mg·kg <sup>-1</sup> )	HD-Víctor (125mg Kg <sup>-1</sup> )	Ácido gálico
Glucosa (mg/dL)	136.0 ± 2.9	144.8 ± 3.2	147.0 ± 3.5	114.0a ± 3.2	138 ± 6.2
AST(UI)	301.0 ± 12.9	259.3 ± 13.5	291.7 ± 18.0	309.7 ± 26.3	324.5 ± 15.0
ALT(UI)	134.2 ± 12.1	114.0 ± 10.6	115.8 ± 8.4	113.3 ± 12.5	132 ± 16.10
Fosfatasa (UI)	65.0 ± 3.3	98.5 ± 8.8	92.0 ± 17.1	61.3 ± 8.0	48.2 ± 2.1
Creatinina (mg/dL)	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.5 ± 0.04
Urea (mg/dL)	52.5 ± 2.3	48.6 ± 2.1	53.8 ± 3.5	46.3 ± 2.3	51.5 ± 2.1
Ácido Úrico (mg/dL)	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.5	3.52 ± 0.4	3.3 ± 0.5

### **7.8 Efecto del extracto de frutos *nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor sobre el índice hepático en un modelo murino de daño hepático**

El hígado al ser el órgano encargado de metabolizar las sustancias nocivas del torrente sanguíneo y convertirlas en sustancias inocuas para el humano, se encuentra en constante exposición a tóxicos, que al no ser eliminados pueden llegar a causar enfermedades de hígado, tales como cirrosis (Bermúdez *et al.*, 2014). Por ello actualmente se evalúan algunos metabolitos de origen natural que presentan actividad antioxidante como flavonoides y compuestos fenólicos con posibles efectos hepatoprotectores (Pérez, 2016). Es conocido que el fruto de *Sechium edule* contiene metabolitos antioxidantes (Siciliano, 2004; Salazar-Aguilar *et al.*, 2017; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2017), que le pueden conferir efecto hepatoprotector.

Para confirmar si los genotipos evaluados de *Sechium* presenta actividad hepatoprotectora se administró vía intraperitoneal extractos en metanol de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> + (CCl<sub>4</sub> al 10%), además de extracto de HD-Víctor en dosis de 8, 50 y 125 mg kg<sup>-1</sup> + (CCl<sub>4</sub> al 10%), como control de hepatoprotección al ácido gálico en dosis de 50 mg kg<sup>-1</sup> + (CCl<sub>4</sub> al 10%), y como control de daño hepático a CCl<sub>4</sub> al 10%, además del vehículo (PBS + CCl<sub>4</sub> al 10%) y basal (0) a ratones hembras y machos de 1 a 3 meses de edad de la cepa (CD-1) a los cuales previamente se les administro (CCl<sub>4</sub>) vía subdérmica como inductor de daño hepático (modelo de daño hepático). Los resultados mostraron que no existieron alteraciones en el índice hepático con respecto al basal (Figuras 7 y 8).



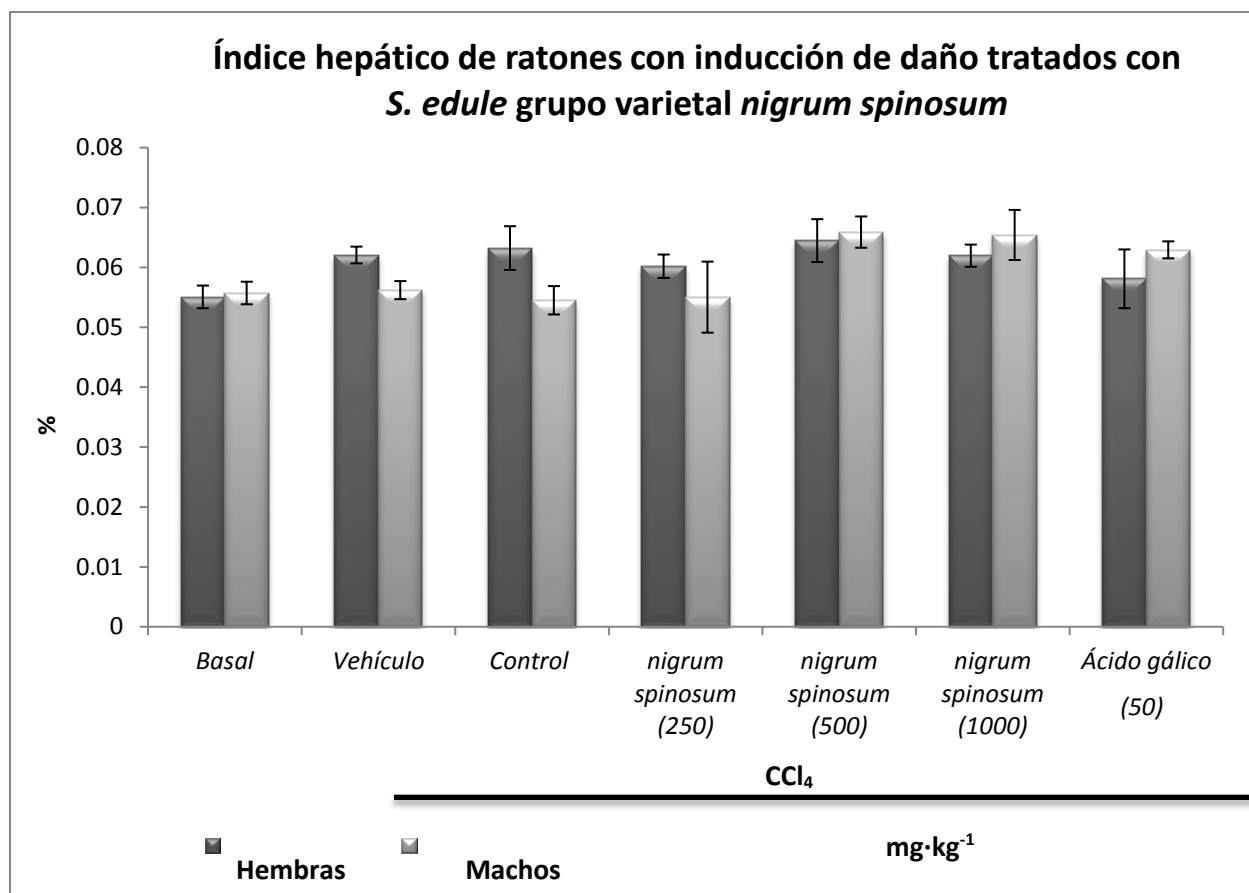


Figura 7. Índice hepático de ratones hembras y machos con inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule nigrum spinosum*. n = 6. Promedios ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05).

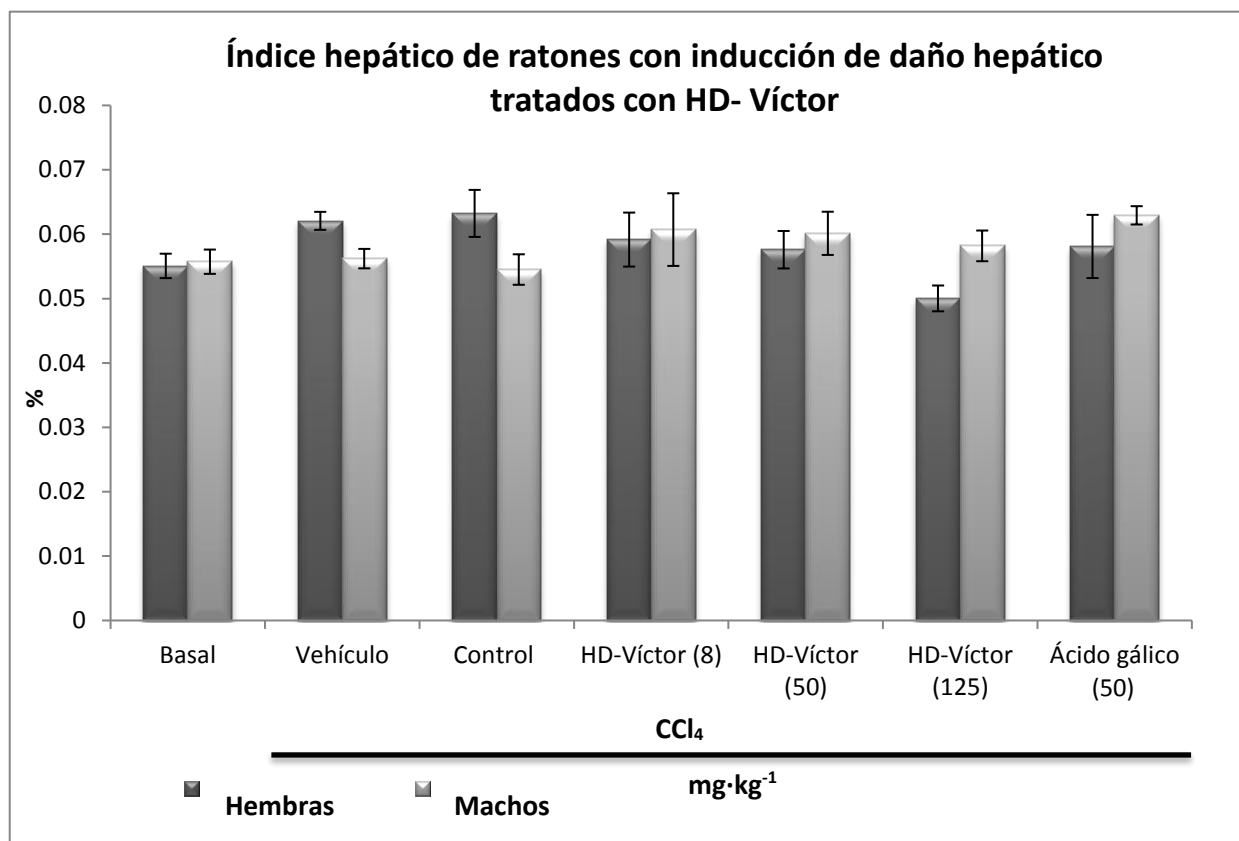


Figura 8. Índice hepático de ratones hembras y machos con inducción de daño hepático tratados vía intraperitoneal con dosis de 8, 50, 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. \*Diferencia significativa (Tukey p<0.05).

### **7.9 Efecto del extracto de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* e híbrido HD-Víctor sobre enzimas indicadoras de funcionamiento hepático en un modelo murino de daño hepático.**

Para observar si el extracto de *nigrum spinosum* y del híbrido HD-Víctor producen efecto hepatoprotector, se midieron las concentraciones séricas de glucosa, AST, ALT, fosfatasa alcalina. Los resultados en hembras con daño hepático (CCl<sub>4</sub> al 10%), en control y vehículo, mostraron que la concentración se duplicó o más de AST, ALT y fosfatasa alcalina con respecto al basal (Cuadro 6), dato contundente del daño hepático inducido por el CCl<sub>4</sub>, pero la adición de *nigrum spinosum* o HD-Víctor en todas las condiciones, redujo significativamente los niveles de AST, ALT y fosfatasa, sin alcanzar los niveles del basal (Cuadro 6 y 7), aun así resalta el potencial hepatoprotector de los genotipos de *Sechium* ante el daño hepático con CCl<sub>4</sub>, ya que la adición del ácido gálico, un reconocido hepatoprotector, también reduce a niveles similares de ALT a los tratamientos con *nigrum spinosum*, pero en forma más acentuada, en fosfatasa alcalina que alcanza los niveles del basal que no tiene CCl<sub>4</sub>, mientras que los niveles de AST son al menos seis veces menores que los niveles del basal. Aquí es importante mencionar que la disminución de las enzimas en valores inferiores al basal, no siempre indican curación, ya que en la necrosis hepática masiva hay escasez de hepatocitos, por lo tanto, la liberación de las enzimas al torrente sanguíneo es escasa o nula (Gissen y Arias, 2015). En cuanto al modelo de lesión hepática Toro *et al.*, (2013) describe que las concentraciones enzimáticas de AST, ALT y fosfatasa alcalina en un modelo de lesión hepática por CCl<sub>4</sub>, aumentan alrededor de 10 veces en los controles de daño comparado con los controles basales, mientras que Firdous *et al.*, (2012), describe que la concentración de ALT es ocho veces mayor en el control de lesión hepática con respecto al basal, los resultados obtenidos presentan la misma relación, por lo tanto se confirma el establecimiento de la lesión hepática bajo las condiciones de trabajo del laboratorio.

La literatura describe que al administrar *S. edule* a ratas con inducción de daño hepático la concentración de ALT se redujo a la mitad con respecto al control de daño, y de manera similar AST y fosfatasa alcalina reducen su concentración cuando se administra *nigrum spinosum*. Finalmente, en relación a niveles de urea, ácido úrico o creatinina, prácticamente no mostraron variación con respecto al basal, lo cual indica que el CCL<sub>4</sub> no altera estos parámetros (Cuadro 6 y 7).

Cuadro 6. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras con inducción de daño hepático, tratadas con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule* grupo varietal *nigrum spinosum*. n = 6, se presentan promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = Ácido gálico.

Hembras con inducción de daño hepático							
<i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i> (mgkg <sup>-1</sup> ) + (CCl <sub>4</sub> 10%)							
Variable	Basal	Control + (CCl <sub>4</sub> 10%)	Vehículo + (CCl <sub>4</sub> 10%)	250	500	1000	Ácido gálico + (CCl <sub>4</sub> 10%)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	135.2 ± 4.3	131.1 ± 6.26	145.4 ± 8.43	114.4 ± 3.70	112.0 ± 1.47	112.0 ± 6.08	138.2 ± 7.47
<b>AST (UI)</b>	345.4 ± 9.7 b,c	632.4 ± 13.9 a,c	599.5 ± 22.5 a,c	321.5 ± 13.4 b,c	497.7 ± 36.2 a, b, c	559.3 ± 8.2 a, b, c	52.8 ± 32.6 a,b
<b>ALT (UI)</b>	137.3 ± 5.1 b,c	782.5 ± 34.3 a,c	880.2 ± 50.6 a,c	521.2 ± 115.4 a,b	387.3 ± 27.6 a,b,c	582.0 ± 23.8 a,b	514.8 ± 43.4 a,b
<b>Fosfatasa (UI)</b>	66.6 ± 5.2 b	150.2 ± 6.32 a,c	149.2 ± 8.26 a,c	76.3 ± 14.6 b	119.0 ± 22.5 a,c	130.0 ± 20.8 a,c	60.0 ± 2.0 b
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.7 ± 0.02 b	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.02
<b>Urea (mg/dL)</b>	56.0 ± 2.7	66.1 ± 5.24	58.4 ± 5.32	61.4 ± 2.26	61.4 ± 2.78	58.4 ± 2.43	44.5 ± 1.23 b
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	5.9 ± 0.4 b c	3.34 ± 0.36 a	2.89 ± 0.29 a	1.65 ± 0.39 a	3.92 ± 0.57	4.74 ± 0.25	2.39 ± 0.10 a

Cuadro 7. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones hembras con inducción de daño hepático, tratadas con dosis de 8, 50 y 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido de *Sechium* HD-Víctor. n = 6, se presentan promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico.

Hembras con inducción de daño hepático							
Híbrido HD-Víctor (mg·kg <sup>-1</sup> ) + (CCl <sub>4</sub> 10%)							
Variable	Basal	Control + (CCl <sub>4</sub> 10%)	Vehículo + (CCl <sub>4</sub> 10%)	8	50	125	Ácido gálico + (CCl <sub>4</sub> 10%)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	135.2 ± 4.3	131.1 ± 6.26	145.4 ± 8.43	134.0 ± 9.95	115.6 ± 3.23	119.7 ± 4.45	138.2 ± 7.47
<b>AST (UI)</b>	345.4 ± 9.7 b,c	632.4 ± 13.9 a,c	599.5 ± 22.5 a,c	455.3 ± 60.0 b,c	400.0 ± 5.0 b,c	476.2 ± 44.7 b,c	52.8 ± 32.6 a, b.
<b>ALT (UI)</b>	137.3 ± 5.1 b,c	782.5 ± 34.3 a,c	880.2 ± 50.6 a,c	654.7 ± 51.7 a, b, c	503.8 ± 42.9 a,b	621.1 ± 28.5 a	514.8 ± 43.4 a,b
<b>Fosfatasa (UI)</b>	66.6 ± 5.2 b	150.2 ± 6.32 a,c	149.2 ± 8.26 a,c	35.0 ± 8.0 a, b	65.6 ± 13.69 b	29.3 ± 4.06 a, b	60.0 ± 2.0 b
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.7 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.02
<b>Urea (mg/dL)</b>	56.0 ± 2.7	66.1 ± 5.24 c	58.4 ± 5.32	56.6 ± 1.68	51.5 ± 2.06	47.9 ± 2.47 b	44.5 ± 1.23 b
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	5.9 ± 0.4 c	3.34 ± 0.36 a	2.89 ± 0.29 a	2.48 ± 0.94 a	2.18 ± 0.69 a	3.67 ± 0.76 a	2.39 ± 0.10 a

En los machos, al igual que las hembras tratadas con solo CCL<sub>4</sub> (control y vehículo), aumentaron significativamente los niveles de ALT, AST y fosfatasa alcalina con respecto al basal. En los ratones con daño hepático y tratados con extracto de *nigrum spinosum* se observó que en AST, las dosis de 250 y 500 mg·kg<sup>-1</sup> lo disminuyeron, mientras que la dosis de 1000 mg·kg<sup>-1</sup> no mostró diferencias, pero con ALT solo la concentración de 500 disminuyó con respecto al control de daño. Finalmente, cuando se observó fosfatasa alcalina, solo la dosis de 250 mg·kg<sup>-1</sup> disminuye con respecto al control de daño (Cuadro 8). En cuanto a los ratones que fueron tratados con HD-Víctor (las dosis de 50 y 125 mg·kg<sup>-1</sup>) disminuyen con respecto al control de daño, mientras que en la fosfatasa alcalina todas las dosis disminuyeron. Al comparar el ácido gálico con respecto al basal, AST disminuye, ALT aumenta y fosfatasa alcalina no registra alteraciones, y cuando se compara con el control de daño, se observó que las tres enzimas disminuyen en ambos tratamientos (Cuadro 9). En resumen, la ausencia de efecto hepatoprotector de *Sechium* en machos parece poco consistente y requiere aumentar el tamaño de muestra para verificar tal efecto hepatoprotector, lo cual sería interesante mostrar ya que, al menos en humanos, las hembras tienen mayor longevidad posiblemente debido a la mayor capacidad de respuesta ante los agentes antioxidantes.

Cuadro 8. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos con inducción de daño hepático, tratados con dosis de 250, 500 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico.

Machos con inducción de daño hepático							
<i>S. edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i> (mg·kg <sup>-1</sup> ) + (CCl <sub>4</sub> 10%)							
Variable	Basal	Control + (CCl <sub>4</sub> 10%)	Vehículo + (CCl <sub>4</sub> 10%)	250	500	1000	Ácido gálico + (CCl <sub>4</sub> 10%)
Glucosa (mg/dL)	136.0 ± 2.9	139.4 ± 10.6	126.3 ± 7.1	126.4 ± 8.2	114.0a ± 2.3	121.4 ± 7.4	142.8 ± 7.7
AST (UI)	301.0 ± 12.9	632.3 ± 23.1 a	587.3 ± 13.9 a	257.6c ± 70.8 b	353.0c ± 94.5 b,c	565.1 ± 8.5 a,b,c	163.7 ± 75.3 a,b
ALT (UI)	134.2 ± 12.1	748.3 ± 46.2 a	868.3 ± 45.4 a	628.7 ± 98.9 a,	387.3 ± 27.3 a,b,c	638.8 ± 45.7 a	561.0 ± 59.0 a,b,c
Fosfatasa (UI)	65.0 ± 3.3 b	150.2 ± 8.3 a	149.3 ± 6.3 a	76.3c ± 18.0 b	119.0 ± 22.5 a,c	130.0a ± 20.9 a,c	60.0c ± 2.0 b
Creatinina (mg/dL)	0.5 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.03
Urea (mg/dL)	52.5 ± 2.3	79.6 ± 5.3 a,c	58.5 ± 14.0	61.4 ± 2.3 c	61.4 ± 2.8 c	65.0 ± 6.8 c	44.6 ± 1.4 a,b
Ácido Úrico (mg/dL)	2.4 ± 0.2	3.3 ± 0.29 a,c	2.9 ± 0.36	1.7 ± 0.4	3.9 ± 0.6	5.2 ± 0.5 a,c	2.4 ± 0.1



Cuadro 9. Concentraciones séricas de metabolitos indicadores de funcionamiento hepático y renal de ratones machos con inducción de daño hepático, tratados con dosis de 8, 50 y 125 mg kg<sup>-1</sup> de extracto en metanol del híbrido HD-Víctor. n = 6. Promedios ± error estándar. Diferencia significativa (Tukey p<0.05) respecto: a= basal b= control c = ácido gálico.

Machos con inducción de daño hepático							
Híbrido HD-Víctor (mg·kg <sup>-1</sup> ) + (CCl <sub>4</sub> 10%)							
Variable	Basal	Control + (CCl <sub>4</sub> 10%)	Vehículo + (CCl <sub>4</sub> 10%)	8	50	125	Ácido gálico + (CCl <sub>4</sub> 10%)
Glucosa (mg/dL)	136.0 ± 2.9	139.4 ± 10.6	126.3 ± 7.1	128.7 ± 9.9	115.6 ± 3.2	113.2 ± 7.6	142.8 ± 7.7
AST (UI)	301.0 ± 12.9	632.3 ± 23.1 a	587.3 ± 13.9 a	546.0 ± 64.6 c	427.3 ± 63.0 b,c	453.7 ± 69.7 b,c	163.7 ± 75.3 a, b
ALT (UI)	134.2 ± 12.1	748.3 ± 46.2 a	868.3 ± 45.4 a	654.8 ± 51.8 a	503.8 ± 43 a,b	589. ± 36.65 a,b	561.0 ± 59.0 b
Fosfatasa (UI)	65.0 ± 3.3 b	150.2 ± 8.3 a,c	149.3 ± 6.3 c	35.0 ± 5.7 b,c	65.7 ± 13.7 b	29.3 ± 4.1 a,b,c	60.0 ± 2.0 b
Creatinina (mg/dL)	0.5 ± 0.04 b	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03
Urea (mg/dL)	52.5 ± 2.3	79.6 ± 5.3 a,c	58.5 ± 14.0	56.6 ± 1.7	51.2 ± 2.1	47.9 ± 2.5 b	44.6 ± 1.4
Ácido Úrico (mg/dL)	2.4 ± 0.2	3.3 ± 0.29	2.9 ± 0.36	2.5 ± 0.9	2.2 ± 0.7	3.7 ± 0.8	2.4 ± 0.1

El efecto hepatoprotector que presenta *Sechium edule* var *nigrum spinosum* en forma contundente en hembras se puede atribuir al conjunto de compuestos fenólicos presentes en los frutos de ambos genotipos entre los que se encuentran rutina, mirecetina, quercetina, narigenina, galangina y apigenina. ácidos fenólicos: ácido gálico, clorogenico, siríngico, vinílico, *p*-hidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, *p*-cumarinico,y cucurbitacinas D, I, B y E. de los que se destaca, la naringenina con una concentración de 3.304 mg g<sup>-1</sup>este flavonoide ha sido descrito como un potente hepatoprotector debido a que presenta tres principales vías de hepatoprotección (inhibición del estrés oxidativo, transformación del factor de crecimiento (TGF-β), y prevención de la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas (HSC) (Hernández y Muriel, 2018). Se ha descrito también que el ácido gálico promueve la citotoxicidad y los procesos apoptóticos, así como también disminuye la inflamación de tejidos, la angiogénesis y la invasión de células malignas en diversos tipos de cáncer, incluidos de mama, vejiga, próstata, hígado, leucemia y gliomas (Salas *et al.*, 2013). Mientras que el ácido cafeico, la florizidina y quercetina tienen actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Hale *et al.*, 2008; Wybranowski *et al.*, 2013), que pueden ayudar a prevenir el daño celular (Pietta, 2000).

## 8 CONCLUSIONES

- El extracto de frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* y el híbrido HD-Víctor caracterizados por HPLC, presentan flavonoides, cucurbitacinas y ácidos fenólicos siendo los extractos de los frutos del híbrido HD-Víctor quien tiene mayor contenido de metabolitos secundarios.
- El extracto de frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* y el híbrido HD-Víctor en un modelo murino de lesión hepática, presentan disminución de enzimas hepáticas (AST, ALT y FA), presentando mejor efecto el extracto de los frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*.
- El extracto de los frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* y el híbrido HD-Víctor en un modelo murino de lesión hepática, no presentan alteraciones morfométricas en el hígado de ratones tratados.
- El extracto de los frutos de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* y el híbrido HD-Víctor en un modelo murino de lesión hepática, no presentan alteraciones hematológicas en ratones tratados.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel, A., & Engelmann, F. (2002). Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* JACQ. SW.) zygotic embryos and shoot-tips from in vitro plantlets. *CryoLetters*, 23(5), 299-308.
- Afifi, M. S., Ross, S. A., ElSohly, M. A., Naeem, Z. E., & Halaweish, F. T. (1999). Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4), 847-859.
- Aguñiga-Sánchez, I., Cadena-Íñiguez, J., Santiago-Osorio, E., Gómez-García, G., Mendoza-Núñez, V. M., Rosado-Pérez, J., & Soto-Hernández, R. M. (2017). Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1638-1645.
- Aguñiga-Sanchez, I. (2017). Efecto antitumoral in vivo de *Sechium P. Browne* (cucurbitaceae). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Aguñiga-Sánchez I., Soto R.M., Cadena J., Ruíz L.M., Cadena J.D., González A.K., Weiss B., Santiago E. (2015). Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutr. Cancer*. 67, 1–8.
- Aguñiga-Sánchez, I. (2013). Efecto antileucemico in vitro de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados.
- Albone, K. S., Gaskin, P., MacMillan, J., & Sponsel, V. M. (1984). Identification and localization of gibberellins in maturing seeds of the cucurbit *Sechium edule*, and a comparison between this cucurbit and the legume *Phaseolus coccineus*. *Planta*, 162(6), 560-565.
- Alghasham, A. A. (2013). Cucurbitacins—a promising target for cancer therapy. *International journal of health sciences*, 7(1), 77.
- Álvarez-Martínez, H., & Pérez-Campos, E. (2005). The patient with hypertransaminasemia. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 48(2), 58-65.
- Aniya Y. (2018). Development of bioresources in Okinawa: understanding the multiple targeted actions of antioxidant phytochemicals. *Journal of toxicologic pathology*, 31(4), 241-253.

- Avendaño Arrazate, C. H. (2010). Las variedades del chayote mexicano, recurso ancentral con potencial de comercialización/por Carlos Hugo Avendaño Arrazate (et al) (No. Libro 635.62 A8.). Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM).
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. In *Insulin Action* (pp. 31-48). Springer, Boston, MA.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441.
- Bansal, M. B., Kovalovich, K., Gupta, R., Li, W., Agarwal, A., Radbill, B., & Taub, R. A. (2005). Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl<sub>4</sub>-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *Journal of hepatology*, 42(4), 548-556.
- Bartels, H., Böhmer, M. & Heierli, C. (1972). Serum Kreatinib-estimmung ohne Enteiweissen. *Clinical Chemistry*. 37, 193–197.
- Baynes, J., Dominizac, M. (2004a). *Bioquímica Médica. Lípidos y Lipoproteínas*. 2ª ed. Elsevier España. 229-245.
- Baynes, J., Dominizac, M., Jones, A. (2004b). *Bioquímica Médica. Funciones específicas del hígado*. 2ª ed. Elsevier España. 405-416.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), 547-581.
- Bermúdez T., Boffill C., Betancourt M, Emoe, Escobar R, Correa I., Alonso I. (2014). Evaluación preclínica de la actividad hepatoprotectora de *Ocimum basilicum* L. y *Allium sativum* L. *MediSur*, 12(1), 51-62.
- Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., & Lusis, A. J. (2002). A tale of two controversies defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17415-17427.
- Bustíos, C, Dávalos, M, Román, R, & Zumaeta, E. (2007). Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 27(3), 238-245.

- Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernandez, M., Torres-Salas, A., Aguiñiga, I., Ruiz-Posadas, L., Rivera-Martinez, A. R., & Santiago-Osorio, E. (2013). The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 455-460.
- Cadena-Iñiguez, J., Arévalo Galarza, M., & de Lourdes, C. (2011). Las variedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) y su comercio mundial (No. 635.64 C3V3).
- Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C. H., Soto-Hernández, M., Ruiz-Posadas, L. M., Aguirre-Medina, J. F., & Arévalo-Galarza, L. (2008). Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 835-847.
- Cadena-Iñiguez, J., Arévalo-Galarza, L., Avendaño-Arrazate, C. H., Soto-Hernández, M., Ruiz-Posadas, L. D. M., Santiago-Osorio, E., & Ochoa-Martínez, D. (2007). Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh produce*, 1(1), 41-53.
- Cadena-Iñiguez, J. (2005). Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) (TESIS). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Centro Botánica.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(11), 3426-3431.
- Cardona, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F. J.; Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Beneficios de los polifenoles sobre la microbiota intestinal y sus implicaciones en la salud humana. *J. Nutr. Biochem*, 24, 1415-1422.
- Ciocca, M., Costaguta, A., Cuarterolo, M., Delgado, L., Garcete, L., Godoy, M., ... & Ramonet, M. (2016). Insuficiencia hepática aguda pediátrica. Grupo de trabajo de la Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SLAGHNP). *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 46(1), 52-70.
- Chan, F. K. M., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., & Lenardo, M. J. (2003). A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51613-51621.

- Che, C. T., Fang, X., Phoebe Jr, C. H., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N. R., Yellin, B., & Hecht, S. M. (1985). High-field <sup>1</sup>H-NMR spectral analysis of some cucurbitacins. *Journal of natural products*, 48(3), 429-434.
- Chu, F. F., Doroshov, J. A., & Esworthy, R. S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *Journal of Biological Chemistry*, 268(4), 2571-2576.
- Comhair, S. A., Bhatena, P. R., Farver, C., Thunnissen, F. B., & Erzurum, S. C. (2001). Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *The FASEB Journal*, 15(1), 70-78.
- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Daza, E. F., Juan, E. F., Mejía, I. M., & Mejía, M. M. (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio*, 14(11-12), 533-546.
- Deichmann, W. B., & Keplinger, M. L. (1966). Effect of combinations of pesticides on reproduction of mice. In *Toxicology and Applied Pharmacology* 8(2), pp.337 San Diego, CA USA: Academic Press Inc Elsevier Science.
- Diré, G. F., Vasoonceios, S. D. D., Siqueira, P. R. A., Duarte, R. M., Aimeida, M. C. L., & Rodrigues, J. S. (2006). The analysis of the effect of a chayotte extract on the radiolabeling of blood elements in diabetic rats. *Pakistan journal of nutrition*, 5(3), 269-273.
- Diré, G. F., Rodrigues, J. S., Oliveira, J. C., Vasconcelos, S. D., Siqueira, P. R., Duarte, R. M., & Bernardo-Filho, M. (2007a). Biological effects of a chayotte extract in Wistar rats with induced diabetes: a radiopharmaceutically analysis. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(4), 568-574.
- Diré, G. F., Almeida, M. C., Coura, M. F., Vasconcelos, S. D., Siqueira, P. R., Duarte, R. M., & Bernardo-Filho, M. (2007b). Effects of a chayotte (*Sechium edule*) extract (macerated) on the biochemistry of blood of Wistar

- rats and on the action against the stannous chloride effect. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(5), 823-827.
- Doñate, F., Yañez, A. J., Iriarte, A., & Martinez-Carrion, M. (2000). Interaction of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase and its presequence peptide with model membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34147-34156.
- Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Deme, D., & Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 266(6), 3739-3743.
- Edwards, R., & Gatehouse, J. A. (1999). Secondary metabolism. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Eds. J Lea and C Leegood, 193-217.
- Elberry, A. A., Mufti, S., Al-Maghrabi, J., Abdel Sattar, E., Ghareib, S. A., Mosli, H. A., & Gabr, S. A. (2014). Immunomodulatory effect of red onion (*Allium cepa* Linn) scale extract on experimentally induced atypical prostatic hyperplasia in Wistar rats. *Mediators of Inflammation*, 2014.
- Erhardt, A., & Tiegs, G. (2010). Tolerance induction in response to liver inflammation. *Digestive diseases*, 28(1), 86-92.
- Escorcia-Gutiérrez, N., Molina-Galán, J. D., Castillo-González, F., & Mejía-Contreras, J. A. (2010). Rendimiento, heterosis y depresión endogámica de cruces simples de maíz. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(3), 271-279.
- Firdous S., K Sravanthi, R Debnath, K Neeraja. (2012). Protective effect of ethanolic extract and its ethylacetate and n-butanol fractions of *Sechium edule* fruits against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *International Journal of PharmacyPharmaceutical Sciences*, 4:354-359.
- Flohé, L. (1988). Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 49, 663–668.
- Flores, E. M. (1989). El chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae). *Rev. Biol. Trop.* 37(1):1-54.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., & Gottlieb, E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107.
- GISeM [Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México] (2008). Colecta, caracterización y conservación de *Sechium* spp. Informe



- en extenso. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos-SAGARPA. México.
- Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of hepatology*, 63(4), 1023-1037.
- Gordon, E. A., Guppy, L. J., & Nelson, M. (2000). The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *The West Indian Medical Journal*, 49(1), 27-31.
- Granger, D. N. (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 255(6), H1269-H1275.
- Gromer, S., Urig, S., & Becker, K. (2004). The thioredoxin system—from science to clinic. *Medicinal research reviews*, 24(1), 40-89.
- Hale, A. L., Reddivari, L., Nzaramba, M. N., Bamberg, J. B., & Miller, J. C. (2008). Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among *Solanum* species. *American journal of potato research*, 85(5), 332.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hernández-Aquino, E., & Muriel, P. (2018). Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. *World journal of gastroenterology*, 24(16), 1679.
- Heymann, F., & Tacke, F. (2016). Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 13(2), 88.
- IFCCSC [International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Committee] (1980). *Journal Clinical, Chemistry and Clinical Biochemistry*, 18,521-534.
- INEGI [Instituto Nacional De Estadísticas Y Geografía] (2017). Estadística a propósito del día mundial de muertos. Disponible en: [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017\\_Nal.pdfpdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdfpdf)
- Ishii, T., Kira, N., Yoshida, T., & Narahara, H. (2013). Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Tumor Biology*, 34(1), 285-291.
- Jiménez, M. R., & Kuhn, G. R. (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos.

- Kamble, M. B., Dumbre, R. K., & Rangari, V. D. (2008). Hepatoprotective activity studies of herbal formulations. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 2(3).
- Kapoor, S. (2013). Cucurbitacin B and its rapidly emerging role in the management of systemic malignancies besides lung carcinomas. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(4), 359-359.
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., & Turkeli, M. (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011.
- Karimi, M. H., Geramizadeh, B., & Malek-Hosseini, S. A. (2015). Tolerance Induction in Liver. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 6(2), 45-54.
- Kew M. (2000) Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 355:591-592.
- Kinnula, V. L. (2005). Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(4), 465-470.
- Kinnula, V. L., & Crapo, J. D. (2003). Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(12), 1600-1619.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908-13914.
- Kiso, K., Ueno, S., Fukuda, M., Ichi, I., Kobayashi, K., Sakai, T., & Kojo, S. (2012). The role of Kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(6), 980-983.
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 598-625.
- Kulcharyk, P. A., & Heinecke, J. W. (2001). Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry*, 40(12), 3648-3656.
- Kumar, P. (2004). Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Current Science*, 86(7), 930-937.

- Kumar, R. S., Gupta, M., Mazumdar, U. K., Rajeshwar, Y., Kumar, T. S., Gomathi, P., & Roy, R. (2005). Effects of methanol extracts of *Caesalpinia bonducella* and *Bauhinia racemosa* on hematology and hepatorenal function in mice. *The Journal of toxicological sciences*, 30(4), 265-274.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*.
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox report*, 7(1), 55-57.
- Lira, R., Castrejon, J., Zamudio, S., & Rojas-Zenteno, C. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana*, (49), 47-61.
- Lira R. (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 Research Institute. Italy. 58.
- Lisbonne M, L'Hellegouarch A, Nauwelaers G, Turlin B, Lucas C, Herbelin A, Claire P & Michel S. (2011). Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl<sub>4</sub> -induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. *Eur J Immunol*, 41,1720-1732.
- Lorraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41 (4), 18-27.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287.
- Louis, H., Van Laethem, J. L., Wu, W., Quertinmont, E., Degraef, C., Van den Berg, K., & Devière, J. (1998). Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology*, 28(6), 1607-1615.
- Maity, S., Firdous, S. M., & Debnath, R. (2013). Evaluation of antidiabetic activity of ethanolic extract of *Sechium edule* fruits in alloxan-induced diabetic rats. *World J Pharm Pharm Sci*, 2(5), 3612-3621.
- Malhi, H., Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2010). Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiological reviews*, 90(3), 1165-1194.

- Mansour, M. A., Al-Shabanah, O. A., & El-Khashef, H. A. (2003). L-arginine ameliorates kidney function and urinary bladder sensitivity in experimentally-induced renal dysfunction in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 373-378.
- May, P., Anastácio, M., Castañón Nájera, G., Tun Suárez, J. M., Mendoza Elos, M., Mijangos Cortés, J. O., & Latournerie Moreno, L. (2010). Efectos heteróticos y aptitud combinatoria en poblaciones de chile dulce (*Capsicum annum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 353-360.
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108.
- Mishra, A., Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattoni, G., Nightingale, J., Kharitonov, S. A., & Barnes, P. J. (1999). Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(1), 216-220.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., & Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 142-149.
- Neeraja, K., Debnath, R., & Firdous, S. M. (2015). Cardioprotective activity of fruits of *Sechium edule*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1), 125-130.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2005). *Principles of biochemistry*. WH Freeman and Company, New York, fourth edition edition, 1(1.1), 2.
- O'Shea, R., Dasarathy, S., McCullough, A. J. (2010), Alcoholic liver disease. *Hepatology*, 51: 307-328.
- Park, O., Jeong, W. I., Wang, L., Wang, H., Lian, Z. X., Gershwin, M. E., & Gao, B. (2009). Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology*, 49(5), 1683-1694.
- Parra J, Hernández P, Ocampo F, Álvarez V, Carvajal Y, Rodríguez G, Herrera C (2018). Phytochemical characterization and antioxidant profile of *Sechium*

- edule (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) varieties grown in Costa Rica. *J Pharm Pharmacogn Res*, 6(6), 448–457.
- Patton, C. J., & Crouch, S. R. (1977). Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 49(3), 464-469.
- Pérez, G. M. Z. (2016). Importancia nutricional, farmacológica y química de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*).
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Ramaiah, S. K., & Jaeschke, H. (2007). Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicologic pathology*, 35(6), 757-766.
- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A., Rodriguez, C. A., & Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 241-246.
- Reichling, J. J., & Kaplan, M. M. (1988). Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 33(12), 1601-1614.
- Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9-18.
- Robinson, T. (2012). *The biochemistry of alkaloids* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Salama A., E Polo, C Contretras, L Maldonado. (1986). Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. *Rev. Col. Ciencias Químicas Farmacológicas*. 15,79-82.
- Salas, M. G., Cruz, A. Z., Belmares, S. Y. S., & Valdivia, B. (2013). Actividad anticancerígena del ácido gálico en modelos biológicos in vitro. *Revista Científica*, 5(9).
- Salazar-Aguilar, S., Ruiz-Posadas, L. D. M., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, M., Santiago-Osorio, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Rivera-Martínez, A. R. & Aguirre-Medina, J. F. (2017). *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a New Cultivar

- with Antiproliferative Potential in a Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *Nutrients*, 9(8), 798.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799.
- Sato, A., Nakashima, H., Nakashima, M., Ikarashi, M., Nishiyama, K., Kinoshita, M., & Seki, S. (2014). Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury. *PLoS one*, 9(3), e92515.
- Setzer, W. N., & Setzer, M. C. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 3(6), 540-556.
- Shaadi, F., Naczek, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press. Londres. 1-16.
- Siciliano, T., De Tommasi, N., Morelli, I., & Braca, A. (2004). 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*, 52(21), 6510-6515.
- Siest, G., Schiele, F., Galteau, M. M., Panek, E., Steinmetz, J., Fagnani, F., & Gueguen, R. (1975). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in plasma: statistical distributions, individual variations, and reference values. *Clinical chemistry*, 21(8), 1077-1087.
- Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature medicine*, 21(7), 698.
- Taiz, L. (2006). *Plant physiology*, Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., & Grossman, S. (2007). Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(1), 181-186.
- Threlfall, D. R., Whistance, G. R., & Goodwin, T. W. (1971). *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*. by TW Goodwin, Academic Press, London and New York, 357-404.
- Toro A, R. M., Aragón N, D. M., & Ospina G, L. F. (2013). Hepatoprotective effect of calyces extract of *Physalis peruviana* on hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub> in Wistar rats. *Vitae*, 20(2).
- Van Acker, S. A., de Groot, M. J., van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Donné-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). A quantum

- chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical research in toxicology*, 9(8), 1305-1312.
- Van Dalen, C. J., Winterbourn, C. C., Senthilmohan, R., & Kettle, A. J. (2000). Nitrite as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11638-11644.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(10), 700.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., & Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1378-1386.
- Watanabe, Y., Morita, M., & Akaike, T. (1996). Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. *Hepatology*, 24(3), 702-710.
- Weber, L. W., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105-136.
- Weng, C. J., & Yen, G. C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 76-87.
- Whiteman, M., Jenner, A., & Halliwell, B. (1997). Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA. *Chemical research in toxicology*, 10(11), 1240-1246.
- WHO [Organización mundial de la salud] (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Ginebra, Suiza.
- Wink, M., & Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. *Annual Plant Reviews*, 3, 17-133.
- Wintrobe, M. M., & Greer, J. P. (2009). Lymphocytes and lymphatic organs. *Wintrobe's clinical hematology*, 12th edn. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 300-325.
- Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., Gibson, P. C., Cooper, D. M., & Garg, M. L. (2000). Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids*, 35(9), 967.

- Wybranowski, T., Ziolkowska, B., & Kruszewski, S. (2013). Antioxidant properties of flavonoids and honeys studied by optical spectroscopy methods.
- Yen, G. C., Chen, H. Y., & Peng, H. H. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical toxicology*, 39(11), 1045-1053.
- Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27-32.
- Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte Médico*, 5(2).



## ANEXO I

### **RX1. Reactivo de trabajo glucosa**

R1. Reactivo glucosa (tampón fosfatos 50 mMol/L, pH 7.0, Fenol 11 mMol/L, 4-aminofenazona 0.77 mMol/L, glucosa oxidasa 1.k U/L y peroxidasa 1.5k U/L), conservar entre +2 - +8°C.

### **RX2. Reactivo de trabajo urea**

R1a. Buffer Tris-Buffer (150 mMol/L, pH7).

R1b. Reactivo enzimático UR 456. (Ureasa 15 U/mL, GLDH 1 U/mL, NADH 0.28 mmol/l, adenosine-5-diphosphate 2.45 mMol/L y  $\alpha$ -oxoglutarato 11.7 mMol/L).

Reconstituir un vial de reactivo enzimático (Rb1) con 15 mL de buffer (R1a), el reactivo de trabajo es estable 4 semanas en refrigeración (+2 a +8°C).

### **RX3. Reactivo de trabajo creatinina**

R1a. Acido pícrico (35 mMol/L)

R1b. Hidróxido sódico (0.32 mMol/L)

Mezclar el R1a y R1b en proporción 1:1. El reactivo de trabajo es estable 3 días, conservarse entre (+15 y +25°C).

### **RX4. Reactivo de trabajo ácido úrico**

R1a. Tampón (T. HEPES 50 mMol/L pH 7.0, 3.5 DCHBS 4.0 mMol/L)

R1b. Reactivo enzimático UA 230 (4-minofenazona 0.25 mMol/L, peroxidasa 1000 U/L y uricase 200 U/L).

Reconstituir el contenido de un vial de reactivo enzimático (R1b) con un pequeño volumen de tampón (R1a) y transferir el contenido entero a la botella de (R1a), estable 21 días, conservar entre +2 y +8°C. Protegido de la luz.

### **RX5. Reactivo de trabajo aspartato aminotransferasa (AST)**

R1a. Tampón/sustrato (Tampón tris 80 mMol/L, L-aspartato 240 mMol/L)

R1b. Tampón/coenzima/  $\alpha$ -oxoglutarato ( $\alpha$ -oxoglutarato 12 mMol/L, MDH 420 U/l, LD 600 U/l, NADH 0.18 mMol/L).

Reconstituir un vial de tampón/coenzima/  $\alpha$ -oxoglutarato R1b con 2 mL de R1a tampón sustrato. El reactivo es estable 14 días, conservar entre +2 - +8°C.

### **RX6. Reactivo de trabajo alanina aminotrasferasa (ALAT)**

**R1a.** Tampon/suatrato (tampón tris 100 mMol/L, pH 7.5, L-alanina 0.6 mMol/L)

**R1b.** Tampón/coenzima/  $\alpha$ -oxoglutarato ( $\alpha$ -oxoglutarato 15 mMol/L, LD 1.2 U/ml, NADH 0.18 mMol/L).

Reconstituir un vial de tampón/coenzima/  $\alpha$ -oxoglutarato R1b con 2 mL de R1a tampón/sustrato. El reactivo es estable 14 días, conservar entre +2 - +8°C.

## ANEXO II

### Solución Buffer de fosfatos (PBS).

Esta solución de sales de fosfato conserva la fisiología celular. Para preparar 1L.

-Agua bidestilada	1.0 L
-Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA)	8.0 g
-Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA)	0.2 g
-Fosfato monoácido de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (Sigma, Chem, USA)	2.16 g
-Fosfato diácido de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (Sigma, Chem, USA)	0.2 g

Las sales de NaCl, KCl y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se disuelven completamente una por una en 800 mL. de agua bidestilada. Una vez disuelto todo se ajusta el pH de 7.2 -7.4 con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se afora al volumen final de 1 L. Se vacía en botellas de vidrio para esterilizarlas por autoclave, dejar enfriar y almacenar a 4°C.