



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO



TESIS:

Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA
MOLECULAR

QUE PRESENTA:

Biol. Zimri Aziel Alvarado Ojeda.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Gabriela Rosas Salgado.

Cuernavaca, Morelos, México, 2022

SINODALES

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

COMITÉ REVISOR

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dra. Gladis Fragoso Gonzáles

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



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



Apoyos recibidos.

Zimri Aziel Alvarado-Ojeda agradece al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado (No. 1019271).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo de la Dra Marisol Méndez Martínez, Dra. Celeste Trejo-Moreno, por su asesoría para los montados de técnicas elaborados en el presente estudio. Así mismo, al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer, para la obtención del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule*, así como la cuantificación del ácido cinámico.

Agradezco al apoyo técnico del M.C Juan Carlos Villegas García, por su ayuda a la esterilización del material utilizado para este trabajo.

Finalmente agradezco a mi comité que evaluó con precisión mi desempeño semestre con semestre hasta finalizar las 3 etapas requeridas:

Dr. Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Dr. Jesús Santa Olalla[†]

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por todas las bendiciones en mi vida y por darme la oportunidad de encontrar en este proceso a personas que me han mantenido y ayudado a seguir adelante. A todos los retos y caídas que me impulsaron a mejorar como persona y como profesional, permitiéndome llevar el conocimiento que me da a las personas.

Le agradezco a Dios por dejarme ser hijo de Oscar Alvarado Terrones y Lorena Ojeda Flores, que, sin sus consejos, amor, paciencia y apoyo no podría haber llegado al lugar donde estoy ahora. Que con su esfuerzo inigualable y gracias a la fuerza que Dios les puso, me ayudaron a concluir un trabajo que no solo me ayudará en mi vida profesional, si no me ayudará a ser mejor persona. Porque, sus oraciones y consejos como “Disfruta tu presente pensando en tu futuro”: “Mientras tengamos vida siempre hay esperanza”, me han impulsado siempre.

Le agradezco a Dios por dejarme ser nieto de abuelos tan maravillosos como Guadalupe Terrones Castillo[†] y Gabino Alvarado Neri[†], a quienes no dedico esta tesis puesto que no pude ayudar cuando era pequeño; Sin embargo, esto me ha impulsado a generar conocimiento y ayudar a las personas haciendo ciencia de frontera. Ya que si no fuera por ellos y su legado: “Cuando seas grande debes ser un súper héroe y ayudar a muchas personas” no podría impulsarme. Lo cual valoro siempre ya que es mejor dar sin esperar a recibir nada a cambio.

Le agradezco a Dios por dejarme ser sobrino de tíos como Arturo Alvarado-Terrones, Edgar Alvarado, Ángel Alvarado-Terrones, José Ojeda-Flores, Hugo Ojeda-Flores, Gisela Cruz Roldán quienes me ayudaron miles de veces cuando más los necesité, me enseñaron a amar, ayudar, ver por los demás, amar a la familia, ser honesto y luchar por tus sueños. Todos son personas extraordinarias a las cuales les debo mi amor y le agradezco a Dios por pertenecer en su familia. En especial agradezco a Dios por mi tío Alejandro Alvarado, quien por causas del destino que tenía Dios para él partió antes de ver concluir esta tesis, por esta razón también se la dedico, ya que miles de veces me ayudó a ser mejor, leyendo lo que publicaba, viendo en vida lo que exponía y siempre alentándome y dándome consejos para mejorar; y que además me impulsó su muerte a trabajar con terapias contra COVID. Finalmente doy gracias a Dios por la vida de mi tía Laura Alvarado-Terrones quien con su amor y pasión por el área de la Salud me hizo amar, desde pequeño la ciencia y la medicina; doy gracias a Dios por su amor y paciencia, y por haberme instruido en esta área.

Gracias a Dios por dejarme ser Hermano de Nancy y Pablo, quienes hacen de mis días un sinfín de aventuras, con risas, y lágrimas. Por estar conmigo siempre, y no dejarme. Gracias por ayudarme siempre y así como estuvieron conmigo yo lo estaré para ustedes sin pensarlo. Porque por eso quiero salir adelante, para cumplir sueños que siempre quisimos desde pequeños, de los cuales no los cumpliré solo, porque ustedes si Dios lo permite estarán siempre de mi mano. Le agradezco a Dios por mi sobrina Emma Amiel que, sin su amor, y su cariño no podría seguir. Por último, pero no menos importante, agradezco a Dios por el apoyo y cariño de Santiago quien, con sus bromas, pláticas y consejos no dejé todo por aquello que gracias a Dios me ha dado; también por muchas veces darme la respuesta sin saber de las cosas que no comprendía. A mi amiga Diana y Daniela por hacerme de mis días en la facultad una aventura y diversión. A dianita por nunca dejarme y siempre estar conmigo en las buenas y en las malas, en mis alegrías y tristezas.

INDICE	
Abreviaturas.	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El hepatocito y su función en el organismo (filtrador hematológico).	1
1.1.1. Esteatosis: un desequilibrio en la síntesis, degradación y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos.	1
1.2 ESTRÉS OXIDANTE Y MUERTE CELULAR.	14
1.2.1 Estrés mitocondrial, activación de peroxisomas y citocromo P450.	14
1.2.2 Estrés oxidante (ROS), peroxidación lipídica (MDA) y muerte celular	15
1.3 ROS, DAMPS, ÁCIDOS GRASOS LIBRES E INFLAMACIÓN.	16
1.4 Tratamientos (Tx) para esteatosis hepática.	17
1.4.1 Metformina como control farmacológico.	18
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Información etnomédica las cucurbitáceas para el manejo de patologías hepáticas.	19
2.2 Antecedentes fitofarmacológicos de <i>Sechium edule</i> sobre enfermedades metabólicas asociadas al daño hepático.	19
2.3 Efecto hepatoprotector del rSe-HA.	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. PLANETAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVO GENERAL	24
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	24
7. METODOLOGIA	25
7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico de la raíz de <i>Sechium edule</i> .	25
7.2 Análisis cromatográfico de alta resolución del rSe-HA	25
7.3 Determinación de la concentración de Ácido Cinámico en el rSe-HA	26
7.4 Cultivos celulares.	26
7.5 Viabilidad Celular por Azul Tripano	27
7.6 Evaluación del poder reductor por MTT.	27
7.7 Cuantificación de enzimas hepáticas (TGP/ALT) en medio.	27
7.8 Inducción de esteatosis con Ácido Oleico/BSA.	28
7.9 Determinación de la CE50 y la Emax del rSe-HA.	28

7.10	Tinción Red-Oil-O en células HepG2.	30
7.11	Cuantificación de triglicéridos en lisados de hepatocitos.	30
7.12	Evaluación de Resistencia a la insulina por el consumo de 2-Deoxiglucosa.	31
7.13	Determinación de glicerol en medio de cultivo.	32
7.14	Determinación de IL-6 y TNF- α por método de ELISA en Sándwich.	32
7.15	Cuantificación de Malonaldehido (MDA)	33
7.16	Análisis estadísticos.	34
8.	RESULTADOS	34
8.1	CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CINÁMICO EN rSe-HA.	34
8.2	EL rSe-HA NO ES TÓXICO PARA LAS CÉLULAS HepG2.	36
8.3	LA CE ₅₀ DE 0.20 μ g/ml ES EFICIENTE PARA EVITAR Y REVERTIR LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA.	39
		40
8.4	EL rSe-HA EVITA LA ESTEATOSIS.	41
8.5	EL rSe-HA AUMENTÓ LIPOLISIS.	42
		43
8.5.1	rSe-HA AUMENTÓ EL PODER REDUCTORASOCIADO A LA LIPÓLISIS.	43
8.6	EL rSe-HA EVITA LA EXPRESIÓN DE TNF α e IL6.	44
8.7	EL rSe-HA EVITA O VENDE LA RESISTENCIA A LA INSULINA.	47
8.8	EL rSe-HA EVITA EL ESTRÉS OXIDANTE.	48
9.	DISCUSIÓN.	49
9.	CONCLUSIÓN	56
10.	PERSPECTIVAS	56
11.	LITERATURA CITADA	57

Abreviaturas.

AGLs	Ácidos grasos libres
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
RI	Resistencia a la insulina
TGs	Triglicéridos
ROS	Por sus siglas en inglés Reactive oxygen species
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ANGII	Angiotensina II
AO	Ácido oleico
AO-BSA	Ácido oleico conjugado con albumina
FABS	Transportadores lipídicos unidos a CDs
TNFR1	Receptor de Factor Tumoral Alpha 1
TNFα	Factor de necrosis tumoral Alpha
S1P	Serín proteasa 1
S2P	Serín proteasa 2
SREBP1c	proteína 1 de unión a los elementos reguladores de esteroles
FAS	Por sus siglas en inglés Fatty acid synthase
PPAR γ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
AMPK	Proteína cinasa Activada por Monofosfato de Adenina
Ser	Serina
IRS	Receptor de Insulina
IRS-1	Bucle de activación del receptor de insulina 1
AKT	Proteína cinasa B
SHIP 2	Inositol fosfatasa 1 que contiene SH2
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP-1B	Tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 1
ATP	Adenosin Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
4-HNE	4-Hidrononenal
MDA	Malonaldehido
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
O²⁻	Ion superóxido
OH	Hidroxilo
AGs	Ácidos grasos
DAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Daño
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
IL-6	Interleucina 6
Tx	Tratamientos
MET	Metformina

rSe-HA	Extracto Hidroalcohólico de la raíz de <i>Sechium edule</i>
Thr¹⁷²	Residuo 172 de Treonina
TGP/ALT	Alanina aminotransferasa
CE₅₀	Concentración Efectiva 50
HPLC	Análisis cromatográfico de alta resolución
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
REL	Retículo Endoplásmico Liso
2-DG	2-Deoxiglucosa
2-DG6P	2-Deoxiglucosa 6 fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
NASH	Por sus siglas en inglés Nonalcoholic Steatohepatitis
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
HO1	Hemo-oxigenasa 1

RESUMEN

La esteatosis o hígado graso es una enfermedad en la que los hepatocitos acumulan grasa y presentan resistencia a la insulina; estas condiciones desarrollan un ambiente prooxidante asociado a un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive oxygen species) y lípidos oxidados como el malonaldehído (MDA) y a un ambiente proinflamatorio, lo que lleva a la cirrosis o carcinoma hepático. Esta enfermedad es consecuencia del ambiente proesteatótico (inflamación y estrés oxidante sistémica de bajo grado, alta concentración sérica de glucosa y lípidos) generado durante el Síndrome Metabólico inducido por distintas patologías que se presentan simultáneamente como Obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y dislipidemias.

El hígado graso es una enfermedad multifactorial para la cual aún no existe un único tratamiento por lo que se requiere de una polifarmacia para su control. Los extractos de plantas son una buena opción terapéutica para ella, ya que, al estar conformadas por diferentes moléculas, pueden actuar sobre los diferentes blancos terapéuticos responsables de las diferentes patologías que la conforman. Se ha reportado que el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule*, Chayote, (rSe-HA) controla i) el ambiente proesteatótico (hipertrigliceridemia) en ratones obesos y ii) evita el daño hepático (efecto hepatoprotector) ya que no permite la acumulación de triglicéridos en el hígado, la necrosis, inflamación y fibrosis, inducida por la aplicación crónica de ANGII en ratón. Sin embargo, aún se desconoce el modo de acción del rSe-HA, por lo tanto, para iniciar con estos estudios, se planteó la pregunta de investigación que da origen al presente proyecto: ¿El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* evita y revierte la esteatosis, inflamación y estrés oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales? Para satisfacer este objetivo se colectó la raíz de *S.edule* en la localidad de Cuautlapan perteneciente al municipio de Ixtaczoquitlán, Veracruz; de la cual se obtuvo el extracto hidroalcohólico a través de un proceso de extracción por maceración que se empleó como tratamiento. Se determinó una CE₅₀= 0.20µg/ml tanto para el modelo preventivo (incubación de las células HepG2 con ácido oleico + el tratamiento por 24h), como para el ii) modelo terapéutico (inducción de daño con ácido oleico por 24h, pasado ese tiempo, se retiró el medio y se incubaron por otras 24 h con el ácido oleico + Tratamiento. Al terminar los tiempos experimentales de ambos modelos, se evaluó su efecto sobre otros aspectos que caracterizan a la esteatosis como, la esterificación rSe-HA de triglicéridos (TGs), degradación de lípidos, estado redox, la producción de citocinas proinflamatorias, la resistencia a la insulina (RI) y la producción de lípidos oxidados. Los resultados mostraron que la CE₅₀ [0.20 µg/ml] del rSe-HA evitó y redujo la concentración de TGs en lisados de hepatocitos; aumentó la lipólisis y estado redox observada a través de la concentración de glicerol y formazán; evitó la RI observada a través el consumo de glucosa; evitó la producción de TNFα e IL6 y bajó la concentración de MDA. Estos resultados indican que el rSe-HA evitó y revirtió la esteatosis, el estado pro-inflamatorio y pro-oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales por ácido oleico. En conclusión, este trabajo abona información del extracto rSe-HA para contemplarlo con un potencial uso para el control y prevención de la esteatosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El hepatocito y su función en el organismo (filtrador hematológico).

El hígado a través de los hepatocitos realiza numerosas funciones vitales, incluida la desintoxicación de la sangre antes de que llegue al cerebro; simultáneamente secreta e internaliza decenas de proteínas, lípidos y carbohidratos, lo que ayuda a mantener el equilibrio químico en sangre. Además, se considera un reservorio energético al captar lípidos y carbohidratos y también sintetiza bilis que ayuda a la digestión de los alimentos ^[1]. Los hepatocitos llegan a ser hasta el 80% de la población celular total del volumen del hígado humano y están íntimamente asociados con la sangre arterial y venosa^[2].

Debido a su función como filtrador, alrededor de un 12% del volumen total sanguíneo reside dentro de él, para lo cual, la sangre fluye a través del hígado por un sistema de vasos muy fenestrados que lo atraviesan lo que permite el intercambio bidireccional de componentes entre células y plasma. Estos vasos están rodeados por cordones de hepatocitos, por lo que se puede decir que cada hepatocito está literalmente "bañado en sangre" ^[1]. Esta intimidad física entre las células y el plasma permite que el hígado tenga dos funciones importantes como filtrador hematológico: i) la producción de proteínas para el plasma sanguíneo y ii) la captación endocítica concomitante de carbohidratos y lípidos con la intención de almacenar energía, ya que esterifica estos monómeros en glucógeno o triglicéridos respectivamente, esta función se mantiene regulada en condiciones sanas ^[3]. Esta excepcional capacidad de purificación pone en riesgo al hígado dado que lo hace altamente susceptible al daño por exposición excesiva a grasas, alcohol, drogas y otras toxinas así como una gran cantidad de patógenos como los virus de la hepatitis ^[1].

1.1.1. Esteatosis: un desequilibrio en la síntesis, degradación y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos.

La esteatosis, es un proceso en donde los hepatocitos comienzan a acumular grasa de manera excesiva; como consecuencia del exceso de ácidos grasos libres (AGLs) y glucosa en sangre de pacientes con obesidad, DMT2 y dislipidemias ^[4]. Se ha reportado que este

proceso es la forma en la que la célula se protege de la toxicidad de los AGLs, ya que estos lípidos ^[5,6] al aumentar su concentración dentro del hepatocito desarrollan 1) RI; 2) muerte celular, 4) inflamación y 3) estrés oxidante ^[7]. Esto fue comprobado tras evaluar que la inhibición en la producción de TG lleva a una baja esterificación de estos, pero incrementa la concentración de ROS, necrosis, inflamación y fibrosis ^[8,9]. El problema que se presenta en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas como la Obesidad, la DMT2 y las dislipidemias, es que la esterificación de TGs sobrepasa los límites de almacén; lo que lleva a que la célula sea incapaz de esterificar los lípidos en TGs. A su vez, esta condición obliga al hepatocito a entrar en lipólisis como consecuencia de la RI ^[10,11] lo que lleva a estrés oxidante, muerte celular, inflamación y Fibrosis ^[12,13].

Los hepatocitos absorben los AGLs por endocitosis mediada por receptores ^[14], los cuales cruzan la membrana por una combinación de transporte facilitado y difusión ^[15]. A este exceso de AGLs dentro del hepatocito se le conoce como acumulación lipídica. Estos lípidos acumulados pueden esterificarse en TGs u oxidarse en las mitocondrias por medio de la fosforilación oxidativa ^[16]. La esterificación, por un lado, permite la formación de Droplets característica de la esteatosis y por otro a la producción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL) cuya función es el transporte de lípidos a otros tejidos ^[16]. La oxidación de AGs, que dependerá de la RI, llevará a un aumento en la producción de cuerpos cetónicos, un compuesto que da energía a la misma célula y al exportarse en sangre, brinda energía al cerebro u otros órganos^[16].

Las diversas fuentes de estos ácidos grasos en pacientes incluyen i) la grasa proveniente de la dieta ^[3]; 2) los AGLs y TGs provenientes de los adipocitos con resistencia a la insulina ^[3], ii) síntesis *de novo*, un proceso que utiliza a la glucosa incapaz de poder ser almacenada en glucógeno como materia prima de los AGs^[17] o por iii) el aumento en la concentración y actividad de la angiotensina II ^[18, 19]. Todas estas condiciones, aumentan la concentración de AGLs en sangre con dirección a tejidos no adiposos como el hígado ^[20,21]. En el hígado, el exceso de AGs debe tratarse de otra manera, una mínima cantidad puede ser transportada fuera de los hepatocitos por los mismos mecanismos que permite su absorción, y otra tanta es convertida en TGs que pueden ser almacenados casi inmediatamente al entrar a las células ^[20].

El desbalance entre la síntesis y degradación de lípidos y la eficacia de la primera, es consecuencia de la saturación catabólica (lipólisis) lo que lleva al fallo mitocondrial, fallo del Retículo endoplasmático Liso (Citocromo P450) y bajo catabolismo en peroxisomas. Esto se da como consecuencia de la RI, condición que, i) obliga a las células a entrar en lipólisis y ii) evita el consumo de glucosa ^[22,23]. Pero ¿cómo es que a pesar de tener RI los hepatocitos no logran disminuir la carga lipídica? Para responder a esto hay que considerar que en modelos *in-vivo* e *in-vitro* se ha reportado que la esteatosis se mantiene a pesar de la lipólisis constante por la RI y esto se debe a que el daño mitocondrial inducido por los AGs y ROS deteriora la oxidación de lípidos, razón por la cual es más eficiente la síntesis de lípidos ^[4, 18,23-26].

Por otro lado, existen diferentes estudios preclínicos que reportan que el aumento en la concentración de ácidos grasos como el ácido oleico (AO) en sangre, es uno de los principales inductores de la esteatosis hepática en pacientes obesos y con RI ^[26], esto ha sido corroborado en estudios *in-vitro*, en donde células hepáticas HepG2 [27 -31], al ser expuestas a diferentes concentraciones de ácido oleico (AO) conjugado con albumina (AO-BSA) desarrollan esteatosis [27 -31]. Este conjugado molecular entra a la célula a través de receptores específicos como el CD36 y los FABPs, que en conjunto permiten la translocación de los AGs como el AO hacia el interior de la célula ^[3, 32, 33]. Al entrar a la célula, el AO en alta concentración desarrolla esteatosis por dos vías distintas:

1. El AO induce la salida de la cisteína proteasa (Catepsina B) que sale de los lisosomas al citosol ^[34,35], la cual activa la NFκB a través de la disociación de Ikk α/β, lo que lleva al hepatocito a producir citocinas proinflamatorias como TNF-α ^[34,35], TNF-α al unirse a su receptor TNF 1 (TNFR1), activa a las serin-proteasas S1P y S2P ^[36], las cuáles son responsables de la maduración y liberación de la proteína 1 de unión a los elementos reguladores de esteroides SREBP-1c, el cual es un factor transcripción que inicia la transcripción de enzimas implicadas en la síntesis y esterificación de lípidos y TGs como la ácido graso sintasa (FAS), monoacilglicerol acil-transferasa, diacilglicerol acil-transferasa ^[37] (Fig 1B).

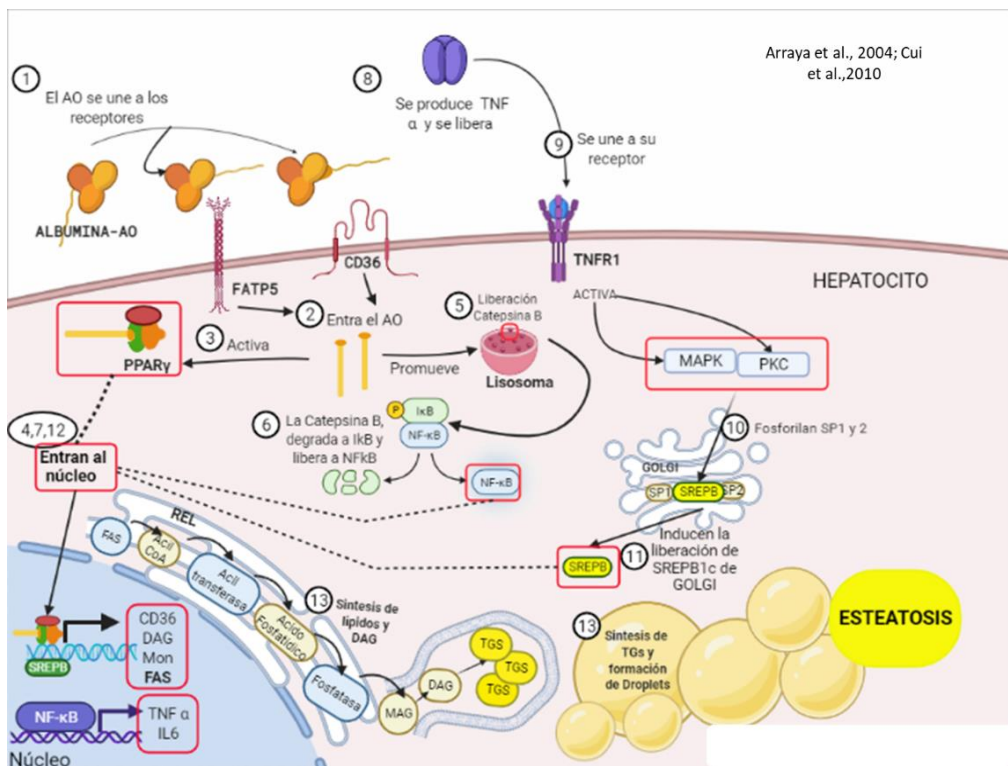
2. Mientras que el AO por un lado activa a SREBP-1c via TNF α por otro lado al unirse al sitio de unión al ligando “huérfano” de PPAR γ lo activa ^[38] lo que promueve su translocación al núcleo con la consecuente transcripción de enzimas como la ácido graso sintasa (FAS), monoacilglicerol acil-transferasa, diacilglicerol acil-transferasa, todas esenciales para la síntesis de lípidos y TGs ^[38] por lo que induce la síntesis y esterificación de lípidos durante el desarrollo de esteatosis hepática ^[38] (Fig 1).

La resistencia a la insulina es otra condición patología resultante de la acumulación de lípidos^[36] que genera un ambiente de conflicto entre la síntesis y degradación en el hepatocito, ya que no solo el órgano es afectado, si no otros tejidos como los adipocitos, y el producto de esta situación es una alta concentración de lípidos en sangre, lo que compromete el metabolismo del hepatocito, ya que es mayor la concentración de lípidos en el medio que lo obligan a guardar lípidos que la de la RI lo lleva a degrada pese a que esté activa AMPK ^[3, 31-33, 40,41]. Además, la síntesis será más rápida porque, tanto PPAR γ como SREBP- 1c actuarán y estarán sobre expresadas aun en presencia de RI ^[41].

La RI en el hepatocito se caracteriza molecularmente por:

- i) Una mayor actividad de la Serin/Threoinina cinasas, que va a fosforilar residuos Ser (Ser³¹² y Ser⁶¹⁶) del IRS1 ^[41,42] lo que trae por consecuencia que no se active la Fosfoinositol 3-cinasa, enzima responsable de comenzar la señalización rio debajo de la insulina, culminando con la activación de AKT.
- ii) Aumento en la degradación de proteínas IRS-1 ^[43,44,45].
- iii) Aumento en la actividad de las Tyr-fosfatasa, incluidas SHIP2, PTEN y PTP-1B ^[46].
- iv) Disminución de la activación de moléculas de señalización rio abajo de IRS1 (Akt y PKC) ^[47].

Juntas o por separado durante la RI, inducen el bloqueo de las vías anabólicas (síntesis) y activan las vías catalíticas (degradación) ^[48] ya que se activa AMPK (una proteína cinasa activada por AMPc y regulada por la insulina) la cual prende vías de degradación de los lípidos y TGs al inhibir las vías que consumen ATP ^[49,50,51] (Fig1).



Arraya et al., 2004; Cui et al., 2010

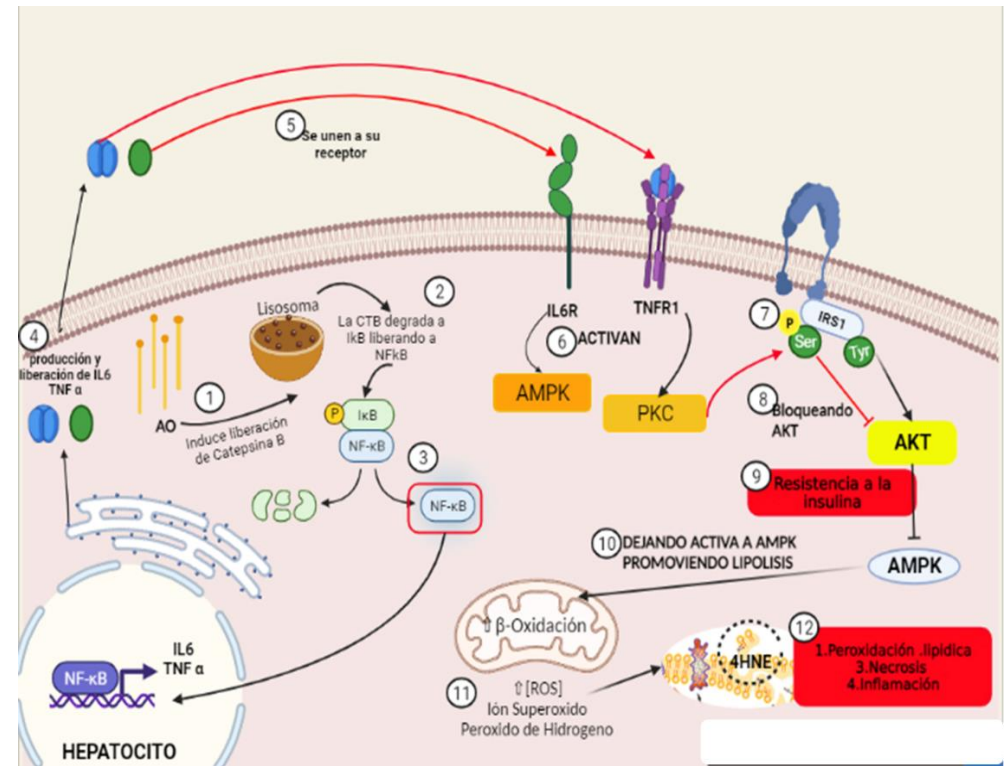


Figura 1. A) Inducción de Esteatosis hepática (hígado graso) por el ácido oleico 1.-el ácido oleico se une a los receptores DE36 y FATP5, 2) el ácido oleico induce esteatosis por dos vertientes 3) activando a PPAR γ el cual 4) entra al núcleo de la célula y comienza la expresión de genes que llevan a la síntesis de enzimas clave para la producción de lípidos como FAS, DAGT, MGAT etc.; Por otro lado induce esteatosis al activar la vía proinflamatoria dado que 5) induce la liberación de la catepsina B del lisosoma, 6) esta enzima degrada a I κ B el cual mantiene bloqueado a NF κ B de esta forma 7) NF κ B entra al núcleo y comienza a inducir la expresión de genes que llevan a la síntesis de mediadores proinflamatorios como IL6 y TNF α , 8) se produce u libera TNF α el cual 9) al unirse a su receptor activa la vía de las MAPK y PKC, la cuales 10) activan por fosforilación a SP1 Y SP1 enzimas que 11) liberan al factor de transcripción SREPB1c del aparato de GOLGI, el cual 12) entra al núcleo y así como PPAR γ , induce la expresión de genes que llevan a la producción de enzimas que sintetizan lípidos y TGs, desarrollando así ESTEATOSIS. **La figura B, representa el proceso para el desarrollo de estrés oxidante y muerte celular asociados a la RI y sobreactivación de lipólisis** 1,2,3Y4) el AO induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL6 y TNF α (proceso descrito anteriormente). 5 y 6) la unión de IL6 y TNF α a su receptor inducen la activación de vías de señalización como MAPK y PKC, las cuales 7) fosforilan los residuos Serina (Ser) del bucle de activación 1 del receptor de insulina (IRS1), lo cual 8) bloquea la actividad de AKT, por lo que 9) desarrolla RI y esto mantiene 10) sobreactiva a la cinasa AMPK, la cual induce la activación de la degradación de lípidos.11) Este proceso lleva a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) como ion superóxido (O \cdot^-) y peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$) desarrollando estrés oxidante, que se caracteriza por la desnaturalización y pérdida de función de múltiples macromoléculas, entre las cuales se encuentran los lípidos de la membrana de los hepatocitos, 12) lo que lleva a la ruptura de la membrana (peroxidación lipídica), a la formación de 4hidroxononanal (4HNE), a la muerte celular por necrosis y en conjunto potencian el ambiente proinflamatorio ya que estas moléculas son reconocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPS) por los macrófagos, lo que los activa y producen citocinas proinflamatorias. (IMÁGENES CREADAS EN BioRender.com)

El AO desarrolla RI, de manera indirecta, ya que induce la sobreexpresión de TNF α , molécula que, al unirse a su receptor, activa a las MAP cinasas (MAPK) y PKC que fosforilan de IRS1 en sus Ser³¹² y Ser⁶¹⁶ [40,52], lo que activa vías de degradación de macromoléculas como glucógeno, y triglicéridos. Por lo tanto, al no funcionar la insulina, AMPK se activará y comenzará a activar vías de oxidación de lípidos y TGs [49,50,51] aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROs) que serán las responsables de desarrollar un estado de estrés oxidante [53]; recientes avances reportan también que los ROS activan a PPAR γ , induciendo la síntesis y esterificación de lípidos en los hepatocitos desarrollando esteatosis [54].

El estado oxidante en el hepatocito, también se caracteriza por la pérdida del funcionamiento de macromoléculas de importancia como son el DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos de la membrana, este último evento generará la producción de compuestos derivados de aldehídos como es el 4-Hidrononal (4-HNE) y el malonaldehído (MDA), responsables de la necrosis celular [53] que finalmente inducirá un proceso inflamatorio y de reparación (fibrosis) [53].

1.2 ESTRÉS OXIDANTE Y MUERTE CELULAR.

1.2.1 Estrés mitocondrial, activación de peroxisomas y citocromo P450.

Durante la esteatosis hepática, los hepatocitos aumentan la oxidación de grasas, por lo tanto, también aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno como el ion superóxido O²⁻, el peróxido de hidrógeno H₂O₂ y el radical hidroxilo (HO) [55-58] induciendo la liberación de cofactores oxidados (NAD⁺ y FAD) los cuales son transformados en cofactores reducidos (NADH y FADH₂) [59], proceso en el que se liberan electrones, los cuales entran a la cadena transportadora de electrones, en donde los complejos I, III y IV los transforman en moléculas reactivas de oxígeno [57, 58,60,61].

Por otro lado, la esteatosis hepática logra saturar la capacidad metabólica de la mitocondria, volviéndola disfuncional, esta disfunción se caracteriza por: 1) presentar alteraciones en la cadena transportadora de electrones y por ende en la producción de ATP,

debido al daño el DNA mitocondrial (DNAm_t) el cual codifica proteínas de importancia para estos procesos, y 2) generar saturación metabólica ^[57,62] volviéndose incapaz de realizar su función, obligando a la célula a emplear un segundo mecanismo de degradación de ácidos grasos. El segundo mecanismo de degradación lo llevan a cabo los peroxisomas y el Citocromo P450, enzima expresada en el retículo endoplasmático liso ^[57,62-64], considerando que ambas vías también inducen la producción de ROS, por lo que aumenta su concentración de estas especies reactivas de oxígeno^[39]. Los ROS provenientes de la mitocondria, peroxisomas y retículo, aumentan hasta sobrepasar la capacidad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), la catalasa (CAT) y la glutatión (GSH) que están dentro de estas células ^[57,59,60]. También se observa que tanto el retículo como el peroxisoma, entran en un estado de estrés ^[65]; el retículo al entrar en estrés comienza a liberar el calcio, el cual va a inducir la salida del Citocromo C de la mitocondria, activando vías de muerte celular por necrosis ^[39]. Todas estas características componen al estado prooxidante que se compone por la disfunción mitocondrial, microsomal e inducen peroxidación lipídica (Fig 1).

1.2.2 Estrés oxidante (ROS), peroxidación lipídica (MDA) y muerte celular

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria, peroxisomas y CYP450, provoca la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares a través de sus electrones libres, y forman compuestos hidroperóxidos derivados de lípidos o bien conocidos como compuestos derivados de aldehídos ^[66]. Entre todos estos productos, el compuesto 4- hidroxí-2-nonenal (4-HNE) y el malonaldehído (MDA) son de los más reactivos y mejor estudiados durante el estado de estrés oxidante ^[66,67,68]. La peroxidación lipídica es un proceso que oxida ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ^[68], los cuales pueden clasificarse en omega-3 (n-3) y omega-6. (n-6) ^[69]. Existen dos formas de producir lípidos peroxidados, la vía enzimática y no enzimática, en el primer caso 1) El ácido graso n-6 (ácido araquidónico), se reduce mediante peroxidación enzimática a prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y otros productos derivados de ciclooxigenasa, lipoxigenasa o citocromo P450 ^[69]; y la segunda vía 2) peroxidación no enzimática sí

dependiente de radicales de oxígeno, los cuales transforman los AGs poliinsaturados a MDA, y 4-HNE ^[69] (Fig 1).

Dado que los lípidos son responsables de mantener la integridad de las membranas celulares, la peroxidación extensa de los lípidos altera el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas ^[88]. Como compuestos altamente reactivos, estos peróxidos de lípidos también pueden propagar una mayor generación de ROS o degradarse en compuestos reactivos capaces de dañar el ADN y las proteínas ^[69]. Las enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), particularmente GPx4, son reguladores clave de los peróxidos de lípidos en las células, usando al glutatión (GSH) como cosustrato para reducir los peróxidos de lípidos a los alcoholes correspondientes ^[68]. La inactivación de esta enzima da como resultado la acumulación de peróxidos de lípidos y, a menudo, la muerte celular, ya que estas moléculas tienen una vida más larga que los ROS y forman enlaces covalentes no deseados con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana, por lo que tendrán la capacidad de propagar más el daño oxidante, necrosando al tejido circundante sano, desestabilizando con más facilidad la membrana celular, hasta formar poros donde hay un flujo excesivo de agua y iones dentro de las células, hasta lograr lizarlas^[39]. La formación de 4-HNE consta de 3 pasos 1) oxidación de 9- y 13-hidroperoxioctadecadienoato por los ROS, formando un radical lipídico (iniciación); 2) posteriormente los mismos ROS, lo vuelve a oxidar hasta formar un radical lipídico peroxidado, compuesto que vuelve a interactuar con otro lípido para formar más lípidos peroxidados (propagación) y que finalmente termina 3) con la fragmentación y formación de 4-HNE ^[68]. Por otro lado, se ha reportado que los ROS no solo inducen muerte celular, también se observado que activan a SREBP1c en hepatocitos HepG2 y se propone que esto puede contribuir a propagar el desarrollo de esteatosis al tejido circundante ^[70].

1.3 ROS, DAMPS, ÁCIDOS GRASOS LIBRES E INFLAMACIÓN.

Como mencionamos anteriormente el estrés oxidante lleva a la necrosis hepatocelular; proceso donde los hepatocitos mueren y liberan DAMPS, siendo estos capaces de inducir inflamación ^[18] (Fig1). No obstante, el hígado a pesar de tener células especializadas en censar y mantener el equilibrio del órgano (macrófagos o células de

Kupffer)^[71], los hepatocitos también son capaces de responder a estímulos nocivos como lípidos, ROS y bacterias, lo que los lleva a producir citocinas proinflamatorias y óxido nítrico en señal de auxilio; a través de la activación de NFκB^[72,73]. Esto se ha comprobado por diversos estudios *in-vitro* donde reportan que células HepG2 al incubarlas con lipopolisacáridos (LPS), ácidos grasos (ácido oleico, ácido palmítico) o peróxido de hidrogeno (H₂O₂) producen citocinas proinflamatorias como IL1β, IL-6, IL-8, TNFα y MCP1, también producen moléculas de adhesión como I.-CAM y también genera Óxido nítrico (ON) a través de la Oxido nítrica sintasa inducible (iNOS)^[74, 75, 76].

Esta producción de citocinas proinflamatorias activa e incrementan la respuesta inmune, lo que lleva a un proceso inflamatorio crónico^[18] promoviendo así la sobre activación de células de Kupffer^[18] y el reclutamiento de más células del sistema inmune^[18]. Como se ha señalado anteriormente, las citocinas tienen múltiples funciones en el hepatocito como activar a factores de transcripción implicados en la síntesis y esterificación de TGs (Fig 1 A) (apartado 1.1.1), generar Resistencia a la Insulina (Fig 1 B) (apartado 1.1.1) y activar vías de lipólisis como AMPK (apartado 1.1.) (Fig 1 B)

1.4 Tratamientos (Tx) para esteatosis hepática.

La esteatosis hepática es una enfermedad multifactorial y abarca la generación y acumulación errática de lípidos, el estrés oxidante y la inflamación entre otros; de no controlarse a tiempo lleva al desarrollo de enfermedades más graves y mortales como la cirrosis o el cáncer hepático. En la actualidad para su control se utiliza una polifarmacia que controla cada una de estas condiciones^[77]. El tratamiento más utilizado, es el uso fármacos para la pérdida de peso, sensibilizadores de la insulina, antilipogénicos y sobre todo antioxidantes^[78].

Con base en lo propuesto por el colegio americano de Gastroenterología y la asociación americana de gastroenterología en el 2015-2019 son los siguientes:

Pioglitazonas: Son agonistas del Receptor Nuclear activado por Proliferadores de Peroxisoma (PPAR) de tipo α para hepatocitos y de tipo γ para adipocitos por lo que disminuye la concentración de triglicéridos, lípidos y carbohidratos^[79] dentro de la célula y

en suero. Sin embargo, el uso de este fármaco de manera crónica genera efectos colaterales como: trastornos de sueño, ansiedad, agresividad y en casos extremos daño hepático aumentado la concentración de enzimas hepáticas en suero ^[80].

Vitamina E y C: Ambos son compuestos con propiedades anti-oxidantes, recetado tanto en pacientes con hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica ^[81,82,83]. Además, se ha visto que tienen la capacidad de evitar la cirrosis hepática, con efectos anti-inflamatorios. ^[81, 82, 83]

1.4.1 Metformina como control farmacológico.

La metformina es un fármaco que se utiliza a menudo para el control del hígado graso en pacientes con DMT2 y obesidad ^[84]. Este fármaco es una biguanida que por excelencia sensibiliza a las células a la insulina y esto lleva a su efecto hipoglucemiante ^[85].

Este fármaco funciona a través de la fosforilación de AMPK en el residuo Thr¹⁷² por lo que: 1) disminuye la gluconeogénesis y la lipogénesis en el hígado. 2) activa la degradación de lípidos, 3) Reactiva la captura de glucosa ^[86], 4) Activa a P53 por lo que evita que la célula muera por necrosis y entre a un proceso de muerte celular no inflamatorio programado (apoptosis) ^[87] por lo que se reduce la concentración de enzimas hepáticas (TGP/ALT) en suero ^[93,94]. También se ha visto que tiene efecto 5) antiinflamatorio ya que evita la translocación de NFκB al núcleo, lo que lleva a una baja concentración de mediadores proinflamatorios (TNFα, IL6, IL1β) ^[88,89]. Evita la producción de lípidos y su esterificación en TGs, a través de la activación de factores de transcripción como SREBP1c y PPARγ ^[90,91,92]. Sin embargo, a pesar de que este medicamento ofrece muchas ventajas para el control de la enfermedad, su uso crónico puede inducir insuficiencia renal, hepática y cardíaca, así como acidosis metabólica aguda o crónica. No obstante, es buena opción utilizarlo como control farmacológico para fortalecer el efecto antilipogénico, antiinflamatorio y sensibilizador de insulina de otros productos, como son los de origen natural (fitomedicamentos).

2. ANTECEDENTES

2.1 Información etnomédica las cucurbitáceas para el manejo de patologías hepáticas.

Las plantas medicinales son buena opción terapéutica, ya que gracias a sus diferentes compuestos químicos brindan diferentes blancos terapéuticos, lo que ayudaría a sustituir la polifarmacia. Varias plantas de la familia de las cucurbitáceas han sido utilizadas para el control de enfermedades crónicas hepáticas como hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis hepática y han sido muy eficientes para controlar cada una de ellas (Tabla 1).

Tabla 1. Cucurbitáceas y su efecto hepatoprotector

NOMBRE	NOMBRE COMÚN	FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	MODELO	CITA
<i>Trichosnathes cucumerica</i>	Calabaza serpiente	<i>Cucurbitaceae</i>	Reduce enzimas hepáticas en suero (AST, ALT, ALP, TB) y disminuye la necrosis celular.	Ratas administradas con CCL4	Kumar et al., 2009
<i>Cuccinia grandis</i>	Calabaza hiedra	<i>Cucurbitaceae</i>	Disminuye enzimas hepáticas (AST, ALT, ALP, TB) y disminuye necrosis celular.	Ratas administradas con CCL4	Varatharajan, et al., 2009
<i>Cucurbita maxima</i>	Calabaza	<i>Cucurbitaceae</i>	Disminuye la concentración de enzimas hepáticas AST, TGP	Ratas administradas con Isoniacida	Ramos, 2018
<i>Cucumis sativus</i>	Pepino	<i>Cucurbitaceae</i>	Reduce enzimas hepáticas en suero (AST, ALT, ALP, TB) y tiene un efecto anti-oxidante	Ratas administradas con CCL4	Dhande et al., 2013

2.2 Antecedentes fitofarmacológicos de *Sechium edule* sobre enfermedades metabólicas asociadas al daño hepático.

Sechium edule (Chayote), es una planta herbácea perteneciente a la familia de las cucurbitáceas originaria de México que crece en climas cálidos y templados, entre los 500 y los 2000m de altitud. Es endémica de los estados de Veracruz, Michoacán, Quintana Roo, Estado de México y Puebla [95,96]. Se han investigado distintas fracciones y extractos de diferentes partes de la planta como hojas, semillas, tallo, flor, fruto y raíz, y han demostrado ser eficientes como tratamiento para distintas enfermedades.

Lombardo en el 2008, comenzó con la fitofarmacología de la raíz de *Sechium edule*, demostrando que el extracto hidroalcohólico, la fracción acetónica y las subfracciones R14 Y R17 tienen actividad antihipertensiva [97], además por HPLC reportó que los compuestos

que conformaban la planta eran de tipo flavonoide, como apigenina glicosilada. Estos mismos autores en el 2013, evaluaron el efecto combinado de R14 Y R17, en un modelo *in-vivo* y reportaron 1) la actividad antiinflamatoria en un modelo murino de hipertensión y disfunción endotelial inducido por la aplicación aguda de ANGII y 2) a través de HPLC identificaron tanto en el extracto hidroalcohólico, la fracción acetónica y en las subfracciones combinadas de R14 y R17, compuestos derivados del ácido cinámico ^[98]. Estos trabajos fueron la base para los estudios de Trejo-Moreno en el 2013, quien evaluó la capacidad antiinflamatoria e inmunoreguladora de la raíz de *S. edule*, a partir de nuevo material vegetal, demostrando que 1) la fracción metanólica evitaba la producción de citocinas proinflamatorias y 2) induce la diferenciación de células T a células T reguladoras (CTreg) en un modelo de disfunción endotelial e hipertensión *in-vivo* e *in-vitro*, inducidos por la aplicación crónica de ANGII ^[99]. Este mismo material vegetal fue fraccionado en dos fracciones (acetónico e hidroalcohólico) y subfraccionado en (R31, R19, R14 y R15), para después ser evaluado, y demostrando tener varios efectos sobre enfermedades metabólicas y sus comorbilidades, como la sensibilización de insulina, antihipertrigliceridemiante, cicatrizante y neuroprotector en ratones obesos, antioxidante, antihipertensivo, antiinflamatorio, nefroprotector en ratones con hipertensión y disfunción endotelial ^[100-1003].

Trejo-Moreno, en el 2018, evaluó la fracción acetónica en un modelo murino de disfunción endotelial e hipertensión inducidos por la aplicación crónica de ANGII, desmostando que evita la disfunción endotelial, la esteatosis y fibrosis causadas por la actividad de la ANGII y al evaluar la composición química de la raíz, reportaron que tenía compuestos como ácido cinámico, cumárico y ferúlico ^[19]. Para el 2020, Costet, identificó por HPLC y espectrofotometría de masas, que la raíz tenía compuestos fenólicos (medianamente polares) como ácido cumárico y ácido cinámico), flavonoides (medianamente polares) como la apigenina y terpenos (menos polares) como el Metil tetradecanoato, Ácido hexadecanoico, metil éster, Ácido hexadecanoico, Escualeno, y Estigmasterol ^[102] (Tabla 2).

TITULO	Comparación fitoquímica entre raíces de <i>Sechium edule</i> con actividad antihipertensiva, cultivadas en campo y raíces propafadas en hidroponía	Caracterización farmacologica de los compuestos polifenolicos de la Raíz de <i>Sechium edule</i> y su efecto sobre la Disfunción endotelial	Evaluación de la capacidad del extracto metanolico de la raíz de <i>Sechium edule</i> (Chayote) para reparar el daño tisular y controlar la inflamción en un modelo murino de hipertensión	La fracción de las raíces comestibles de <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw. exhiben actividad anti-disfunción endotelial.	Estudio biodirigido de las reuniones rSeCRC1R25 Y rSeCRC1R28 de la raíz de <i>S.edule</i> para el control de la inflamción y el EO.	Estudio Químico y Actividad Nefroprotectora del Extracto Hidroalcohólico Estandarizado de la Raíz de <i>Sechium edule</i> (Jacq sw)
Autor y Año	Galia Lombardo Earl (2008)	Galia Lombardo Earl (2013)	Celeste Trejo-Moreno (2013)	Celeste Trejo-Moreno (2018)	Christian Carlos Ramírez Hernández (2019)	Alejandro Costet Mejia (2020)
Extracto o fracción	Hidroalcohólico, fracción acetónica	Hidroalcohólico, Metanolico, Acetonico	Metanolico	Acetonico	Fracción acetónica obtenida apartir de la maceración con n-Hexano	Fracción acetónica obtenida apartir de maceración con Etanol/Agua
Forma de separación	Sílica gel fase normal	Sílica gel fase normal	Cromatografía Gas	Sílica gel fase normal	Sílica gel fase normal	Sílica gel fase normal (menos polares) y sílica fase reversa (más polares)
Sistema de Elucion	Cloroformo/Metanol	Cloroformo/Metanol	Helio	Diclorometano/metanol	Diclorometano/metanol	Hexano/acetato de etilo (fase normal) y acetonitrilo (fase reversa)
Cantidad de muestras obtenidas	41 fracciones agrupadas en 20, de las cuales solo se evaluaron 8	41 fracciones argupadas en 20	5	x	2 fracciones	64 fracciones
Fracciones evaluadas	R2; R5; R6; R8; R11; R14; R17 ; R20	Solo evaluaron R14 Y R17	Extracto hidroacohólico, acetónico, metanolico y F31, F19, R14 y R15	Extracto hidroacohólico, acetónico, metanolico y F31, F19, R14 y R15	Evaluó R14 (SeGLC3R14) y R15 (SeGLC3R15) [3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875 ug/ml]	Estudios espectroscópicos y esepctrométricos
Actividad Biologica	Antihipertensiva	Anti-hipetensivo, antiinflamatoria, antioxidante	Antiinflamatorio; inmunoregulador	Antidisfunción endotelial	Antioxidante y antiinflamatorio	Efecto nefroprotector
Observaciones	El ExSe-HA; la Face-rSe; R14 y R17 obtenidas de la fracción Acetonica tuvieron la actividad de la raíz cultivada en campo e hidroponía	Identificaron los compuestos por HPLC, en el extracto hidroalcohólico, acetónica, R14 Y R17	Observaron el efecto inmunoregulardo, ya que induce la proloferación de Celular <i>Treg in vitro</i> .	observaron dos nuevos efectos 1) antiesteatotico, 2)antifibrotico	Se usó nuevo extracto,	Se usó nuevo extracto,
Compuesto obtenido	Compuestos de tipo flavonoides: Apigenina glicosilada	Compuestos derivados de ácido cinámico	Compuestos fenolicos como ácido cinámico, cumárico y ferúlico	Compuestos fenolicos como ácido cinámico, cumárico y ferúlico	Acido cinámico	Fenoles: como ácido cumárico, ácido cinámico; flavonoides como apigenina. Terpenos como Metil tetradecanoato, Ácido hexadecanoico, metil éster, Ácido hexadecanoico, Escualeno y Estigmasterol

2.3 Efecto hepatoprotector del rSe-HA.

Como mencionamos anteriormente, el estudio de Trejo-Moreno (2018) fue la base de los estudios de Alvarado en el 2019, quien en un modelo murino reportó el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico estandarizado en ácido cinámico, inducido por la aplicación crónica de ANGII, ya que evitaba la esteatosis, la hepatomegalia, aumento en masa de tejido adiposo, hipertrigliceridemia, la inflamación (disminución de IL-1, IL-6, TNF- α y aumento de TGF- β), muerte celular (disminución de puntos necrosis y de TGP/ALT séricos) y fibrosis^[108] volviéndose en sí, los primeros antecedentes del efecto hepatoprotector de la raíz de *Sechium edule*. Sin embargo, sí se ha reportado que diferentes partes aéreas como frutos y hojas de esta misma especie en modelos *in-vivo*^[109] e *in-vitro*^[110] tiene la misma actividad que la raíz.

Como mencionamos anteriormente la eficacia farmacológica de los extractos de plantas medicinales, es gracias a sus múltiples compuestos químicos que la componen. Con base en lo anterior, se propone que la actividad farmacológica del rSe-HA es el resultado del conjunto de compuestos químicos como los reportados por Trejo-Moreno (2018) y Costet (2020), dado que han reportado de manera aislada que tienen los mismos efectos que se han reportado de *S. edule* (TABLA 3). Wu (2014) y Yang (2015) también al evaluar la capacidad antiesteatitca de las partes áreas de *S.edule* reportaron que activa a AMPK vía fosforilación en residuos Thr¹⁷², inhibe a PPAR γ y SREBP1C y también lo atribuyen a la serie de compuestos químicos producidos por el metabolismo secundario de la planta^[104,105]

COMPUESTO	FUNCIÓN	MECANISMO	CITA
ÁCIDO CINAMICO	MEJORA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA	Mejora la fosforilación del sustrato IRS-1 y PI3K	Huang et al., 2009
ÁCIDO CINAMICO Y ÁCIDO CUMARICO	ANTIOXIDANTES	1.- Reaccionan directamente con los radicales libre. 2.- Inhiben la actividad de la succinato deshidrogenasa al activar a las proteínas desacopladoras (UCP) a través de su grupo 2-alqueno, evitando así la producción de RO's por enzimas mitocondriales	Echtay et al., 2003; Brad et al., 2004; Fernandez-Martinez et al., 2007; Azzu y Brand, 2010; Trejo-Moreno et al., 2018
ÁCIDO CINAMICO Y ÁCIDO CUMARICO	ANTI-INFLAMATORIOS	1.- Evitan producción de DAMPS al evitar el estado pro-oxidante. 2.- Inhiben a NF-kB lo que evita su translocación al núcleo para producción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión.	Fernandez et al., 1998; Luceri et al., 2004; Chaing et al., 2003; De, Baltas y Belval, 2011
ÁCIDO CINAMICO	ANTI-FIBROTICO	Activan al factor de transcripción Nrf2 al disociar el inhibidor Keap1, por lo que Nrf2 se transloca al núcleo favoreciendo la expresión de genes que inhiben la actividad de la vía de señalización TGF/SAMD y aumenta la producción de enzimas que degradan colágena (I y III)	Korkina, 2007; Oh et al., 2012

Tabla 3. farmacología del ácido cinámico y ácido cumarico

3. JUSTIFICACIÓN

La esteatosis hepática o hígado graso, es una enfermedad caracterizada por la acumulación excesiva de lípidos, siendo el comienzo de un proceso crónico y degenerativo del hígado, culminando con la cirrosis, donde el único tratamiento es el trasplante del órgano. La disfunción del hepatocito tiene un papel importante, ya que, en estas condiciones, se ve obligado a tener un metabolismo errático en el que se desregulan y sobreactivan las vías de síntesis y degradación de los lípidos entre otras, influyendo en el aumento de especies reactivas de oxígeno, necrosis e inflamación; condiciones que exacerban más el daño. Actualmente se receta múltiples fármacos para su control, ya que las enfermedades hepáticas son multifactoriales; por esta razón los extractos de plantas medicinales son una buena opción terapéutica ya que, al estar conformadas por múltiples compuestos químicos, logran tener diferentes blancos terapéuticos. Tal es el caso de *Sechium edule* (Chayote), se ha comprobado que el extracto hidroalcohólico de la raíz no solo controla el ambiente proestático sino también evita el daño hepático (esteatosis hepática, hipertrigliceridemia, aumento de tejido adiposo, necrosis hepatocelular, inflamación y fibrosis) en un modelo murino inducido por la aplicación crónica de ANGII. Sin embargo, no se conoce el modo de acción del extracto y

con la intención de iniciar este estudio se analizó el efecto del extracto sobre la esteatosis, estado proinflamatorio y prooxidante en células HepG2 inducido por ácido oleico

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo anterior y con el objetivo de fortalecer el uso del extracto hidroalcohólico para ayudar al control de la esteatosis y evitar enfermedades de mayor gravedad, se plantea la pregunta de investigación que da origen al presente proyecto:

¿El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* evita y revierte la esteatosis, el perfil proinflamatorio y estrés oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales por ácido oleico?

5. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* evita y revierte la esteatosis, el perfil proinflamatorio y el estrés oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales por ácido oleico.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del rSe-HA sobre la acumulación de lípidos, el perfil proinflamatorio y el estrés oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* y cuantificación de ácido cinámico.
2. Determinar la CE₅₀ y la E_{max} del rSe-HA.
3. Evaluar la CE₅₀ del rSe-HA para revertir o evitar la esteatosis en hepatocitos HepG2 disfuncionales.
4. Evaluar la CE₅₀ del rSe-HA para evitar la producción de citocinas proinflamatorias (TNF α e IL6).
5. Determinar si la CE₅₀ rSe-HA vence la RI de los hepatocitos HepG2 disfuncionales.
6. Determinar si la CE₅₀ del rSe-HA evita o revierte la peroxidación lipídica.

7. METODOLOGIA

7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule*.

La raíz de *Sechium edule* se obtuvo en la localidad de Cuautlapan perteneciente al municipio de Ixtaczoquitlán, Veracruz (DMS: 18°53'05.1''N 97°00'57.6''W). Se lavaron profusamente con agua corriente y posteriormente se trasladaron al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS) donde se secó en condiciones de oscuridad a una temperatura de 70°C con recirculación de aire durante 24-36 horas. El material vegetal seco se molió en un molino eléctrico (Pulvex) hasta que se obtuvieron partículas menores de 4 mm. El extracto hidroalcohólico se obtuvo del proceso de maceración de la raíz pulverizada (10 kg) en 12 Lt de una mezcla (60:40 v/v) de etanol/agua a temperatura ambiente. Veinticuatro horas después de la primera extracción se obtuvo la fase líquida y la fase sólida, la cual se sometió a una segunda extracción bajo las mismas condiciones y por otras 24 horas. El líquido fue pasado por un filtro prensa 20 x 20 cm de 12 marcos, con placas de celulosa de 0.5 cm de profundidad y se concentró por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio a 56°C. Para el secado completo, el extracto se liofilizó por 24hrs y se almacenó a 4°C hasta su uso.

7.2 Análisis cromatográfico de alta resolución del rSe-HA

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico de alta resolución del extracto integro, se utilizó un equipo de HPLC marca Waters con módulo de separación 2695 y módulo de detección (PDA) 2996, con un programa de corrida en el cual se mantuvo el degasificador encendido y el detector de burbujas activado. Para la separación química se utilizó una columna SUPELCO ANALYTICAL SUPELCOSIL LC-F cat 59158 25*4.6mm con partículas de 5µm. El equipo fue programado para manejar presiones de hasta 5000 psi para el adecuado cuidado de la columna. La fase móvil consistió en una mezcla de disolventes separados en líneas independientes de a) agua acidulada (agua con ácido trifluoroacético, 5 ml de TFA por cada 1000ml agua) y b) acetonitrilo (ACN). El gradiente fue ajustado de la siguiente manera: 0-1 min, 0%, 2-3 min, 5%, de 4-20 min, 30%, 21-23 min, 50%, 24-25,

80%, 26-27 min, 100% y de 28-30 min, 0%. Los cromatogramas fueron observados mediante el programa Empower 3 a un rango de longitud de onda 190-600 nm, determinando la presencia de compuestos por su tiempo de retención y espectro UV. Las muestras fueron inyectadas a un volumen de 10 µl de muestra por corrida, todas las alícuotas fueron disueltas con metanol grado analítico. Se emplearon referencias comerciales de ácido cinámico y ácido cumárico como estándares.

7.3 Determinación de la concentración de Ácido Cinámico en el rSe-HA

Para la preparación de la curva patrón de ácido cinámico (Sigma Aldrich, Inc) se preparó una concentración inicial de 1mg/ml de este fenilpropanoide en metanol y a partir de esta solución se tomó una alícuota para realizar las sucesivas diluciones y conseguir las concentraciones deseadas: 1.562 µg/ml, 3.12 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml. Cada una de estas muestras fue inyectada en el equipo de HPLC por triplicado y los cromatogramas obtenidos se observaron a una longitud de onda de 280nm, se integró el área bajo la curva de cada pico obtenido (R_T 12.00) para generar la ecuación $y = mx + b$ ($y = 1945.6x - 461.88$). Esta cuantificación del ácido cinámico se determinó como mg de compuesto por gramo de extracto.

7.4 Cultivos celulares.

Las células humanas HepG2 fueron proporcionadas por la Dra. Ana María Salazar del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México y se cultivaron en cajas de 24 o 96 pozos, dependiendo de los requerimientos experimentales, en medio Dulbecco's Eagle's (DMEM) bajo en glucosa (ATCC 30-2002) y suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma D1781, St. Louis, MO), 1% de L-Glutamina (Sigma D1578, St. Louis, MO), 1% de penicilina-estreptomina (Sigma D1881, St. Louis, MO) a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Las cajas de 24 pozos fueron sembradas con 5×10^5 células y las de 96 con 5×10^3 .

7.5 Viabilidad Celular por Azul Tripiano

Para desprender las células se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS (140 mM de NaCl, 2 mM de KCl y 1.15 mM de K_2HPO_4) frío. Por pozo se les agregó 200 μ l de Tripsina en solución de EDTA 1X (0.05% trypsin, 0.02% EDTA) en solución salina de Hanks y se incubaron a 37°C con 5% CO_2 por 5 min. Para detener la reacción de la tripsina se agregaron 600 μ l de medio DMEM bajo en glucosa suplementado, la suspensión celular se centrifugó a $377 \times g$, a 4°C por 7 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en medio completo y se evaluó su viabilidad con azul tripano 1:10. El conteo se realizó utilizando el método estándar en un hemocitómetro.

7.6 Evaluación del poder reductor por MTT.

Este procedimiento se basa en la formación de formazán a partir del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a través de la actividad de la succinato deshidrogenasa ^[107]. Para estos experimentos las células se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp, Roskilde, Demark), según las condiciones indicadas en el apartado 7.2.1 y con el protocolo indicado en el apartado 7.4.

Para este fin, se retiró el medio de cultivo, se les agregó 20 μ l de una solución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, sigma, M 2128) a una concentración de 5 mg/ml y se incubó en oscuridad a 37°C. Pasado ese el tiempo de incubación, se agregó 100 μ l de una solución de SDS 10% con HCl 0.01 N (1:1) a cada pozo y se incubó 2 horas más a 37°C. Al término de la incubación se cuantificó la absorbancia a una λ de 570 nm en un lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

7.7 Cuantificación de enzimas hepáticas (TGP/ALT) en medio.

Este procedimiento se basa en la cuantificación enzimática de TGP/ALT, una enzima que aumenta su concentración cuando los hepatocitos mueren por necrosis, y se considera un parámetro clínico indicador de daño hepatocelular ^[25]. La concentración de TGP/ALT

permitirá evaluar tanto el daño inducido por el AO/AB como la efectividad de CE₅₀ del rSe-HA para controlar la muerte celular asociada a la esteatosis.

Para estos experimentos se tomaron 19 µl del medio obtenido previamente que se colocó en placas de 96 pozos (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp, Roskilde, Demark). Para conocer la concentración de esta molécula en el medio de cultivo, se realizó un ensayo enzimático utilizando el kit QCA, Amposta, Tarragona, Spain [25] siguiendo las instrucciones de uso. Brevemente, en placas de 96 pozos de fondo plano se colocaron 185 µl del reactivo A, seguido de 19 µl del medio de cultivo. Posteriormente se dejó incubar aproximadamente por 1 minuto y se le añadió 46 µl del reactivo B. La lectura de la absorbancia del producto de reacción se midió a una longitud de onda 340 nm en un lector de ELISA (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) a los 1, 2 y 3 minutos y La cuantificación se obtuvo por la siguiente ecuación

$$1) \lambda (1min) - \lambda (2 min) = \lambda 1'2) \lambda (2min) - \lambda (3 min) = \lambda 2'$$

$$3) \lambda 1' - \lambda 2' \times 2140 = U/dL(TGP/ALT)$$

7.8 Inducción de esteatosis con Ácido Oleico/BSA.

Como inductor de esteatosis se utilizó el agonista Ácido oleico conjugado con albumina (AO) (Sigma D1881, St. Louis, MO O3008) a una concentración de 1mM y cultivados por 24hrs o 48 hrs [105,106] en las condiciones indicadas.

7.9 Determinación de la CE₅₀ y la Emax del rSe-HA.

Con el objetivo de determinar la CE₅₀ y la Emax, primero se retó la mejor concentración del rSe-HA que previene o revierte efecto del agonista AO/BSA a una sola concentración que fue de 1 mM, las células se sembraron en cajas de 24 pozos para ambas condiciones. El protocolo de cultivo se muestra en la tabla 4.

CONDICIÓN	Tx		
	AO/BSA (1mM)	Metformina (2 mM)	rSeHA µg/ml
Control positivo	si	no	no
Control farmacológico	si	si	no
Concentración 1	si	no	0.1875
Concentración 2	si	no	0.375
Concentración 3	si	no	0.75
Concentración 4	si	no	1.5
Concentración 5	si	no	3

Tabla 4. Protocolo experimental para evaluar las diferentes concentraciones del rSeHA para controlar la esteatosis inducida por AO/BSA en células HepG2.

Posteriormente, se eligieron las dos concentraciones (0.1875 y 0.375 µg/ml) (Figura 4, A,B) del experimento anterior que mejor evitaron o revertieron el efecto del agonista (AO). Estas dos concentraciones se volvieron a retar a diferentes concentraciones de AO/BSA como se observa en la tabla 5.

CONDICIÓN	Tx			
	AO/BSA mM	Metformina (2 mM)	rSeHA (concentración del experimento anterior) (µg/ml)	
			Protección	Restaurador
Control blanco	no	no	-	-
Control positivo	si	no	-	-
Concentración para evaluar	0.5	si	0.18	0.37
Concentración para evaluar	1	si	0.18	0.37
Concentración para evaluar	2	si	0.18	0.37

Concentración para evaluar	4	si	0.18	0.37
Concentración para evaluar	8	si	0.18	0.37

Tabla 5. Protocolo experimental para determinar la concentración efectiva 50 y la E=max del rSeHA para controlar la esteatosis inducida por AO/BSA

7.10 Tinción Red-Oil-O en células HepG2.

Para determinar la CE₅₀ y la Emax, se utilizó como técnica de estudio la tinción de Red Oil O, el cual es un compuesto lipófilo, por lo que, debido a su comportamiento de solución, difunde hacia los lípidos del tejido o célula ^[108] y permite conocer la concentración de los lípidos acumulados dentro de la célula ya sea por métodos colorimétricos o de medición de color en micrografías ^[108].

Para realizar esta tinción, una vez terminado el tiempo experimental, se retiró el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados con PBS frío, se agregaron 500 µl de formalina al 10%, bofereada con PBS dejándola incubar por 60 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se retiró la formalina y se realizaron dos lavados con PBS frío. Posteriormente se agregaron 500 µl de isopropanol al 60% (isopropanol/agua grado milliQ)/pozo y se dejó reposar por 5 min. Pasando este tiempo, se añadió la tinción de trabajo de Red Oil O (200ul) (Stock de red oil O: 7mg en 200ml isopropanol al 100%; solución de trabajo: 6 partes de Stock por 4 partes de agua destilada) y se dejó reposar por 30 min. Se lavaron los pozos hasta retirar el exceso y precipitado con PBS frío. Posteriormente se agregó 750 µl de isopropanol al 100% y se dejó incubar por 5 min, se retiró el medio y se colocaron 159 µl en placas de 96 pozos, y se leyó en un lector de Elisa (VERSAmax Molecular Devices) a 510 nm. Los valores se graficaron por la DO obtenida.

7.11 Cuantificación de triglicéridos en lisados de hepatocitos.

Los triglicéridos son la forma esterificada de los lípidos simples, almacenados en Droplets, desarrollando esteatosis ^[18]. Para cuantificarlos se utilizó un método colorimétrico

que se basa en la degradación del triglicérido hasta la formación de quinoneimina, fenómeno que cambia de coloración el medio con el Kit: Triglicéridos-LQ kit (QCA, Amposta, Tarragona, Spain) ^[107] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar las cuantificaciones se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con un Buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM; Tritónx-100 al 0,1%) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 2500rpm por 5 min y se obtuvo los sobrenadantes. Para la cuantificación se tomaron 2.5µl de muestra y se colocaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp, Roskilde, Demark) a la que se le añadió 250 µl de reactivo color, se incubó 5 min a 37°C y se midió la absorbancia a 505 nm en un lector ELISA (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). La concentración se calculó por:

$$\Delta \text{ Problema} / \Delta \text{ estándar} \times 200 \text{ mg/dl} = \text{Concentración TG mg/dl.}$$

7.12 Evaluación de Resistencia a la insulina por el consumo de 2-Deoxiglucosa.

Este procedimiento se basa en que el análogo de la glucosa 2-Deoxiglucosa (2-DG) al entrar a la célula, es transformado en 2-Deoxiglucosa-6-fosfato por la hexoquinasa, el cual no podrá ser metabolizado por lo que se acumula dentro de la célula de manera proporcional a la captación de glucosa hecha por las células. En este ensayo, la absorción de 2-DG se determinará mediante un ensayo enzimático en el que se oxida el 2-DG6P, lo que da como resultado la generación de NADPH, que luego se determina mediante una reacción de amplificación de reciclaje en la que el NADPH es utilizado por el glutatión reductasa en una reacción enzimática acoplada que produce glutatión. El glutatión reacciona con DTNB para producir TNB, que se detecta a 412 nm.

Para estos experimentos las células se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp, Roskilde, Demark), en las condiciones indicadas en el apartado 7.9

y con el protocolo indicado en el apartado 7.4, anexando dos grupos más 1) células sanas con 2DG + Insulina; 2) Células sanas sin 2DG e Insulina; 3) células sanas sin 2DG + insulina. El consumo de 2-DG se realizó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit Uptake 2-DG (Sigma MAK083) ^[107], siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, pasado el tiempo experimental, se retiró el medio y se incubaron por 40 min en buffer KRPH (HEPES 20 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 136 mM y KCl 4,7 mM) más albúmina bovina al 2%. Posteriormente, a los grupos correspondientes se les estimuló con insulina 1 μM durante 20 minutos; y pasado este tiempo se añadió 10 mM 2-DG, en que medio KRPH y se incubaron por otros 20 minutos. Pasado el tiempo, se retiró el medio y las células se lisaron en ciclos de calentamiento-congelación, con la solución de reacción A (buffer de ensayo más mezcla de enzimas en una proporción de (8: 2)); las placas se incubaron a 37°C durante 60 minutos en la oscuridad; luego, se añadió el buffer de extracción y se dejó reposar durante 5 minutos. La reacción se detuvo añadiendo la solución de reacción B (53% de glutatión reductasa, 42% de sustrato DTNB y 5% de mezcla de reciclado). La absorbancia del producto de reacción se midió a 412 nm. La concentración de 2-DG fue calculado a partir de una curva estándar.

7.13 Determinación de glicerol en medio de cultivo.

Se cuantificó la concentración de glicerol en el medio utilizando el kit de glicerol de ensayo colorimétrico (Sigma, Cat. No. MAK117) ^[107,109,110]. Se añadieron 10 μl de medio de cultivo de cada muestra a placas de 96 pozos y se agregaron 100 μl/pozo de Master Reaction Mix; las placas se incubaron durante 20 min a TA, en la oscuridad. Luego, se midió la absorbancia a 570 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva estándar usando la siguiente ecuación: $C=(A570) \text{ muestra/pendiente}$

7.14 Determinación de IL-6 y TNF-α por método de ELISA en Sándwich.

Este procedimiento se basa en que la detección de citocinas por anticuerpos, lo que permite conocer la concentración de estas citocinas en el medio utilizando los Kits de IL6

(ELISA MAX 430502) (Biolegend) y TNFa (BD OptEIA 555212). Brevemente, en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp, Roskilde, Demark) se colocaron 100 μ l por pozo de anticuerpo de captura a una concentración de 1:500 y 1:250 respectivamente diluido en buffer de Carbonatos de sodio 0.1 M pH 9.5. Se incubó toda la noche a 4 °C y al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, posteriormente se agregó 100 μ l de PBS-albumina al 1% se incubó durante una hora a TA. Al terminar el tiempo de incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween. Se añadió 100 μ l de muestra o curva estándar en los pozos correspondientes y se incubó durante 2 horas, después la placa se lavó 3 veces con PBS-Tween y se colocaron 100 μ l por pozo de una concentración 1:500 y 1:250 del anticuerpo de detección en PBS-SFB 10% acoplado a la enzima HRP y se incubó durante 1 hora. Pasado ese tiempo se realizaron 5 y 6 lavados con PBS-Tween, se agregó el TMB (Life technologies, 002023) como sustrato de la enzima y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N. La lectura de la absorbancia del producto de reacción se realizó a 450 *en un lector de ELISA* (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Se determinó la concentración de proteínas por el método estándar de Bradford (Sigma B6916-500ML).

7.15 Cuantificación de Malonaldehído (MDA)

EL MDA proviene de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los cuales son susceptibles a los ROS. Para que se forme el MDA, un hidrógeno es extraído por el radical hidroxilo (HO•), lo que forma radicales peroxilo lipídicos (LOO•). Este radical reacciona con un segundo PUFA, lo que forma un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un segundo LOO•. Todos los LOO• formados robarán electrones con más lípidos e irán formando un endoperóxido cíclico, el cual se transformará en malonaldehído o 4HNE ^[111-113]. Se ha reportado que el 1-metil-2-fenilindol reacciona con el malonaldehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos lo cual genera un cromóforo estable y el uso de ácido clorhídrico da como resultado un rendimiento óptimo de cromóforo producido a partir de MDA y de 4-hidroxinonenal, el cual puede leerse a una ABS=586nm ^[114].

Finalmente, en tubos eppendorf se colocaron 650µL de medio de cultivo y se añadió 150 ul 1-metil-2-fenilindol [10 mM]. Se vortexearon las muestras para formar los cromatóforos y se añadieron 30ul de HCL al 37% para generar la coloración, se volvió a vortexear y se incubaron en oscuridad por 60 min (45°C). Pasado del tiempo de incubación se centrifugaron a 300g por 15 min (hasta obtener el sobrenadante). Finalmente se tomaron 150 ul del sobrenadante y se colocaron en placas de 96 pozos y se hicieron las lecturas en un lector de ELISA a una ABS=586nm. Los resultados se calcularon con base en una curva patrón de Tetrametoxipropano (TMOP) [4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µM] y se graficaron en base a la concentración de proteínas medidas por medio del método estándar de Bradford (Sigma B6916-500ML).

7.16 Análisis estadísticos.

Todos los parámetros medidos se compilaron en Excel (Microsoft Co, Redmond WA, EE. UU.). Los datos se presentan como diagramas de caja y bigotes. Las diferencias entre grupos se analizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Todos los datos se analizaron con el programa INSTAT para realizar los análisis uni y multivariados. Con un valor de significancia de $P \leq 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CINÁMICO EN rSe-HA.

Con la intención de conocer la cantidad de ácido cinámico que contiene la CE₅₀ del extracto rSe-HA que se obtendrá en estudios posteriores se realizó por HPLC una curva patrón utilizando un estándar de ácido cinámico.

En la Figura 2, se muestra tanto el cromatograma del extracto (A) como del estándar de ácido cinámico comercial (B) utilizado como parámetro. El estándar de ácido cinámico tiene un RT de 16.892 min equivalente al del rSe-HA que fue de 16.940 (Fig. 2A, cuadros verdes). Este resultado se verificó comparando un espectro UV del rSe-HA y del ácido

cinámico estándar; ambos espectros mostraron una absorbancia máxima de 278.1 y 279.3 nm respectivamente (recuadro de Fig 2A). Con base en la curva patrón (Fig 2B) se obtuvo la ecuación de la recta ($y = 97600x + 29590$) con una $R^2=1$. Al despejar X de la ecuación, y sustituyendo el valor de Y por el espectro del extracto de rSe-HA (AU=232041) se determinó que el extracto de rSe-HA tiene una concentración de ácido cinámico de $1350 \pm 0,00 \mu\text{g/g}$. Con base en estos resultados, calculamos cuantos μg de ácido cinámico hay en cada gramo, dando como resultado $1350\mu\text{g/g}$. Este valor nos permitió calcular que por cada gramo de extracto se tiene 1.35 mg de ácido cinámico (Fig.2C).

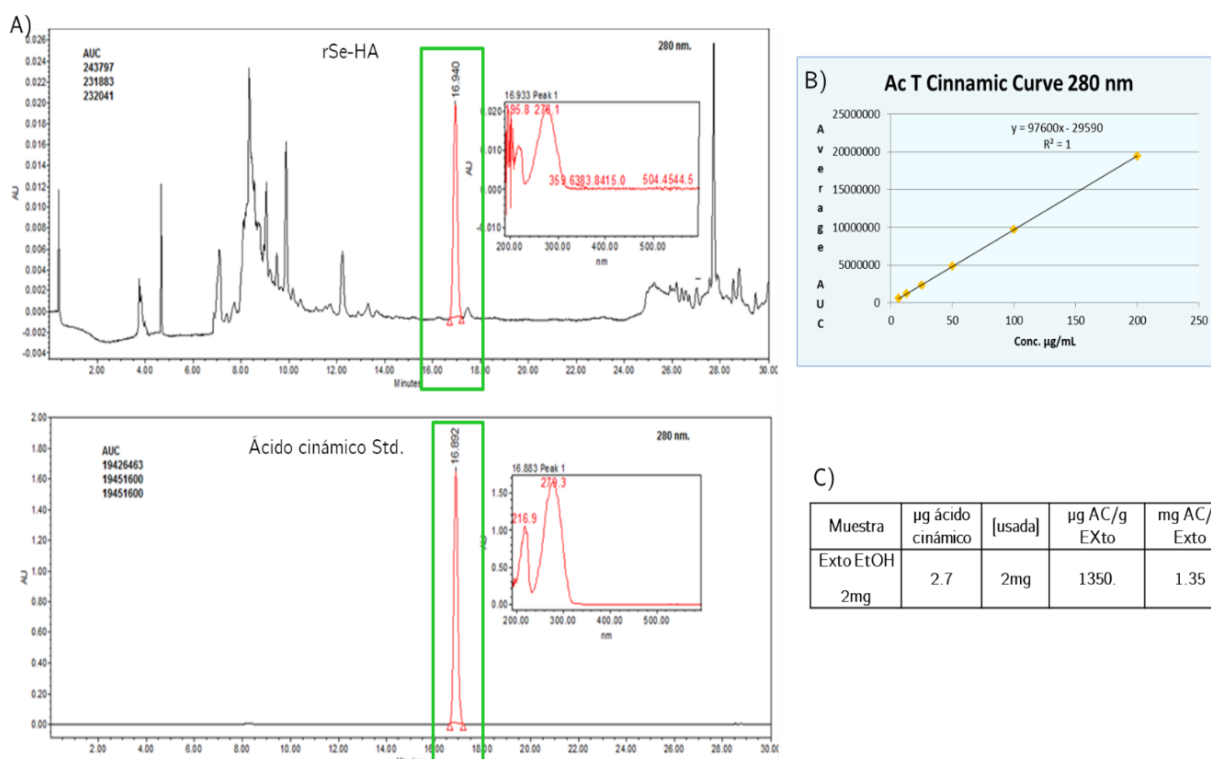


FIG. 2 CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL ÁCIDO CINÁMICO. A) Ácido cinámico (Sigma-Aldrich) (RT = 16.692); Extracto hidroalcohólico de las raíces de *S. edule* (rSe-HA) (RT = 16.940); B) Curva patrón de ácido cinámico Std con la ecuación de la recta. C) concentración de ácido cinámico al despejar X de la ecuación y sustituyendo el valor de Y por el AUC del rSe-HA. $\lambda = 278.1; 279.3 \text{ nm}$

8.2 El rSe-HA NO ES TÓXICO PARA LAS CÉLULAS HepG2.

Previo al cálculo de la CE_{50} y para validar los resultados de esta, primero se evaluó la toxicidad del extracto en las concentraciones propuestas [0.18, 0.37, 0.75, 1.5 3 $\mu\text{g/mL}$]. Para ello se realizaron dos pruebas de viabilidad celular: Con un colorante de exclusión (azul tripano) y concentración de TGP/ALT en medio que implica necrosis ^[12], que es un indicador de la actividad metabólica ^[108]. Estas evaluaciones se realizaron a las 24 horas dado que es el tiempo que se exponen las células al extracto.

La Figura 3 muestra que ningún tratamiento afectó la viabilidad de las células (panel A-C) a excepción del DMSO (control de muerte) después de 24 horas de cultivo. En el panel A, B se presentan los resultados obtenidos por la técnica de azul tripano, en los que se observa que, al final del cultivo, la cantidad de células vivas aumentó significativamente ($P < 0.001$) 5 veces con respecto a las células sembradas en un origen (tiempo cero), mientras que las células cultivadas con DMSO presentaron una disminución significativa de células vivas de un 46.5% con respecto a las sembradas en el tiempo 0. Este resultado concuerda con lo observado para la necrosis, en los que no se observan diferencias significativas entre las células tratadas con las diferentes concentraciones del extracto y las células sin tratamiento (panel C). Estos resultados indican que las concentraciones del extracto a evaluar son inocuas para las células

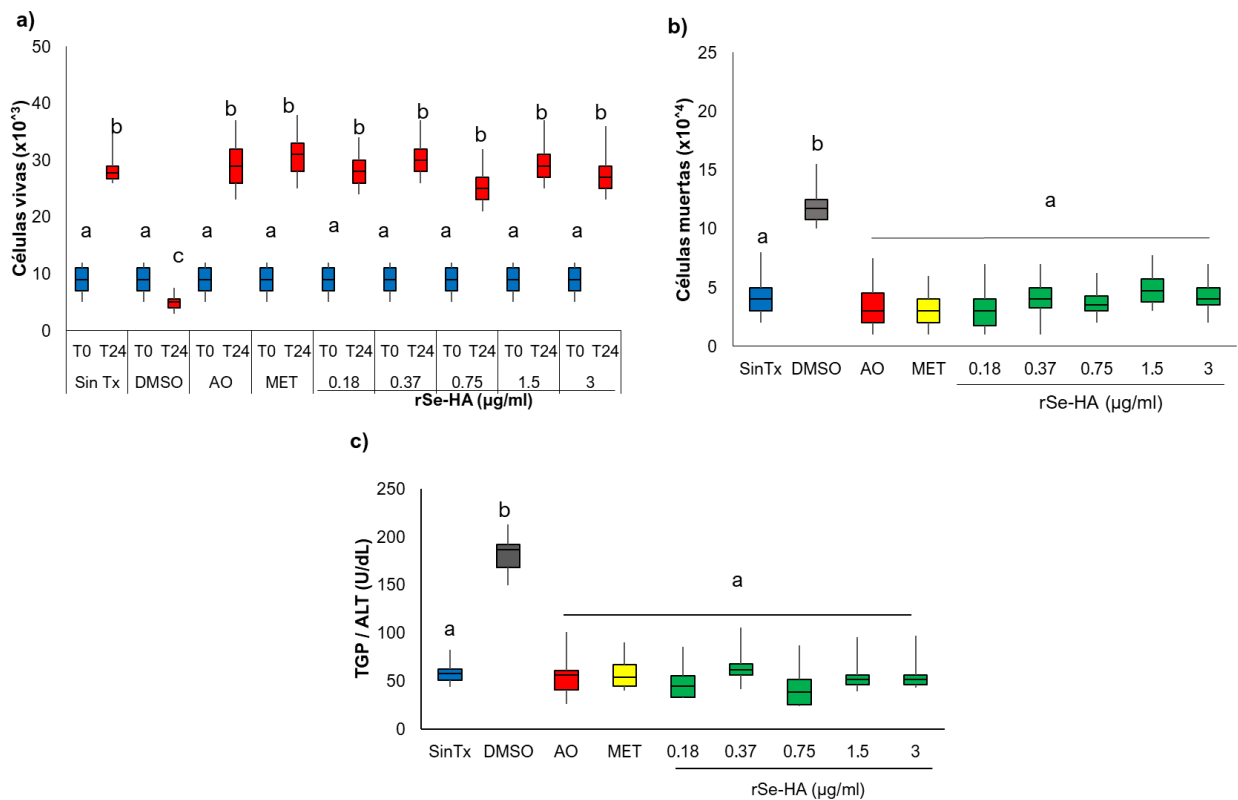


FIG. 3 EFECTO DE LOS TX SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR. A) Conteo de células vivas por azul tripano, que fueron tratadas por 24 horas con; solo medio suplementado (Sin Tx); con DMSO 60%, (control de muerte); ácido oleico 1mM (AO); Metformina 2mM (Met) y rSe-HA [3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.18 $\mu\text{g/ml}$]. Barras azules = inicio del experimento (0hrs); Barras rojas= final del experimento (24hrs). Se observan que no hay diferencias significativas entre los grupos a excepción del control de muerte (DMSO). B) Cantidad de células muertas, donde el grupo con DMSO fue el único que aumentó la cantidad de células comparados con los demás grupos. C) Cuantificación de TGP/ALT en medio de células HepG2 Sin Tx, y de células tratadas con DMSO (60%); AO (1Mm); MET (2mM); rSe-HA [3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.18 $\mu\text{g/ml}$]. El único tratamiento que amento a concentración de TGP en medio, fue el DMSO comparadas los demás tratamientos. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.3 LA CE₅₀ DE 0.20 µg/ml ES EFICIENTE PARA EVITAR Y REVERTIR LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA.

La acumulación de lípidos es el paso inicial para la inducción del daño hepático, por esta razón es el parámetro sobre el cual se calcula la concentración efectiva 50 (CE₅₀) del extracto como preventivo y terapéutico. El parámetro que se utilizó para este cálculo fue la concentración de Red-Oil-O dentro de las células que fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

En la Figura 4 se observan los resultados obtenidos de la técnica de Red Oil O, e indicaron que después de 24 de exposición al OA la absorbancia fue de 1.4 (Panel A,B), y a las 48 fue de 2.4 (Panel B) siendo ambas significativamente mayor que el grupo Sin Tx. Al evaluar la concentración de 0.18 µg/ml y de 0.37 µg/ml del extracto (reparador, panel A y B) como la MET, disminuyeron este parámetro de manera significativa (p=0.001) llevándolo al nivel del control Sin Tx. lo que implica una disminución del 33.55% y 336.5% con respecto a la presentada a las 24 horas. Por otro lado, las otras concentraciones analizadas no mostraron este efecto, ya que la concentración de 0.18 (panel B, modelo reparador) la disminuyó un 80% (p=0.001) llevándolo a niveles más bajos con respecto a los controles. La concentración de 0.75 (panel A y B) en el modelo preventivo no hubo diferencias con respecto al grupo AO y en el modelo reparador solo tuvo una ligera disminución (6.6%). Finalmente en ambos modelos desde la concentración de 1.5 y 3 µg/ml ya no hubo efecto, ya que la ABS era igual que a las 24 horas de exposición al OA.

En el panel C y D se observa el efecto de la concentración del AO con respecto a la absorbancia, tanto del AO solo como del AO-MET u AO-rSe-HA. La CE₅₀ para rSe-HA es de 0.20 µg/ml para ambos modelos, lo que contiene 0.27 ng/ml de ácido cinámico, de la MET es 0.8 µg/ml mientras que la relación concentración-respuesta del OA es de 1 ug/ml. Por otro lado, las Emax son de 0.7,1.4 y 3.3 ug/ml respectivamente.

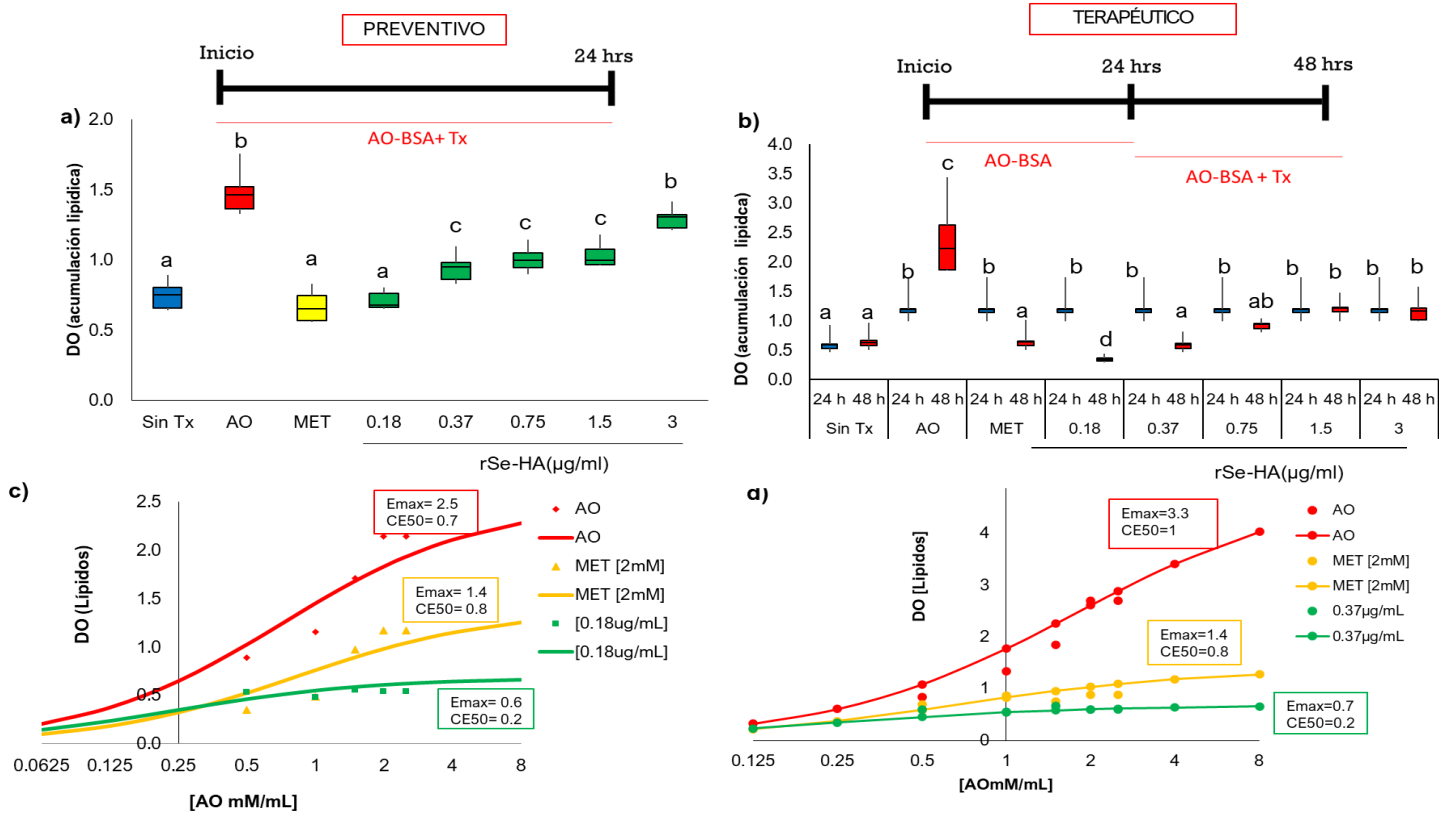


FIG. 4 OBTENCIÓN DE LA CE₅₀. DO de la acumulación de lípidos por Red Oil O. **A)** Modelo preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO más MET 2mM ó 3,1.5,0.75,0.37,0.18 µg/ml de rSe-HA. **C)** Modelo terapéutico; células HepG2 Tx por 24 hrs solo con AO para inducir esteatosis y otras 24 hrs con AO más MET 2mM ó 0.18, 0.373, 0.75, 1.5 y 3 µg/ml de rSe-HA. En ambas se observa un efecto dosis dependiente, ya que en cuanto menor sea la concentración más eficiente es el rSe-HA para llevar a niveles basales la acumulación de lípidos. Mientras que a mayor concentración no revierte la esteatosis, pero si evita el efecto por otras 24 horas con AO. **B y D)** obtención de la CE para modelo de protección (0.18 ug/ml) y de 0.37 µg/ml como terapéutico. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.4 EL rSe-HA EVITA LA ESTEATOSIS.

Los AGs al entrar al hepatocito son esterificados en TGs con la intención de que estos no afecten el metabolismo celular e induzcan su muerte^[18,19,115]. Con la intención de determinar si el rSe-HA evita esta esterificación, se cuantificó la concentración de TGs en lisados de hepatocitos, a través de un kit colorimétrico.

En la figura 5 se observa que la [0.20 μ g] de rSe-HA evitan (panel A) y revierte (panel B) la esterificación de los triglicéridos. Al analizar el grupo tratado solo con AO se observa un aumento significativo ($P < 0.01$) en la concentración de TGs en el hepatocito comparado con el grupo Sin Tx (panel A). Mientras que el grupo de MET y la [0.20 μ g/ml] del rSe-HA tanto en el modelo de protección (panel A) como en el de reparación (panel B) evitan la generación de triglicéridos o restauran el nivel de TGs a niveles basales ya que pese a que estas células fueron expuestas previamente al AO por 24 hrs mantienen la concentración de TGs así como lo hace el grupo Sin Tx

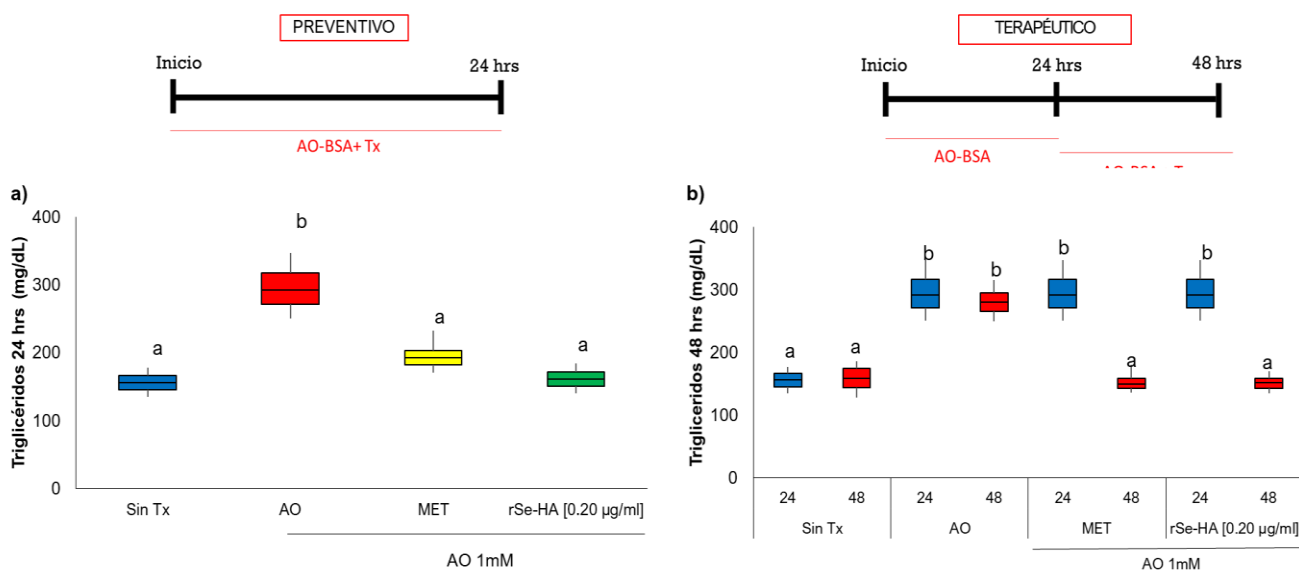


FIG . 5 CUANTIFICACIÓN DE TGs EN LISADOS DE HEPATOCITOS HepG2. Respuesta de los Tx al ser sometidos por 24 y 48 hrs con AO [1mM] obtenido en lisados celulares y con el kit TGs LQ. **A)** Modelo de Protección; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 μ g/ml de rSe-HA. Se observa que el grupo tratado solo con AO aumenta a la 24 hrs la esterificación de lípidos a TGs dentro del hepatocito, mientras que la MET y el rSe-HA mantienen los TGs a niveles basales como se ve en el grupo Sin Tx. **B)** Modelo de Reversión; células HepG2 Tx por 24 hrs solo con AO para inducir esteatosis y otras 24 hrs con AO más MET 2mM 0.20 μ g/ml de rSe-HA. El grupo con AO aumenta la concentración de TGs de las 24 a las 48 hrs, por lo que podría deberse a mayor tiempo de exposición mayor cantidad de

lípidos están siendo esterificados, mientras que la MET y el rSe-HA no solo evitan este aumento, si no que revierten la esteatosis ya inducida (primeras 24 hrs de exposición con AO). Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.5 EL rSe-HA AUMENTÓ LIPOLISIS.

La lipolisis es el proceso mediante el cual se rompen biomoléculas como triglicéridos para formar 3 ácidos grasos y un glicerol [109,116]. Este proceso inicia ya sea por i) necesidad energética; ii) por RI o iii) fármacos lipogénicos como la MET [109,116]. Con la intención de averiguar si la disminución de triglicéridos dentro del hepatocito se debe a su degradación (lipolisis), se midió la concentración de glicerol en el medio de cultivo obtenido de ambos modelos a través de técnicas colorimétricas con ayuda de un kit colorimétrico específico.

La figura 6 muestra que el rSe-HA incrementa la lipolisis ya que aumenta la concentración de glicerol en el medio de cultivo de manera significativa ($P < 0.001$) con respecto al control de AO y Sin Tx. Esto se corrobora a partir del análisis del grupo tratado solo con AO vs Sin Tx (panel A) ya que el primer grupo aumentó significativamente ($P < 0.001$) un 16% la producción de glicerol con respecto al grupo Sin Tx. Por otro lado, mientras que en el panel A aumenta la concentración de glicerol, en el modelo terapéutico este valor baja significativamente un 20%. Las células expuestas a la MET+AO por 24 hrs (panel A) aumentan significativamente ($P < 0.001$) un 40% la producción de glicerol con respecto al grupo Sin Tx. Sin embargo, cuando se trata con este mismo Tx a las células esteatóticas (panel B) solo aumentó significativamente un 20% la concentración de glicerol de manera contraria a lo que se observa en el panel A. De manera interesante el rSe-HA como preventivo aumentó significativamente ($P < 0.001$) un 35% la producción de glicerol con respecto al grupo Sin Tx (panel A) y aunque no llegó a niveles como los de la MET (panel A), cuando se trató en células esteatóticas (panel B) por 24hrs más el rSe-HA siguió manteniendo los niveles de glicerol como en el panel A dado que aumentó un 30%.

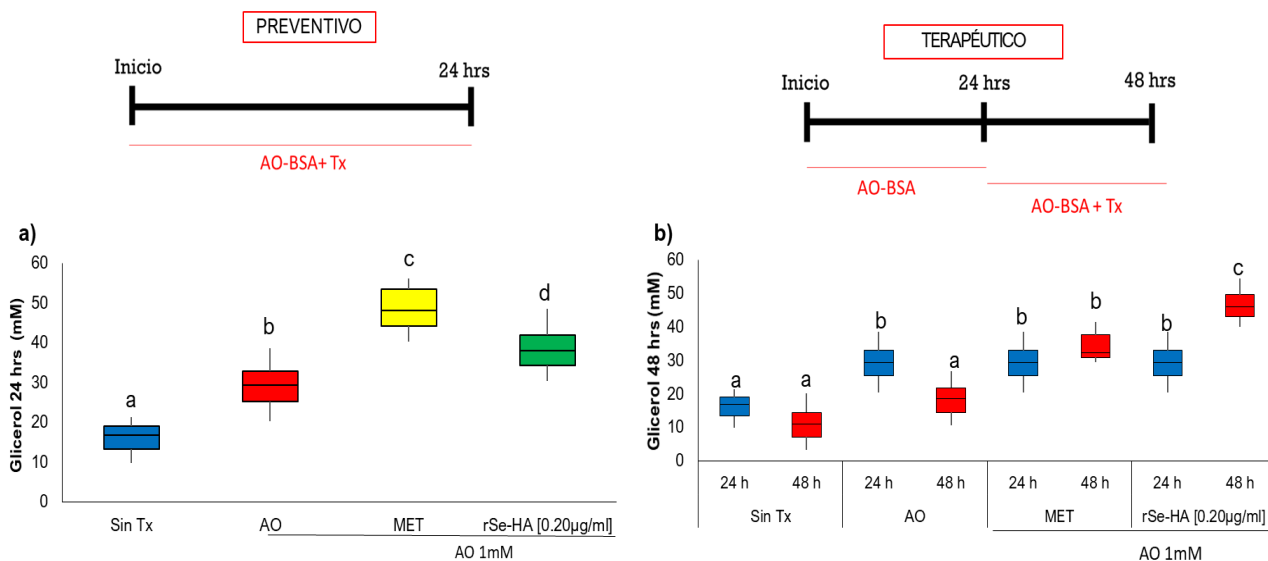


FIG. 6 CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL. Respuesta de las células al ser sometidas por 24 y 48 hrs con los Tx sobre la producción de glicerol en medio de cultivo. **A)** Modelo Preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 µg/ml de rSe-HA. Se observa que el grupo tratado solo con AO aumenta a la 24 hrs el glicerol en medio, mientras que la MET y el rSe-HA aumentan aún más el glicerol que el AO. **B)** Modelo terapéutico; células HepG2 Tx por 24 hrs solo con AO para inducir esteatosis y otras 24 hrs con AO más MET 2mM 0.20 µg/ml de rSe-HA. El grupo con AO no aumenta la concentración de glicerol como en el modelo de protección, por lo que podría deberse a que a mayor tiempo de exposición está afectando el metabolismo del hepatocito, mientras que la MET y el rSe-HA aumentan la concentración de glicerol. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.5.1 El rSe-HA AUMENTÓ EL PODER REDUCTORASOCIADO A LA LIPÓLISIS.

En 2017 Rai y cols., reportaron que el ensayo de MTT utilizado de manera común como un indicador de viabilidad y proliferación celular, en realidad no lo mide, sino que determina el estado de activación o inactivación metabólica, así como el estado redox de las células a través de la reducción de MTT a formazán [177]. Con el objetivo de evaluar si la CE₅₀ del rSe-HA aumenta el estado reductor de las células esteatoticas, se cuantificó la concentración de formazán en las células sometidas a los diferentes tratamientos.

En la figura 7 A, se observa que la CE_{50} del rSe-HA y la MET, utilizados de manera preventiva, a las 24 hrs incrementaron significativamente ($P < 0.001$) la producción de formazán comparadas con los controles. Al evaluarlo en condiciones terapéuticas (panel B) se observa que, después de 24 hrs del tratamiento, tanto del rSe-HA como la de la MET, aumentaron significativamente ($P < 0.001$) la concentración de formazán contrarrestando el efecto del AO. En ambas condiciones experimentales el AO disminuye significativamente ($P < 0.001$) la concentración de formazán.

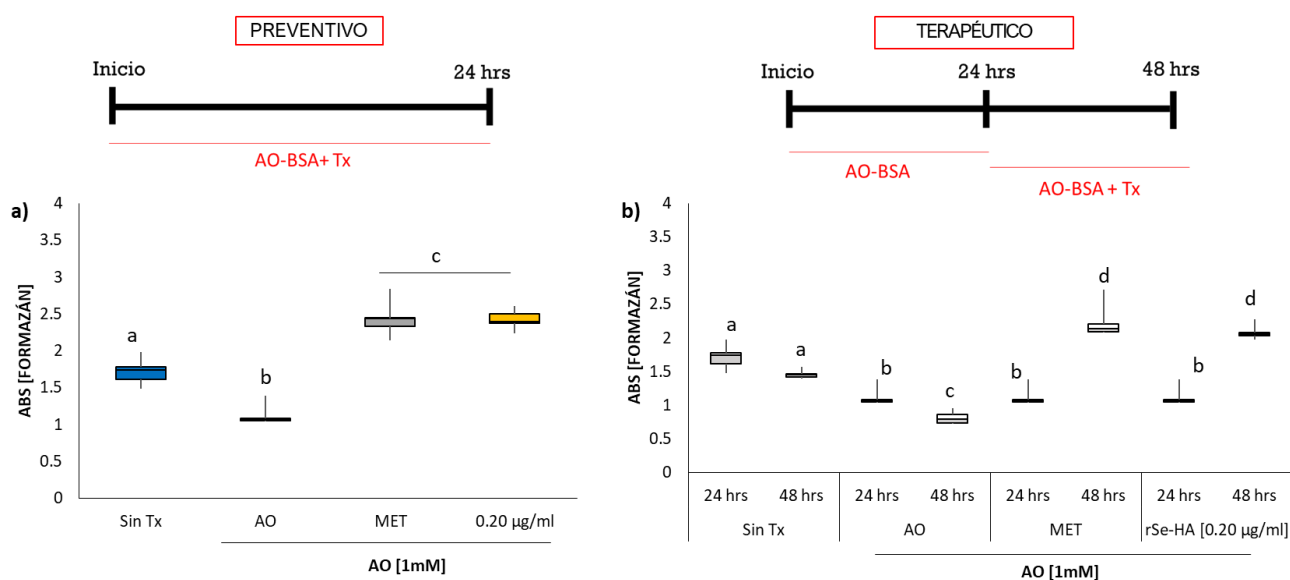


FIG . 7 CUANTIFICACIÓN DE FORMAZÁN. Respuesta de las células al ser sometidas por 24 y 48 hrs con los Tx sobre la producción de formazán en células. **A)** Modelo Preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 µg/ml de rSe-HA. El grupo tratado solo con AO disminuye a la 24 hrs la producción de formazán, mientras que la MET y el rSe-HA lo aumentan. **B)** Modelo terapéutico; células HepG2 Tx por 24 hrs solo con AO para inducir esteatosis y otras 24 hrs con AO más MET 2mM 0.20 µg/ml de rSe-HA. El grupo con AO no aumenta la concentración de glicerol como en el modelo de protección, mientras que la MET y el rSe-HA aumentan la concentración de formazán. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.6 EL rSe-HA EVITA LA EXPRESIÓN DE TNF α e IL6.

Se ha reportado que en la esteatosis se producen citocinas como el TNF α y la IL6, las cuales participan en el desbalance en la acumulación de grasa dentro de la célula, además de inducir resistencia a la insulina (apartado 1.1.1). Con la intención de evaluar si el extracto ayuda a controlar este proceso a través de la producción de TNF α y la IL6, estas se midieron en el medio de cultivo por la técnica de ELISA en sándwich.

En la figura ocho se observa que el extracto evita el aumento en la concentración de las citocinas medidas a pesar del estímulo del AO. Como preventivo evitó su producción (A y C) ya que mantuvo su concentración significativamente igual que el grupo Sin Tx. Por otro lado, cuando se retó la CE₅₀ del rSe-HA a células esteatoticas (B y D), a pesar de que a las 24 horas habían incrementado significativamente ($P < 0.001$) el 70 y 50% más la concentración de TNF α e IL6 respectivamente, después del tratamiento con el extracto+AO se redujeron al nivel del grupo Sin Tx. Esto se corroboró al comparar el grupo Sin Tx vs AO, ya que el AO incrementó significativamente ($P < 0.001$) a las 24 hrs la concentración de TNF α e IL6 un 80 y 70% (panel A,C) con respecto al grupo Sin Tx; y cuando se aplicó el AO por otras 24 hrs (modelo terapéutico, panel B,D) se observa un ligero aumento aunque no significativo en la concentración de TNF α (B), sin embargo, al analizar la concentración de IL6, esta si incrementó significativamente 3 veces más que el mismo AO a las 24 hrs y 5 veces más que el grupo Sin Tx. La MET así como el rSe-HA, mantuvo a niveles basales (Sin Tx) las dos citocinas medidas en los 2 modelos.

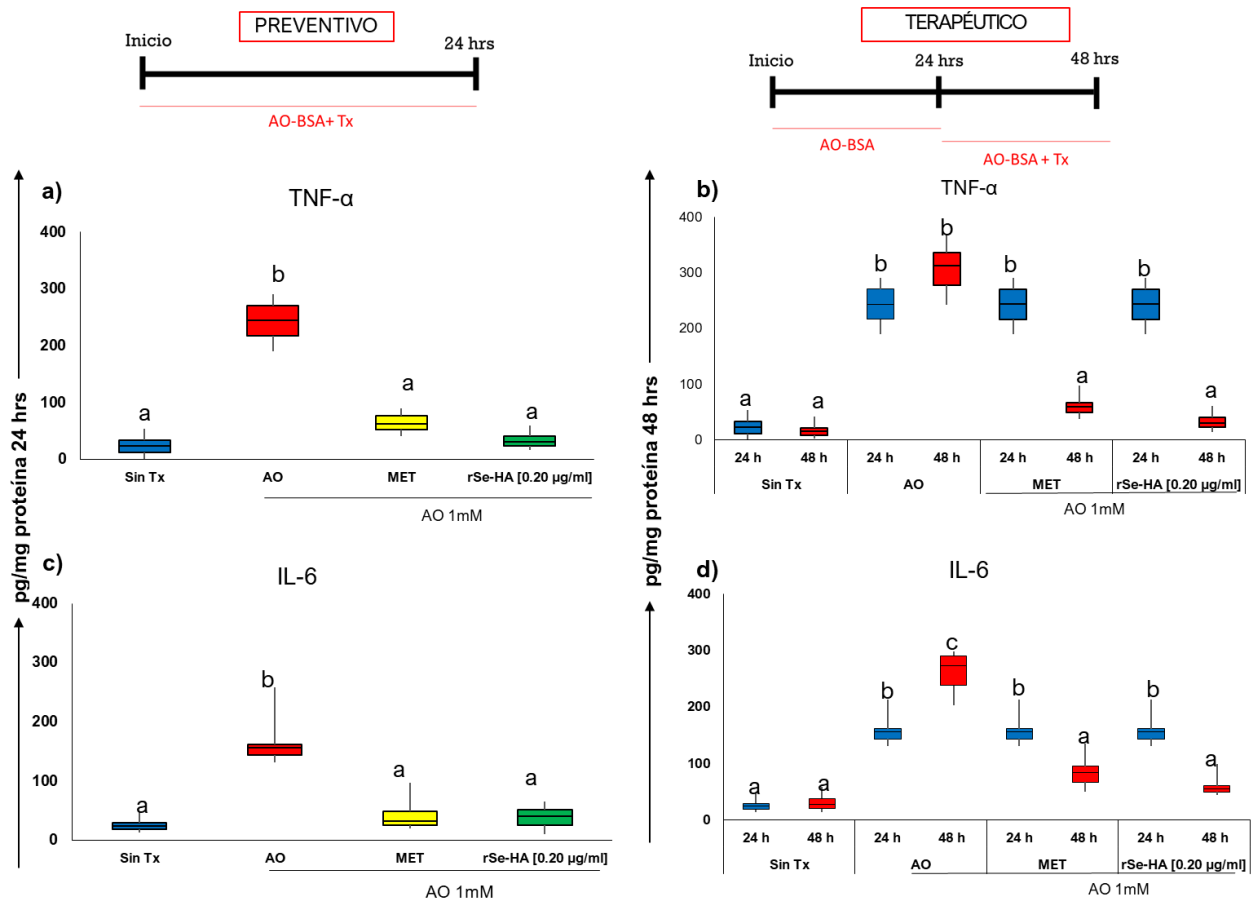


FIG . 8 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS. Respuesta de las células al ser sometidas por 24 y 48 hrs con los Tx sobre la producción de TNF α e IL6 en medio de cultivo. **A)** Modelo preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 µg/ml de rSe-HA. Se observa que el grupo tratado solo con AO aumenta a la 24 hrs ambas citocinas, mientras que la MET y el rSe-HA evitaron esta producción siendo así no significativas con el grupo Sin Tx. **B)** Modelo Terapéutico; células HepG2 Tx por 24 hrs solo con AO para inducir esteatosis y otras 24 hrs con AO más MET 2mM 0.20 µg/ml de rSe-HA. El grupo con AO vuelve a aumentar la concentración de citocinas como en el modelo de protección, mientras que la MET y el rSe-HA evitan esta producción. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.7 EL rSe-HA EVITA O VENCE LA RESISTENCIA A LA INSULINA.

La resistencia a la insulina es una condición clínica que no permite al hepatocito ingerir y almacenar glucosa; y las obliga a entrar en lipólisis de manera constante ^[117] lo que aumenta los ROS hasta desarrollar estrés oxidante, falló mitocondrial y finalmente las lleva a su muerte ^[118].

Con la intención de determinar si la CE₅₀ del rSe-HA evita o vence la RI, se midió la concentración de 2-DG6P (análogo de glucosa) dentro de las células ^[107]. En condiciones preventivas el rSe-HA aumentó significativamente (P<0.001), con respecto a los controles, la concentración de 2-DG6P dentro de la célula, lo que se relaciona con un incremento de la sensibilidad de esta pese a la presencia del AO. Por otro lado, en condiciones terapéuticas (panel B) el rSe-HA no solo restauró el consumo de 2-DG6P sino que incrementó significativamente (P<0.001) la sensibilidad de la célula hacia el consumo de dicha molécula, lo que se observa por el incremento de 2DG6P dentro de los hepatocitos. En ambas condiciones el AO disminuyó significativamente (P<0.001) con respecto al control el consumo de 2DG6P.

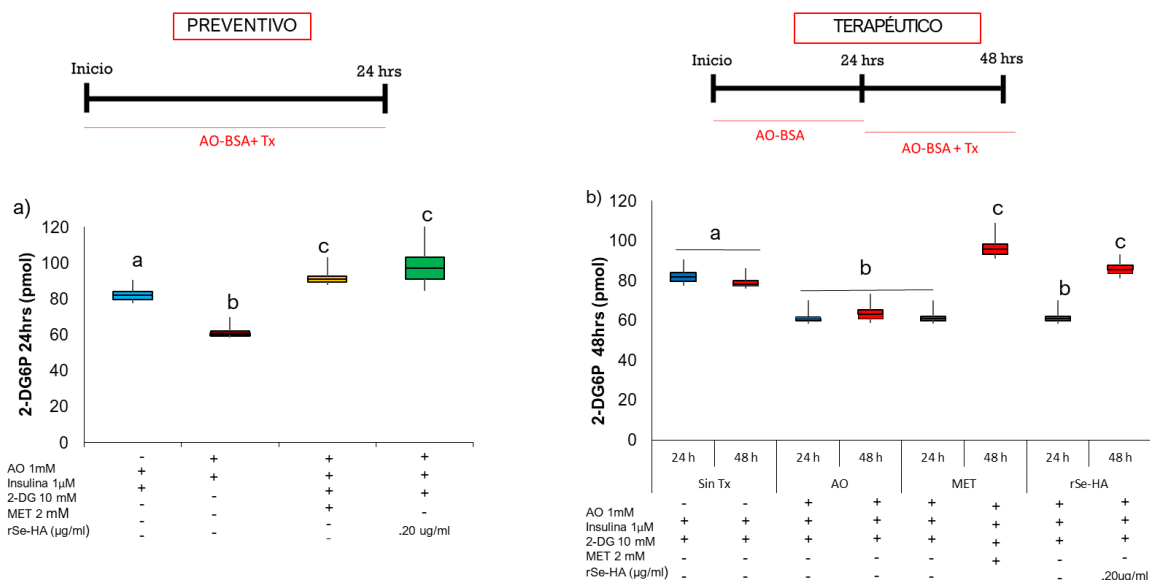


FIG . 9 CUANTIFICACIÓN DE 2-DEOXIGLUCOSA-6-FOSFATO. Respuesta de las células al ser sometidas por 24 y 48 hrs con los Tx sobre el consumo de glucosa (2DG). **A)** Modelo preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] (caja roja) más MET 2mM (caja amarilla) ó 0.20 µg/ml de rSe-HA (caja verde).

El grupo tratado solo con AO disminuye la concentración de 2DG6P que fue transformado a partir del 2DG consumido, mientras que la MET y el rSe-HA aumentan significativamente la concentración con respecto al grupo Sin Tx y AO. **B)** Modelo terapéutico; las células HepG2 fueron Tx por 24 hrs, solo con AO [1mM] o con medio de mantenimiento (Sin Tx) (cajas azules), y por otras 24 (48 hrs) con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 µg/ml de rSe-HA (cajas rojas). El grupo con AO redujo la concentración de 2DG6P tanto a las 24 y mantuvo estos valores a las 48hrs, mientras que la MET y el rSe-HA pese al bajo consumo de glucosa a las 24 hrs aumentan la concentración incluso más que el grupo Sin Tx, controles de técnica y AO. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

8.8 EL rSe-HA EVITA EL ESTRÉS OXIDANTE.

La oxidación de lípidos ya sea por la RI o la inducida por fármacos antilipogénicos producen ROS, los cuales llevan a un estado de EO; durante este proceso los ácidos grasos poliinsaturados son los que más sufren daño por estas moléculas; lo que lleva a la formación de peróxidos de lípidos como el malonaldehído (MDA)^[119]. El MDA es un marcador de estrés oxidante y se relaciona con la muerte celular, dado que al descomponer la membrana esta se rompe y la célula muere por necrosis. Por lo tanto, con la intención de conocer el efecto antioxidante del rSe-HA se cuantificó la concentración de MDA tanto en medio como en lisados celulares.

La figura 10 A indica que el rSe-HA evita significativamente ($P < 0.001$) la producción de MDA comparado con el grupo AO, razón por la cual no tiene diferencias con el grupo Sin Tx. Cuando se retó nuevamente el rSe-HA en células enfermas (panel B) redujo de manera significativa ($P < 0.001$) la concentración de MDA comparado con el grupo AO. Esto se corroboró al comprar la concentración de MDA del grupo con AO y Sin Tx (panel A, B), lo que nos dice que el AO induce significativamente ($P < 0.001$) un 20 y 30% más la generación de MDA a las 24 y 48 hrs respectivamente. Mientras que la MET, se observa un incremento significativo ($P < 0.001$) de un 15% y 16% de MDA comparado con el grupo Sin Tx y del rSe-HA (panel A, B), llegando a niveles en como el del AO.

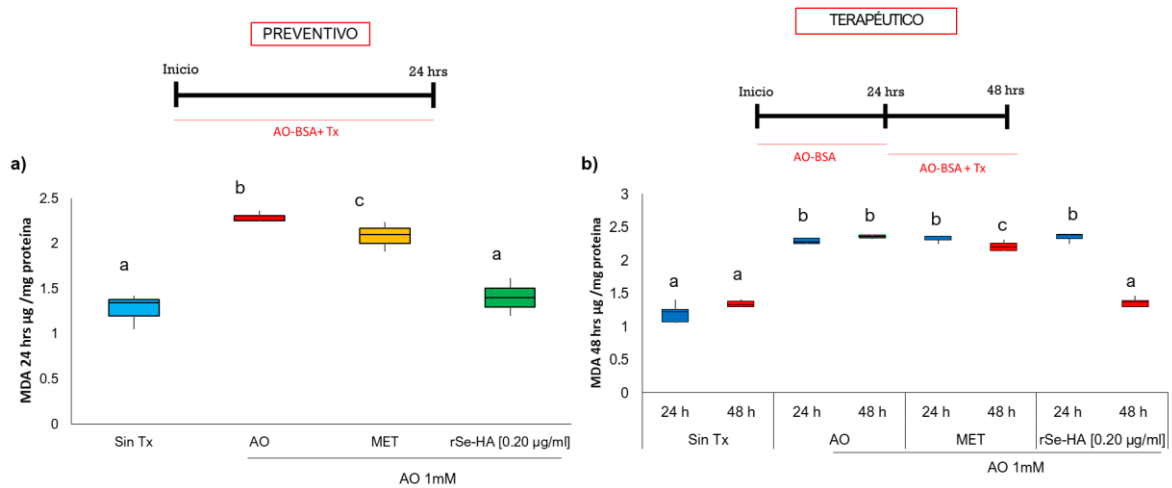


FIG . 10 CUANTIFICACIÓN MDA. Respuesta de las células al ser sometidas por 24 y 48 hrs con los Tx sobre el consumo de glucosa (2DG). **A)** Modelo preventivo; células HepG2 Tx por 24 hrs, con AO [1mM] (caja roja) más MET 2mM (caja amarilla) ó 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rSe-HA (caja verde). Se observa que el grupo tratado con AO y MET aumentan la concentración de MDA comprados con el Sin Tx, mientras el rSe-HA disminuye y evita de manera significativa la concentración de MDA. **B)** Modelo terapéutico; las células HepG2 fueron Tx por 24 hrs, solo con AO [1mM] o con medio de mantenimiento (Sin Tx) (cajas azules), y por otras 24 (48 hrs) con AO [1mM] más MET 2mM ó 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rSe-HA (cajas rojas). El grupo con AO aumentó la concentración de MDA a las 24 y mantuvo estos valores a las 48hrs, al igual que la MET; mientras que el rSe-HA evita la producción de MDA. Las diferencias entre grupos se realizaron con una prueba de ANOVA y una prueba a posteriori de Tukey-Kramer. Con un valor significativo de $P \leq 0.001$ (literales diferentes); literales iguales no hay diferencia.

9. DISCUSIÓN.

La esteatosis hepática es una enfermedad metabólica que abarca la acumulación de grasa dentro del hepatocito, lo que lo lleva a un estado prooxidante y proinflamatorio que, a la larga, por un lado, potencia el síndrome metabólico del cual suele ser parte, como el desarrollo de enfermedades mucho más graves como la NASH y cirrosis. Dadas las condiciones multifactoriales y la complejidad de la NAFLD y la contribución del estrés oxidante y la generación de citocinas como el TNF α e IL6 en su desarrollo, los fitomedicamentos son una buena opción para su control, ya que al estar compuestos por múltiples moléculas con diferentes blancos terapéuticos pueden actuar como reductores de grasa potenciando la lipólisis, reduciendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno y además evitando el ambiente proinflamatorio, lo que evitaría la polifarmacia. Trabajos previos han demostrado que el extracto hidroalcohólico ^[103] y la fracción acetónica ^[19] de la raíz de *S. edule* evitan el daño hepático inducido por la aplicación crónica de angiotensina II en ratón ^[19, 120]. En este trabajo analizamos el efecto del extracto en condiciones clásicas de generación de NAFLD que es por la acción del AO que es el lípido más abundante en personas con SM y al que se le ha relacionado con el desarrollo de esta patología. Es importante aclarar que el desarrollo de NAFLD o NASH es diferente en las 2 condiciones ya que cuando se induce por ANGII el desarrollo de las patologías se va principalmente sobre la disfunción mitocondrial y la activación de factores de transcripción lipogénicos como SREBP2, mientras que cuando se utiliza AO la inducción se relaciona principalmente con la activación de factores de transcripción como PPAR γ , SREB1c aunado a la saturación catabólica de la célula y al ambiente proinflamatorio. Por esta razón, se consideró retar al rSe-HA en el modelo de OA para disminuir la esteatosis, estrés oxidante y la producción de citocinas proinflamatorias en hepatocitos HepG2.

De manera interesante la CE₅₀ calculada para el extracto y utilizada a lo largo de este trabajo, es más baja que la de la MET para ambas condiciones (panel C, D) lo que indica que rSe-HA es más potente para evitar y revertir la acumulación de lípidos inducida por el AO que la MET, ya que entre más baja sea la CE₅₀ del fármaco a evaluar, es más potente es para llegar al efecto esperado ^[136].

Por otro lado, si comparamos la concentración utilizada en este proyecto con respecto a las concentraciones evaluadas por otros autores de partes aéreas en modelos *in-vitro* [105], la raíz es más potente; ya que las concentraciones de partes aéreas son de 1 mg/ml a 5 mg/ml [105] mientras que de la raíz fue de 0.20µg/ml lo que implica solo la 4^{ta} y 5^{ta} parte de las concentraciones mencionadas. El cálculo de la concentración de ácido cinámico presente en la CE₅₀ del rSe-HA (0.27 ng/mL) permitirá estandarizar en futuros estudios la concentración efectiva a utilizar. Además, si también se compara la concentración de ácido cinámico (0.27 ng/mL) presente en la CE₅₀ del rSe-HA, con respecto a otros estudios *in-vitro* donde utilizan ácido cinámico comercial; la concentración usada por estos autores es mucho mayor, ya que utilizan entre 25 y 200 µM^[119]. Por lo tanto, esto indica su eficiencia y potencia farmacológica; además, se ha reportado que el ácido cinámico sintético a mayor dosis administrada y de manera constante posee efectos tóxicos, por lo que lo ideal son concentraciones bajas ^[181], tal y como se encuentra en la CE₅₀ del rSe-HA.

Una vez establecida la CE₅₀ para ambos modelos, se evaluó su efecto sobre la esterificación de lípidos a Triglicéridos, los cuales son los responsables de hacer disfuncional el hepatocito [18, 139]. La figura 5 muestra que el grupo de células tratadas con AO incrementaron la concentración de TGs en ambos modelos (panel A y B), lo cual concuerda con diferentes autores, quienes reportan que el AO aumenta la producción de TGs [76,140]. Esto se debe a que el AO activa a factores de transcripción lipogénicos como PPARγ y SREBP1c. El AO los activa por dos vías distintas ii) se une a la subunidad de unión al ligando de PPARγ y ii) activa la vía proinflamatoria la cual al producir citocinas como TNFα va a activar a SREBP1c [34-37]. Cuando se empleó la CE₅₀ del rSe-HA para evitar y revertir la esteatosis inducida por el AO, el extracto no solo evitó el aumento en la concentración de TGs, sino también redujo los TGs de las células expuestas previamente al AO (Fig 5 A, B). Este efecto concuerda con lo reportado por diferentes autores, quienes al evaluar el efecto antilipogénico de partes aéreas de *Sechium edule in-vivo* e *in-vitro* observaron que reduce la acumulación de lípidos [18,108,135,136,138] y al evaluar el modo de acción proponen que es por la inactivación de SREBP1c, SREBP2 y PPARγ [109,110,135,136,138]. Con base en lo anterior, y a lo reportado por diferentes autores indican que algunas de las moléculas que conforman el rSe-HA como el ácido cinámico, el ácido cumárico, la apigenina, el metiltetradecanoato, el ácido hexadecanoico, el escualeno y estigmasterol [102], disminuyen

la acumulación y esterificación de TGs, a través de la inactivación de factores de transcripción como SREBP1c, SREBP2 y PPAR γ ^[141-150]. Por lo tanto, se propone que estos compuestos estuvieran confiriendo el efecto antilipogénico al extracto. Por otro lado, al analizar el efecto de la metformina, un fármaco recetado para el control del hígado graso ^[171,172,173] y que en este estudio se utilizó como control farmacológico para validar el efecto del rSe-HA como antilipogénico; se observa cómo redujo la concentración de TGs en hepatocitos HepG2 esteatóticos inducido por el AO (Fig 5 A, B). Este efecto concuerda con diferentes autores quienes reportan que disminuye los triglicéridos por la inactivación de SREBP1c, SREBP2 y PPAR γ ^[171,172,173]. Por esta razón, se podría proponer que el rSe-HA tiene un efecto antilipogénico como la MET ya que podrían estar actuando de la misma forma, lo que lleva a la disminución de lípidos por ambos tratamientos.

El efecto antilipogénico no solo consiste en la inactivación de la lipogénesis, sino también en la activación de la lipólisis ^[107, 109,110,116]. Por lo tanto, con el objetivo de conocer si el rSe-HA evita y reduce la acumulación de TGs por la activación de la lipólisis, se cuantificó la concentración de glicerol, el cual es liberado por la ruptura de los TGs ^[107, 109]. La figura 6 indica que el AO a las 24 hrs aumenta la concentración de glicerol comparado con las células sanas (Fig 6 A), y este valor baja significativamente a las 48 hrs (Fig 6 B). Estos resultados concuerdan con Lu y cols., (2012), quienes reportan que al incubar hepatocitos con ácidos grasos por 24 hrs se aumenta la concentración de glicerol y este valor disminuye a las 48 hrs, comparados con su control ^[141]. Estos autores proponen que a las 24 hrs las células comienza a ser menos eficiente por la saturación enzimática y a las 48 hrs ya son incapaces de romper los TGs ^[141,76] como consecuencia del daño mitocondrial y del retículo endoplásmico liso (REL) ^[151]. Esta condición, permite que la síntesis de lípidos sea más eficiente ^[152] llevando a una baja concentración de glicerol, como se observa en la Fig 6 B. Mientras que, al analizar el efecto del rSe-HA y la MET, ambos Tx aumentan la concentración de glicerol (Fig 6 A, B), lo que indica que ambos Tx están induciendo la ruptura de los TGs. Otra forma de evaluar el estado de activación/inactivación del catabolismo de lípidos, es a través del estado redox de las células, ya que cuando hay formación de moléculas (anabolismo) incrementa el estado oxidante^[182, 183] y disminuye el estado reductor; mientras que cuando se degradan macromoléculas (catabolismo) el estado oxidante baja y el poder reductor incrementa ^[182,183]. Por esta razón se evaluó a través de

MTT el poder reductor, dado que muchas de las enzimas reductoras son las que transforman el MTT a formazán ^[176-1810] por lo que la concentración de formazán se relaciona con el aumento o disminución de glicerol. En la figura 7, se muestra como el AO a las 24 hrs disminuye la concentración de formazán comparado con las células sanas, y este valor a las 48 hrs vuelve a bajar de manera significativa. Como se ha mencionado el AO satura la actividad mitocondrial y del REL a las 24 hrs y, a las 48 hrs de exposición, la misma saturación metabólica causan daño en estos organelos, condición que deteriora la degradación de lípidos en las células y aumenta su formación^[141,76]; razón por la cual probablemente no aumentó la concentración de formazán ya que está incrementando el poder oxidante. Cuando se analizó el efecto del rSe-HA y de la MET sobre la producción de formazán en presencia de AO, ambos Tx aumentaron de manera significativa su concentración. Esto indica que muy probablemente están aumentando el poder reductor, y ya que también aumentan la concentración de glicerol, indicaría que así como se están formando los TGs la célula los está degradando, (Fig 6 A) razón por la cual ambos Tx evitan el aumento de TGs (Fig 5 A). Finalmente, cuando se retó el rSe-HA y la MET en células esteatoticas, ambos incrementaron la producción de formazán y de glicerol (Fig 6); lo que indica que muy probablemente también están aumentando el poder reductor, lo que se relaciona con la baja concentración de TGs (Fig 5 B) y el aumento de glicerol (Fig 6 B). La metformina, un fármaco antilipogénico por excelencia ^[84,85,86], reduce la acumulación de lípidos y TGs ^[140,141,142] por la activación de la lipólisis a través de la activación de AMPK por su fosforilación en el residuo Thr¹⁷² ^[84,85,86] lo que lleva a un aumento en la concentración de glicerol ^[121]. La AMPK es una cinasa implicada en la activación del catabolismo (lipólisis) y la inactivación del anabolismo (lipogénesis) ^[49-51] y es blanco terapéutico de muchos fármacos antilipogénicos, y se ha demostrado por otros autores que los extractos acuosos y etanolicos de partes de áreas de *S. edule*, también son eficientes para activar a AMPK por la fosforilación del residuo Thr¹⁷² ^[135,137]. Algunos de los compuestos del rSe-HA como el ácido cinámico, el ácido cumarico, la apigenina, el metiltetradecanoato, el ácido hexadecanoico, el escualeno y estigmasterol, han sido evaluados por diferentes autores y han sido eficientes para disminuir la concentración de lípidos y TGs al activar a AMPK a través de la fosforilación del residuo Thr¹⁷² ^[141,142,147,150,154-158]. Con base en lo anterior, se cree que el rSe-HA tiene una actividad antilipogénica como la MET ya que i) evita la acumulación y

esterificación de TGs, ii) activa la lipólisis aumentando la concentración de glicerol y iii) aumentan el estado reductor. También proponemos, que muy probablemente gracias a sus múltiples compuestos químicos, ejerce un modo de acción sobre la activación de i) enzimas reductoras (CYP450) [133-135], ii) AMPK a través de la fosforilación del residuo Thr¹⁷² [141,142,147,150,154-158], aunado a la inactivación de la lipogénesis.

Otra condición que se genera durante el daño hepático es la producción de mediadores proinflamatorios como, TNF α e IL6, las cuales tienen un papel preponderante en el desarrollo de esteatosis hepática [25, 39] y RI [26,38]. Al evaluar su presencia en el medio de cultivo de células expuestas al AO, estas aumentaron la concentración de ambas citocinas. Esto se debe a que el AO induce la salida de la cisteína proteasa B (Catepsina B) que sale de los lisosomas al citosol [21, 22], la cual activa a NF κ B a través de la disociación y degradación de I κ B α/β , lo que lleva al hepatocito a producir citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL6 [21,22]. El rSe-HA evitó y redujo la concentración de manera significativa de ambas citocinas proinflamatorias (Fig 7 A, D), lo que se puede deber a que muchos de los compuestos químicos de la planta como el ácido cinámico, el ácido cumárico, la apigenina, el metiltetradecanoato y el estigmasterol [102] inactivan a NF- κ B mediante la supresión de la fosforilación de p65 [159-164], lo que evita que se transloque al núcleo evitando así la expresión de genes involucrados en la síntesis de citocinas proinflamatorias. La metformina también demostró evitar y reducir esta concentración de las citocinas proinflamatorias (Fig 7 A, D); lo cual concuerda con lo reportado en el 2016 por Cameron y cols [165]. Estos mismos autores proponen que este efecto antiinflamatorio, es gracias a que actúa río-arriba de IKK α/β lo que lleva a la supresión de la fosforilación de p65 [165]. Lo que finalmente, lleva a que ambos tratamientos evitan la inflamación inducida por el AO, la cual tiene un papel preponderante en el desarrollo de esteatosis y RI.

Otro parámetro evaluado fue la RI que fue inducida por el AO, la cual lo logra a través de las vías proinflamatorias (TNF α e IL6) y que se asocia a la disminución en el consumo de glucosa de la célula [40,52]. La figura 8 muestra que el tratamiento con AO disminuyó la concentración de glucosa en las células (panel A, B), ya que tanto TNF- α e IL6 producidas por el efecto del AO; al unirse a su receptor, activan a las MAP cinasas (MAPK) y PKC que fosforilan a IRS1 en Ser³¹² y Ser⁶¹⁶ [40, 52] lo cual va a mantener inhibido a AKT, evitando así

la translocación de los receptores GLUT2 al exterior, evitando así el consumo de glucosa^[40,52]. Cuando se retó al rSe-HA en células con AO, se observó que el extracto, así como la MET i) evita y vence la RI, ya que mantuvo los niveles de glucosa como el Sin Tx (Fig 8 A, B) y ii) sensibiliza a las células a consumir más glucosa, (Fig 8 A, B). Esto concuerda con estudios *in-vivo* en donde ratones obesos con RI inducida por dieta hipercalórica, el rSe-HA disminuyó la glucosa en sangre, y tuvo un efecto sensibilizador a la insulina^[101]. Muy probablemente este efecto se debe a la actividad de los diferentes compuestos químicos del extracto que lo conforman, tanto el ácido cinámico y cumárico se han reportado que tienen efecto sobre la fosforilación del residuo Tyr de IRS1 lo que lleva a un consumo de glucosa adecuado^[168,169,170]. Ya que tanto el rSe-HA como la MET evitan la producción de citocinas, se puede decir que están actuando desde el inicio de esta condición clínica y además al mismo tiempo al inducir la fosforilación adecuada del sustrato del receptor de Insulina 1 (IRS-1) probablemente están logrando sensibilizar a las células a la insulina.

El incremento en la lipólisis en la mitocondria y del REL por el exceso de lípidos, trae consigo un aumento de ROS. La sobreproducción de ROS provoca la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares a través de sus electrones libres, y forman compuestos derivados de aldehídos^[66]; como el 4- hidroxí-2-nonenal (4-HNE)^[66,67] y el malonaldehído (MDA), los cuales son los que inician la necrosis y potencian la inflamación^[69]. Al evaluar la producción de lípidos peroxidados (MDA) por el efecto del EO, se observó que el AO incrementó la concentración de MDA comparado con el Sin Tx (9 A, B) al igual que el grupo tratado con MET (Fig 9 A, B). Esto se debe a que el AO, al aumentar la lipólisis también aumenta los ROS hasta sobrepasar la capacidad antioxidante de la célula; lo que lleva a estrés oxidante, que se caracteriza por la peroxidación lipídica que trae consigo producción de malonaldehído, que es un lípido peroxidado que se encargará de necrosar y potenciar la inflamación^[66,67]. Este mismo efecto observado en la MET, se debe a que al aumentar la lipólisis por la activación de AMPK, también aumenta los ROS así como fue reportado por Mogabero y cols., en el 2017 y Batandier y cols., en el 2006^[174,175]; y dado que este medicamento no tiene efectos antioxidantes no disminuye la concentración de MDA. Mientras que el rSe-HA no solo aumentó la actividad de AMPK para disminuir la carga lipídica, sino además contrarrestó el efecto de los ROS, ya que los compuestos que

conforman el extracto son antioxidantes y reducen los ROS por dos vías i) actúan como scavenger ya que interactúan con los electrones libres de los ROS, e ii) inducen la activación del factor de transcripción Nrf2 a través de vía de señalización de PKC [176]; el cual una vez dentro del núcleo Nrf2 induce la expresión de genes implicados en la síntesis de proteínas como la hemo-oxigenasa 1 (HO1). La HO1 será la responsable de potenciar el efecto antioxidante ya que transformará los ROS en H₂O y O² [176,177] lo cual ayuda a evitar el estrés oxidante, peroxidación lipídica y por ende la necrosis e inflamación. Por lo tanto, se diría que el rSe-HA a comparación de la MET no solo tendrá efecto antilipogénico y antiinflamatorio, sino que también evitará el aumento en la producción de ROS por su efecto antioxidante.

9. CONCLUSIÓN

El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* evita y revierte la esteatosis, el perfil proinflamatorio y estrés oxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales en un modelo de esteatosis inducido por el ácido oleico.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar si el rSe-HA [0.20ug/ml] evita la producción de lípidos a través de la actividad del enzima ácido graso sintasa (FAS).
- Evaluar si el rSe-HA [0.20ug/ml] activa el catabolismo de lípidos por la activación de AMPK en el residuo Thr¹⁷².
- Evaluar el efecto del rSe-HA [0.20ug/ml] sobre los ácidos grasos libres liberados por la degradación de Triglicéridos y/o la acumulación lipídica, a través de la producción de cuerpos cetónicos.
- Evaluar si el rSe-HA [0.20ug/ml] aumenta el metabolismo el aumento en la producción de ATP o electrones.
- Evaluar si el rSe-HA [0.20ug/ml] vence la resistencia a la insulina por la fosforilación de sustrato del receptor de insulina (IRS-1) en residuos Tyr y no en Ser.
- Evaluar si el rSe-HA [0.20ug/ml] evita la producción de mediadores proinflamatorios a través de la no activación de NFκB (p65).

11. LITERATURA CITADA

1. Schulze, R. J., Schott, M. B., Casey, C. A., Tuma, P. L., & McNiven, M. A. (2019). The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *Journal of Cell Biology*, 218(7), 2096-2112.
2. Blouin, A., R.P. Bolender, and E.R. Weibel. 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* 72:441–455.
3. Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 48(4), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>.
4. Browning, J. D., & Horton, J. D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of clinical investigation*, 114(2), 147–152. <https://doi.org/10.1172/JCI22422>
5. Buhman, K. K., Chen, H. C., & Farese, R. V., Jr (2001). The enzymes of neutral lipid synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 276(44), 40369–40372. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100050200>
6. Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 81(March), 687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-1024302>; Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C., & Jr, R. V. F. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.008>
7. Martínez Sámano, J., Torres Durán, P. V., & Juárez Oropeza, M. A. (2013). Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 56(1), 05-18
8. Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y. X., & Diehl, A. M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(6), 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>
9. Li, Z. Z., Berk, M., McIntyre, T. M., & Feldstein, A. E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *The Journal of biological chemistry*, 284(9), 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>
10. (Fartoux, L., Chazouillères, O., Wendum, D., Poupon, R., & Serfaty, L. (2005). Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology Baltimore, Md.*), 41(1), 82–87. <https://doi.org/10.1002/hep.20519>
11. Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), 167–175.
12. Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y., Berria, R., Buzzigoli, E., Sironi, A. M., Cersosimo, E., Ferrannini, E., & Defronzo, R. A. (2007). Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in

- nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology*, 133(2), 496–506. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.068>
13. Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), 167–175; Neuschwander-Tetri B. A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 52(2), 774–788. <https://doi.org/10.1002/hep.23719>
 14. Lambert MS, Avella MA, Berhane Y, Shervill E, and Botham KM. The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their binding and internalization by isolated hepatocytes. *Eur J Biochem* 268: 3983–3992, 2001.), en otros, los TG pueden ser degradado por la lipasa hepática (HL).
 15. Berk PD and Stump DD. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* 192: 17–31, 1999.
 16. Habib, A., Mihas, A. A., Abou-Assi, S. G., Williams, L. M., Gavis, E., Pandak, W. M., & Heuman, D. M. (2005). High-density lipoprotein cholesterol as an indicator of liver function and prognosis in noncholestatic cirrhotics. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 3(3), 286–291. [https://doi.org/10.1016/s1542-3565\(04\)00622-6](https://doi.org/10.1016/s1542-3565(04)00622-6).
 17. Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R., & Nakamuta, M. (2007). Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*, 20(3), 351–358.
 18. Wei, Y., Clark, S. E., Morris, E. M., Thyfault, J. P., Uptergrove, G. M., Whaley-Connell, A. T., Ferrario, C. M., Sowers, J. R., & Ibdah, J. A. (2008). Angiotensin II-induced non-alcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG(mRen2)27(Ren2) rats. *Journal of hepatology*, 49(3), 417–428. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.018>.
 19. Trejo-Moreno, C., Castro-Martínez, G., Méndez-Martínez, M., Jiménez-Ferrer, J. E., Pedraza-Chaverri, J., Arrellín, G., Zamilpa, A., Medina-Campos, O. N., Lombardo-Earl, G., Barrita-Cruz, G. J., Hernández, B., Ramírez, C. C., Santana, M. A., Fragoso, G., & Rosas, G. (2018b). Acetone fraction from *Sechium edule* (Jacq.) S.w. edible roots exhibits anti-endothelial dysfunction activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 220(March), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.036>.
 20. Bradbury, M. W. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(2), G194-G198.
 21. Nagarajan, S. R., Paul-Heng, M., Krycer, J. R., Fazakerley, D. J., Sharland, A. F., & Hoy, A. J. (2019). Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 316(4), E578-E589.
 22. Seebacher, F., Zeigerer, A., Kory, N., & Kraemer, N. (2020, May). Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press.
 23. Shimomura, I., Bashmakov, Y., & Horton, J. D. (1999). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 30028–30032. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30028>
 24. Yahagi, N., Shimano, H., Hastay, A. H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J. I., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002). Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19353–19357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201584200>

25. Wei, Y., Clark, S. E., Thyfault, J. P., Uptergrove, G. M., Li, W., Whaley-Connell, A. T., Ferrario, C. M., Sowers, J. R., & Ibdah, J. A. (2009). Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats. *The American journal of pathology*, 174(4), 1329–1337. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080697>
26. Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L. A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., & Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science*, 106(6), 635-64.
27. Cui, W., Chen, S. L., & Hu, K. Q. (2010). Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 95–104.
28. Liao, C. C., Ou, T. T., Huang, H. P., & Wang, C. J. (2014). The inhibition of oleic acid induced hepatic lipogenesis and the promotion of lipolysis by caffeic acid via up-regulation of AMP-activated kinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1154–1162. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6386>.
29. Wu, C. H., Ou, T. T., Chang, C. H., Chang, X. Z., Yang, M. Y., & Wang, C. J. (2014). The polyphenol extract from *Sechium edule* shoots inhibits lipogenesis and stimulates lipolysis via activation of AMPK signals in HepG2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(3), 750-759.
30. Yao, H. R., Liu, J., Plumeri, D., Cao, Y. B., He, T., Lin, L., Li, Y., Jiang, Y. Y., Li, J., & Shang, J. (2011). Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *American journal of translational research*, 3(3), 284–291.
31. Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 367–417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>.
32. Koo, S. H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 19(3), 210–215. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.3.210>.
33. Yang, J., Sambandam, N., Han, X., Gross, R. W., Courtois, M., Kovacs, A., Febbraio, M., Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2007). CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circulation Research*, 100(8), 1208–1217. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000264104.25265.b6>.
34. Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., & Loria, P. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(5), 830–840. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>.
35. Poletto, A. C., Furuya, D. T., David-Silva, A., Ebersbach-Silva, P., Corrêa-Giannella, M. L., Passarelli, M., & Machado, U. F. (2015). Oleic and linoleic fatty acids downregulate Sre2a4/GLUT4 expression via NFκB and SREBP1 in skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 401, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.001>.
36. Kim, J. A., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*, 102(4), 401–414. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165472>.
37. Ferré, P., & Foufelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Hormone research*, 68(2), 72–82. <https://doi.org/10.1159/000100426>.
38. Evans, R. M., Barish, G. D., & Wang, Y. X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature medicine*, 10(4), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nm1025>
39. Poulsen, L. I., Siersbæk, M., & Mandrup, S. (2012). PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(6), 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>.
40. Browning, J. D., & Horton, J. D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 147–152. <https://doi.org/10.1172/JCI200422422>.

41. Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(6), 172–176. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x>.
42. Zick, Y. (2005). Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2005(268). <https://doi.org/10.1126/stke.2682005pe4>.
43. Tgawa, K., Nakashima, N., Sharma, P. M., Maegawa, H., Nagai, Y., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., & Olefsky, J. M. (2000). Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 141(6), 1930–1935. <https://doi.org/10.1210/endo.141.6.7516>.
44. Shah, B. H., Yesilkaya, A., Olivares-Reyes, J. A., Chen, H. D., Hunyady, L., & Catt, K. J. (2004). Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(8), 2035–2048. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0476>.
45. Hiratani, K., Haruta, T., Tani, A., Kawahara, J., Usui, I., & Kobayashi, M. (2005). Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(3), 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.152>.
46. Xue, B., Kim, Y. B., Lee, A., Toschi, E., Bonner-Weir, S., Kahn, C. R., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2007). Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*, 282(33), 23829–23840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609680200>.
47. Andreozzi, F., Laratta, E., Sciacqua, A., Perticone, F., & Sesti, G. (2004). Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation research*, 94(9), 1211–1218. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126501.34994.96>.
48. Olivares-Reyes, J. A., Arellano-Plancarte, A., & Castillo-Hernandez, J. R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and cellular endocrinology*, 302(2), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.011>.
49. Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., & Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*, 546(1), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00560-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00560-X).
50. Hardie, D. G. (2004). AMP-activated protein kinase: A master switch in glucose and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(2), 119–125. <https://doi.org/10.1023/B:REMD.0000021433.63915.bb>.
51. Thomson, D. M., & Winder, W. W. (2009). AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiologica*, 196(1), 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01973.x>.
52. Tokushige, K., Hashimoto, E., Tsuchiya, N., Kaneda, H., Tani, M., & Shiratori, K. (2005). Clinical significance of soluble TNF receptor in Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(12 SUPPL.), 298–303. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000191810.46000.37>.
53. Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M., & Feldstein, A. E. (2018). Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0009-6>.
54. Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M., & Sakamoto, K. (2008). Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 375(4), 602–607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.068>.
55. Buqué, X., Aspichueta, P., & Ochoa, B. (2008). Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 100(9), 565–578. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000900007>;

56. Koek, G. H., Liedorp, P. R., & Bast, A. (2011). The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta*, 412(15–16), 1297–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.013>;
57. Rolo, A. P., Teodoro, J. S., & Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003>;
58. Teresita, M., González, M., Cor, T., Hurtado, J., & Amat, D. M. (2001). Daño Múltiple De Órganos : Morfología De La Respuesta. *Revista Cubana Médico Militar*, 30, 77–88
59. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
60. Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004, 37(6), 755-767. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>.
61. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
62. Johnson, E. F., Palmer, C. N. A., Griffin, K. J., & Hsu, M.-H. (1996). Role of the peroxisome regulation receptor in cytochrome. *Faseb*, 6(5), 1241–1248.
63. Johnson et al., 1996; Reddy, J. K., & Rao, M. S. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(5), 852–858. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00521.2005>.
64. Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., & Tiengo, A. (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(4), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.12.015>
65. Fu, S., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell metabolism*, 15(5), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.007>.
66. Yin, Huiyong, Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
67. Zhong, H., & Yin, H. (2015). Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*, 4, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>
68. Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
69. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
70. Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M., & Sakamoto, K. (2008). Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 375(4), 602–607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.068>.
71. Zhou, Z., Xu, M. J., & Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
72. Banerjee, R., Karpen, S., Siekevitz, M., Lengyel, G., Bauer, J., & Acs, G. (1989). Tumor necrosis factor-alpha induces a kappa B sequence-specific DNA-binding protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 10(6), 1008–1013. <https://doi.org/10.1002/hep.1840100620>

73. ____Schreck, R., Albermann, K., & Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications*, 17(4), 221–237. <https://doi.org/10.3109/10715769209079515>
74. ____Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Fannin, R., Montuschi, P., Flood, L., & Luster, M. I. (1998). Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 18(8), 629–638. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.629>
75. ____Geller, D. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L., & Billiar, T. R. (1993). Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 522–526. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.522>
76. ____Cui, W., Chen, S. L., & Hu, K. Q. (2010). Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American journal of translational research*, 2(1), 95–104
77. Filozof, C., Goldstein, B. J., Williams, R. N., & Sanyal, A. (2015). Non-Alcoholic Steatohepatitis: Limited Available Treatment Options but Promising Drugs in Development and Recent Progress Towards a Regulatory Approval Pathway. *Drugs*, 75(12), 1373–1392. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0437-3>
78. Danielle Tholey, T. J. U. H. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) - Hepatic and Biliary Disorders - MSD Manual Professional Edition. <https://www.msmanuals.com/professional/hepatic-and-biliary-disorders/approach-to-the-patient-with-liver-disease/nonalcoholic-fatty-liver-disease-naflD>
79. Sakamoto, J., Kimura, H., Moriyama, S., Odaka, H., Momose, Y., Sugiyama, Y., & Sawada, H. (2000). Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), 704–711. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3868>.
80. Domínguez G F, Monroy A P, Herrera M M, Serrano A V, López EL, Trinidad LO, Becerra P, Tapia V N, Vázquez D G (2015), Edición 11. *Vademécum de Medicamentos genéricos*. México: (PLM) Para Los Médicos
81. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M., & Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, 142(7), 1592–1609. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.001>;
82. Harrison, S. (2003). Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(11), 2485–2490. <https://doi.org/10.1016/j.amjgastroenterol.2003.08.005>;
83. Kugelmas, M., Hill, D. B., Vivian, B., Marsano, L., & McClain, C. J. (2003). Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology*, 38(2), 413–419. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50316> .
84. DeFronzo, R. A., & Goodman, A. M. (1995). Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *The New England journal of medicine*, 333(9), 541–549. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508313330902>.
85. Hermann, L. S., Scherstén, B., Bitzén, P. O., Kjellström, T., Lindgärde, F., & Melander, A. (1994). Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations. A double-blind controlled study. *Diabetes care*, 17(10), 1100–1109. <https://doi.org/10.2337/diacare.17.10.1100>.

86. You, M., & Crabb, D. W. (2004). Recent advances in alcoholic liver disease - II. Minireview: Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1 50-1), 1–6. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2004>.
87. Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Zoli, M., & Melchionda, N. (2001). Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*, 358(9285), 893–894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06042-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06042-1); Marchesini, G., & Marzocchi, R. (2007). Metabolic Syndrome and NASH. *Clinics in Liver Disease*, 11(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.02.013>.
88. Oliveira, W. H., Nunes, A. K., França, M. E., Santos, L. A., Lós, D. B., Rocha, S. W., Barbosa, K. P., Rodrigues, G. B., & Peixoto, C. A. (2016). Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain research*, 1644, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.013>.
89. Besli, N., Yenmis, G., Tunçdemir, M., Sarac, E. Y., Doğan, S., Solakoğlu, S., & Sultuybek, G. K. (2020). Metformin suppresses the proliferation and invasion through NF-κB and MMPs in MCF-7 cell line. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(3), 295-304.
90. Yap, F., Craddock, L., & Yang, J. (2011). Mechanism of AMPK suppression of LXR-dependent Srebp-1c transcription. *International journal of biological sciences*, 7(5), 645–650. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.645>
91. Wu, W., Tang, S., Shi, J., Yin, W., Cao, S., Bu, R., Zhu, D., & Bi, Y. (2015). Metformin attenuates palmitic acid-induced insulin resistance in L6 cells through the AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein-1c pathway. *International journal of molecular medicine*, 35(6), 1734–1740. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2187>
92. Qu, R. N., & Qu, W. (2019). Metformin inhibits LPS-induced inflammatory response in VSMCs by regulating TLR4 and PPAR-γ. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(11), 4988–4995. https://doi.org/10.26355/eurrev_201906_18090.
93. Dhande, S. R., Dongare, P. P., Shah, P. R., Joshi, Y. M., & Kadam, V. J. Antihepatotoxic potential of *Cucumis sativus* and *Pogostemon patchouli* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 2013, 3, 9213-9221.
94. Sathesh Kumar S., Ravi Kumar B., Krishna Mohan G. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina* Var *cucumerina* L. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009, 123(2), 347-350. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.023>
95. Argueta, A. (Coord). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol.3 Instituto Nacional Indigenista. México D.F. 1994;
96. Saade, R. L. (1996). Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
97. Lombardo E.G. Comparación fitoquímica entre raíces de *Sechium edule* con actividad antihipertensiva cultivadas en campo y raíces propagadas en hidroponía. México. Tesis de Maestría Ciencias en desarrollo de Productos Bioticos. IPN. 2008.
98. Lombardo E.G, Jiménez E., Zamilpa A., Herrera M., Rosas G. Efecto de los extractos de diferentes polaridades de raíz de *Sechium edule* sobre alteraciones fisiopatológicas asociadas a la disfunción endotelial. *Rev.Latinoamer.quim.* 2012, 39-200.
99. Trejo Moreno, Celeste. Evaluación de la capacidad del extracto metanólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) para reparar el daño tisular y controlar la inflamación en un modelo murino de hipertensión. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.2013.

100. Castro Martínez, Gabriela. Evaluación farmacológica del extracto acetonico y etanolico de la raíz de *Sechium edule* sobre la hipertensión e inflamación asociada. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). 2014;
101. Hernández Acosta, Julieta. Evaluación del efecto de la fracción acetónica de la raíz de *Sechium edule* sobre el daño cognitivo asociado a hipocampo en ratones con síndrome metabólico. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) 2019;
102. Costet Mejia, Alejandro. Estudio Químico y Actividad Nefroprotectora del Extracto Hidroalcohólico Estandarizado de la Raíz de *Sechium edule* (Jacq sw). Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).2020.
103. Alvarado-Ojeda, Zimri Aziel. Efecto hepatoprotecto del extracto Hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* estandarizado en ácido cinámico. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). 2019
104. Yang, M. Y., Chan, K. C., Lee, Y. J., Chang, X. Z., Wu, C. H., & Wang, C. J. (2015). *Sechium edule* Shoot Extracts and Active Components Improve Obesity and a Fatty Liver That Involved Reducing Hepatic Lipogenesis and Adipogenesis in High-Fat-Diet-Fed Rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(18), 4587–4596. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00346>
105. Wu, C. H., Ou, T. T., Chang, C. H., Chang, X. Z., Yang, M. Y., & Wang, C. J. (2014). The polyphenol extract from *Sechium edule* shoots inhibits lipogenesis and stimulates lipolysis via activation of AMPK signals in HepG2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(3), 750–759. <https://doi.org/10.1021/jf404611a>
106. Cui, W., Chen, S. L., & Hu, K. Q. (2010). Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American journal of translational research*, 2(1), 95–104.
107. Marisol, M. M., Celeste, T. M., Laura, M. M., Fernando, E. G., José, P. C., Alejandro, Z., Omar, M. C., Francisco, A. A., Julio César, A. P., Erika, C. N., Angélica, S. C., Gladis, F., Enrique, J. F., & Gabriela, R. (2019). Effect of *Cucumis sativus* on Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *Scientific reports*, 9(1), 13372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49458-6>
108. Welsch Sobotta - Lehrbuch Histologie, Editor: Ulrich Welsch, 2006, ELSEVIER Urban&Fischer, 2. Auflage
109. Mauriège, P., Després, J. P., Prud'homme, D., Pouliot, M. C., Marcotte, M., Tremblay, A., & Bouchard, C. (1991). Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Journal of lipid research*, 32(10), 1625–1633.
110. Kim, G. S. et al. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med*. 3, 12–31 (2012).
111. Esterbauer, H., et.al., Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malondialdehyde and Related Aldehydes, *Free Rad. Biol. Med.* 11:81-128; 1991
112. Zwart, L.L., et.al., Biomarkers of Free radical Damage Applications in Experimental Animals and Humans, *Free Rad. Biol. Med.* 26:202-226; 1999
113. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Rad. Biol. Med.* 9:515-540; 1990
114. Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., & Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*, 11(10), 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
115. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.

116. Schweiger, M., Eichmann, T. O., Taschler, U., Zimmermann, R., Zechner, R., & Lass, A. (2014). Measurement of lipolysis. *Methods in enzymology*, 538, 171–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800280-3.00010-4>
117. Beck-Nielsen H. (1999). General characteristics of the insulin resistance syndrome: prevalence and heritability. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR). *Drugs*, 58 Suppl 1, 7–82. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958001-00003>.
118. Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., & Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.024>
119. Wu, Y., Wang, M., Yang, T., Qin, L., Hu, Y., Zhao, D., Wu, L., & Liu, T. (2021). Cinnamic Acid Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Suppressing Hepatic Lipogenesis and Promoting Fatty Acid Oxidation. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2021, 9561613. <https://doi.org/10.1155/2021/9561613>
120. Trejo-Moreno, C., Jiménez-Ferrer, E., Castro-Martínez, G., Méndez-Martínez, M., Santana, M. A., Arrellín-Rosas, G., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N., Hernández-Téllez, B., Ramírez-Pliego, O., Herrera-Ruiz, M., Cervantes-Torres, J., Alvarado-Ojeda, Z. A., Costet-Mejía, A., Fragoso, G., & Rosas-Salgado, G. (2021). Characterization of a murine model of endothelial dysfunction induced by chronic intraperitoneal administration of angiotensin II. *Scientific reports*, 11(1), 21193. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00676-x>
121. Vidyashankar, S., Sandeep Varma, R., & Patki, P. S. (2013). Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(2), 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.014>
122. Bruce, J. S., & Salter, A. M. (1996). Metabolic fate of oleic acid, palmitic acid and stearic acid in cultured hamster hepatocytes. *The Biochemical journal*, 316 (Pt 3)(Pt 3), 847–852. <https://doi.org/10.1042/bj3160847>
123. Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR (ed) *Biotechnology annual review*, vol 11. Elsevier, p 127–152.
124. Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferation index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vet Parasitol* 2003;113:211–6.
125. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
126. Angius, F., & Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(2), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
127. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1601, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
128. Diaz, G., Melis, M., Musin, A., Piludu, M., Piras, M., & Falchi, A. M. (2007). Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. *European journal of histochemistry : EJH*, 51(3), 213–218.
129. Muraina, I. A., Suleiman, M. M., & Eloff, J. N. (2009). Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts?. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16(6-7), 665–668. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.11.005>
130. Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta medica*, 68(5), 445–448. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32073>

131. Liu, Y., & Nair, M. G. (2010). An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. *Journal of natural products*, 73(7), 1193–1195. <https://doi.org/10.1021/np1000945>
132. Shoemaker, M., Cohen, I., & Campbell, M. (2004). Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of ethnopharmacology*, 93(2-3), 381–384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.011>
133. Navaneethan, D., & Rasool, M. K. (2014). An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food & function*, 5(10), 2438–2445. <https://doi.org/10.1039/c4fo00346b>
134. Поздняков, Д. І., & Корянова, К. Н. (2021). Cinnamic acid derivative reduces tumor growth by decreasing Hif-1 α expression and suppressing the Warburg effect. *Український радіологічний та онкологічний журнал*, 29(4), 26-38.
135. Sen, A., Terzioglu, G., Atmaca, P., Celik, G., Ozgun, O., & Arslan, S. (2015). Modulatory actions of o-coumaric acid on carcinogen-activating cytochrome P450 isozymes and the potential for drug interactions in human hepatocarcinoma cells. *Pharmaceutical biology*, 53(9), 1391–1398. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014919>
136. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principles of biochemistry. 3th ed. New York, NY: Worth Publishing; 2000.
137. Yang, M. Y., Chan, K. C., Lee, Y. J., Chang, X. Z., Wu, C. H., & Wang, C. J. (2015). Sechium edule shoot extracts and active components improve obesity and a fatty liver that involved reducing hepatic lipogenesis and adipogenesis in high-fat-diet-fed rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(18), 4587-4596.
138. Firdous, S., Sravanthi, K. A., Debnath, R. A., & Neeraja, K. A. (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. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 354-9.
139. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
140. Homan, R., Grossman, J. E., & Pownall, H. J. (1991). Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by HepG2 cells. *Journal of lipid research*, 32(2), 231–241.
141. Lu, J., Meng, Z., Cheng, B., Liu, M., Tao, S., & Guan, S. (2019). Apigenin reduces the excessive accumulation of lipids induced by palmitic acid via the AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(4), 2965–2971. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7905>
142. Ono, M., & Fujimori, K. (2011). Antiadipogenic effect of dietary apigenin through activation of AMPK in 3T3-L1 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13346–13352. <https://doi.org/10.1021/jf203490a>
143. Wang, J., Huang, M., Yang, J., Ma, X., Zheng, S., Deng, S., Huang, Y., Yang, X., & Zhao, P. (2017). Anti-diabetic activity of stigmaterol from soybean oil by targeting the GLUT4 glucose transporter. *Food & nutrition research*, 61(1), 1364117. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1364117> .
144. Nachar, A., Saleem, A., Arnason, J. T., & Haddad, P. S. (2015). Regulation of liver cell glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Phytochemistry*, 117, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.001>
145. Wei, M., Li, H., Li, Q., Qiao, Y., Ma, Q., Xie, R., Wang, R., Liu, Y., Wei, C., Li, B., Zheng, C., Sun, B., & Yu, B. (2020). Based on Network Pharmacology to Explore the Molecular Targets and Mechanisms of Gegen Qinlian Decoction for the Treatment of Ulcerative Colitis. *BioMed research international*, 2020, 5217405. <https://doi.org/10.1155/2020/5217405>

146. Wu, L., Guo, T., Deng, R., Liu, L., & Yu, Y. (2021). Apigenin Ameliorates Insulin Resistance and Lipid Accumulation by Endoplasmic Reticulum Stress and SREBP-1c/SREBP-2 Pathway in Palmitate-Induced HepG2 Cells and High-Fat Diet-Fed Mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 377(1), 146–156. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000162>
147. Wu, C. H., Ou, T. T., Chang, C. H., Chang, X. Z., Yang, M. Y., & Wang, C. J. (2014). The polyphenol extract from *Sechium edule* shoots inhibits lipogenesis and stimulates lipolysis via activation of AMPK signals in HepG2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(3), 750–759. <https://doi.org/10.1021/jf404611a>
148. Aranaz, P., Navarro-Herrera, D., Zabala, M., Miguéiz, I., Romo-Hualde, A., López-Yoldi, M., Martínez, J. A., Vizmanos, J. L., Milagro, F. I., & González-Navarro, C. J. (2019). Phenolic Compounds Inhibit 3T3-L1 Adipogenesis Depending on the Stage of Differentiation and Their Binding Affinity to PPAR γ . *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1045. <https://doi.org/10.3390/molecules24061045>.
149. Wu, Y., Wang, M., Yang, T., Qin, L., Hu, Y., Zhao, D., Wu, L., & Liu, T. (2021). Cinnamic Acid Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Suppressing Hepatic Lipogenesis and Promoting Fatty Acid Oxidation. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2021, 9561613. <https://doi.org/10.1155/2021/9561613>
150. de Cavanagh, E. M., Inserra, F., Ferder, M., & Ferder, L. (2007). From mitochondria to disease: role of the renin-angiotensin system. *American journal of nephrology*, 27(6), 545–553. <https://doi.org/10.1159/000107757>
151. Wei, Y., Rector, R. S., Thyfault, J. P., & Ibdah, J. A. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World journal of gastroenterology*, 14(2), 193–199. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.193>
152. Wei, Y., Clark, S. E., Thyfault, J. P., Uptergrove, G. M., Li, W., Whaley-Connell, A. T., Ferrario, C. M., Sowers, J. R., & Ibdah, J. A. (2009). Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats. *The American journal of pathology*, 174(4), 1329–1337. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080697>.
153. Yang, Y., Lu, R., Gao, F., Zhang, J., & Liu, F. (2020). Berberine induces lipolysis in porcine adipocytes by activating the AMP activated protein kinase pathway. *Molecular medicine reports*, 21(6), 2603–2614. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11070>
154. Nam, H., Jung, H., Kim, Y., Kim, B., Kim, K. H., Park, S. J., & Suh, J. G. (2017). Aged black garlic extract regulates lipid metabolism by inhibiting lipogenesis and promoting lipolysis in mature 3T3-L1 adipocytes. *Food science and biotechnology*, 27(2), 575–579. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0268-y>
155. Yoon, S. A., Kang, S. I., Shin, H. S., Kang, S. W., Kim, J. H., Ko, H. C., & Kim, S. J. (2013). p-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(4), 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.067>
156. Kopp, C., Singh, S. P., Regenhard, P., Müller, U., Sauerwein, H., & Mielenz, M. (2014). Trans-cinnamic acid increases adiponectin and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase through G-protein-coupled receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2906–2915. <https://doi.org/10.3390/ijms15022906>
157. Nguyen, L. V., Nguyen, K., Ma, C. T., Nguyen, Q. T., Nguyen, H., Yang, D. J., Tran, T. L., Kim, K. W., & Doan, K. V. (2021). p-Coumaric Acid Enhances Hypothalamic Leptin Signaling and Glucose Homeostasis in Mice via Differential Effects on AMPK Activation. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1431. <https://doi.org/10.3390/ijms22031431>
158. Li, X., Wen, Z., He, X., & He, S. (2006). Effects of cinnamic acid on expression of tissue factor induced by TNF α in endothelial cells and its mechanisms. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 69(5), 207–212. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70220-5](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70220-5)

159. Neog, M. K., Joshua Pragasam, S., Krishnan, M., & Rasool, M. (2017). p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. *BioFactors* (Oxford, England), 43(5), 698–717. <https://doi.org/10.1002/biof.1377>
160. Sabitha, R., Nishi, K., Gunasekaran, V. P., Annamalai, G., Agilan, B., & Ganeshan, M. (2019). p-Coumaric acid ameliorates ethanol-induced kidney injury by inhibiting inflammatory cytokine production and NF- κ B signaling in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(5), 188
161. Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrillin, M. A., Wewers, M. D., Guttridge, D. C., Grotewold, E., & Doseff, A. I. (2007). Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 179(10), 7121–7127. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7121>
162. Omran, G., Abd-Alhaseeb, M., & Houssen, M. (2021). The anti-tumor effect of stigmasterol on sorafenib treated human breast cancer cell lines.
163. de las Heras, B., Rodríguez, B., Boscá, L., & Villar, A. M. (2003). Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(2), 171–185. <https://doi.org/10.2174/1568026033392462>
164. Cameron, A. R., Morrison, V. L., Levin, D., Mohan, M., Forteach, C., Beall, C., McNeilly, A. D., Balfour, D. J., Savinko, T., Wong, A. K., Viollet, B., Sakamoto, K., Fagerholm, S. C., Foretz, M., Lang, C. C., & Rena, G. (2016). Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circulation research*, 119(5), 652–665. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308445>
165. Ran, J., Hirano, T., & Adachi, M. (2004a). Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 287(2 50-2), 1–5. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00090.2004>;
166. Ran, J., Hirano, T., & Adachi, M. (2005). Angiotensin II infusion increases hepatic triglyceride production via its type 2 receptor in rats. *Journal of Hypertension*, 23(8), 1525–1530. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000174077.88121.19>
167. Huang, D. W., Shen, S. C., & Wu, J. S. (2009). Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7687–7692. <https://doi.org/10.1021/jf901376x>
168. Abdel-Moneim, A., Abd El-Twab, S. M., Yousef, A. I., Ashour, M. B., Reheim, E., & Hamed, M. (2020). New insights into the in vitro, in situ and in vivo antihyperglycemic mechanisms of gallic acid and p-coumaric acid. *Archives of physiology and biochemistry*, 1–7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1762659>
169. Wu, L., Guo, T., Deng, R., Liu, L., & Yu, Y. (2021). Apigenin Ameliorates Insulin Resistance and Lipid Accumulation by Endoplasmic Reticulum Stress and SREBP-1c/SREBP-2 Pathway in Palmitate-Induced HepG2 Cells and High-Fat Diet-Fed Mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 377(1), 146–156. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000162>
170. Mansour, H. H., El Kiki, S. M., & Galal, S. M. (2017). Metformin and low dose radiation modulates cisplatin-induced oxidative injury in rat via PPAR- γ and MAPK pathways. *Archives of biochemistry and biophysics*, 616, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.01.005>
171. Wu, W., Tang, S., Shi, J., Yin, W., Cao, S., Bu, R., Zhu, D., & Bi, Y. (2015). Metformin attenuates palmitic acid-induced insulin resistance in L6 cells through the AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein-1c pathway. *International journal of molecular medicine*, 35(6), 1734–1740. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2187>

172. Deng, J., Peng, M., Zhou, S., Xiao, D., Hu, X., Xu, S., Wu, J., & Yang, X. (2021). Metformin targets Clusterin to control lipogenesis and inhibit the growth of bladder cancer cells through SREBP-1c/FASN axis. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 98. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00493-8>
173. Mogavero, A., Maiorana, M. V., Zanutto, S., Varinelli, L., Bozzi, F., Belfiore, A., Volpi, C. C., Gloghini, A., Pierotti, M. A., & Gariboldi, M. (2017). Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Scientific reports*, 7(1), 15992. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16149-z>
174. Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M. Y., Fontaine, E., Rigoulet, M., & Leverve, X. M. (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 38(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9003-8>
175. Hseu, Y. C., Korivi, M., Lin, F. Y., Li, M. L., Lin, R. W., Wu, J. J., & Yang, H. L. (2018). Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*, 90(2), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.01.004>
176. Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2010). Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Archivos de Neurociencias*, 15(1), 47-55.
177. Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D. K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B. S., & Bhatt, A. N. (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific reports*, 8(1), 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>
178. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
179. Garn, H., Krause, H., Enzmann, V., & Drössler, K. (1994). An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *Journal of immunological methods*, 168(2), 253–256. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90062-0)
180. Janjic, D., & Wollheim, C. B. (1992). Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia*, 35(5), 482–485. <https://doi.org/10.1007/BF02342448>
181. Hoskins J. A. (1984). The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. *Journal of applied toxicology : JAT*, 4(6), 283–292. <https://doi.org/10.1002/jat.2550040602>
182. Sugano, T., Oshino, N., & Chance, B. (1974). Mitochondrial functions under hypoxic conditions. The steady states of cytochrome c reduction and of energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 347(3), 340–358. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(74\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90074-7).
183. Veech R. L. (2004). The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 70(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.09.007>

Cuernavaca, Mor., 27 de septiembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Zimri Aziel Alvarado Ojeda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

Atentamente

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

GERARDO JOEL BARRITA CRUZ | Fecha:2022-09-30 19:04:57 | Firmante

X6Hw5nFb4NlpGMAUCK/bfXzv8F5Y2zuvO7JbeQ/fhomOJhet+uqnD+4pe1EpYIO/oK11ihZR9HQJxBwyQeuYfJup/JX9MHAzdaTmEtu31vpEG79HjkcA0OrZn36C2ERHfHB7L4mf
PUX8ejvp1YMe6HMKTWR2nro7EExiR7aSFwTH1XOw0YS6u/rFy2229NjkbNadQX6LJ/QVGwc3nOG6sX0Lba/RHRjfx6pu41jV8S7HdRGuolnK+6yliuu/AfDnt9GJnD5oHz+d/Q/ko
3hUs3tK1DsFnwCZzyM0nSghrv11B0HZth/hzQW3AMBR4xWRPTtXgtLXu2y0q49SC8FYjQ==

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



[TQB0Jwrb2](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5ZMjwgxclatT92EP9vqmls3cnVpnpGto>



Cuernavaca, Mor., 27 de septiembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Zimri Aziel Alvarado Ojeda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2022-09-30 11:26:21 | Firmante

OMHhhlxzYmRfM8tWWoXYmIsqd0rLmtgZXEgh9cBNQVBC734iaOSlwy3cPSrp/UE7vEpJxMFGUizLYexdXY3TVbDv3WhO/04TxOwJvRzxaFUe/vEB+3qZ1ZGXdbjK37bLfdUZQ/Yu5dWSZXDSzOX16o+c5Sr8+Uu14x3V4col15OOIznoB34v2cCEjrLYglM5IAqPdkQhEsfY+tswHXxSB8BUO6yY8GRF+LSojZjLBSjPR4zXHBfz10zW+SWptfvjhSu+V3HpVorl/H8LSlaSubXOt6NYppZmnYUulJx01GdGjP9Htqfts2lxb7dlqp+N6bdkys+wrpoq5dgMtYrgw==

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



[A8bPDNjYy](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/l6ohXE9xk4X1bMpXJdlrNjfaFINwybkJ>



Cuernavaca, Mor., 27 de septiembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Zimri Aziel Alvarado Ojeda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-09-27 16:26:23 | Firmante

Brm5GB7bEZsRh9wWX2T4/nxlektf5OOsspCw7OxmU6G9ZGCryiHKVl8iM3GaEgVpJCgkYTLNoW3W1rY2alkaSBnh3GvmMDvmJuu6l6AJVFLA2JsuEG7D+29dFv72QqpajxxS
GaCoiTfDeSSiGAOsROaGWB6bG3ILS0by72wLA7DBcZr8R1UqXIVAXC+blsMosy/53DY9JoyhDcfuH5Pi3+wTE2i3qLcW6Jkgq8jJdLYdA8XxPWtp8CRf+7wmjnuERzpdvBYVRhS
AorAeAqnBPKbBk2ZXI7pFnTFImvNBbu1xKE6nRdOZq/ae4XBOhtf/JHoB/lzEUqAOKCbQ0SAeA==

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



[3zefHP1IL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dE8S3FHEIUcx07yWalTHtiHER5opHN0E>



Cuernavaca, Mor., 27 de septiembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Zimri Aziel Alvarado Ojeda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

Atentamente

Dra. Gladis Fragoso González



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

GLADIS FRAGOSO GONZÁLEZ | Fecha:2022-09-27 15:18:26 | Firmante

Rafeo3rNh0RkH1uXuTx1P7Mf6+S2blUAm9UKA3AnzJB2fnLjb+z4N9d8MQHmXQmdQQ19SqAVKvM362xe80gwL5BmtUXPRF5GeDEH5ThqiNIT2bDbyTqiApZH4btI065C1EQ
QOfqys+mAHKsT5X9XtdhuU8dMAF4XPanmxqn1HygYJa+hD41nc2/7SFnMS1/8f5X1O+JOr+aaYTSIHC+54EyHrtmDVy3d/oXwdHz/OclAJLs4GTQ5kJ86xFznUzLr48d1o6ngxlXp
N9MipN8Svcd3YLYiqTHU0myOjebvri0N1oWGk+h3XLVdG5RCbLux3kB5uvDyw76wK43esAmEg==

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



[hQ39YRNnD](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a8OnkDWq1ztFeBGsGj7tFuKL18fepUwZ>



Cuernavaca, Mor., 27 de septiembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Efecto del Extracto hidroalcohólico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) S.w. como antiesteatósico, anti perfil proinflamatorio y antioxidante en hepatocitos HepG2 disfuncionales”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Zimri Aziel Alvarado Ojeda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

A t e n t a m e n t e

Dra. Gabriela Rosas Salgado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2022-09-29 11:57:47 | Firmante

FhvX4bUiehPB+NaJqmwc+yWkH6ZTlhUO9BqvDJSnZTs9MZpIDyulxZpH0KV+h5gOwtnJik4VG2PDRjmDS/XrRXfVB9VQ+w5PTQeTsl3sKxd44VTTLZ4qkTvbs94GnCkvAX7tEII
GK0q3RRPp/1OvmZOhqzm5yiaohnl4aNq+iUDow2gldr/chsDuj2l2vtNq0k14OJblDirDjRMVakGVRQ3Yk7vgKz04YHPzPNqNCIzOLC5RavOd6CrkqIRVTquB6iWakAWuaW2OqIq
A5Hmhw6yBtyl6iQKFAOceZ+GRhk2mb+nsDIRJYdoU1WOrLBIGZ6AT72DnztWTN9GBdvloZw==

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



[WRh7Ju1nl](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tLpLgCO1Pj4TMf6DaGIMX354kTIlgxKN>

