



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BASICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACION EN DINAMICA CELULAR

**EVALUACIÓN DE LAS SUBFRACCIONES F1, F2 y F3 DE LA FRACCIÓN
ACUOSA DE *Cucumis sativus* (PEPINO) Y SU COMBINACIÓN PARA EL
CONTROL DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

M. EN C. CELESTE TREJO MORENO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO (FM-UAEM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2018

SINODALES

Dra. Gabriela Rosas Salgado
Facultad de Medicina, UAEM

Dra. María Angélica Santana Calderón
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

SECRETARIO

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Facultad de Medicina, UAEM

VOCAL

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS

VOCAL

Dr. Jaime Tortoriello García
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS

VOCAL

Dra. María Angélica Santana Calderón
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

SUPLENTE

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS

SUPLENTE

Dra. Gabriela Rosas Salgado
Facultad de Medicina, UAEM

PUBLICACIÓN RELACIONADA CON LA TESIS

Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Perez-Garcia MD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santana MA¹⁰, Esquivel-Guadarrama FR, Castillo A, Cervantes-Torres J, Fragoso G, Rosas-Salgado G. Cucumis sativus Aqueous Fraction Inhibits Angiotensin II-Induced Inflammation and Oxidative Stress In Vitro. *Nutrients*. 10(3). pii: E276. doi: 10.3390/nu10030276.

RESUMEN

La inflamación y el estrés oxidativo desempeñan un papel importante en la disfunción endotelial y son factores clave en la progresión de las enfermedades cardiovasculares. *Cucumis sativus* (pepino) es una planta perteneciente a la familia de las Cucurbitaceas, que ha reportado tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hipoglicemiantes y antihipertensivas. El objetivo de este estudio fue evaluar las subfracciones SF1, SF2 y SF3 de la fracción acuosa de *C. sativus* y su combinación para el control de la disfunción endotelial inducida por angiotensina II, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para las evaluaciones *in vitro*, se utilizaron las células endoteliales de microvasculatura humana-1 (HMEC-1). Estas se cultivaron con diferentes concentraciones de Ang II y las subfracciones. La concentración de interleucina 6 (IL-6) como medida de inflamación. Para identificar las combinaciones de SF más efectivas, se cultivaron células HMEC-1 como se describió anteriormente en presencia de cuatro combinaciones (C1, C2, C3 y C4) de SF1 y SF3. Luego, se evaluaron los efectos de la combinación más efectiva (medida por la producción de IL-6) sobre la expresión de moléculas de adhesión, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO). Además, se realizó un análisis de espectrometría de masas para identificar los compuestos activos. Finalmente se dio tratamiento con la combinación 4 (C4) a ratones con disfunción endotelial y se evaluó la presión arterial, la concentración de citocinas, histopatología y perfil renal, y remodelado vascular. Los resultados indicaron que ambas subfracciones SF1 y SF3 disminuyeron la producción de IL-6 inducida por Ang II, y C4 (SF1 y SF3, 10 µg / ml cada una) fue la combinación más efectiva para inhibir la producción de IL-6. Además, C4 impidió la expresión de moléculas de adhesión, redujo la producción de ROS y aumentó la biodisponibilidad del NO. La glicina, la arginina, la asparagina, la lisina y el ácido aspártico fueron los componentes principales de ambas subfracciones. En el modelo *in vivo*, la C4 normalizó la presión arterial sistólica y diastólica, reguló la producción de la citocina proinflamatoria IL-1β y aumentó la de la citocina anti-inflamatoria IL-10 en riñón. Además, revirtió el remodelado vascular en arterias hepáticas y aorta, y disminuyó el daño renal y

hepático. Estos resultados demuestran que C4 tiene efectos que controlan el estrés oxidante, la inflamación, el remodelado vascular y el daño tisular asociados a la disfunción endotelial y podría ser candidato para el desarrollo de un fitomedicamento para el tratamiento de esta patología.

ABSTRACT

Inflammation and oxidative stress play major roles in endothelial dysfunction and are key factors in the progression of cardiovascular diseases. *Cucumis sativus* (cucumber) is a plant from the Cucurbitaceae family, which has been reported to have antioxidant, antiinflammatory, hypoglycemic and antihypertensive properties. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the effect of three subfractions (SFs) from the *Cucumis sativus* aqueous fraction to reduce inflammatory factors and oxidative stress induced by angiotensin II (Ang II) in human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) cells. The cells were cultured with different concentrations of Ang II and the subfractions. IL-6 (Interleukin 6) concentration was quantified as a measure of inflammation. To identify the most effective SF combinations, HMEC-1 cells were cultured as described above in the presence of four combinations of SF1 and SF3. Then, the effects of the most effective combination on the expression of adhesion molecules, the production of reactive oxygen species (ROS), and the bioavailability of nitric oxide (NO) were evaluated. In addition, a mass spectrometry analysis was performed to identify the active compounds. Both SF1 and SF3 subfractions decreased the induction of IL-6 by Ang II, and C4 (SF1 and SF3, 10 µg/mL each) was the most effective combination to inhibit the production of IL-6. Additionally, C4 prevented the expression of adhesion molecules, reduced the production of ROS, and increased the bioavailability of NO. Glycine, arginine, asparagine, lysine, and aspartic acid were the main components of both subfractions. *In vivo*, C4 normalized systolic and diastolic blood pressure, decreased the production of the proinflammatory cytokine IL-1 β and increased IL-10 in the kidney. Moreover, the C4 reversed vascular remodeling in hepatic and aortic arteries and decreasing renal and hepatic damage. These results demonstrate that C4 has effects that control oxidative stress, inflammation, vascular remodeling and tissue damage associated with endothelial dysfunction and could be potentially useful to the treatment of this pathology.

La presente investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) básico (CB-2012-169011).

La alumna Celeste Trejo Moreno del Doctorado en Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos recibió beca del CONACyT, con el número de becario 258249.

Este trabajo contó con el apoyo de la Biol. Beatriz Hernández Téllez, la histotecnóloga Raquel Guerrero Alquicira y el Dr. Carlos Baez por su colaboración en la realización de los cortes y tinciones para los estudios histológicos.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Gabriela Rosas Salgado, por todo su esfuerzo, conocimiento, tiempo, paciencia, sugerencias, enseñanzas y amistad que me ha brindado a lo largo de esta y otras etapas, gracias por ser una tutora tan dedicada, siempre das el 150% y nos guías como consideras que es lo mejor, gracias por considerarme una amiga más que un simple estudiante más, gracias por tomar en cuenta nuestras opiniones en todo sentido, eres una tutora única.

A mi comité tutorial, el Dr. Enrique Jiménez Ferrer y la Dra. Angélica Santana Calderón, por sus críticas, comentarios, sugerencias y apoyo brindado. Gracias Dr. Ferrer por su empatía con nosotros y al Dr. Zamilpa por su invaluable ayuda en la fitoquímica de las fracciones. Gracias Dra. Santana por sus grandes aportaciones, sus sugerencias y críticas que siempre nos hicieron crecer.

A la M. en C. Marisol Méndez Martínez y M. en MM. Laura Yannin Maldonado Mejía, por su colaboración, apoyo, amistad y solidaridad en todo momento. Gracias por todos los momentos que pasamos, siempre me apoyaron fuera lo que fuera, si había alguien con quien podía contar siempre era con uds, gracias por su responsabilidad, profesionalismo, su empatía, cariño y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. José Pedraza Chaverri y a Omar N. Medina Campos por el apoyo y libertad para realizar los estudios de estrés oxidante.

Al Dr. Alejandro Zamilpa, a Lola y a Arturo por el apoyo en los estudios de fitoquímica y los análisis de masas. Gracias Dr. Zamilpa, por tanto esfuerzo y apoyo en la fitoquímica de estas fracciones que fueron difíciles de elucidar.

A la Dra. Aida Castillo por su apoyo para la realización del cultivo celular, sin las células no se hubiera podido realizar parte de este proyecto.

Al Dr. Gerardo Arrellín Rosas, por su apoyo en la interpretación histopatológica.

A la Dra. Gladis Fragoso por su ayuda inmediata e incondicional, gracias por siempre decir que si nos apoyaba en todo, fuera lo que fuera.

A la Dra. Jacquelynn Cervantes Torres, por su colaboración y paciencia en la realización del western blot, pese a la premura.

A Brenda, por estar ahí, por aprender algo del conocimiento que puedo dar y hacerlo con entusiasmo. Gracias por brindarme apoyo incluso cuando no lo pedía, tu iniciativa es algo maravilloso, y tu amistad más, gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Gabi, Paty, Chari, July, Ana, Lety, Ale y Zimri por su ayuda, compañerismo y amistad. Por hacerme divertidos los días con sus ocurrencias y charlas.

DEDICATORIAS

A Héctor e Iker, mis más grandes motores, mi tesoro, uds que me dan fuerza para seguir con todo, Héctor que me ha tenido un amor y paciencia inmensa, y que ha estado a mi lado incondicionalmente, a Iker por ser mi ilusión y ser mi motivación más grande.

A mis padres, que siempre me han ayudado, guiado y cuidado con amor. Gracias de corazón por todo el apoyo que me han brindado.

A mis hermanos, que siempre han estado ahí para todo.

Les dedico esta tesis y les agradezco por todo lo que han hecho por mí, muchísimas gracias.

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El endotelio	1
1.1.1. Funciones del endotelio	2
1.1.1.1 Angiotensina II y el tono vascular	3
1.2. Disfunción endotelial	4
1.2.1. Características de la disfunción endotelial	5
1.2.1.1. Estrés oxidativo	6
1.2.1.2. Inflamación y NF-κB	9
1.2.1.3. Remodelado vascular	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Tratamientos farmacológicos	12
2.2 Tratamientos alternos	13
2.2.1. Flavonoides, polisacáridos y aminoácidos	13
2.3. <i>Cucumis sativus</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO	18
6. OBJETIVOS PARTICULARES	18

7. MATERIAL Y METODOS	19
7.1. Obtención de las subfracciones de <i>Cucumis sativus</i>	19
7.2. Cultivo celular	19
7.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	20
7.4. Inmunocitoquímica	21
7.5. Western Blot	22
7.6. Cuantificación de ON	23
7.7. Cuantificación de ROS	24
7.8. Cromatografía en Capa Fina	24
7.9. Espectrometría de masas	25
7.10. Animales de experimentación	26
7.11. Inducción de la disfunción endotelial y grupos experimentales	26
7.12. Medición de la presión arterial	27
7.13. ELISA de extractos tisulares	27
7.14. Histopatología	28
7.15. Perfil renal	28
7.16. Análisis estadístico	29
8. RESULTADOS	30
8.1. Las SF1 y SF3 controlan la producción de IL-6	30
8.2. La C4 es la mejor combinación para evitar la producción de IL-6	32

8.3 La C4 evita la expresión de E-selectina e ICAM-1	33
8.4. La C4 favorece la disponibilidad del ON	35
8.5. La C4 evita el incremento de ROS inducido por Ang II	36
8.6 Las SFs contienen flavonoides, polisacáridos y aminoácidos	38
8.7 Las SF1 y SF3 contienen principalmente glicina y asparagina	39
8.8. Evaluación <i>in vivo</i> de la C4	44
8.8.1. Regulación de la presión arterial	44
8.8.2. La C4 induce un ambiente no inflamatorio	46
8.8.3. La C4 revierte el remodelado vascular	48
8.8.4. La C4 disminuye el daño renal	51
8.8.5. La C4 revierte el daño hepático	54
9. DISCUSIÓN	56
10. CONCLUSIÓN	61
11. PERSPECTIVAS	61
12. ARTÍCULOS	62
13. REFERENCIAS	88
14. ANEXOS	106

ABREVIATURAS

ABS.	Absorbancia
AcOEt.	Acetato de etilo
ALO.	Alopurinol
Ang I.	Angiotensina I
Ang II.	Angiotensina II
AQ-Cs.	Fracción acuosa de <i>Cucumis sativus</i>
AP-1.	Proteína activadora 1
ARA-II	Antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II
AT1R.	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2R.	Receptor de angiotensina II tipo 2
BSA.	Albumina sérica bovina
C1-4.	Combinación 1, 2, 3 o 4.
Ca ²⁺ .	Calcio
CaM.	Calmodulina
CAT.	Transportador de aminoácidos catiónicos
CCF.	Cromatografía en placa fina
CCL.	Quimiocina
CD.	Grupo de diferenciación
CE ₅₀ .	Concentración efectiva 50
CH ₃ Cl ₂ .	Diclorometano
CH ₃ CN.	Acetonitrilo
CMLV.	Células de músculo liso vascular

COX.	Ciclooxigenasa
DAB.	Diaminobenzidina
DAG.	Diacilglicérido
DHE.	Dihidroetidio
DPI.	Difenil iodonium
DPPH.	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECA.	Enzima convertidora de angiotensina
ECV.	Enfermedades cardiovasculares
EDTA.	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF.	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
E_{max}	Efecto máximo
eNOS.	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK.	Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares
Eth.	Etidio
FoxP3.	Factor de transcripción <i>forkhead</i> caja P3
GC.	Guanilato ciclasa
GlyR.	Receptor de glicina
GMPc.	Guanosin monofosfato cíclico
GTP.	Guanosin trifosfato
H ₂ O ₂ .	Peróxido de hidrógeno
Hac.	Ácido acético glacial
HE.	Tinción Hematoxilina-Eosina
HMEC-1.	Células endoteliales de microvasculatura humana 1

HO.	Hidroxilo
HRP.	Peroxidasa de rábano
HUVEC:	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humana.
ICAM-1.	Molécula de adhesión intracelular 1
IGF.	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IκB.	Inhibidor del factor de transcripción NF-κB
IKK.	Cinasa del Inhibidor de NF-κB
IL.	Interleucina
IP.	Intraperitoneal
IP ₃ .	Inositol trifosfato
JAK.	Janus cinasa
JNK1.	Cinasa c-Jun N-terminal 1
LDL.	Lipoproteína de baja densidad
LDLox.	Lipoproteína de baja densidad oxidada
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginina metil ester
LOS.	Losartán
MAPK.	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCP-1.	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MEC.	Matriz extracelular
MeOH.	Metanol
MLCK.	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MMP.	Metaloproteinasas
NADH.	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NaF.	Fluoruro de sodio

NaPP _i	Pirofosfato de sodio
NASH.	Esteatohepatitis no alcohólica
NaVPO ₄	Vanadato de sodio
nBuOH.	n-butanol.
NF-κB.	Factor nuclear kappa B
O ₂ ^{•-}	Ión superóxido
ON.	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAD.	Presión arterial diastólica
PAGE.	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS.	Presión arterial sistólica
PBS.	Buffer de fosfatos salino
PDGF.	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE ₂ .	Prostaglandina E ₂
PKC.	Proteína cinasa activada por calcio
PLC.	Fosfolipasa C
PMSF.	Fenil metil sulfonil fluoruro
RAAS.	Sistema renina angiotensina aldosterona
RIPA.	Ensayo de radioinmunoprecipitación
ROK.	Cinasa Rho
ROS.	Especies reactivas de oxígeno
SAPK.	Proteín Cinasas Activadas por Estrés
SF.	Subfracción
SFB.	Suero fetal bovino

SDS.	Dodecilsulfato sódico
SIRT-1.	Homólogo de la proteína 2 del regulador de la información silenciosa
SOD.	Superóxido dismutasa
TBS-T.	Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween-20
TGF β .	Factor de crecimiento transformante beta
T _H .	Linfocitos T cooperadores
TMB.	3,3' 5,5'-tetrametilbenzidina
TNF α .	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA ₂ .	Tromboxano 2A
VCAM-1.	Molécula de adhesión vascular 1
VEGF.	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL.	Lipoproteína de muy baja densidad

1. INTRODUCCION

1.1 El endotelio

Los vasos sanguíneos están formados por una capa adventicia, una capa media formada por células del músculo liso vascular (CMLV) y en la parte más interna se localiza la capa íntima, formada por el endotelio. Este último, es una monocapa continua de células endoteliales que tapizan la cara luminal interna de las arterias, las venas, los capilares y los vasos linfáticos, formando una estructura muy organizada que asegura el acoplamiento funcional entre ellas (Esteller *et al.*, 2005; Kolka y Bergman., 2012).

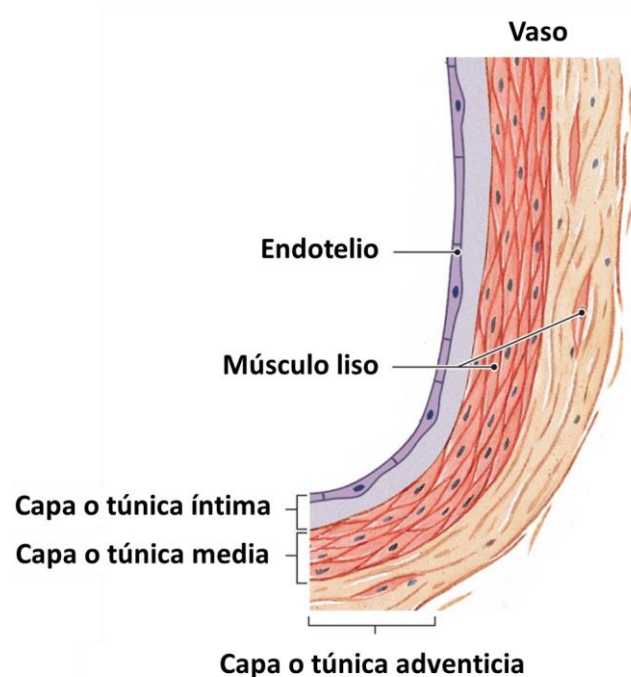


Figura 1. Estructura de los vasos sanguíneos. Los vasos están conformados por tres capas, 1) la íntima, donde está el endotelio, 2) la media, donde están las células de músculo liso vascular y 3) la adventicia. Tomado de Martini F, 2009.

Como tal, tiene dos grandes funciones, la primera es la de regular el tránsito de 7.2 litros diarios de sangre, permitiendo la salida de una cantidad inferior al 0.1% de líquidos hacia los tejidos. La segunda, es coordinar la funcionalidad de células

asociadas tanto a los vasos sanguíneos (células de músculo liso vascular y fibroblastos), como de las que no forman parte de ellos (linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), lo cual hace que el endotelio sea un tejido estructuralmente simple pero funcionalmente complejo (Klabunde R, 2005; Márquez *et al.*, 2009; Kolka y Bergman., 2012).

Para llevar a cabo sus funciones, posee diferentes receptores que le permiten captar señales físicas, químicas, hormonales e inmunológicas. A estas señales puede responder sintetizando, almacenando y liberando diferentes moléculas que cumplen funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas, por lo que forma parte de los grandes sistemas homeostáticos del organismo (neuroinmunoendocrinológico) (Márquez *et al.*, 2009; Esteller *et al.*, 2005; Kolka y Bergman, 2012).

1.1.1 Funciones del endotelio

La función del endotelio depende del tipo de vaso y de la ubicación en la que se encuentre (Klabunde R, 2005; Márquez *et al.*, 2009). Así, el endotelio vascular no es simplemente una barrera que separa la sangre de la pared vascular, sino que también participa en diversas funciones, entre las que destacan:

- El mantenimiento del tono vascular y de la presión arterial, mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Davignon y Ganz, 2004; Márquez *et al.*, 2009, Kolka y Bergman, 2012).
- La capacidad de expresar moléculas de adhesión que a su vez controlan el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos efectores a la íntima y adventicia, donde serán activados participando en el proceso inflamatorio (Pacurari *et al.*, 2014; Muniyappa y Sowers, 2013).
- La creación de una superficie no trombogénica por la síntesis de inhibidores de la agregación plaquetaria (Márquez *et al.*, 2009; Versteeg *et al.*, 2013).

- Regulación del remodelado vascular, al sintetizar y liberar factores de crecimiento que promueven la proliferación de las células del músculo liso vascular (CMLV) (Forstermann *et al.*, 2012; Pacurari *et al.*, 2014).

2.1.1.1 Angiotensina II y el tono vascular

La angiotensina II (Ang II) es un péptido biológicamente importante del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (Liang *et al.*, 2015), pues induce varios efectos biológicos como vasoconstricción, incremento de contractilidad miocárdica, proliferación celular y retención de agua-sodio. La formación de la Ang II comienza con la síntesis de su precursor, el angiotensinógeno dentro del hígado. Este viaja al riñón a través de los vasos sanguíneos para ser catalizado por la renina, proteasa que se sintetiza y almacena en el aparato yuxtaglomerular (área especializada de las nefronas). El angiotensinógeno catalizado por la renina se convierte en un decapeptido de 14 aminoácidos denominado angiotensina I (Ang I). Posteriormente Ang I es catalizado por la enzima convertidora de Angiotensina (ECA) liberada por las células endoteliales a nivel pulmonar quedando como un octapéptido denominado Ang II (Pérez-Díaz *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2010; Pacurari *et al.*, 2014). Por otra parte, la Ang II se puede formar de manera local en vasos sanguíneos, el riñón, corazón y cerebro a través de vías no dependientes de ECA (Santeliz *et al.*, 2008).

La Ang II actúa principalmente a través de dos receptores diferentes de 7 dominios transmembranales: el receptor de Ang II tipo 1 (AT1R) y el receptor de Ang II tipo 2 (AT2R) (Lemarie y Schiffrin, 2010). Cuando la Ang II se une al AT1R en las células de músculo liso vascular (CMLV) se activa la proteína G acoplada al receptor, a su vez, ésta activa a la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). Este último induce la salida del Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, el Ca²⁺ forma un complejo con la calmodulina y juntos activan a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), luego esta fosforila a la miosina, induciendo así la contracción. El mecanismo de vasodilatación es a través del óxido nítrico (ON), el cual se genera por la óxido nítrico sintasa (eNOS) en las células endoteliales. El ON difunde libremente hacia las células de músculo liso

vascular y activa a la guanilato ciclasa (GC), ésta cicla al GTP en GMPc, y este segundo mensajero activa a una cinasa que posteriormente fosforila y activa a la fosfatasa G que desfosforila a la miosina conduciendo así a la vasodilatación (Figura 2) (Márquez *et al.*, 2009; Lanz *et al.*, 2010).

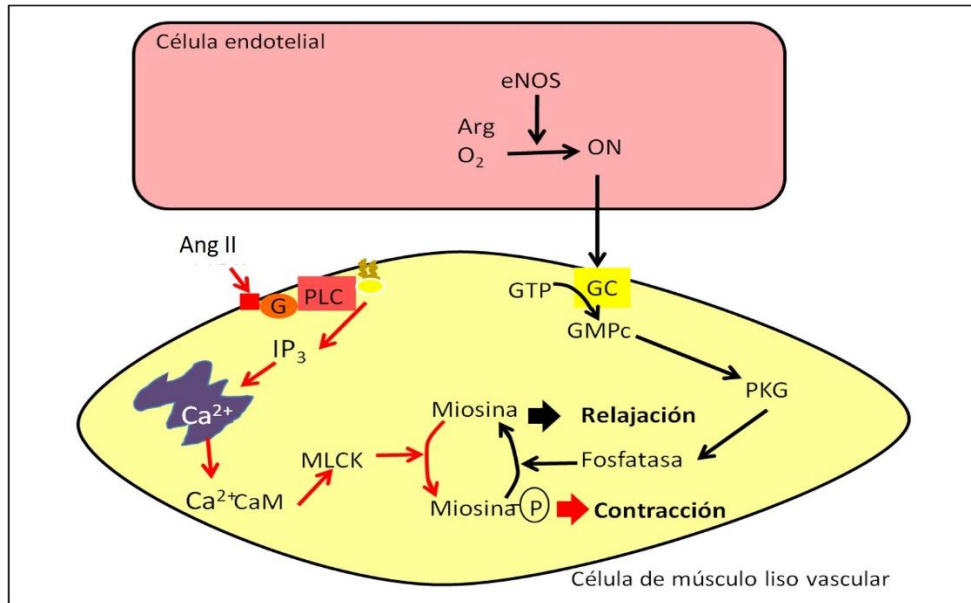


Figura 2. Regulación del tono vascular. La angiotensina II (Ang II) se une a su receptor AT1R en las células del músculo liso vascular y desencadena la señalización que conduce al incremento en los niveles de calcio intracelular, lo cual conduce a la vasoconstricción (flechas rojas). El ON generado por la eNOS en las células endoteliales difunde libremente hacia la célula del músculo liso vascular y promueve la vasodilatación (flechas negras).

1.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial es un marcador de daño vascular y es el precursor de diversas enfermedades cardiovasculares (hipertensión, disfunción renal y enfermedades cerebro-vasculares), que son la principal causa de defunción a nivel mundial (Davignon y Ganz, 2004). Se calcula que en el 2012 murieron aproximadamente 17.5 millones de personas, representando el 30% de las muertes registradas a nivel mundial y se estima que para el 2030, se tenga un registro de 23.6 millones de personas fallecidas por enfermedades cardiovasculares (ECV) (OMS, 2016). Además, más del 75% de las defunciones por ECV se producen en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015;) como lo

es México, que tan solo en el 2014 registró 633 mil muertes (63.8%) correspondiente a ECV e hipertensión (INEGI, 2014).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de medio camino 2016 (ENSANUT 2016) en México uno de cada 4 adultos padece hipertensión arterial (25.5%), presentándose ligeramente más en mujeres (26.1%) que en hombres (24.9%). Esto generó un impacto económico de 76,193 millones de pesos gastados en el 2016, cifra que representa el 29% de los ingresos totales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2016).

1.2.1. Características de la disfunción endotelial

La disfunción endotelial puede definirse como el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores sintetizados por las células endoteliales (Endemann y Schiffrin, 2004; Muniyappa y Sowers, 2013), lo que dirige a la pérdida de la capacidad del endotelio de modular las funciones fisiológicas del lecho vascular (Lemarie and Schiffrin, 2010; Cho et al., 2018). La disfunción endotelial se caracteriza por:

1) Desregulación del tono vascular y de la presión arterial, mediante la disminución de la biodisponibilidad del Óxido Nítrico (ON), que actúa como vasodilatador (Böhm y Pernow, 2007; Endemann y Schiffrin, 2004; Kolka y Bergman., 2012).

2) Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), que conducen a un estado de estrés oxidante (Kietadisorn *et al.*, 2012; Guzik *et al.*, 2007; Forstermann *et al.*, 2012).

3) Favorecer un estado protrombótico al promover la cascada de la coagulación y disminuir la cascada fibrinolítica (Doller *et al.*, 2009; Yagi S., *et al.*, 2010; Brown et al., 2000).

4) Adquisición de un fenotipo proinflamatorio, principalmente por la activación del factor de transcripción NF- κ B (Guzik *et al.*, 2007; Schiffrin E.L., 2005), por lo que se inicia la producción de:

- Moléculas de adhesión, como E-selectina, P-selectina, la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Margetic S. 2012, Muniyappa y Sowers, 2013; Schiffrin *et al.*, 2013).
- Citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1 beta (IL-1 β) e IL-6 y el Factor de necrosis tumoral (TNF α) (Harrison *et al.*, 2011; Muniyappa y Sowers, 2013).
- Quimiocinas, como la IL-8 (CCL8) y la proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1 (CCL2) (Muniyappa y Sowers, 2013; Endemann y Schiffrin, 2004).
- Metaloproteinasas, como la MMP-2 y MMP-9 (Endemann y Schiffrin, 2004; Gorman *et al.*, 2014).
- Ciclooxygenasa 2 (COX-2), favoreciendo la producción de prostaglandinas (PGE2) y tromboxanos (TXA2) (Márquez *et al.*, 2009; Jaimes *et al.*, 2010; Bernatova I., 2014; Pacurari *et al.*, 2014).

La disfunción endotelial tiene un origen multifactorial, y puede ser inducida por incremento en las concentraciones de glucosa, triglicéridos, LDL y VLDL, leptina, ROS, endotelina-1, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), proteína C reactiva, IL-6 y de manera relevante por la Ang II (Montezano *et al.*, 2014; Jaimes *et al.*, 2009; Márquez *et al.*, 2009; Schiffrin *et al.*, 2002; Kho *et al.*, 2014; Matsumoto *et al.*, 2014).

1.2.1.1. Estrés oxidativo

En el sistema vascular, los ROS como el O₂^{•-}, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroxilo (HO) y peroxinitrito (ONOO⁻) son producidas por células endoteliales, las células de músculo liso vascular y las células inflamatorias infiltradas en el tejido perivascular. Las principales fuentes generadoras de ROS en la disfunción endotelial son la NADH oxidasa, la succinato deshidrogenasa en la mitocondria, la xantina oxidasa y la eNOS desacoplada (Guo *et al.*, 2013; Maron *et al.*, 2012).

La NADH oxidasa endotelial es un complejo enzimático que puede ser estimulada por diversos factores como:

- Factores físicos (presión de cizalla).
- Agentes vasoactivos (Ang II, endotelina-1, aldosterona).
- Factores de crecimiento (VEGF, EGF, PDGF, IGF).
- Hormonas (insulina).
- Elementos de la respuesta inmune (TNF- α , IL-6, IL-1 β).
- Otros (ácidos grasos libres, glucosa, LDLox) (Touyz R., 2004a y 2004b; Montezano *et al.*, 2010; Schramm *et al.*, 2012; Guzik *et al.*, 2007; Hoch *et al.*, 2009).

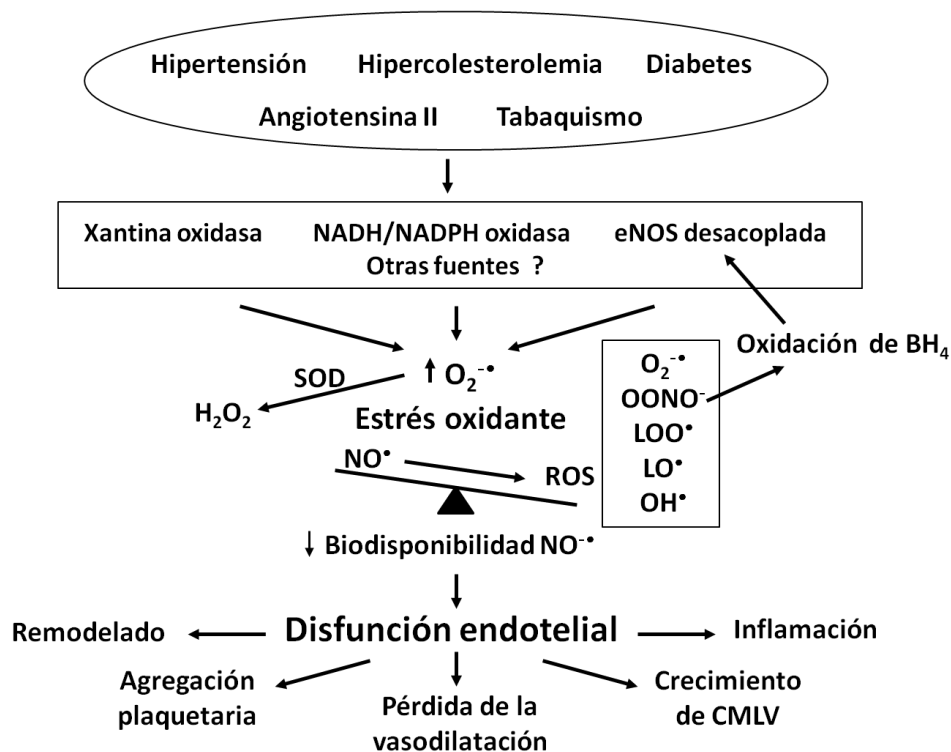


Figura 3. El estrés oxidante induce disfunción endotelial. Diversos factores y condiciones incrementan la producción de ROS, los cuales superan a los mecanismos antioxidantes de las células, lo que promueve el remodelado vascular, la agregación plaquetaria, la pérdida del tono vascular, la inflamación y la proliferación de las células del músculo liso vascular, es decir, promueve el desarrollo de la disfunción endotelial. Tomada de Cai y Harrison, 2000).

Las células endoteliales sanas metabolizan el oxígeno y generan ROS potencialmente nocivos, pero la tasa de formación de agentes oxidantes está equilibrada con la tasa de su eliminación (Wattanapitayakul *et al.*, 2000; Touyz R. 2004b). Ese potencial antioxidante de las células se debe a la actividad de las enzimas: Superóxido Dismutasa (SOD) responsable de dismutar al $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , la Catalasa, que transforma al $O_2^{\bullet-}$ en H_2O y O_2 , y la Glutación Peroxidasa, que cataliza la reacción para convertir al H_2O_2 en H_2O (Touyz R., 2004b; Schramm *et al.*, 2012). Sin embargo, el desequilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes (Figura 3), dan origen al estrés oxidante.

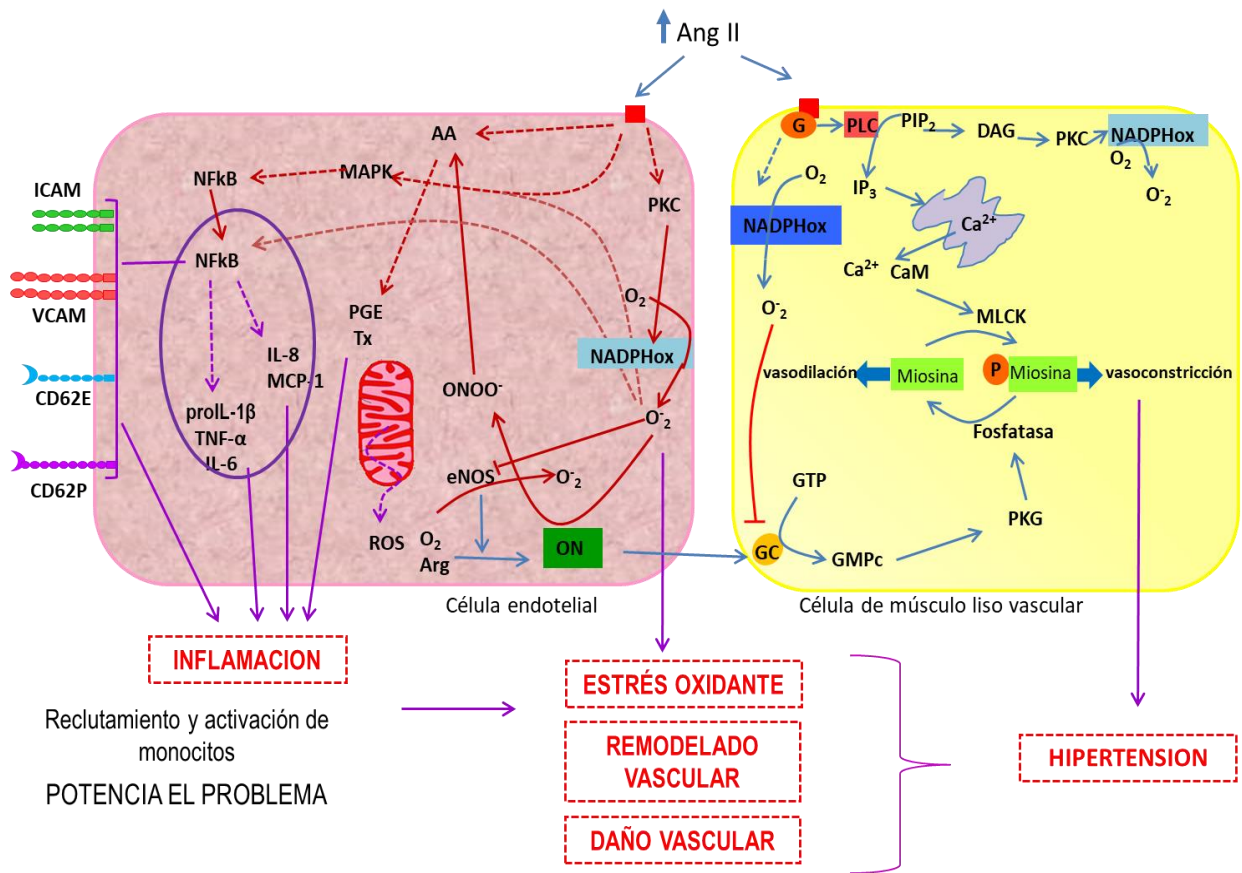


Figura 4. Efecto de la Ang II sobre las células endoteliales y CMLV. Las flechas verdes indican los mecanismos de vasoconstricción y vasodilatación inducidos por la Ang II para regular la presión arterial. Las flechas azules indican las señales promovidas por la Ang II en un estado de hipertensión.

Como ya se mencionó, la Ang II tiene un efecto prooxidante, que se debe a que una vez que se une al receptor AT1R en las células endoteliales y CMLV, estimula a la fosfolipasa C y D (PLC y PLD), las cuales producen DAG e IP₃. Estos mediadores activan a la Proteína Cinasa Activada por Calcio (PKC) que puede fosforilar a la subunidad p47phox de la NADH oxidasa y activarla. Por consecuencia, se incrementa la generación de ROS (O₂[•] y H₂O₂) que, al superar a los mecanismos antioxidantes propios de la célula, generan estrés oxidante (Lyle & Griendling, 2006; Schramm *et al.*, 2012). El O₂[•] por un lado, secuestra al ON y genera peroxinitrito, y por otro desacopla a la eNOS, teniendo como consecuencia la pérdida del tono vascular con lo que se favorece el estado vasoconstrictor, que conducirá a la hipertensión (Figura 4) (Wattanapitayakul *et al.*, 2000; Cai y Harrison *et al.*, 2000; Marchesi *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2011; Hoch *et al.*, 2009; Schramm *et al.*, 2012; Cai H., 2002; Touyz, 2004; Guzik *et al.*, 2007; Mollnau *et al.*, 2002). Por otro lado, el estrés oxidante puede contribuir al efecto proinflamatorio, a través de la activación del NF-κB (Gloire *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Hoch *et al.*, 2009; Guzik *et al.*, 2007; Marchesi *et al.*, 2009).

1.2.1.2. Inflamación y NF-κB.

La familia del Factor de Transcripción NF-κB está representada por cinco miembros: p50, p65 (RelA), c-Rel, p52 y RelB, que forman homo- o heterodímeros, siendo la forma más común de respuesta a stress la de p50/p65. En células en reposo, éstos factores de transcripción se encuentran secuestrados en el citoplasma en una forma inactiva, ya que se encuentran asociados con el Inhibidor de NF-κB (IκB) (Douillette *et al.*, 2006; Hoesel *et al.*, 2013). Cuando la Ang II se une al AT1R en las células endoteliales, promueve la señalización de las Proteín Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPKs) que conducen a la activación de la Cinasa del Inhibidor de NF-κB (IKK) que fosforila a IκB, que en esa condición libera al dímero del NF-κB y este transloca al núcleo (Urso *et al.*, 2011).

Otra forma de activar al NF-κB es a través de los ROS, ya que este factor de transcripción es sensible al estado redox (oxido-reducción) y los ROS lo pueden

regular a través de la formación de enlaces disulfuro en los dominios de unión al ADN. Además, el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 pueden oxidar los residuos de cisteína de los sitios activos para fosfatasas (se inactivan) y cinasas (se activan), como las Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK), serina-treonina cinasas y Proteín Cinasas Activadas por Estrés (SAPK), que promueven la remoción del I κ B del NF- κ B (Irani *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2011; Tabet *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2012; Hoesel *et al.*, 2013; Indra *et al.*, 2013; Pueyo *et al.*, 2000). Una vez que NF- κ B transloca al núcleo se une a la secuencia promotora de una variedad de genes, que en general dirigen la expresión de moléculas de adhesión como E- y P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, así como la producción de quimiocinas (CCL8, CCL2), citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6), proteína C reactiva y Ciclooxigenanasa 2 (COX-2) (Figura 5). Este ambiente induce el reclutamiento y activación de monocitos los cuales extravasan hacia la capa íntima y media del vaso y liberan moléculas efectoras, promoviendo el efecto prooxidante y el proinflamatorio que lleva al daño tisular (Hoch *et al.*, 2009; Lanz *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2011; Guzik *et al.*, 2007; Touyz R., 2004; Marchesi *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011).

En el riñón se induce el reclutamiento de más linfocitos T_H17 y neutrófilos por las células mesangiales favoreciendo así la disfunción vascular y renal (Harrison *et al.*, 2011), lo que lleva a la proliferación mesangial, glomerulonefritis, hipertrofia y esclerosis glomerular y túbulointersticial (Paust *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2012).

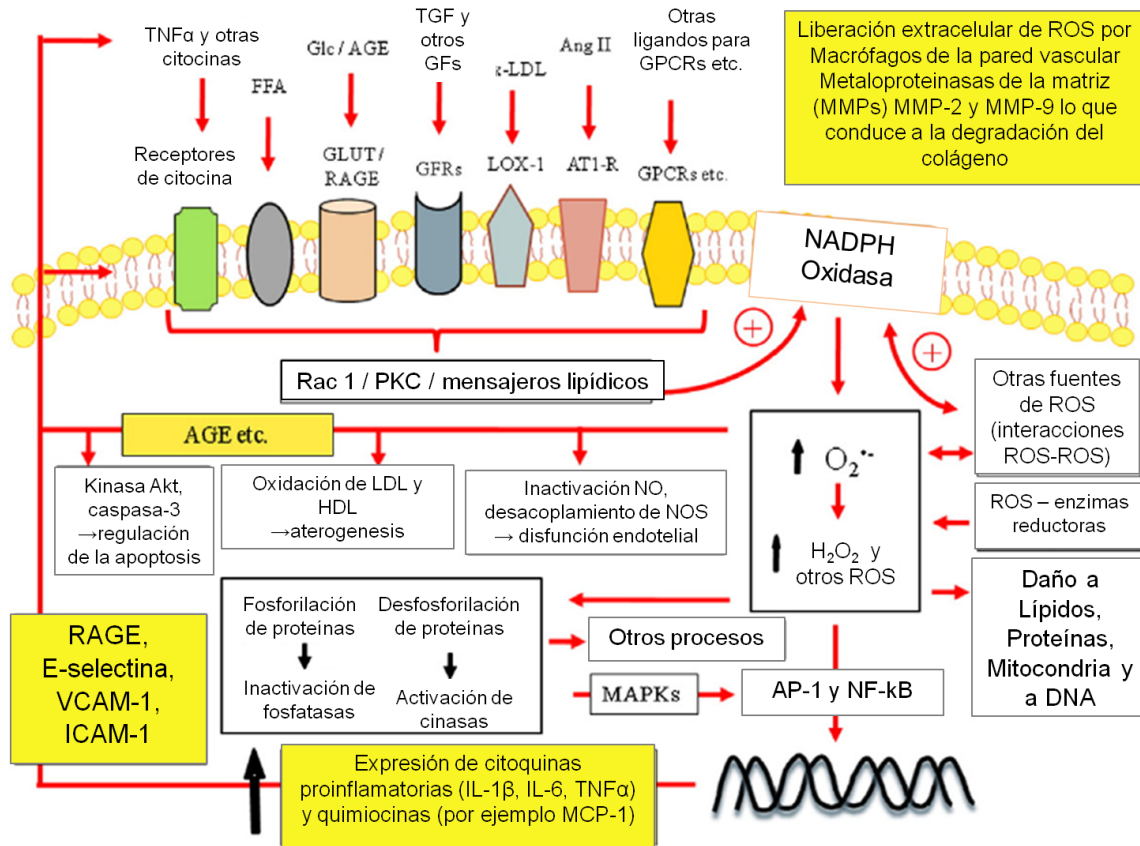


Figura 5. Vías de señalización en la activación del NF-κB. La activación de los receptores para factores de crecimiento (GFRs), LDL oxidadas (LOX-1), Angiotensina (AT1R) y otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores para citocinas y otros receptores que dirigen a la activación de Rac-1, Protein cinasa C (PKC) y/o producción de mensajeros lipídicos, inducen la activación de la NADPH oxidasa. Los ROS producidos modifican la fosforilación de proteínas, la expresión de genes sensibles al estado redox, inducen daño, median el crecimiento, proliferación, migración y numerosos procesos. MAPKs—proteínas cinasas activadas por mitógenos; AP-1 – Proteína Activadora-1; NF-κB – Factor nuclear-κB; (R)AGE – (receptor de) productos finales de la glicación avanzada. Modificada de Schramm *et al.*, 2012.

1.2.1.3. Remodelado vascular

Durante un estado inflamatorio, en la pared de los vasos sanguíneos se producen cambios morfológicos como consecuencia de estímulos nocivos que inducen la reorganización de las estructuras vasculares, tanto celulares como de matriz extracelular (MEC), este proceso es conocido como remodelado vascular arterial y es el principal responsable del estrechamiento de la luz vascular (Renna N., 2013).

El remodelado vascular de las arterias grandes, pero especialmente las de la microvasculatura, contribuyen de manera importante al desarrollo de la hipertensión. Los cambios se basan en dos aspectos: (1) remodelación eutrófica hacia el interior, en la que el diámetro externo y el lumen disminuyen, la relación entre capa media/lumen aumenta, y el área de la sección transversal de la capa media permanece inalterada; y (2) remodelación hipertrófica, en la que la capa media se engrosa e invade el lumen, lo que da como resultado un aumento en el área de la sección transversal de la capa media y la relación media/lumen (Intengan y Schiffrin, 2001).

Se ha reportado que la Ang II promueve el remodelado vascular a través de la unión al AT1R de la célula endotelial, esa unión estimula la producción de metaloproteinasas (MMP) y la activación del receptor para el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) aunado a la producción de Factores de Crecimiento, como el Epidérmico (EGF), el Derivado de Plaquetas (PDGF) y el Semejante a la Insulina (IGF), los cuales promueven la proliferación de las CMLV promoviendo el engrosamiento de la pared vascular y el remodelado vascular, lo cual contribuye a la hipertensión (Touyz; 2005; Nakai *et al.*, 2013; Gorman *et al.*, 2014; Intengan and Schiffrin, 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tratamientos farmacológicos

En la actualidad no existe un tratamiento dirigido al control de la disfunción endotelial, pero si existen tratamientos para el control de cada uno de sus componentes (Radenković *et al.*, 2013). Entre estos medicamentos están los antihipertensivos, antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticos/ anticoagulantes. Dentro de los antihipertensivos están los inhibidores de la ECA (captopril, enalapril y fosinopril) y los antagonistas del AT1R, los ARA-II (candesartán, telmisartán, valsartán, losartán, etc) (Davignon y Gnaz, 2004; Nadar *et al.*, 2004). Pese a que estos tratamientos logran mejorar en parte la función del endotelio, no lo llevan a las condiciones normales incluso cuando se administran

de manera conjunta, además producen efectos secundarios adversos como: náuseas, mareos, cansancio, dolor estomacal, muscular o en articulaciones, gastritis, pérdida del apetito, pérdida de la memoria, cefalea, convulsiones, moretones, sarpullido, ampollas en la piel, problemas visuales, dificultad para respirar, entre otros. Dentro de los antiinflamatorios está el etanercept (un antagonista de TNF- α) y el infliximab que es un anticuerpo monoclonal que induce la apoptosis de linfocitos que se encuentran anormalmente activados y regula la presión arterial. Por lo anterior es importante generar nuevos tratamientos para la terapéutica integral de la disfunción endotelial (Schiffrin y Touyz, 2003; Silva *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2003; Venegas-Pont *et al.*, 2010; Filho *et al.*, 2013; Palloshi *et al.*, 2004).

2.2 Tratamientos alternos

En la medicina tradicional se han utilizado diferentes extractos de plantas para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Los efectos benéficos de estos productos naturales han sido atribuidos, en parte, a sus efectos directos sobre los vasos sanguíneos y en particular sobre las células endoteliales, restaurando sus funciones (Duarte *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 1997). Entre los desórdenes que este tipo de extractos ayudan a controlar figuran la hipertensión, el estrés oxidante, la inflamación y el remodelado vascular, todos ellos característicos de la disfunción endotelial. Entre los diversos compuestos activos de los extractos se encuentran los polifenoles, polisacáridos y aminoácidos (Hendra *et al.*, 2011).

2.2.1. Flavonoides, polisacáridos y aminoácidos

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Hendra *et al.*, 2011). Se ha reportado que los flavonoides como la Vitexina (Figura 6A), Isovitexina (Figura 6B), Orientina (Figura 6C), isoorientina (Figura 6D), Quercetina (Figura 6E), Kaempferol (Figura 6F) entre otros, tienen la capacidad de reducir la expresión de la NADH oxidasa, citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y de inhibir la endotelina 1 y la COX-2. Además, pueden reducir el estrés oxidante e incrementar la expresión de la eNOS,

es decir, contrarrestar la disfunción endotelial (Balasuriya *et al.*, 2011; Olszanecki *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2014; Jiwajinda *et al.*, 2002; Lombardo *et al.*, 2014; Machha *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2013).

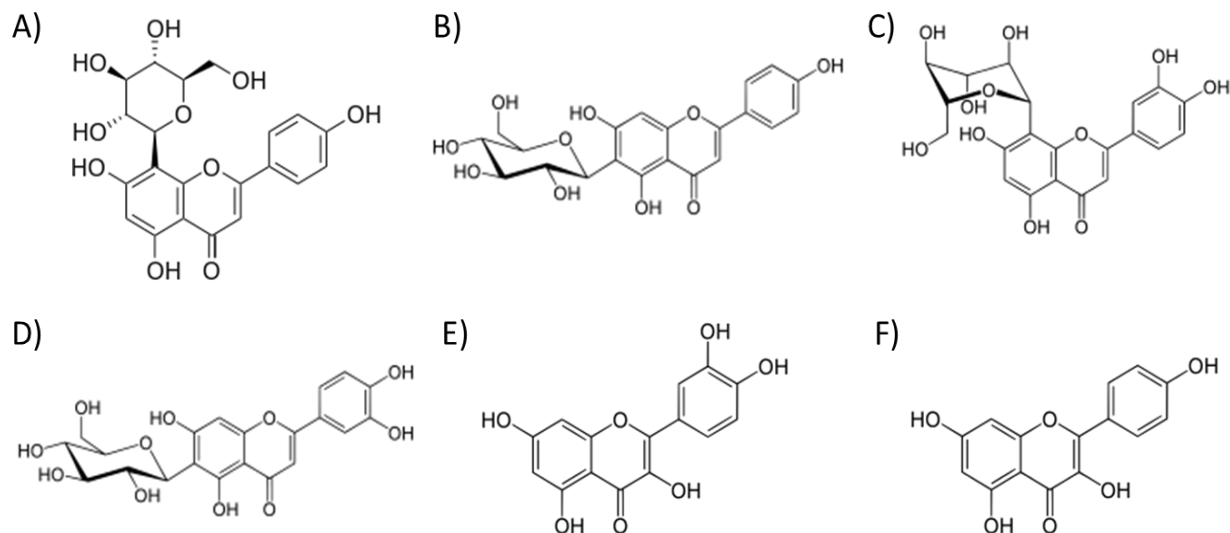


Figura 6. Estructuras químicas de algunos flavonoides. A) Vitexina, B) Isovitexina, C) Orientina, D) Isoorientina, E) Quercetina y F) Kaempferol.

Por otro lado, los polisacáridos también han presentado efectos sobre la disfunción endotelial y la hipertensión (Lee *et al.*, 2013). Xie en el 2004 reportó que los polisacáridos del extracto de la baya del ginseng americana tienen propiedades anti-hiperglucemiantes, mientras que los del hongo *Pleurotus nebrodensis* mostraron efecto anti-hipertensivo al inhibir la vía de la conversión de la angiotensina (Miyazawa *et al.*, 2008) y los de *Lycium Barbarum* contrarrestan la hipertensión ocular aguda además de tener un efecto neuroprotector (Mi *et al.*, 2013).

Por otro lado, los aminoácidos también podrían ser los responsables de los efectos para contrarrestar la disfunción endotelial, ya que se ha reportado que los aminoácidos de *Panax ginseng* presentan actividad antioxidante (Kuo *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2008), y los de las flores de *Camellia sinensis* podrían influir en los efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes reportados para la planta (Wang *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que la glicina (Figura 7A) tiene la capacidad de

disminuir la producción de ROS y la activación de la cinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1), IKK y la del factor de transcripción CHOP que participa en el estrés de retículo endoplasmático. Además, disminuye la producción de TNF α , MCP-1, CD68, el infiltrado celular y la activación de las células Kupffer. Mientras que incrementa la cantidad de glutatión sintetasa, SOD y eNOS, así como también promueve la vasodilatación y disminuye la hipertensión arterial (Zhou.*et al.*, 2016; Ruiz-Ramírez A *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2008; El Hafidi *et al.*, 2004). Por otro lado, la arginina (Figura 7B) se ha reportado que disminuye la expresión de la caspasa 3 y 9, TNF α , IL-1 β , IL-8, ROS y la activación de la subunidad p65 del NF- κ B, además de que incrementa la SOD, la catalasa y los niveles de ON (Wang *et al.*, 2015; Coronel I *et al.*, 2010; Dhawan *et al.*, 2005; Carlström *et al.*, 2013). Además, los aminoácidos de cadena ramificada, es decir, la leucina (Figura 7C), isoleucina (Figura 7D) y la valina (Figura 7E), han demostrado disminuir los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-8, MMP-9 y ROS y también disminuye la activación de NF- κ B; mientras que promueven la expresión de I κ B, IL-10 y TGF β (Feng *et al.*, 2017; Mi *et al.*, 2015).

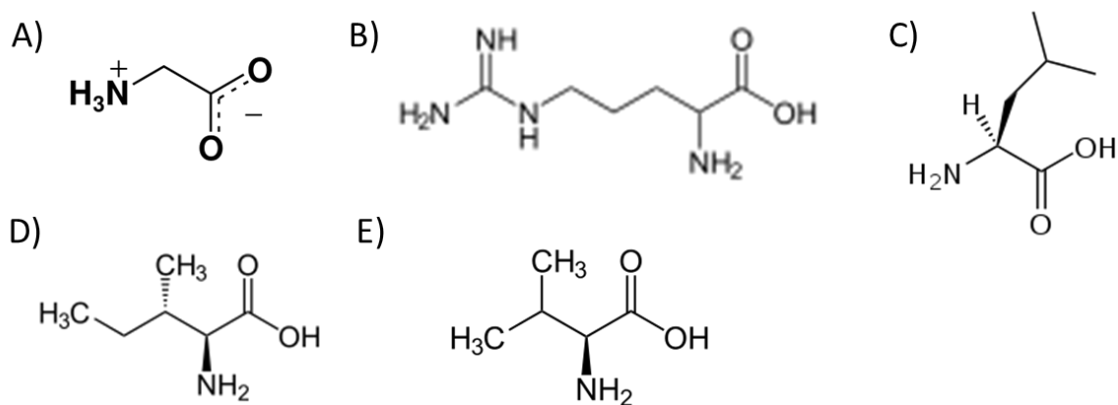


Figura 7. Estructuras químicas de algunos aminoácidos. A) Glicina, B) Arginina, C) Leucina, D) Isoleucina y E) Valina.

2.3 *Cucumis sativus*

Cucumis sativus (pepino) es una planta perteneciente a la familia Cucurbitaceae, la cual comprende especies que poseen propiedades con potencial terapéutico. Su clasificación es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Cucurbitaceae

Género: *Cucumis* L., 1753

Especie: *Cucumis sativus* L., 1753

Se ha reportado que *C. sativus* presenta actividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, anti-inflamatorias, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y diuréticas (Mukherjee *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Salahuddin y Jalalpure; 2010). El extracto acuoso de *C. sativus* tiene efectos antioxidantes y analgésicos a la concentración de 500 mg/ml y 500 mg/kg, respectivamente. Esos efectos fueron similares a los del ácido ascórbico como captador de radicales libres y como los del diclofenaco de sodio como analgésico, y posiblemente esas propiedades sean debidas a la presencia de flavonoides y taninos (Kumar *et al.* 2010). También el extracto metanólico y la isovitexina aislada de las hojas de pepino, han reportado tener actividad antioxidante (Pedras *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2009)

En nuestro grupo de investigación se ha evaluado el efecto de la fracción acuosa y acetoetílica de *C. sativus* sobre la presión arterial, estado inflamatorio y daño renal, en un modelo murino de hipertensión. A ratones C57Bl/6J se les indujo hipertensión a través de la administración crónica de Ang II durante 8 semanas, posteriormente se les dio tratamiento con los extractos durante 8 semanas más en paralelo a la continua administración de Ang II. Al final de los tratamientos se obtuvieron los riñones para determinar los niveles de citocinas e ICAM-1, y riñones

e hígado para evaluar daño orgánico. Con base en los resultados obtenidos se observó que los extractos normalizaron la presión tanto sistólica como diastólica. Particularmente, la fracción acuosa incrementó las concentraciones de la citocina reguladora IL-10 en riñón. Por otro lado, ambas fracciones redujeron la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, aunque la fracción acuosa lo hizo de manera más evidente. También en riñón, esa misma fracción fue capaz de revertir el daño mesangial, disminuyó el edema y el infiltrado leucocitario (Núñez O., 2013). Además, en evaluaciones *in vitro*, en las que se cultivaron esplenocitos en un ambiente inductor de células T_H17, ambas fracciones tuvieron la capacidad de inducir a los linfocitos a un fenotipo CD4⁺Foxp3⁺ (Méndez M., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La disfunción endotelial se caracteriza por tener deterioro en la vasodilatación y presentar un perfil de remodelado vascular, prooxidante y proinflamatorio, siendo estos últimos los principales inductores de la fisiopatología que la componen.

La disfunción endotelial es un problema importante a nivel mundial, ya que se asocia con el desarrollo de varias enfermedades de gran impacto en los índices de mortalidad, como lo son la aterosclerosis, hipertensión, diabetes, infarto de miocardio, enfermedad cerebrovascular e insuficiencia renal crónica. Por ello, el desarrollo de tratamientos enfocados al control de la disfunción endotelial está emergiendo como la llave de terapias que pueden interferir en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares.

Aunque existen múltiples tratamientos farmacológicos que pueden ayudar en el control de las alteraciones de la disfunción endotelial, no las abarcan de manera integral. Para hacerlo se recurre a la prescripción de varios fármacos a la par, lo que resulta en un incremento en la gama de los efectos secundarios que pueden provocar. Por lo que se requiere del desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos enfocados al control integral de las patologías asociadas a la disfunción endotelial. Tratamientos alternos con estas características son los extractos y fracciones de plantas, los cuales han demostrado tener propiedades

para regular el tono vascular, el estrés oxidante y la inflamación (Kuo *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Estudios previos en nuestro grupo de investigación han mostrado que la fracción acuosa de *Cucumis sativus* tiene la capacidad de regular la presión arterial, los niveles de la molécula de adhesión ICAM-1 y revertir el daño en riñón de ratones hipertensos (Núñez O., 2013). Además, en evaluaciones *in vitro*, esa fracción indujo a los esplenocitos hacia un fenotipo CD4⁺Foxp3⁺ pese a que el ambiente era proinflamatorio (Méndez M., 2014). Por lo que la fracción acuosa de *C. sativus* se coloca como candidato para el desarrollo de un fito-medicamento para el control integral de la disfunción endotelial. Motivo por el cual surge la pregunta de investigación del presente trabajo: ¿Las subfracciones F1, F2 y F3 de la fracción acuosa de *C. sativus* y su combinación controlan la disfunción endotelial?

4. HIPOTESIS

Las subfracciones F1, F2, F3 de la fracción acuosa de *C. sativus* (pepino) y su combinación controlan la disfunción endotelial.

5. OBJETIVO

Evaluar las subfracciones F1, F2 y F3 de la fracción acuosa de *C. sativus* y su combinación para el control de la disfunción endotelial inducida por angiotensina II.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar *in vitro* las subfracciones efectivas de la fracción acuosa de *C. sativus* (AQ-Cs) capaces de controlar el estado proinflamatorio inducido por angiotensina II.
- Identificar *in vitro* la mejor combinación de las fracciones efectivas de AQ-Cs capaces de controlar el estado proinflamatorio.
- Evaluar *in vitro* la capacidad de la mejor combinación para regular la disponibilidad del ON.
- Evaluar *in vitro* la capacidad de la mejor combinación para controlar el estrés oxidante.

- Determinar los posibles compuestos responsables del efecto de las subfracciones.
- Evaluar el efecto de la mejor combinación sobre la disfunción endotelial *in vivo*.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1. Obtención de las subfracciones de *Cucumis sativus*.

Las partes aéreas de *Cucumis sativus*, incluidas las frutas, se recolectaron de un cultivo comestible libre de pesticidas y fertilizantes en Xochitepec, México, en el periodo de julio a agosto del 2013. El material vegetal se mantuvo alejado de la luz a temperatura ambiente y se secó en un horno a 50 °C durante 36 h. El material vegetal seco se molió en un molino eléctrico (Pulvex) hasta que se obtuvieron partículas menores de 4 mm. Se realizó un exhaustivo proceso de maceración con etanol / agua (60:40 v / v) a temperatura ambiente para obtener el extracto hidroalcohólico. Este extracto se concentró por destilación a presión reducida a temperatura controlada y luego se liofilizó. Una muestra de este extracto (50 g) se sometió a bipartición con acetato de etilo / agua, obteniéndose 35 g de la fracción acuosa (AQ-Cs).

Con la intención de obtener las diferentes subfracciones a evaluar, 35 gramos de la fracción acuosa se suspendieron en metanol (700 ml) durante 24 h; la fase líquida se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio (Laborota 4000, Heidolph, Schwabach, Alemania), produciendo la subfracción SF1, que se secó mediante liofilización. Por otro lado, la fase orgánica se suspendió en acetona (700 ml), produciendo las subfracciones SF2 (fase soluble) de coloración verde y SF3 (precipitado), de tonalidad amarilla, que finalmente se concentraron a presión reducida y se liofilizaron.

7.2. Cultivo celular

Las células endoteliales microvasculares humanas-1 (HMEC-1) fueron proporcionadas por la Dra. Aida Castillo del Departamento de Fisiología, Biofísica

y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México. Las células se cultivaron en medio MCDB-131 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, L-glutamina 10 mM, 100 U / ml de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), 10 ng / ml de factor de crecimiento endotelial y 1 µg / ml de hidrocortisona (Sigma) a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5%). Todos los experimentos se realizaron usando los pases 3 a 8.

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se lavaron dos veces con PBS (140 mM de NaCl, 2 mM de KCl y 1.15 mM de K₂HPO₄) frío, y se desprendieron con 1 ml de Tripsina 5% - Verseno 5% incubándolas a 37°C con 5% CO₂ por 5 min. Para detener la reacción de la tripsina se agregaron 10 ml de medio MCDB 131 sin suplementar, la suspensión celular se pasó a un tubo estéril y se centrifugó a 377 × g, a 4°C durante 8 minutos. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en medio completo y se evaluó su viabilidad celular con azul tripano 1:10.

Las células se cultivaron en placas de 24 pozos a una densidad de 5x10⁵ células / pozo en 500 µl de medio suplementado con Ang II a diferentes concentraciones (0, 8, 40, 200, 1000, o 5000 nM) y 0.08 o 10 µg / mL de SF1, SF2 o SF3, durante 12 h para evaluar el efecto antiinflamatorio o durante 6 h para evaluar el perfil antioxidante de las subfracciones. Como control, las células HMEC-1 se trataron con 10 µM de Losartán (Yamamoto *et al.*, 2015) en lugar de las subfracciones. En algunos experimentos, las subfracciones SF1 y SF3 se combinaron a una concentración de 0,08 µg / ml cada una (C1), SF1 0,08 µg / ml y SF3 10 µg / ml (C2), SF1 10 µg / ml y SF3 0,08 µg / ml (C3) y SF1 y SF3 (10 µg / ml cada uno) (C4). Para la determinación de ROS y ON, las células se estimularon con Ang II 5000 nM durante 6h.

7.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Uno de los marcadores de disfunción endotelial es la producción de IL6, por lo que se cuantificó su concentración en el medio del cultivo de las células HMEC-1 estimuladas con Ang II. Para ello se utilizó el Kit Human IL-6 BD OptEIA™,

siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Brevemente, el ELISA en sandwich se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano.

Las placas se sensibilizaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo de captura para IL-6. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (0.05%), se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-SFB 5% y se lavaron tres veces más. Las placas se incubaron por dos horas con los sobrenadantes del cultivo o con los estándares de la citocina a temperatura ambiente. Después se lavaron 5 veces y se incubaron con el anticuerpo de detección acoplado a la enzima HRP por 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron 7 lavados más con PBS-Tween 20, posteriormente se le agregó el sustrato TMB y se incubó durante 30 min en oscuridad.

Finalizada la incubación se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2N y se leyó la placa a una longitud de onda de 450 nm a 37 °C, con el equipo VersaMax (Molecular Device). La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford. Se determinaron las concentraciones de las citocinas empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una R²>0.98. Los resultados obtenidos se usaron para trazar curvas de concentración-respuesta y se determinó el efecto máximo (E_{max}) y las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) para cada subfracción.

7.4. Inmunocitoquímica

Con la intención de determinar si la C4 es capaz de evitar la expresión de moléculas de adhesión inducidas por Ang II, 3x10⁵ células/pozo se cultivaron en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina en placas de 24 pozos con las diferentes concentraciones de Ang II, losartán y C4. Al finalizar el cultivo, las células se lavaron 4 veces con PBS atemperado y se fijaron con acetona durante 15 min. Posteriormente se incubaron con H₂O₂ al 30% durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS frío, se bloquearon con una solución de PBS + BSA 0.1% + Tween 20 0.05% durante 10 minutos y se incubaron con los anticuerpos primarios para detectar E-selectina e ICAM-1 (eBioscience) (1:50 y 1:100, respectivamente) a 4°C toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron, se incubaron con PBS +

BSA 0.1% + Tween 20 0.05% durante 10 minutos, se volvieron a lavar y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG mouse-biotinilado (Santa Cruz) (1:500) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron y se incubaron con 200 µl de estreptoavidina peroxidasa (eBioscience) durante 30 minutos a 37°C. Se realizó un último lavado y se incubaron con el sustrato Diaminobenzidina (DB801R DAB, BioCare Medical) durante 5 minutos. Después se contratiñeron con Hematoxilina (HE) de Harris durante 45 segundos, la tinción se detuvo con agua. Posteriormente los cubreobjetos se pasaron a placas de porcelana y se pasaron por el tren de fijación consistiendo en alcohol al 70%, alcohol al 80%, alcohol al 90%, alcohol absoluto 1, alcohol absoluto 2, xilol 1 y xilol 2, durante 5 minutos en cada uno de los fijadores. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con resina sintética (Golden Bell), se dejaron secar y se tomaron las fotografías utilizando el microscopio Nikon ECLIPSE 80i y el software Metamorph software, v. 6.1.

7.5. Western Blot

Las células HMEC-1 se cultivaron con las mismas condiciones que se describieron en el punto anterior, posteriormente, se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis RIPA (Ensayo de radioinmunoprecipitación) (Tris 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 7,4; Triton X-100 0,5%; SDS (dodecilsulfato sódico) 0,1%, desoxicolato sódico 0,5%) , utilizando un cóctel de fosfatasas e inhibidores de la proteasas (fluoruro de sodio (NaF) 25 mM; pirofosfato de sodio (NaPP_i) 1 mM; vanadato de sodio (NaVPO₄) 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM; pepstatina A 0,1 mg / ml; leupeptina 0.1 mg / mL; antipaína 0.1 mg / mL; aprotinina 0.1 mg / mL) (Sigma) por 15 min. Los lisados se rasparon de las placas y se centrifugaron a 15,100 × g durante 10 min a 4 °C. Las proteínas en el sobrenadante se cuantificaron mediante el método de Lowry. Veinte microgramos de proteína se desnaturalizaron por ebullición durante 5 minutos en buffer, separados por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en geles de acrilamida al 10% y transferidos electrolíticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Merck) usando tampón de

transferencia (Tris 25 mM, pH 8,5, glicina 193 mM, metanol 20%). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en tampón de bloqueo TBS-T (solución salina tamponada con Tris que contiene Tween-20) al 0,1% con BSA 2%. Después de eso, las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpos anti-E-selectina, anti-ICAM-1 (Invitrogen) o anti- α -actina (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.), diluidos 1: 1000, 1:500 o 1: 3000, respectivamente, en tampón de bloqueo. Después de lavar tres veces durante 5 min con TBS-T, las transferencias se incubaron con anticuerpos de cabra anti-ratón (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) o anti-conejo (Abcam, Cambridge, RU), diluidos 1: 2500. La unión del anticuerpo se detectó con la solución SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Las bandas se analizaron usando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.) y la señal anti-actina se usó para la normalización de datos.

7.6. Cuantificación de ON

Se ha reportado que en la disfunción endotelial, las células endoteliales disminuyen la producción de óxido nítrico (ON), por lo que se considera como otro marcador de daño endotelial. Este compuesto tiene una vida media muy corta por lo que su detección es complicada, sin embargo, como la mayor parte del ON se encuentra en forma de nitrito y nitrato, podemos utilizar la concentración de estos aniones para cuantificar la producción indirecta de ON. Para ello, se utiliza la reacción de Griess, la cual convierte al nitrito en un cromóforo magenta cuya absorbancia se puede medir por espectrofotometría (Miranda *et al.*, 2001). Brevemente, en una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ l/pozo del medio recuperado del cultivo, 50 μ l/pozo de sulfanilamida 2% y 50 μ l/pozo de N-1-naftiletilendiamina 0.2%, la placa se incubó durante 30 min protegida de la luz a temperatura ambiente y finalmente se leyó a una longitud de onda de 540 nm a 37°C con el equipo VersaMax (Molecular Device). Se determinó la concentración de nitrito empleando la ecuación lineal obtenida a partir de la curva estándar, considerando como adecuado una $R^2 > 0.98$.

7.7. Cuantificación de ROS

La disfunción endotelial se caracteriza por tener un estado prooxidante originado por el incremento en la producción de ROS, como el ión superóxido. Una forma de medir la producción de $O_2^{\bullet-}$ es a través de la conversión de dihidroetidio (DHE) en etidio (Eth), ya que el DHE es oxidado por el $O_2^{\bullet-}$ para formar etidio, que se une al DNA y produce una coloración, la cual se puede leer en un espectrofotómetro (Sato *et al.*, 2005). Las células se cultivaron durante 6h con 500nM de Ang II, treinta minutos antes de finalizar el cultivo, las células se cultivaron con NADH (1 mM), Succinato (5 mM), L-arginina (1 mM) o Xantina (0.1 mM) y con los inhibidores DPI (Difenil idonium) (0.1 mM), Antimicina (0.05 mM), L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginina metil ester) (1 mM) y alopurinol (0.2 mM), los cuales son los inhibidores de la NADH oxidasa, complejo II de la mitocondria, eNOS y xantina oxidasa. Quince minutos antes de finalizar el cultivo, a las células se les incubó con 20 μ M de DHE, posteriormente se les realizó 3 lavados con PBS atemperado, se les colocó medio fresco y se analizaron en el lector de placas multimodal con microscopio CYTATION 5 utilizando el software Gen 5 (Biotek Instruments) a 20X. Finalmente la intensidad del DHE se cuantificó con el software Metamorph v. 6.1.

7.8. Cromatografía en Capa Fina

Con la intención de conocer el perfil químico de las fracciones obtenidas del extracto acuoso, se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF) tanto de fase normal como de fase reversa. Para ambas, se utilizó una fase estacionaria recubierta por sílica gel (Cromatofolio de sílica gel 60 F₂₄₅, Merck), a la que se le marcaron los puntos de aplicación de la muestra con un espacio de 0.5 cm en el borde inferior. Posteriormente se colocó la muestra y los estándares comerciales para flavonoides o aminoácidos; para flavonoides se utilizó rutina un estándar comercial de flavonoides, para polisacáridos la glucosa y para aminoácidos la glicina, alanina, serina, valina, leucina, asparagina, ácido aspártico, lisina, ácido glutámico y arginina. La placa con las muestras se colocó en una parrilla con la intención de eliminar el disolvente y se colocó en una cámara cromatográfica la cual ya contenía la fase móvil. Para la fase normal se utilizaron diversos sistemas

de diferente polaridad (ver Anexo 1), entre ellos Diclorometano:metanol (7:3 v/v), acetato de etilo:metanol:agua:ácido acético glacial (7:2:2:0.5 v/v) y n-butanol:acetona:ácido acético glacial:agua (35:35:10:20 y 70:70:20:10 v/v), mientras que para la fase reversa se utilizó un sistema de agua:acetonitrilo (7:3 v/v). Las placas se retiraron de cada sistema cuando alcanzaron el 90% de elución de manera que quedara un espacio de 0.5 cm entre el límite de la corrida y el final superior. Las placas se acomodaron en la parrilla para eliminar el solvente y se observaron bajo luz UV. Posteriormente a las placas se les aplicaron los reveladores Naftol (Sigma), Ninhidrina (Merck), 4-hidroxibenzaldehído (Merck) o difenilborato de aminoetanol (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las placas para la determinación de polisacáridos se revelaron con Naftol, el revelador de aminoácidos fue Ninhidrina y finalmente los reveladores de flavonoides fueron el 4-hidroxibenzaldehído y el difenilborato de aminoetanol. Una vez reveladas las placas fueron secadas en la parrilla, se observaron los patrones de manchas bajo luz UV y luz visible, y se compararon entre fracciones.

7.9. Espectrometría de masas

Para corroborar la estructura química de los compuestos responsables de las actividades biológicas de SF1 y SF3, se realizó un análisis de espectrometría de masas. Para ello, se diluyó una muestra de 500 µg en metanol-ácido trifluoroacético al 0.05% hasta una concentración final de 50 µg/mL. Las muestras comerciales de glicina, alanina, serina, valina, leucina, asparagina, ácido aspártico, lisina, ácido glutámico y arginina (Sigma) diluidos a la misma concentración fueron usadas como estándares. Todas las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TQD (Waters, Milford, MA, EE. UU.), acoplado a un cromatógrafo de líquidos Acquity (Waters) a través de una fuente combinada de electronebulización APCI Z-spray. Todas las muestras se analizaron en modos de iones positivos y negativos. Finalmente, los aminoácidos se identificaron en las muestras por comparación de espectros de masas con los estándares.

7.10. Animales de experimentación

Se usaron ratones machos C57BL/6J (8-10 semanas de edad) obtenidos de nuestras instalaciones de animales. Cuatro grupos de 20 ratones cada uno fueron alojados y mantenidos en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Morelos (FM-UAEM), a temperatura constante (21-23 °C) y humedad (45 -50%), con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. Todos los protocolos de animales siguieron las normas de la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y fueron revisados y aprobados por el Comité Ético para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo Número de aceptación: 008/2016) en FM-UAEM.

7.11. Inducción de la disfunción endotelial y grupos experimentales

Los ratones se agruparon de acuerdo al tratamiento que recibieron, tal y como se muestra en el cuadro 1. Los ratones del grupo control se trataron solo con solución salina. A los tres grupos restantes se les indujo la disfunción endotelial, a través de la administración I.P. de 0.1 µg/kg de Ang II/día durante 10 semanas, que es el tiempo reportado por Lombardo (2008) para el desarrollo de un estado de disfunción endotelial e hipertensión. A las 10 semanas, los ratones que entraron en los límites de inclusión, es decir, que incrementaron $\geq 15\%$ de su presión arterial basal, fueron considerados para la segunda fase experimental. En esta fase los ratones con Ang II se dividieron en 3 grupos: el que recibió solo Ang II y los que recibieron tratamiento vía oral con losartán (10 mg/kg) y C4 (19 mg/kg de SF1 y 6.7 mg/kg SF3) (ambos diluidos en agua), aunada a la administración de Ang II, durante 10 semanas más.

Cuadro 1. Grupos experimentales

GRUPO	CONTROL	Ang II	Ang II/Losartán [10mg/kg]	Ang II/C4 [19 mg/kg de SF1 y 6.7 mg/kg SF3]
n	25	25	25	25

Para calcular las dosis de SF1 y SF3, nos basamos en la dosis de la fracción acuosa evaluada con anterioridad, que mostró efectividad y los rendimientos obtenidos durante el fraccionamiento.

7.12 Medición de la presión arterial

Los ratones se anestesiaron con xilacina y se les midió la presión arterial a través de un anillo insuflador en la base de la cola del ratón con un transductor de pulso, como lo reportado por Lombardo (2008), Guzik (2007) y Barhoumi (2011). Brevemente, el anillo se infla aproximadamente a 300 mmHg, durante la insuflación del anillo detecta la presión sistólica, posteriormente la presión del anillo es liberada lentamente, durante la pérdida de presión se detecta la presión diastólica. Las presiones fueron registradas en un equipo de adquisición de datos LE5002 Biopac-Panlab-Letica. Con la intención de realizar cinéticas de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) sin causar efectos adversos a los ratones debido al anestésico (daño hepático, shock o hasta la muerte), estos parámetros se midieron cada 5 semanas durante las 20 semanas. Este monitoreo se realizó bajo las mismas condiciones de manipulación en un determinado intervalo de tiempo, es decir, las mediciones se realizaron entre las 11:00 y 15:00 horas. Esto con la finalidad de disminuir la variabilidad debida a la influencia del ciclo circadiano, ya que de manera normal los ratones incrementan su presión durante la noche (vigilia) y a partir de las 7:00 aproximadamente, comienza a descender alcanzando un “valle” a las 11:00 (sueño), el cual se ve interrumpido a las 17:00 cuando la presión comienza a ascender nuevamente (Marques *et al.*, 2011).

7.13 ELISA de extractos tisulares

Los ratones se anestesiaron, se sangraron a blanco y se perfundieron con PBS (140 mM de NaCl, 2 mM de KCl y 1.15 mM de K₂HPO₄) frío, se obtuvieron riñones y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. Para la realización de los extractos tisulares, el órgano se homogenizó en frío con PBS-PMSF (0.1%) en relación 1:10 a su peso, utilizando un politron. Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 377 × g durante 8 min a 4°C, los sobrenadantes se recuperaron y

se almacenaron a -80°C hasta su uso para las mediciones de las diferentes citocinas.

Para la cuantificación de citocinas por ELISA se utilizaron diferentes kits siguiendo las instrucciones descritas por los fabricantes. Los kits de mouse IL-6, IL-1 β , TNF- α , e IL-10 se adquirieron de OptEIA™ BD, y el kite de mouse TGF β se adquirió de Applied Biosystems. Los ELISA se realizaron como se mencionó en el punto 7. 3.

7.14 Histopatología

Después de obtener la última medición de presión, los ratones se anestesiaron y perfundieron con PBS frío. Los riñones, hígados y aortas fueron removidos. Los órganos se fijaron en formol buffer al 10%. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm , se transfirieron a portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma), antes de desparafinarse y rehidratarse. Para los estudios histopatológicos, los portaobjetos se tiñeron con la tinción de tricrómica de Masson, esta tinción permite la tinción selectiva del tejido conectivo de manera que tiñe de rosa el citoplasma, de purpura el núcleo y de azul las fibras (Goldner 1938). Posteriormente los portaobjetos se pasaron por el tren de fijación consistiendo en alcohol al 70%, alcohol al 80%, alcohol al 90%, alcohol absoluto 1, alcohol absoluto 2, xilol 1 y xilol 2, durante 5 minutos en cada uno de los fijadores. Finalmente, se colocaron a los portaobjetos se le colocaron los cubreobjetos con resina sintética (Golden Bell), se dejaron secar y se tomaron las fotografías utilizando el microscopio Nikon ECLIPSE 80i y se analizaron utilizando el software Metamorph, v. 6.1.

7.15 Perfil renal

La sangre obtenida al final de los ensayos se centrifugó a $350 \times g$ por 8 min a temperatura ambiente. Los plasmas se recuperaron y se utilizaron para las determinaciones del perfil renal: creatinina, urea y ácido úrico.

Para la determinación de creatinina, se colocaron 20 μl /pozo de muestra o estándar en placas de 96 pozos, se agregaron 200 μl del reactivo de color (mezcla

del reactivo A y B a volúmenes iguales). La placa se incubó a temperatura ambiente y se realizaron las lecturas a 510 nm a los 20 y 80 segundos, con el equipo VersaMax (Molecular Device). Posteriormente se hacen los cálculos correspondientes para obtener la concentración de creatinina utilizando las siguientes formulas:

$$\Delta\text{ABS} = \text{ABS } 80\text{s} - \text{ABS } 20\text{s}$$
$$(\Delta\text{ABS Muestras}/\Delta\text{ABS estándar}) \times 2 = \text{mg creatinina/dl}$$

Para la determinación de urea, se colocó 1 µl/pozo de muestra o estándar en placas de 96 pozos, se agregaron 100 µl del reactivo A y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron 100 µl del reactivo B, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se procedió a la lectura a 578nm. Se realizaron los cálculos correspondientes como lo indica el fabricante:

$$(\text{ABS Muestras}/\text{ABS estándar}) \times 40 = \text{mg urea enzimática/dl}$$

Para la determinación de ácido úrico, se colocaron 4 µl/pozo de muestra o estándar en placas de 96 pozos, se agregaron 200 µl del reactivo de color, se incubó a 37°C durante 10 minutos y se leyó a 546 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes como lo indica el fabricante utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{ABS Muestras}/\text{ABS estándar}) \times 5 = \text{mg ácido úrico/dl}$$

7.16 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron en el programa Excel y se expresaron en media \pm desviación estándar. La significancia de la diferencia entre las condiciones se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA). A los resultados se les realizó la prueba de Tukey, como prueba post-Hoc con un valor de significancia de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Las SF1 y SF3 controlan la producción de IL-6

Con la intención de evaluar la capacidad de las fracciones obtenidas del CsAQ para controlar la producción de IL-6 inducida por la Ang II, las células se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de Ang II (0, 8, 40, 200, 1000 y 5000 nM) y dos diferentes concentraciones de las fracciones (0.08 y 10 µg/ml) o con 50 µg/ml de Losartán (antagonista del AT1R) como control. Los resultados indican que las dos concentraciones de la SF1 y SF3 evitaron significativamente el incremento de IL-6 inducido por la Ang II, de manera tan eficiente como el losartán (Figura 6). En la Figura 8 se muestran las curvas Concentración-Respuesta de SF1, SF2 y SF3 sobre la producción de IL-6 inducida por el incremento en la concentración de Ang II. Es importante mencionar que la producción de IL6 es un parámetro que permite evaluar la inducción de la disfunción endotelial. Los resultados indican que las dos concentraciones de la SF1 y SF3 reducen la E_{max} con respecto a las células incubadas solo con Ang II ($E_{max}=29.9$), disminuyéndola a un 68.2% ($E_{max}=20.4$) y 64.1% ($E_{max}=19.2$) con 0.08 µg/ml de SF1 y SF3 (paneles A y C), respectivamente; y a un 71.4% ($E_{max}=21.3$) con 10µg/ml de SF1, alcanzando valores similares a las células tratadas con Losartán ($E_{max}=19.7$; 65.9%) (panel D), mientras que las células tratadas con 10µg/ml de SF3 tuvo una $E_{max}=17.4$ (58.1%) teniendo un mejor efecto que losartán. Con respecto a las CE_{50} , ambas concentraciones de la SF1 y SF3 tuvieron CE_{50} similares (4.3 y 2.7nM, y 3.5 y 4.9nM) al Losartán (5.8nM) lo cual indica que las subfracciones ejercieron sus efectos desde concentraciones bajas de Ang II como lo hizo el control. Por otro lado, la SF2 no logró controlar la producción de IL-6 con ninguna de las concentraciones evaluadas (panel B y E).

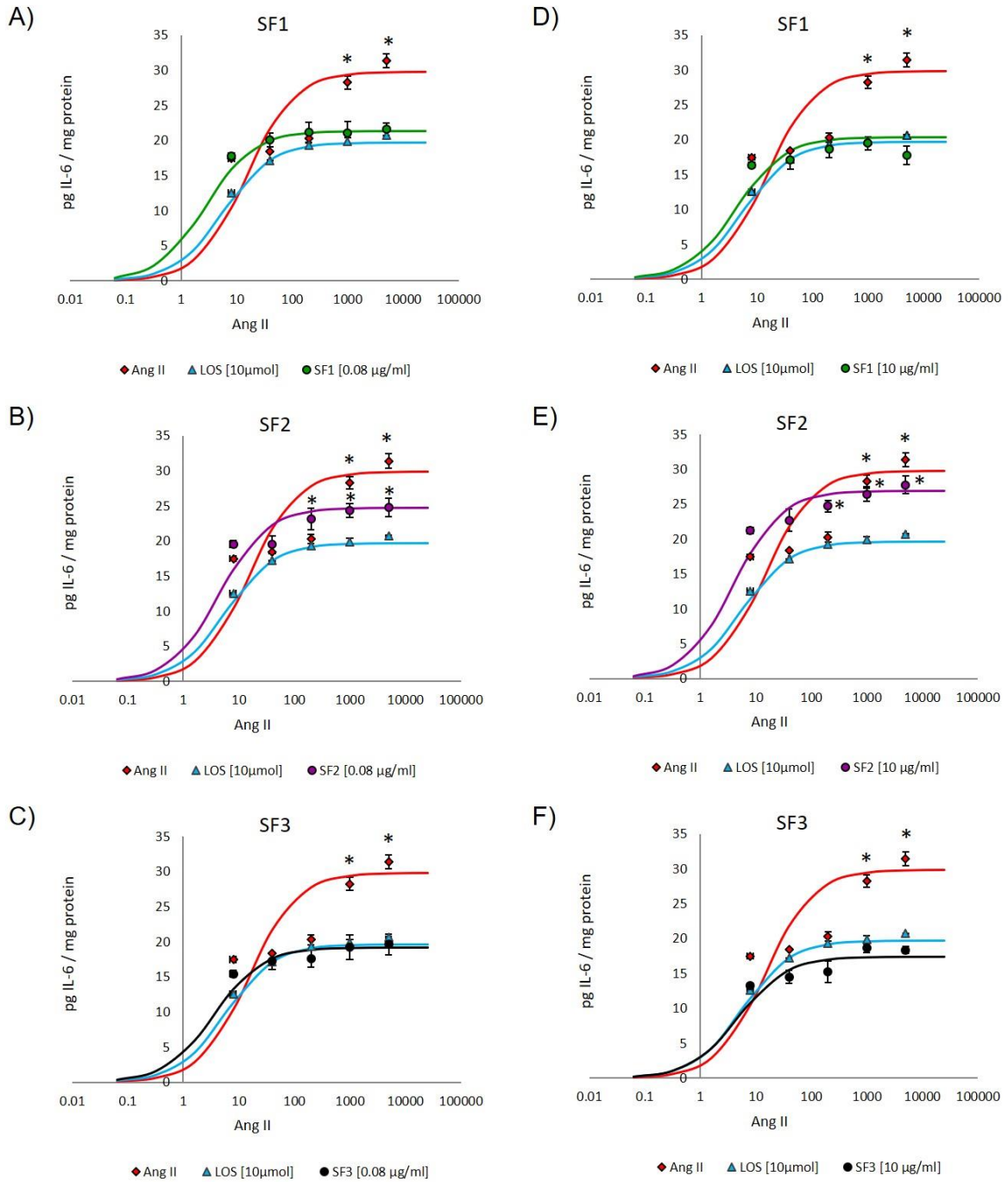


Figura 8. Curvas concentración-respuesta. Efecto de las subfracciones evaluadas sobre la producción de IL6 inducida por Ang II, 12 h después del tratamiento. (A-C) Efecto de 0,08 µg / ml de SF1 (subfracción 1), SF2 y SF3. (D -F) Efecto de 10 µg / ml de SF1, SF2 y SF3. Las células endoteliales microvasculares humanas-1 (HMEC-1) se co-cultivaron con las concentraciones de Ang II especificadas anteriormente. Losartán (LOS) se usó como un control positivo. Los datos se informaron como media \pm DS y se analizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey $n = 5$, * $p < 0,05$ vs control (sin Ang II).

8.2 La C4 es la mejor combinación para evitar la producción de IL-6

Con la intención de identificar *in vitro* la mejor combinación de las fracciones efectivas que logren controlar la disfunción endotelial, las células HMEC-1 se cultivaron con las diferentes concentraciones de Ang II y las 4 diferentes combinaciones resultantes de la SF1 y SF3. En la Figura 9, se observa que todas las combinaciones reducen la producción de IL-6 (E_{max} C1=10.3, C2=7.9, C3=8.9 y C4=7.2) con respecto a la condición control de Ang II (E_{max} =14.2), de esas 4 combinaciones la C1 y C3 fueron las menos efectivas ya que su E_{max} fue más alto que el del Losartán (8.3) (paneles A y C), mientras que la más efectiva fue C4, ya que tuvo un E_{max} (7.2) menor que el del Losartán, lo cual nos indica que fue mejor que uno de los tratamientos farmacológicos más utilizados para el control de la hipertensión, que es uno de los padecimientos debidos a la disfunción endotelial.

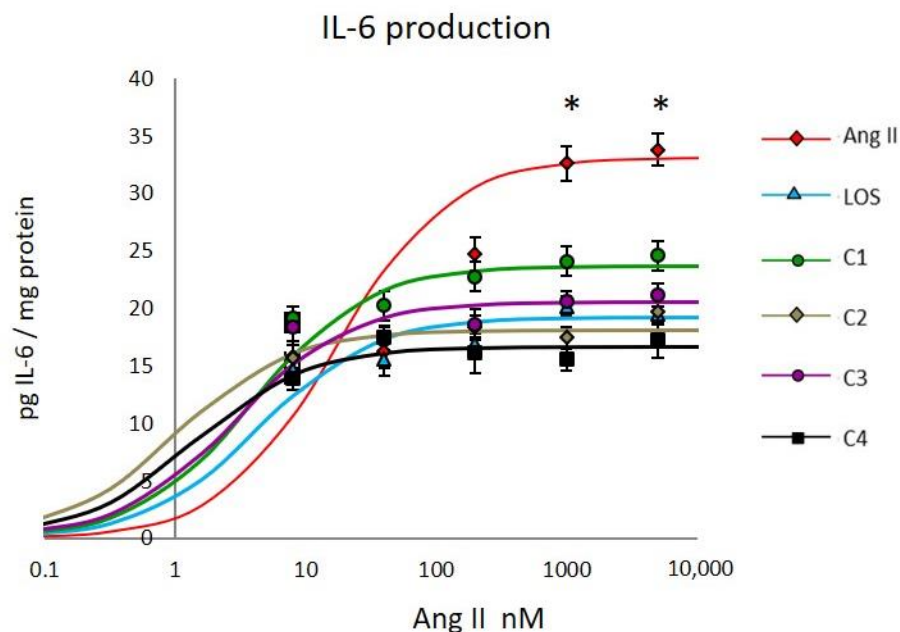


Figura 9. Curvas de concentración-respuesta de las combinaciones. Efecto de las combinaciones evaluadas en la producción de IL-6 inducida por Ang II, 12 h después del tratamiento. Losartán (LOS) se usó como control positivo. C1 = 0.08 μ g / mL de SF1 y 0.08 μ g / mL de SF3; C2 = 0.08 μ g / mL de SF1 y 10 μ g / mL de SF3; C3 = 10 μ g / mL de SF1 y 0.08 μ g / mL de SF3; C4 = 10 μ g / mL de SF1 y 10 μ g / mL de SF3. Los datos se informan como media \pm DS y se analizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. n = 5, * p <0,05 frente al control (sin Ang II).

8.3 La C4 evita la expresión de E-selectina e ICAM-1

Además de la producción de citocinas, otro parámetro de disfunción endotelial es la expresión de moléculas de adhesión, por lo que se evaluó la capacidad de la C4 para evitar la expresión de E-selectina e ICAM-1. Los resultados indican que a partir de 200 nM de Ang II las células HMEC-1 expresan E-selectina y su expresión se incrementa al aumentar la concentración de Ang II, lo cual concuerda con lo reportado por Pastore, quién indicó que 1000nM de Ang II induce la expresión de E-selectina en células endoteliales coronarias (Pastore *et al.*, 1999). También se ha reportado que esa misma concentración de Ang II promueve la expresión de ICAM-1 en células endoteliales de la vena de cordón umbilical (Grafe *et al.*, 1997) y en los resultados obtenidos se observa que a partir 1000nM de Ang II en las células HMEC-1 se expresa ICAM-1, además de que esta se incrementa al aumentar la concentración de Ang II. Esto indica que la expresión de ambas moléculas es dependiente de la concentración de Ang II (Figura 10 y 11). Otra molécula que se evaluó fue VCAM-1 (Anexo 1), sin embargo, bajo las condiciones experimentales establecidas no se observó su expresión en el Western Blot.

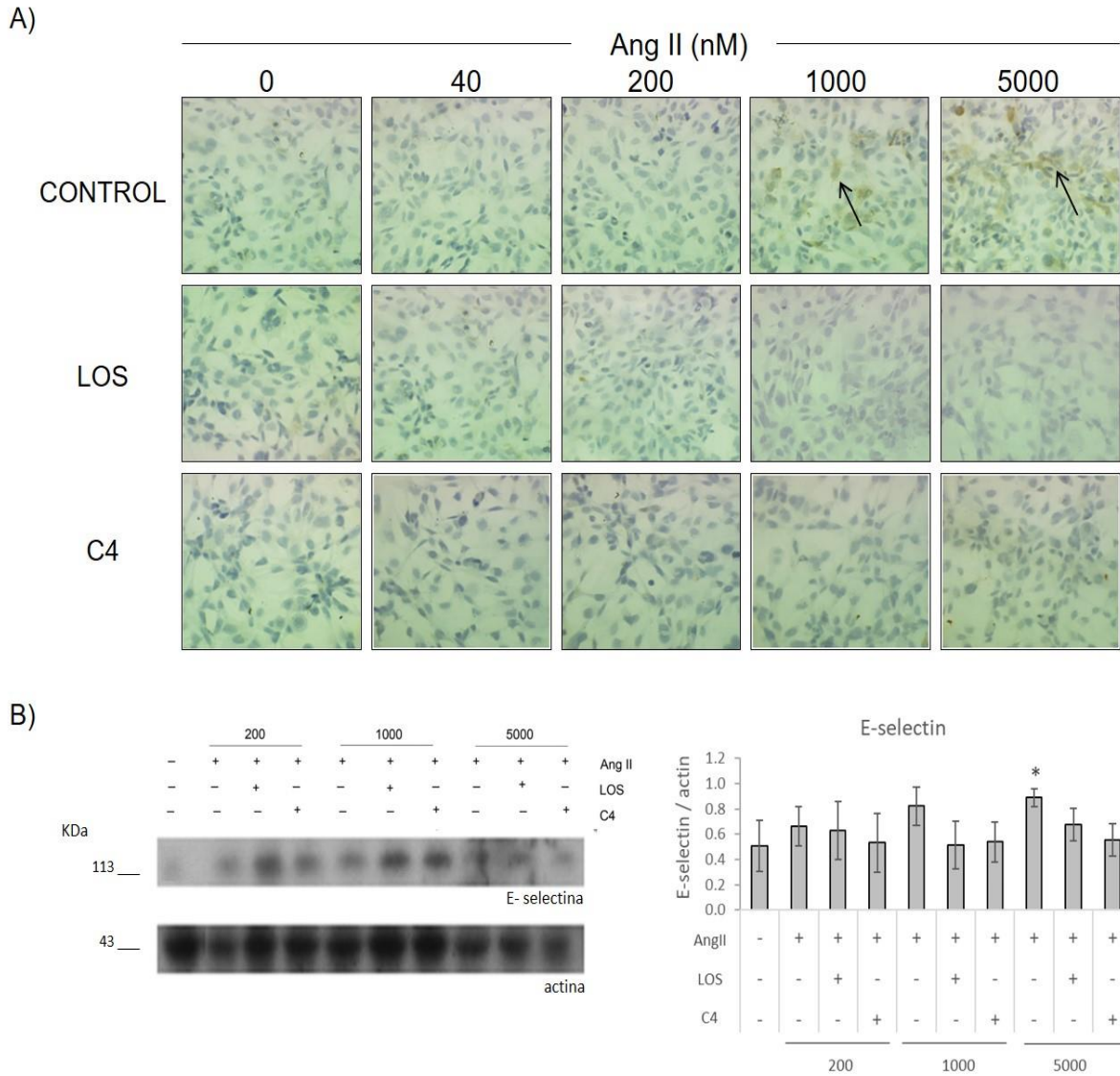


Figura 10. Efecto de C4 en la expresión de E-selectina inducida por Ang II, 12 h después del tratamiento. Inmunocitoquímica (A). Western blot (B). Las flechas indican la marca de E-selectina. Las microfotografías se tomaron con un objetivo de 40X. LOS: Losartán; C4: Combinación de SF1 y SF3, 10 µg / mL cada uno. Los datos se informan como media ± DS y se analizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. n = 4, * p <0,05 frente a control (libre de Ang II).

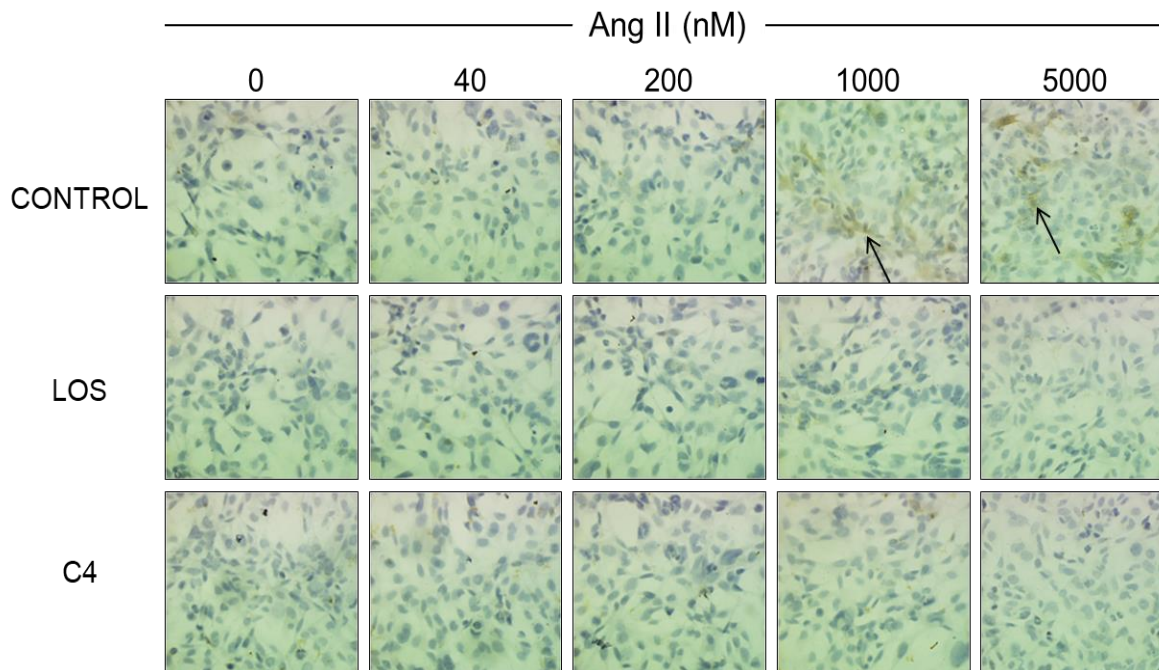


Figura 11. Efecto de C4 en la expresión de ICAM-1 inducida por Ang II, 12 h después del tratamiento. Las flechas indican la marca de E-selectina. Las microfotografías se tomaron con un objetivo de 40X. LOS: Losartán; C4: Combinación de SF1 y SF3, 10 µg / mL cada uno.

8.9. La C4 favorece la disponibilidad del ON

Otro marcador de disfunción endotelial es la disminución de ON, por ello se evaluó la capacidad de la C4 para evitar la disminución del mismo a través de la reacción de Griess. Los resultados se muestran en la figura 12, lo cuales indican que los tratamientos sin Ang II no modifican las concentraciones de ON, mientras que al estimular con Ang II la disponibilidad de este gas se ve disminuida. De manera interesante la C4 logra evitar esa reducción de manera similar al control sin Ang II y Losartán.

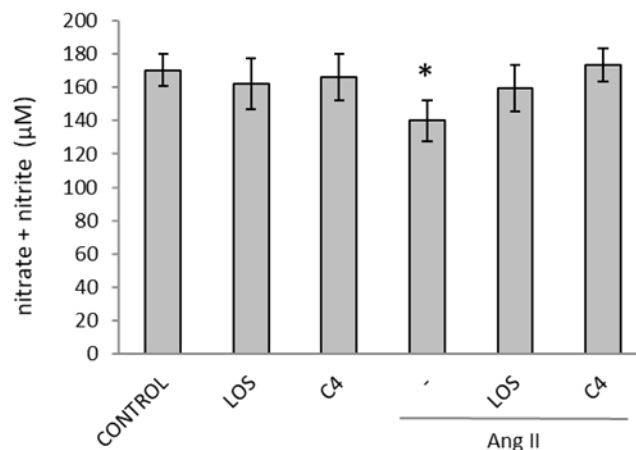


Figura 12. Efecto de C4 sobre la disponibilidad de óxido nítrico (NO). Las células HMEC-1 se estimularon con LOS o C4 o con Ang II 5000 nM más LOS o C4. Los datos se reportan como media \pm DS (desviación estándar) y se analizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. $n = 5$, * $p < 0,05$ frente al control (sin Ang II). LOS: Losartán; C4: Combinación de SF1 y SF3, 10 μg / mL cada uno.

8.5. La C4 evita el incremento de ROS inducido por Ang II

La Ang II promueve el estrés oxidativo al inducir la activación de enzimas como NADH oxidasa, la cadena respiratoria, eNOS y xantina oxidasa, estas enzimas incrementan la producción de ROS que también es marcador de la disfunción endotelial. Por lo anterior, evaluamos el efecto de C4 en la producción de ROS por las enzimas antes mencionadas. Como se muestra en la Figura 13, la Ang II aumentó significativamente la generación de ROS por las cuatro enzimas evaluadas. C4 impidió significativamente la formación de ROS, reduciendo los niveles de ROS derivados de NADH oxidasa en un 78.3%, un valor similar a los obtenidos con losartán (85.5%) y el inhibidor selectivo DPI (66.1%; Figura 13, paneles A, B). Con respecto a las ROS mitocondriales, C4 disminuyó sus niveles en 83.4%, mientras que la disminución debida a losartán fue 72.6%, y la debida a antimicina fue 87.1% (Figura 13, paneles C, D). Además, C4 redujo la producción de ROS por eNOS (74.5%; Figura 13, paneles E, F) y xantina oxidasa (87.7%; Figura 13, paneles G, H) en una medida similar a Losartán (81.3% y 90.9%), L - NAME (60.7%) y alopurinol (89.5%).

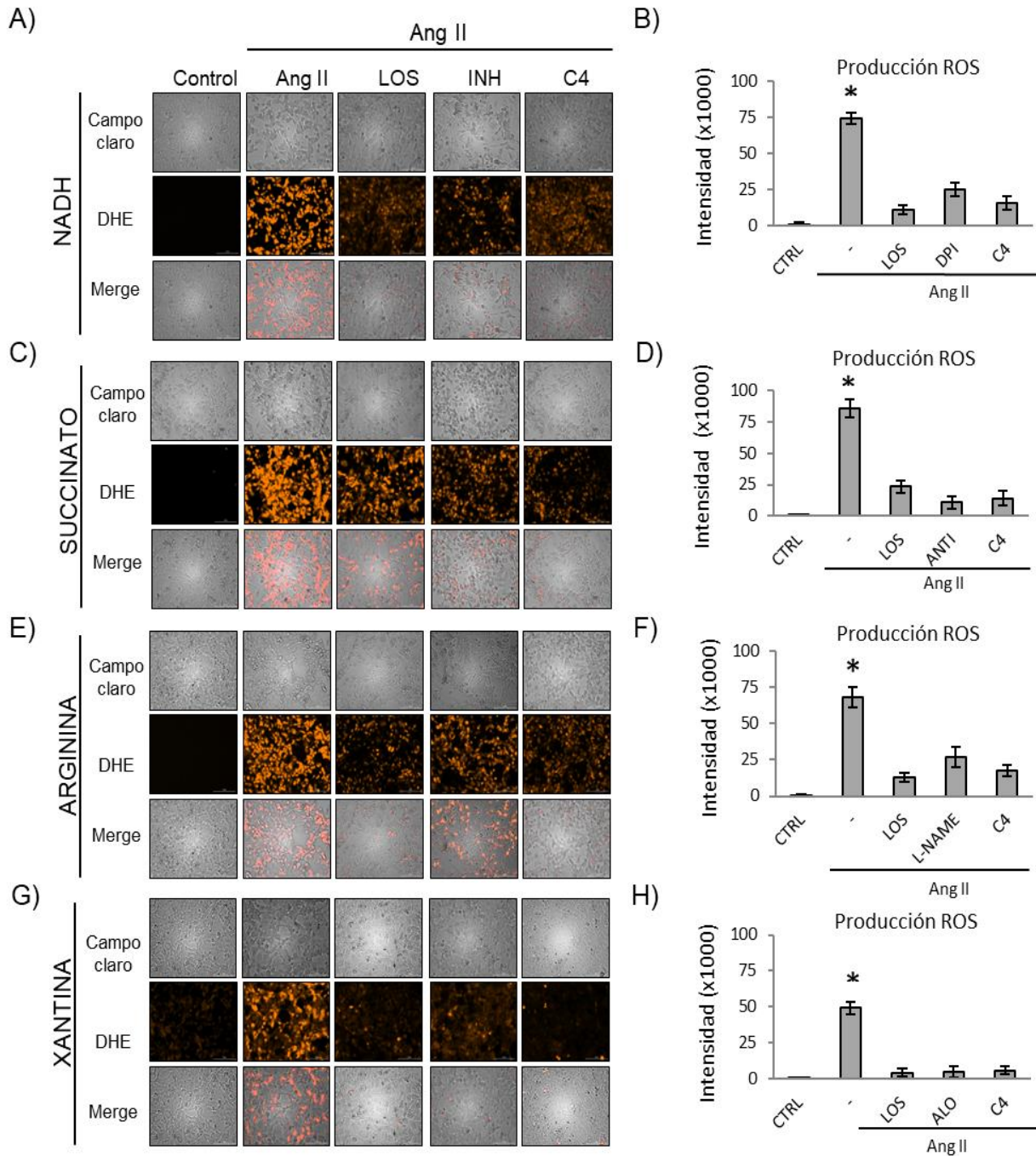


Figura 13. Efecto de C4 en la producción de ROS a partir de cuatro fuentes diferentes de especies reactivas de oxígeno (ROS), NADH oxidasa (A, B), succinato deshidrogenasa (C, D), óxido nítrico sintasa (E, F) y xantina oxidasa (G, H). Las células HMEC-1 se estimularon con Ang II 5000 nM durante 6 h. Se tomaron microfotografías representativas con un objetivo 20X (A, C, E, G). Los datos se reportan como media \pm DS y se analizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. $n = 5$, * $p < 0,05$

frente a control (libre de Ang II), (B, D, G, H). LOS: Losartán; INH: inhibidor respectivo; C4: Combinación de SF1 y SF3, 10 µg / mL cada uno; DHE: Dihidroetidio; ROS: especies reactivas de oxígeno; ALO: alopurinol; CTRL: control; DPI: Diphenyleneiodonium; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ANTI: antimicina; L-NAME: éster metílico de N (ω) -nitro-L-arginina.

8.6 Las SFs contienen flavonoides, polisacáridos y aminoácidos.

Con la intención de hacer un análisis cualitativo de los compuestos que podrían contener las subfracciones, se realizaron cromatografías de capa fina. En la Figura 14 y en el anexo 2 se muestran las placas cromatográficas reveladas para aminoácidos (panel A), flavonoides (panel B) y polisacáridos (panel C). Estos resultados indican que todas las subfracciones presentan estos tres tipos de moléculas, sin embargo, el tipo de moléculas que resaltan en las cromatografías son justamente aquellas reveladas con ninhidrina, lo cual nos indica que los aminoácidos podrían ser los compuestos responsables de los efectos biológicos de las subfracciones.

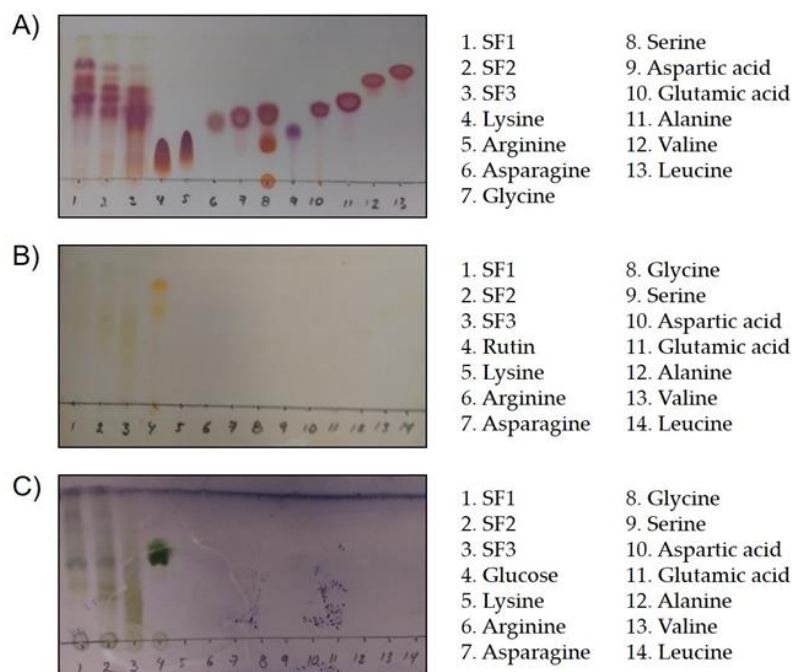


Figura 14. Cromatografía de capa fina. Separación de los diferentes compuestos de las subfracciones de *Cucumis sativus* usando TLC de fase normal y el sistema n-butanol: acetona: ácido acético glacial: agua (35: 35: 10: 20 v / v). Las manchas se revelaron con

ninhidrina para visualizar aminoácidos (A), con aminoetanol dimetilborato para flavonoides (B) y 4-hidroxibenzaldehído para polisacáridos (C).

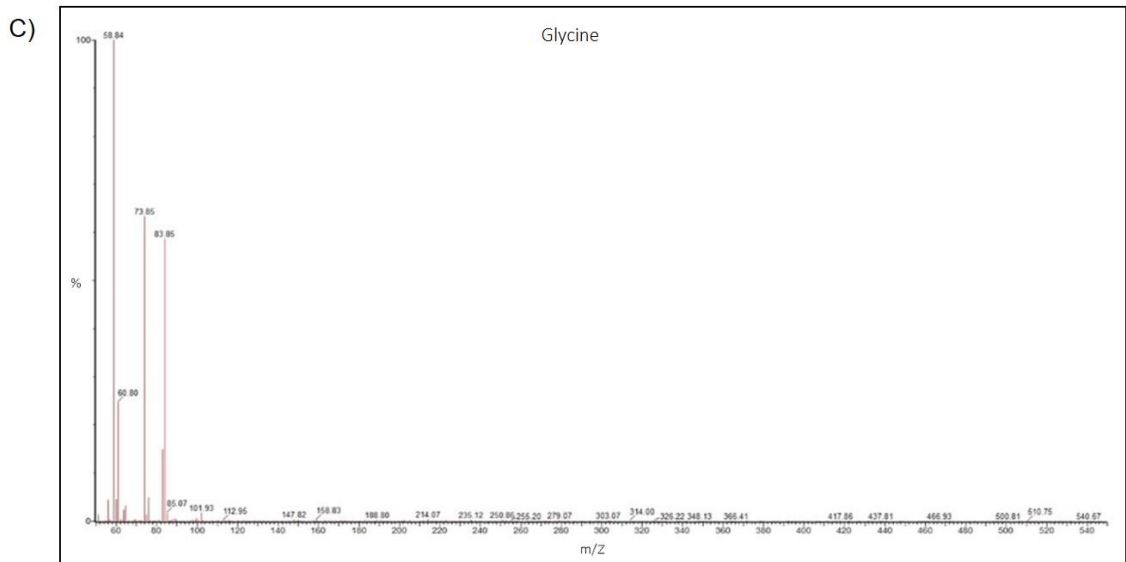
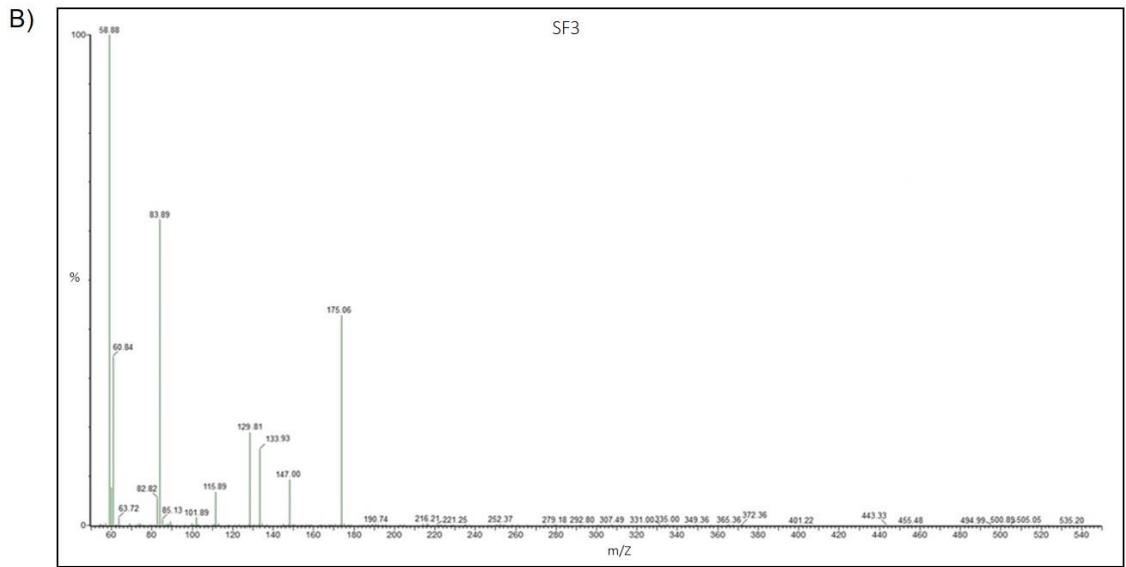
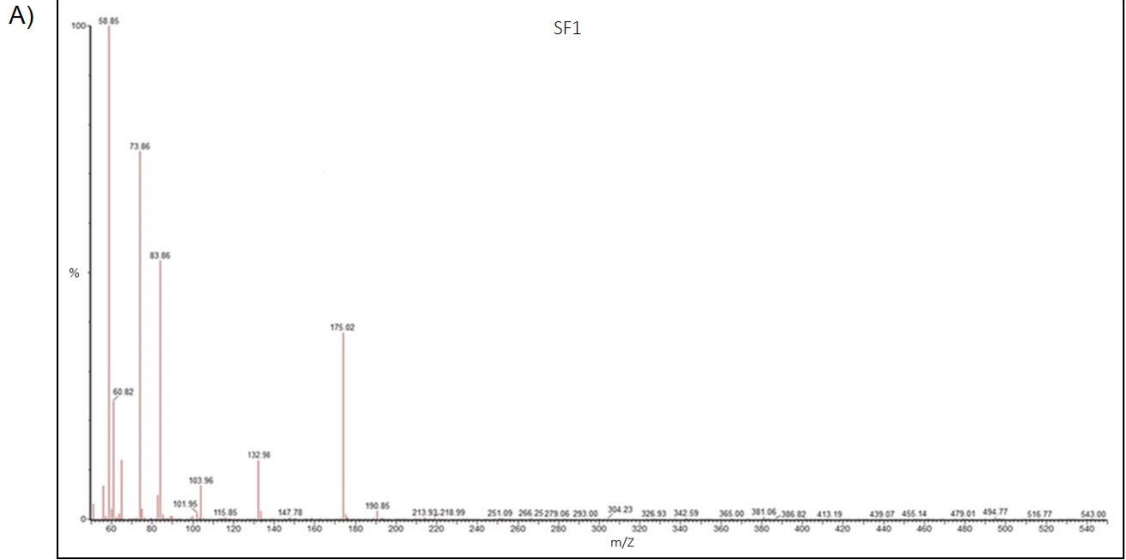
8.7 Las SF1 y SF3 contienen principalmente glicina y asparagina

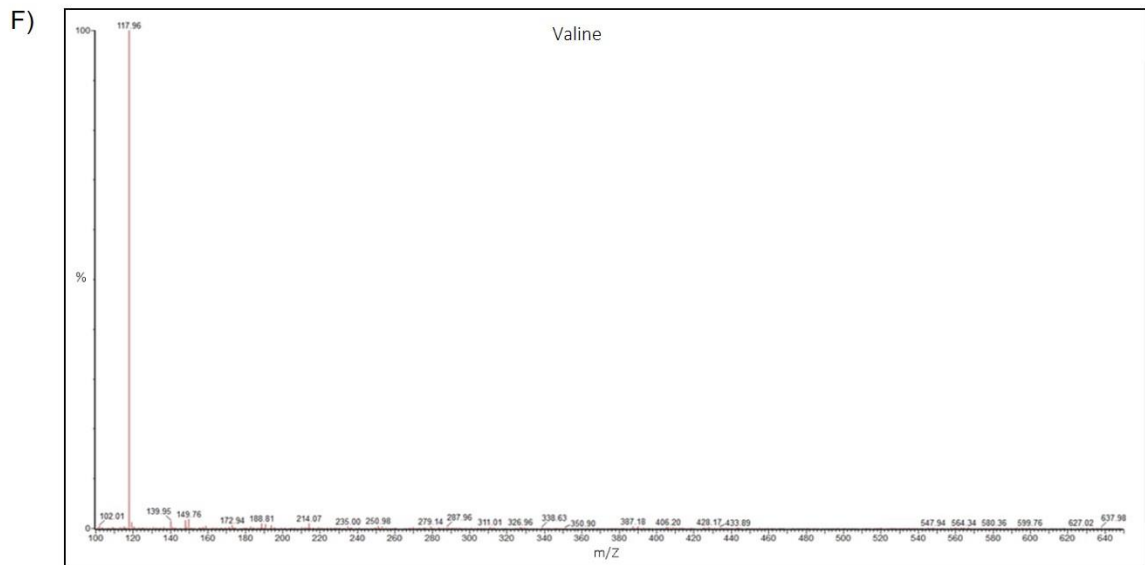
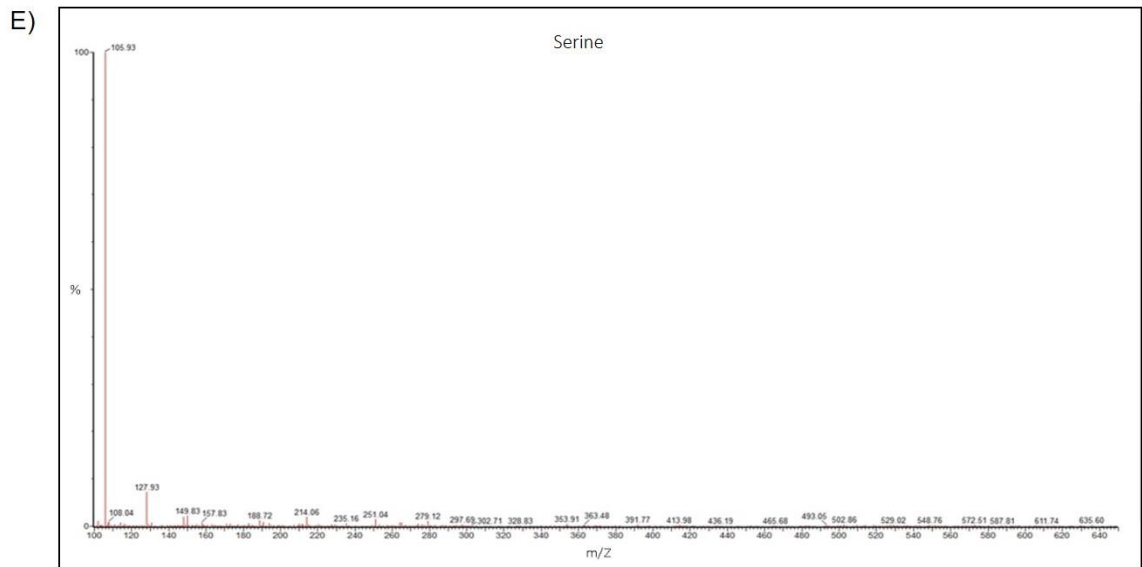
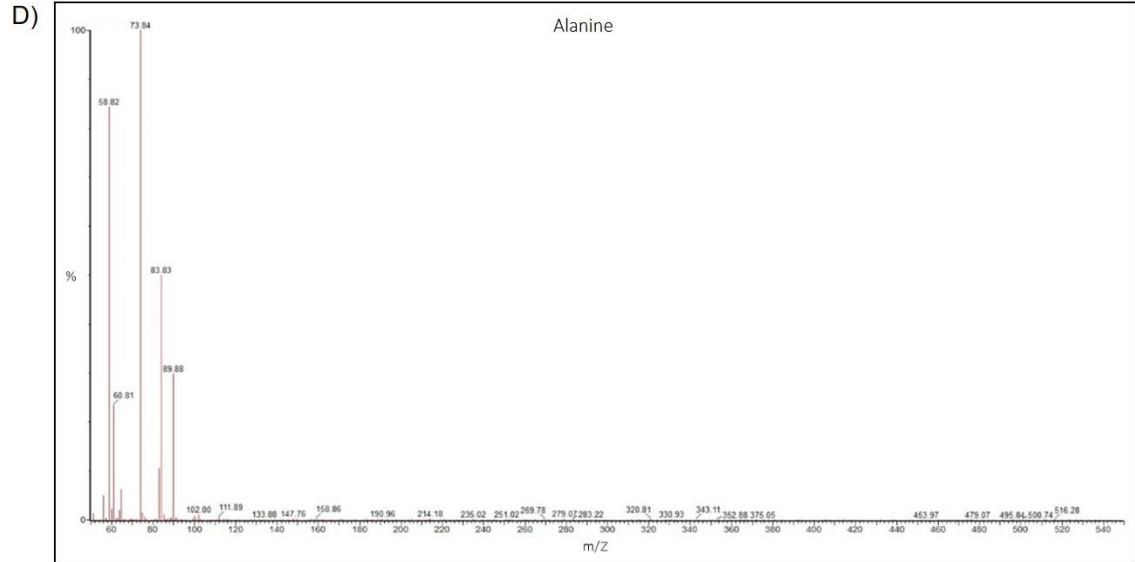
Con la intención de determinar cuáles eran los aminoácidos presentes en las SF1 y SF3 por los cuales estas subfracciones podrían tener los efectos biológicos benéficos, se realizó un análisis de espectrometría de masas con diferentes estándares de aminoácidos. Los resultados (Tabla 1 y Figura 15) indican que en la ionización positiva se produjeron picos con pesos moleculares de 58.84, 133.93, 146.97 y 157.01 Da, los cuales coinciden con los estándares de glicina, ácido aspártico, lisina y arginina, respectivamente, siendo el primero el principal aminoácido en ambas subfracciones. Por otro lado, la ionización negativa produjo un pico precursor con un peso molecular de 132.98 Da, que corresponde al estándar de asparagina.

Tabla 1. Aminoácidos identificados en las SF1 y SF3 de *Cucumis sativus* por espectrometría de masas.

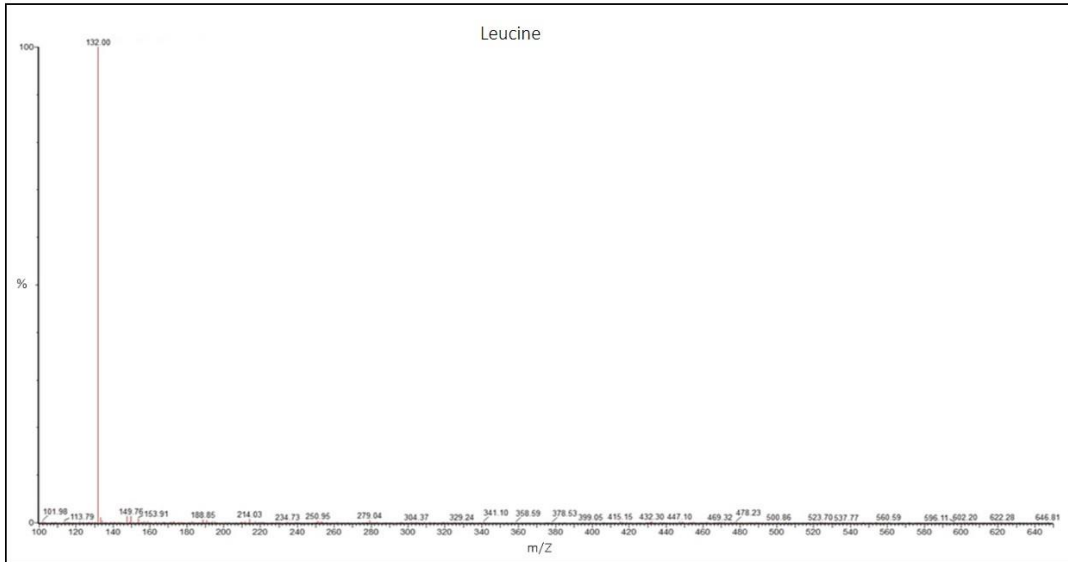
Modo	Pico del precursor (m/Z)	Aminoácido	Formula Molecular	Actividad biológica reportada	Referencia
Positivo	58.84 – 58.88	Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	Reduce TNF- α , IL-6, COX-2, y NF- κ B. Mejora la disponibilidad de ON. Incrementa GSH, SOD, y eNOS.	(Wang <i>et al.</i> , 2009; Almanza-Perez <i>et al.</i> , 2010; Amin <i>et al.</i> , 2016; Gómez-Zamudio <i>et al.</i> , 2015; Haddad <i>et al.</i> , 2005)
Negativo	132.98	Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	Regula a la baja a caspase 3, TNF- α , y la señalización del TLR4	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
Positivo	133.93 – 133.96	Ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	Sin reporte	-
Positivo	146.97 – 147.00	Lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	Sin reporte	-
Positivo	175.01 – 175.06	Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Es el precursor para la síntesis de ON. Reduce IL-17 y NF- κ B. Inhibe iNOS. Incrementa SOD y PI3K. Tiene actividad de scavenger.	(Hnia <i>et al.</i> , 2008; Ren <i>et al.</i> , 2014; Morais <i>et al.</i> , 2018; Ahmad <i>et al.</i> , 2015)

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-6: Interleucina 6; COX-2: ciclooxigenasa-2; NF- κ B: factor nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; GSH: Glutación; SOD: superóxido dismutasa; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; TLR4: receptor tipo Toll 4; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa.

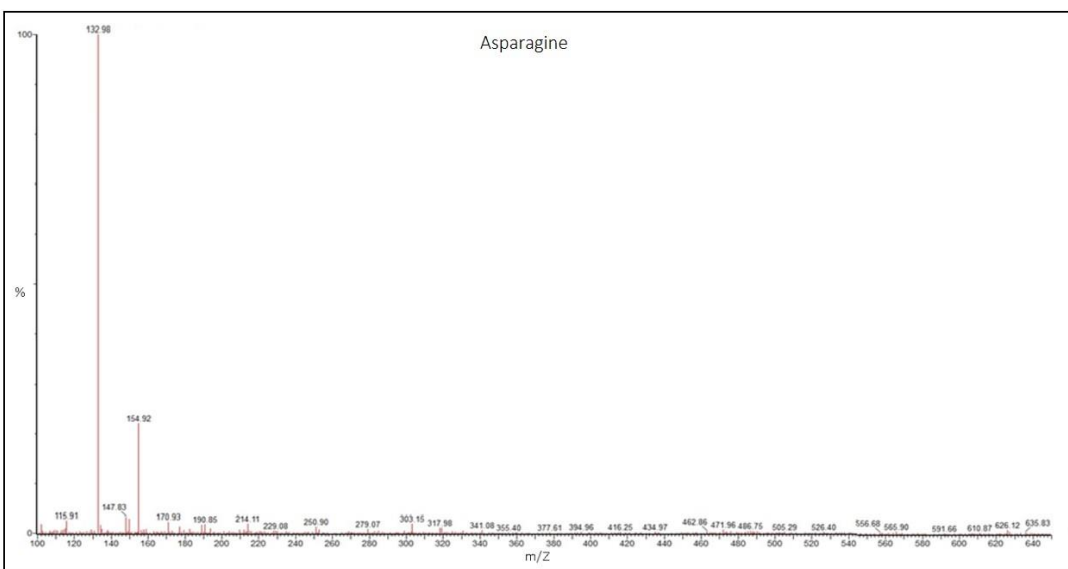




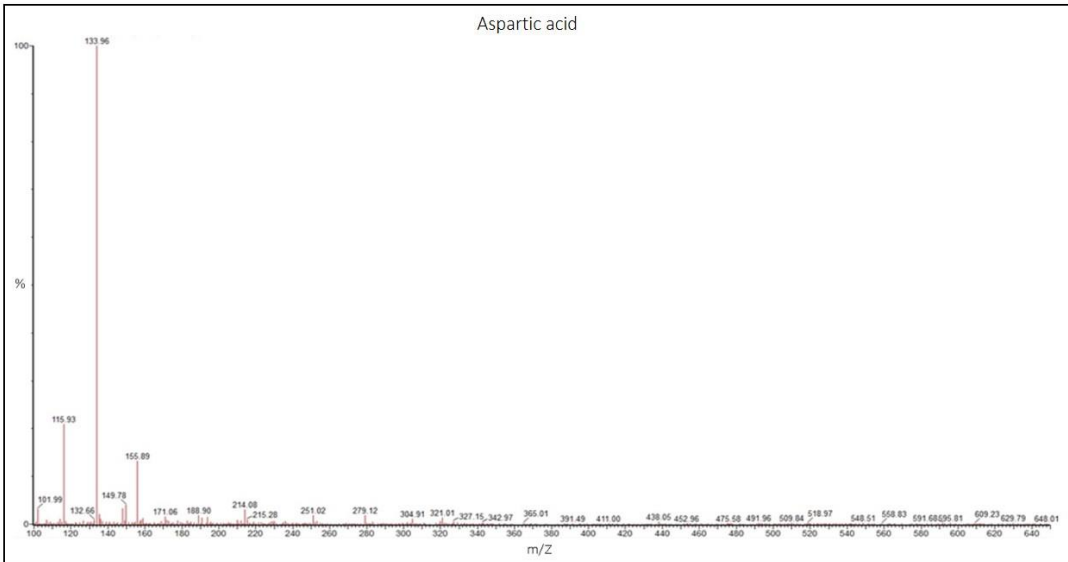
G)



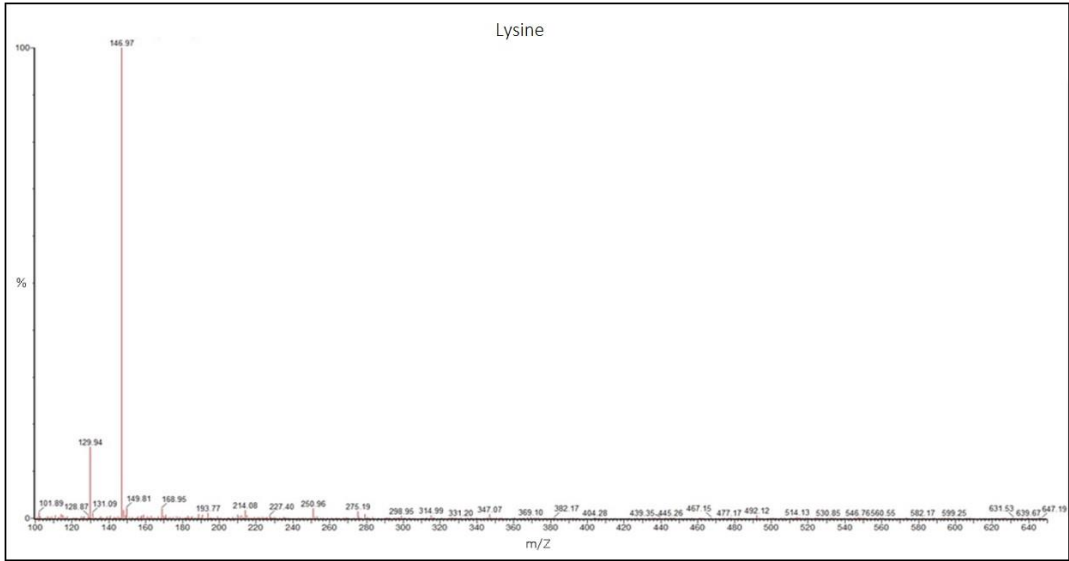
H)



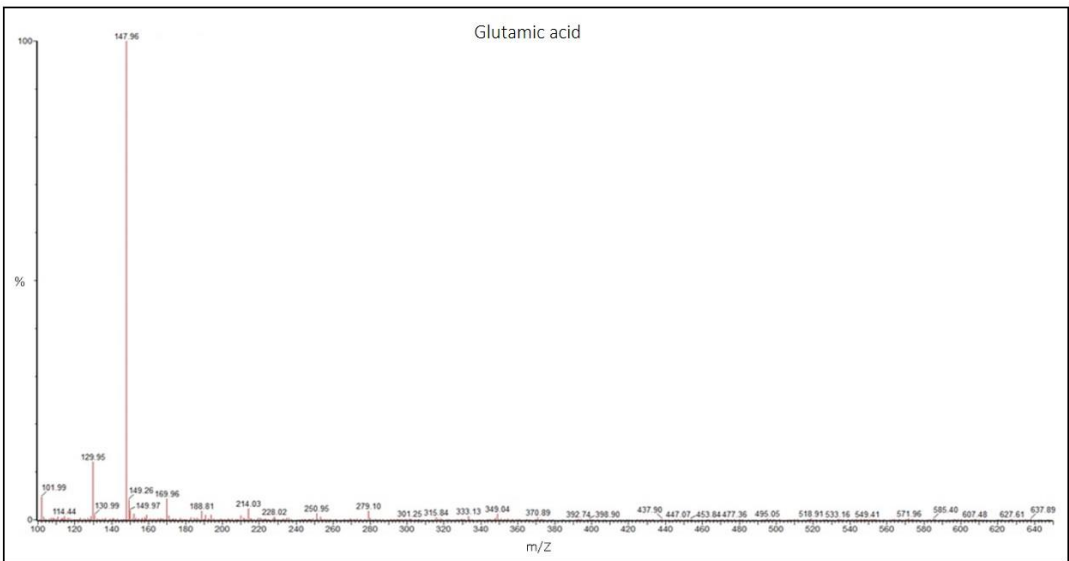
I)



J)



K)



L)

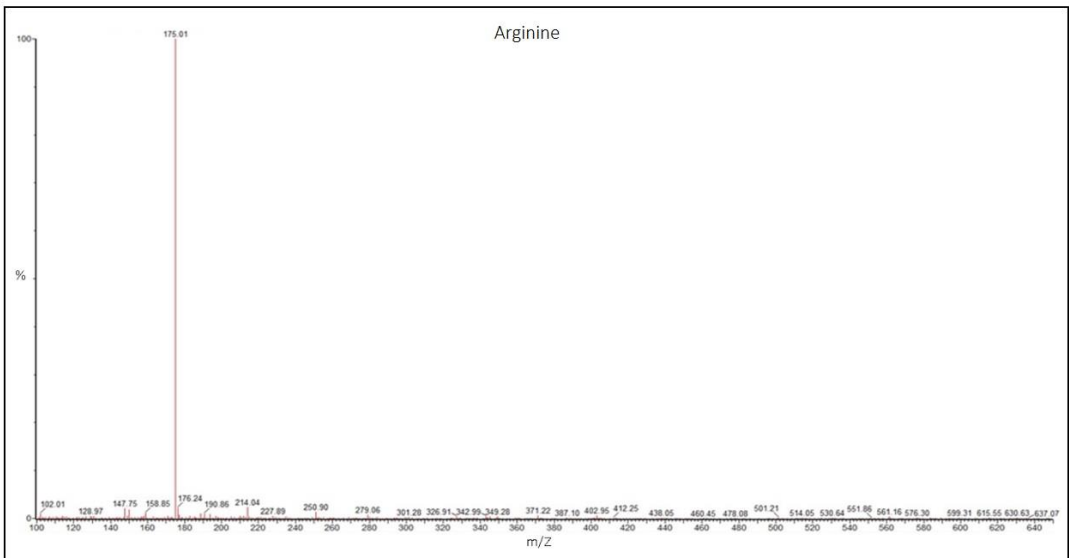


Figura 15. Espectrometría de masas. A) La SF1 contiene glicina, asparagina y arginina (picos 58.85, 132.98 y 175.02, respectivamente). B) La SF3 contiene glicina, ácido aspártico, lisina y arginina (picos 58.88, 133.93, 147.00 y 175.06, respectivamente). C) Estándar de glicina. D) Estándar de alanina. E) Estándar de serina. F) Estándar de valine. G) Estándar de leucina. H) Estándar de ácido aspártico. I) Estándar de asparagine. J) Estándar de lisina. K) Estándar de ácido glutámico. L) Estándar de arginina. Yo pasaría esta figura a la parte de Anexos.

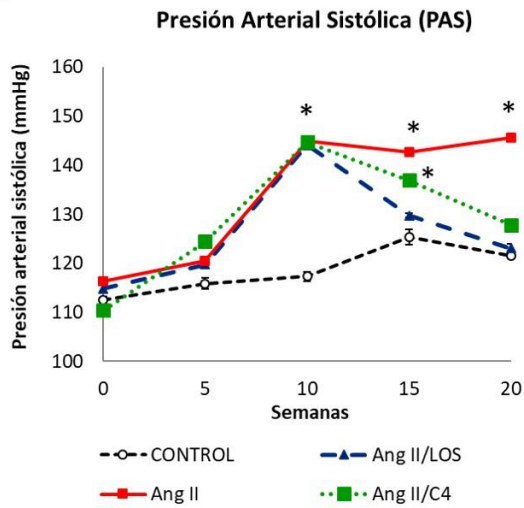
8.8. Evaluación *in vivo* de la C4.

8.8.1. Regulación de la presión arterial.

El aumento en la presión arterial es una de las consecuencias más evidentes de la disfunción endotelial, la cual es el producto de la unión de la AGII a su receptor AT1 en las células endoteliales (Harrison *et al.*, 2011). Con la intención de evaluar la eficiencia de la C4 *in vivo* para controlar esta condición inducida por la AGII, a ratones machos de la cepa C57BL6/J de 8-10 semanas de edad, se les indujo disfunción endotelial a través de la administración crónica de Ang II durante 10 semanas y posteriormente se les trató con la C4 ó Losartán como control durante 10 semanas más aunadas a la administración de Ang II.

En la Figura 16, se muestran las cinéticas de presión arterial sistólica (PAS) (panel A) y diastólica (PAD) (panel B). Los resultados indican que a las 10 semanas de administración de Ang II, la PAS aumentó 23.4% y la PAD 30% con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Posteriormente, desde la quinta semana de tratamiento con losartán ambas presiones disminuyeron de manera de que no presentaron diferencias significativas con respecto al blanco. Por otro lado, los ratones que recibieron la C4 disminuyeron gradualmente ambas presiones, a las 5 semanas aún tenían 9.2% sobre el grupo control en PAS y 13.5% en PAD, mostrando diferencia significativa con respecto a este grupo ($p < 0.05$). Sin embargo, después de 10 semanas de tratamiento, la C4 disminuyó la PAS de manera que solo tenían 5.1% en PAS y 6.6% en PAD arriba del control, sin presentar diferencias significativas con respecto a ese grupo, mientras que el grupo de Ang II tenía 19.9% (PAS) y 26.1% (PAD) arriba del control.

A)



B)

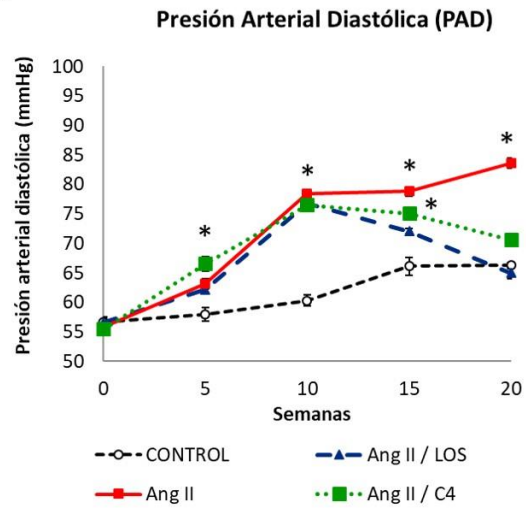


Figura 16. Cinética de presión arterial. La presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se midió en todos los ratones cada 5 semanas. El grupo tratado con Ang II mostró aumentos en ambas lecturas de presión en la semana 10, y el tratamiento con C4 normalizó los valores a nivel del grupo control. Los datos se expresan como la media \pm DS y se analizaron mediante ANOVA y una prueba de Tukey post hoc. * Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

8.8.2. La C4 induce un ambiente no inflamatorio

En la pared vascular, la Ang II conduce a la síntesis crónica de bajo grado de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y TNF α afectando la función endotelial (Schwingshackl *et al.*, 2015). Con la intención de evaluar el efecto de la C4 sobre el perfil de citocinas, en riñón, se cuantificaron las concentraciones de IL-1, IL-6, TNF α como citocinas proinflamatorias y TGF β e IL10 como citocinas antiinflamatorias.

En la figura 17, se observa que la Ang II incrementa significativamente la producción de IL-1 β (panel A) y TNF α (panel B) y mantiene sin cambios la de IL-6, TGF β e IL-10 (panel C-E). Mientras que, el tratamiento con Losartán, así como el de C4 controlaron el aumento de IL-1 β (panel A) llevándolo a las concentraciones del grupo control. Sin embargo, ambos tratamientos no controlaron el incremento de TNF α (panel B). Por otro lado, se puede observar que la C4 favoreció el aumento significativo de IL-10 (panel E), una citocina antiinflamatoria que podría estar regulando parte del proceso inflamatorio desencadenado por la Ang II.

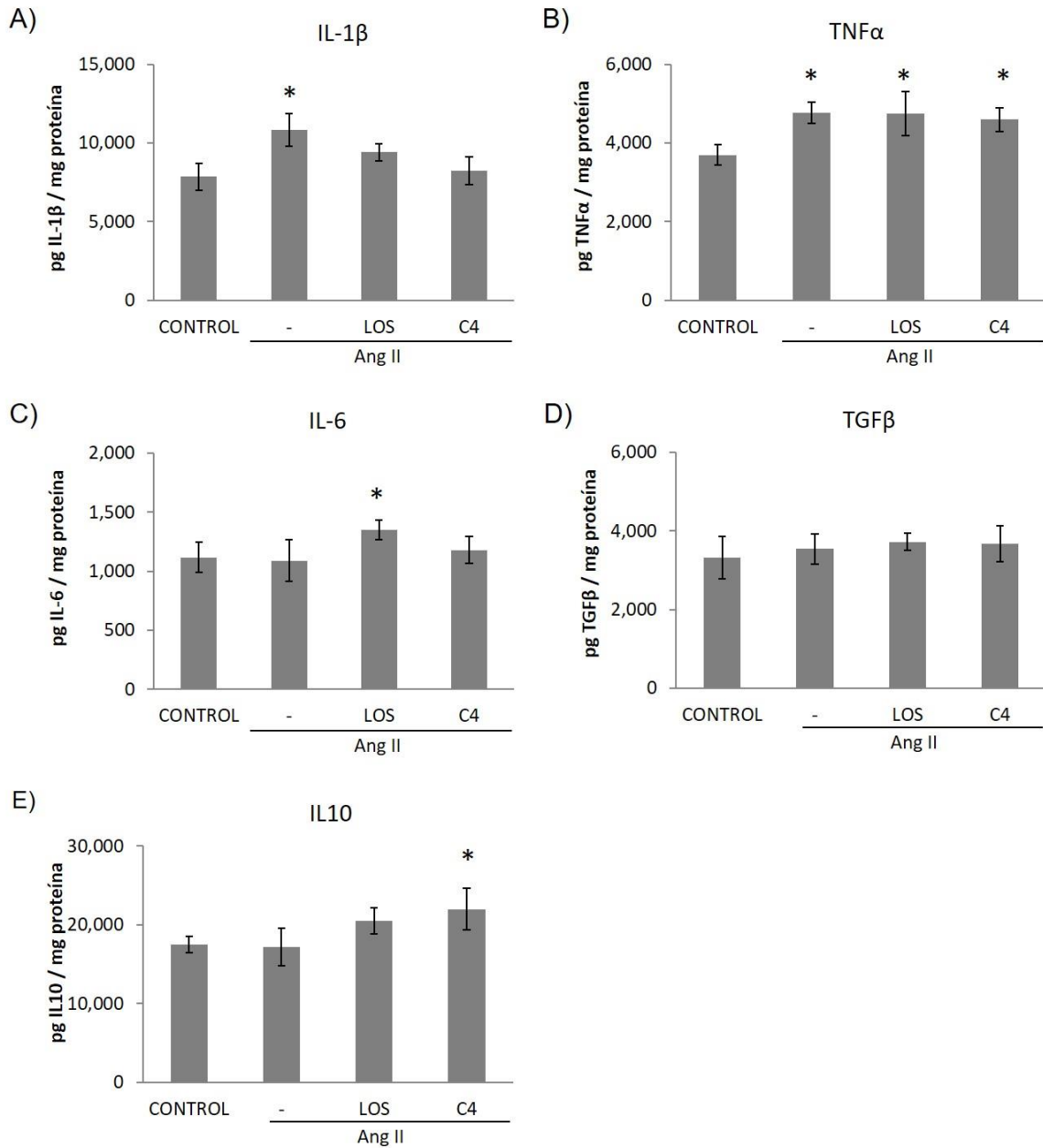


Figura 17. Concentración de citocinas pro- y antiinflamatorias en riñón. Los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α e IL-6) y antiinflamatorias (TGF β e IL-10) se determinaron en riñón 20 semanas después de los tratamientos. Los datos se expresan como la media \pm DE y se analizaron mediante la prueba ANOVA-Tukey. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). LOS: Losartán; C4: SF1 y SF3.

8.8.3. La C4 revierte el remodelado vascular

Uno de los efectos de la baja biodisponibilidad del ON es la proliferación de las células de la musculatura lisa vascular, lo que trae por consecuencia el aumento en el grosor de las paredes de los vasos sanguíneos y la disminución de la luz de los mismos (Ghimire *et al.*,2017). Con la intención de evaluar el efecto de la C4 sobre este parámetro, se midieron las paredes de los vasos de las pequeñas arterias como lo son las arterias hepáticas (Figura 16), así como en las grandes arterias como la aorta (Figura 19).

En ambos tipos de arterias se puede observar que la Ang II promovió el engrosamiento de la túnica media (Figura 18B, 18E, 19B, 19F y 19I), mientras que los tratamientos tanto el farmacológico como C4 disminuyeron significativamente ese efecto (Figuras 18C-E, 19C-D, 19G-I), manteniendo este parámetro similar al grupo control (Figuras 18A,18F, 19A y 19I).

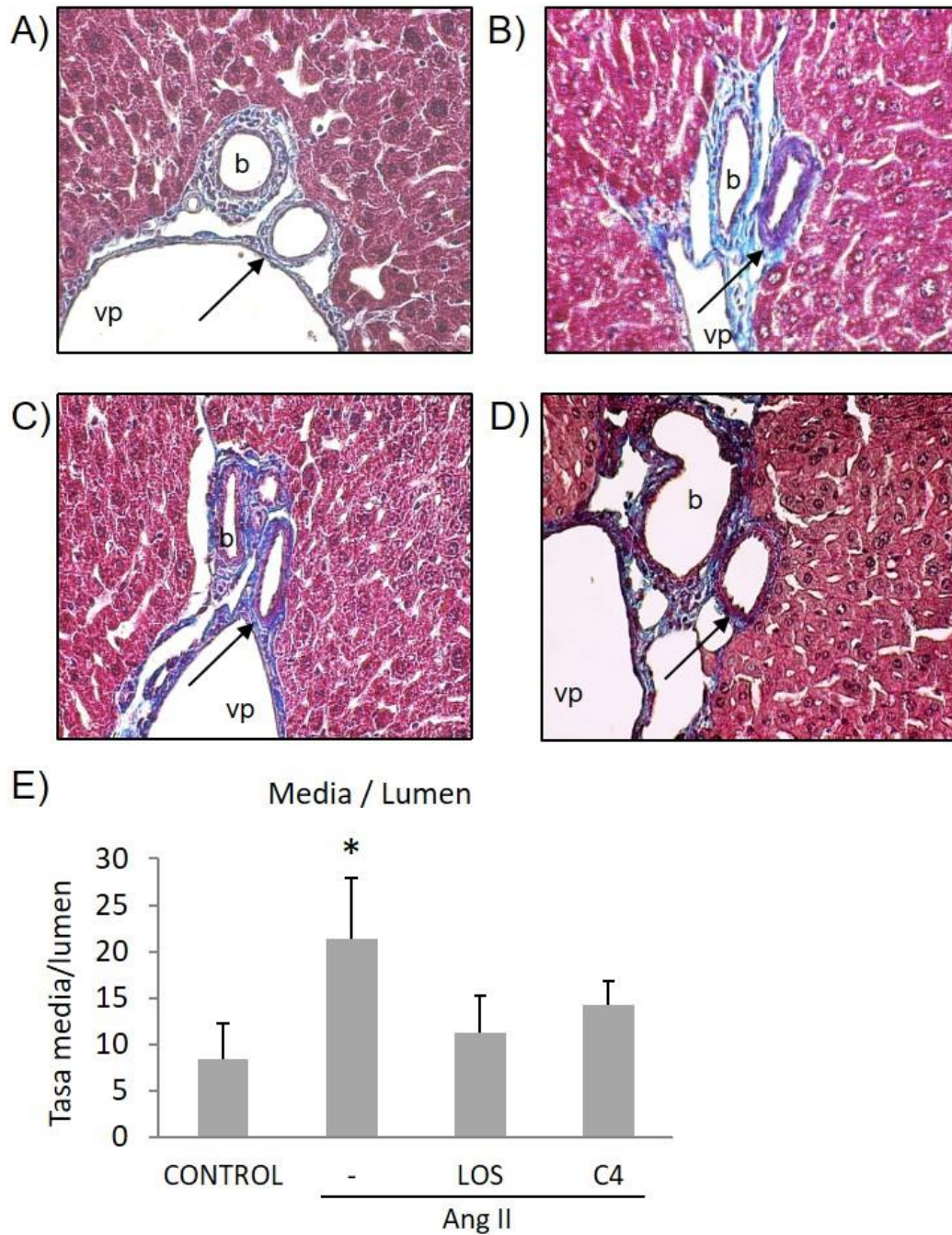


Figura 18. Remodelado vascular en pequeñas arterias. A-D) Microfotografías a 40X de arterias hepáticas teñidas con tricromica de masson. E) Tasa del área de la capa media/lumen. La Ang II indujo el engrosamiento de los vasos y los tratamientos con Losartán y C4 revirtieron ese efecto. Las flechas indican las arterias hepáticas. Los datos se expresan como la media \pm DE y se analizaron mediante la prueba ANOVA-Tukey. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). LOS: Losartán; C4: SF1 y SF3; b: conducto biliar; vp: vena porta.

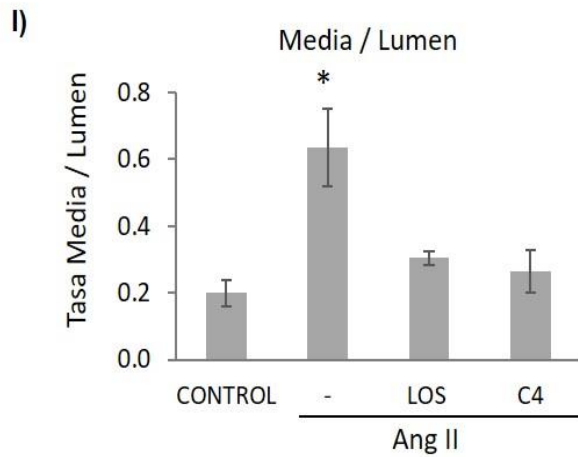
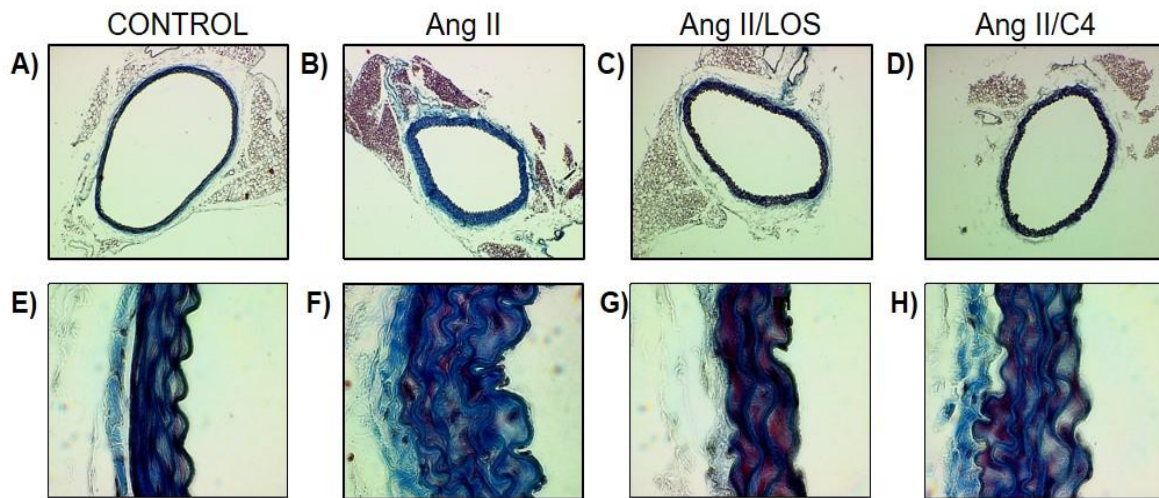


Figura 19. Remodelado vascular de la macrovasculatura. A-D) Microfotografías a 4X de aortas teñidas con tricromica de masson. E-H) Microfotografías tomadas a 100X. I) Tasa del área de grosor de la media/lumen. La Ang II indujo el engrosamiento de la capa media de la aorta y los tratamientos con Losartán y C4 revirtieron ese efecto. Los datos se expresan como la media \pm DE y se analizaron mediante la prueba ANOVA-Tukey. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). LOS: Losartán; C4: SF1 y SF3.

8.8.4. La C4 disminuye el daño renal

El proceso inflamatorio, el estrés oxidante y el remodelado vascular que caracterizan a la disfunción endotelial, tienen como consecuencia el daño en los tejidos (Harrison *et al.*, 2011). En estudios previos ya se había constatado que la AGII generaba daño en el riñón como consecuencia de lo anterior (Trejo-Moreno *et al.*, 2018), por lo cual era de interés saber si la C4 podría ayudar a rehabilitar el daño inducido previamente por la AGII. En la figura 20, se muestra que la Ang II indujo el infiltrado de células mononucleares en la grasa perirrenal (panel B) y en la cápsula renal, aunado a fibroblastos, en esta última que como respuesta a señales de daño produjeron fibras de colágena que la engrosaron (panel F). En la microvasculatura también se promovió el depósito de fibras y el infiltrado celular (panel J). Finalmente, a nivel glomerular, indujo hipertrofia (panel N y Q), depósitos de fibras alrededor del glomérulo (panel N), disminuyó la capilaridad glomerular (panel R) y aumentó el área mesangial (panel S).

Ambos tratamientos (Losartán y C4), disminuyeron el infiltrado en la grasa perirrenal y en la cápsula (panel C, D, G y H, respectivamente), sin embargo, la C4 lo llevó en ambos casos a las condiciones del grupo control (panel A). Por otro lado, tanto el Losartán como la C4 disminuyeron el grosor de la cápsula renal (panel H y G), ya que se redujo la cantidad de fibras de colágena y de fibroblastos en ella. En lo que respecta a la microvasculatura, tanto el Losartán (panel K) como C4 (panel L) rehabilitaron los vasos llevándolos a las condiciones como las del grupo control (panel I). Por otro lado, aunque el Losartán redujo la hipertrofia glomerular (panel O y Q) no la llevó a las condiciones del grupo control (panel M y Q) y no restauró la capilaridad de los glomérulos (panel R) ni revirtió la expansión mesangial (panel S). Finalmente, la C4 no mostró diferencias significativas con respecto al grupo tratado con AGII en ninguno de estos parámetros (paneles Q-S).

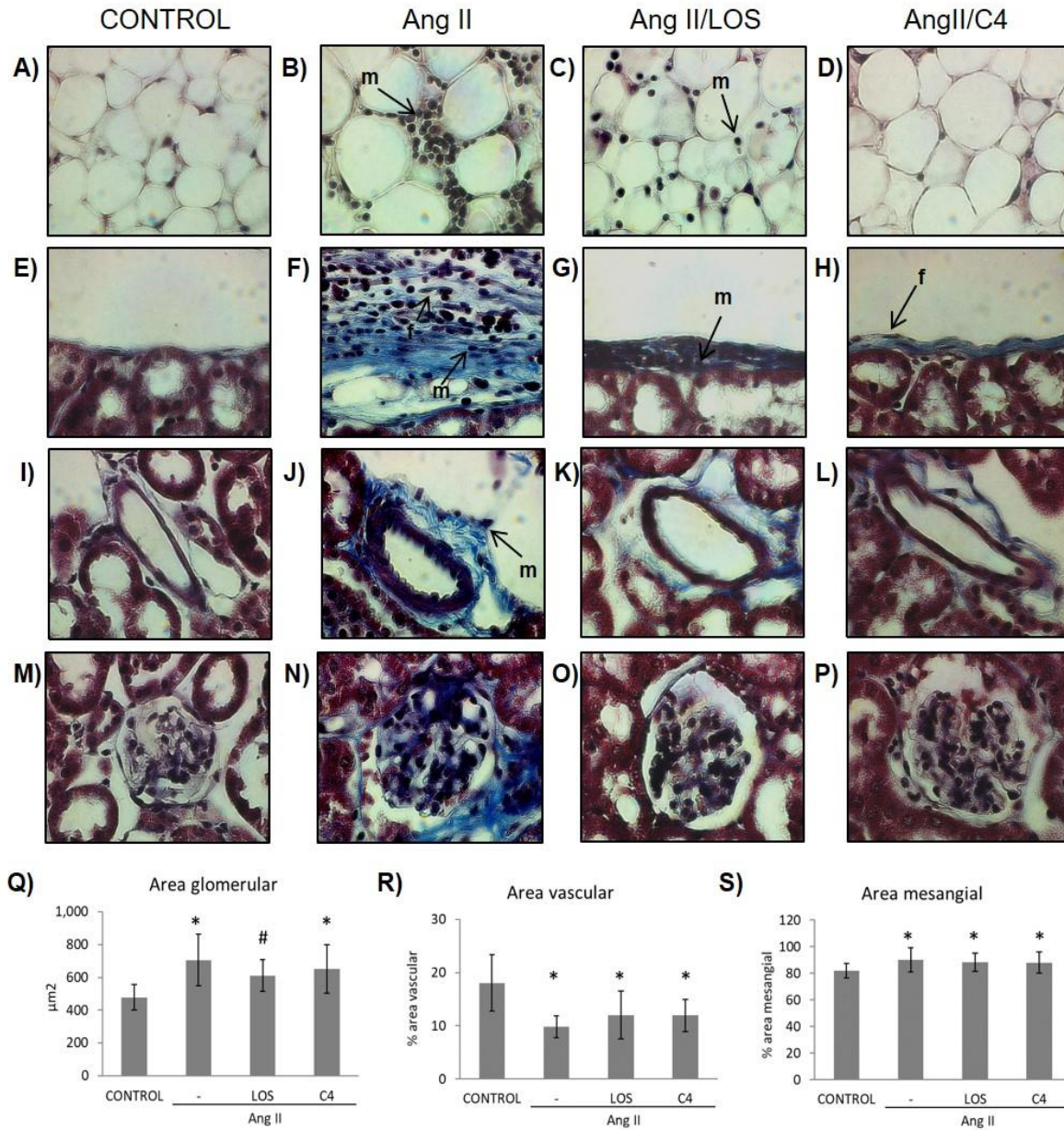


Figura 20. Daño renal. A-D) grasa perirrenal. E-H) Cápsula renal. I-L) Vasos. M-P) Glomérulo cortical. Q-S) Análisis de daño glomerular. La Ang II induce inflamación caracterizada por el infiltrado de células mononucleares y fibroblastos y depósito de fibras de colágeno. El tratamiento con C4 disminuye estos parámetros, excepto el de la capilaridad glomerular. Microfotografías tomadas a 100X. Los datos se expresan como la media \pm DE y se analizaron mediante la prueba ANOVA-Tukey. * Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$); # Diferencias significativas con respecto al grupo control y a Ang II. LOS: Losartán; C4: SF1 y SF3. m: célula mononuclear; f: fibroblastos.

Las alteraciones en la arquitectura del riñón conducen a que la función renal sea anormal, por lo que se elimina menos creatinina, ácido úrico y urea a través de la orina y estas aumentan en sangre (Díaz *et al.*, 2013).

En la figura 21, se observan los parámetros de creatinina (panel A), ácido úrico (panel B) y urea (panel C). El grupo que recibió Ang II mantuvo sin cambios los niveles de los dos últimos, pero incrementó los valores de creatinina en sangre (panel B), lo cual indica que no se está llevando una buena filtración glomerular y con ello una función renal adecuada. Tanto el losartán como C4 mantuvieron la concentración de creatinina a nivel del grupo control, lo cual indica que, aunque no hayan revertido el daño anatómico a nivel glomerular (Figura 19 O-S) controlaron las alteraciones en la filtración renal.

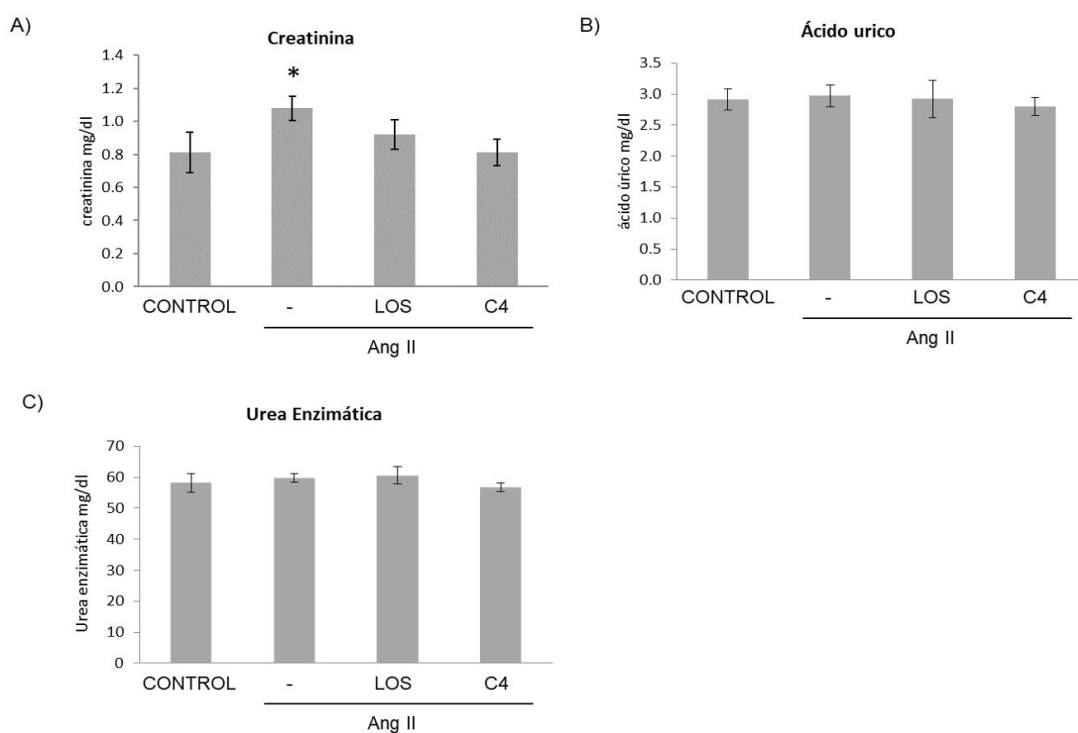


Figura 21. Perfil renal. A) Creatinina. B) ácido úrico. C) Urea enzimática. La Ang II induce el incremento de creatinina en sangre, lo que indica que hay daño en la funcionalidad del riñón. La C4 evita este incremento de creatinina. Los datos se expresan como la media \pm DE y se analizaron mediante la prueba ANOVA-Tukey. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). LOS: losartán; C4: SF1 y SF3.

8.8.5. C4 reduce el daño hepático

La administración crónica de Ang II promueve el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) (Moreno *et al.*, 2018). Las características histológicas de esta patología son: hígado graso, inflamación y fibrosis (Brunt 2004; de Alwis and Day, 2008). Con la intención de evaluar el efecto de la C4 sobre este parámetro, se realizaron estudios histopatológicos en hígado.

En la figura 22 se muestra que todos los grupos desarrollaron hígado graso (panel A-D). Por otro lado, se observa que la Ang II indujo el engrosamiento de la cápsula de Glisson (panel F) y las trabéculas (panel J), debido al depósito de fibras de colágeno e infiltrado de células mononucleares como linfocitos, macrófagos, fibroblastos y fibrocitos, lo que indica la cronicidad del evento inflamatorio y el proceso de reparación en curso. El tratamiento con Losartán mejoró el engrosamiento de la capsula de Glisson, y pese a que la C4 también lo mejoró, el grado en el que lo hizo el Losartán fue mejor. Sin embargo, ambos tratamientos revirtieron el daño en las trabéculas (panel K-L), llevándolo a las condiciones similares al grupo control (panel A).

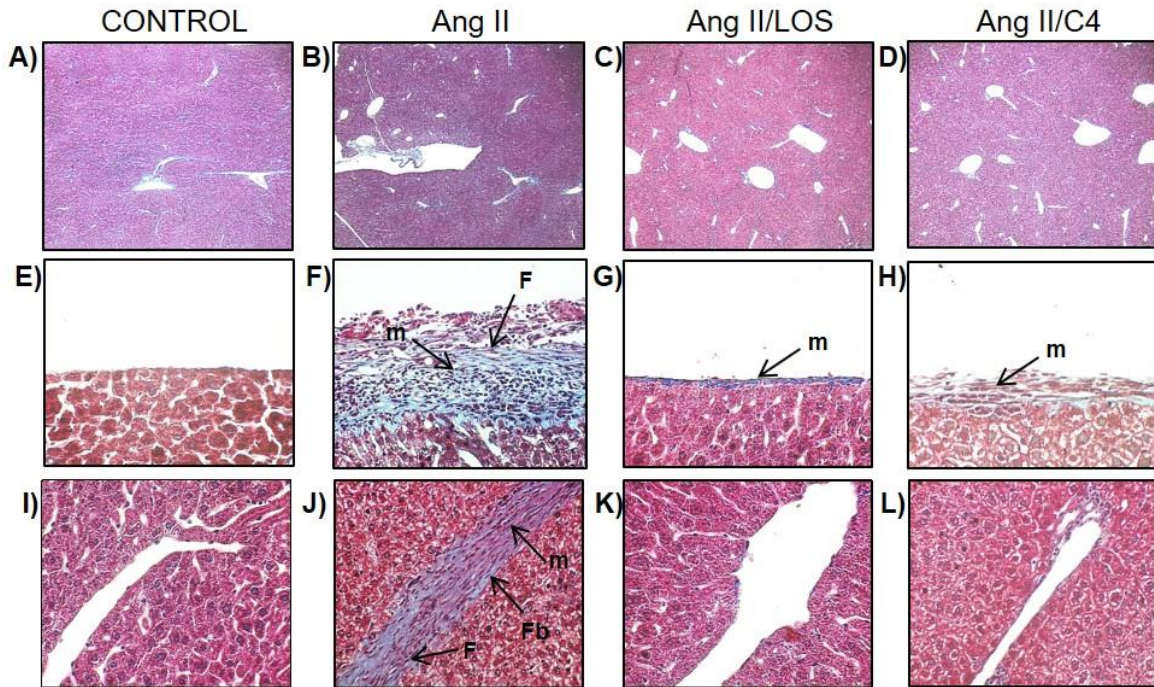


Figura 22. Evaluación del daño hepático mediante tinción con tricrómica de Masson. A-D) Parénquima hepático, 4X. E-H) Cápsula de Glisson, 40X; I-L) Trabéculas, 40X. El grupo tratado con Ang II mostró esteatosis, infiltrado de células mononucleares y depósito de fibras de colágeno. Tanto Losartán como la C4 disminuyeron el engrosamiento de la capsula de Glisson como de las trabéculas, sin embargo, no mejoraron la esteatosis. Microfotografías tomadas con el objetivo de 4X y 40X. m: células mononucleares inflamatorias; F: fibroblastos; Fb: fibrocitos.

9. DISCUSION

La inflamación, el estrés oxidativo y el remodelado vascular son características de la disfunción endotelial; a su vez, este último es el sustrato fisiopatológico de varias enfermedades cardiovasculares con alto impacto en los índices de mortalidad, como hipertensión, infarto de miocardio, enfermedad cerebrovascular e insuficiencia renal crónica (Tanaka, *et al.*, 2016; Kolmos *et al.*, 2016; Mitsides *et al.*, 2017). Por lo anterior, los tratamientos para controlar las afecciones de la disfunción endotelial están emergiendo como terapias clave contra estas enfermedades de alto impacto (Endemann *et al.*, 2004). En el presente trabajo, las subfracciones SF1, SF2 y SF3 de la fracción acuosa de *C. sativus* se evaluaron en su capacidad para controlar la disfunción endotelial inducida por Ang II *in vitro* e *in vivo*. Nuestros hallazgos indican que SF1 y SF3, así como su combinación C4 modularon varios parámetros inflamatorios, oxidativos, de remodelado vascular, hipertensión y de daño orgánico tan eficazmente como el Losartán, un antagonista del receptor de Ang II. Estos resultados podrían deberse a la glicina y arginina, los compuestos mayoritarios presentes en SF1 y SF3. Se ha informado que ambos aminoácidos tienen efectos antiinflamatorios, ya que inhiben la expresión de IL-6, IL-1 β , IL-17, TNF α y ciclooxigenasa 2, así como la infiltración de macrófagos; también regulan negativamente la actividad de NF- κ B (Hnia *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Almanza-Perez *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2014; Gómez-Zamudio *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2016; Morais *et al.*, 2017).

La Ang II es un octapéptido que, al unirse a su receptor AT1R en la célula endotelial, promueve la cascada de señalización de MAPK que conduce a la activación de IKK; que a su vez fosforila a I κ B. Después de su fosforilación, I κ B se degrada y NF- κ B se transloca al núcleo. NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de varios genes implicados en la inflamación, como IL-6, pro-IL-1 β , E-selectina e ICAM-1 (Wolf *et al.*, 2002). Se ha reportado que cuando la glicina se une a su receptor (GlyR), que es un receptor ionotrópico o regulado por ligando, contribuye a la hiperpolarización de células como los macrófagos, dificultando su activación (Froh *et al.*, 2002). Otros autores (Wang *et al.*, 2009; Lu

et al., 2017) han reportado que esta hiperpolarización inhibe la vía MAPK. Por lo que la activación de NF- κ B inducida por Ang II y sus consecuencias inflamatorias se podrían bloquear. El GlyR también se expresa en las células endoteliales (Yamashina *et al.*, 2001; Van den Eynden *et al.*, 2009), por lo que es probable que un mecanismo similar podría estar involucrado. Por lo tanto, la glicina en SF1 y SF3 podría interactuar con el GlyR en las células endoteliales, y así hiperpolarizar su membrana y bloquear la señalización MAPK mediada por Ang II, y consecuentemente inhibir la activación de NF- κ B y la producción de IL-6, E-selectina e ICAM-1. L-Arginina es otro aminoácido que ha demostrado propiedades antiinflamatorias *in vivo* e *in vitro* al disminuir la expresión de citocinas inflamatorias (Hnia *et al.*, 2008). Recientemente se demostró que la L-arginina inhibe la activación de NF- κ B en células Caco-2 por un mecanismo que implica su transporte activo por el transportador de aminoácidos catiónicos CAT1 y el metabolismo por eNOS para generar NO aumentando su biodisponibilidad (Meng *et al.*, 2017).

Por otro lado, *in vivo*, se observó que la Ang II incrementó la concentración de IL-1 β , sin embargo, el tratamiento con C4 controló la producción de esta citocina, además de que se incrementó la de IL-10, una citocina antiinflamatoria. Se ha reportado que la IL-10 suprime la activación de la enzima convertidora de IL-1 β y el consecuente procesamiento y liberación de la IL-1 β madura (Kim *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que la glicina incrementa la producción de IL-10 (Chen *et al.*, 2018). Mientras que la arginina regula epigenéticamente la producción de IL-10, a través de la hipometilación del ADN del promotor de esa citocina en células T_H CD4 (Yu *et al.*, 2017). Por lo anterior, la C4 posiblemente controló la producción de IL-1 β a través de la producción de IL-10 inducida por la glicina y arginina contenidas en las SF1 y SF3.

Además del efecto proinflamatorio, la Ang II tiene un efecto prooxidante que se evidencia con el aumento en la producción de ROS. Existen muchas fuentes potenciales de ROS en las células, incluidas la NADH oxidasa, la mitocondria (succinato deshidrogenasa), la xantina oxidasa y la eNOS desacoplada (Wang *et*

al., 2000). En el presente trabajo se observó que, en las células HMEC-1 tratadas con Ang II y la C4 disminuyó significativamente la producción de ROS proveniente de las cuatro fuentes antes mencionadas. Estos resultados podrían deberse al efecto de los aminoácidos contenidos en la C4 para mejorar las defensas antioxidantes. Se ha reportado que la arginina y la glicina aumentan la cantidad de superóxido dismutasa de cobre / zinc (Cu / Zn-SOD), una enzima antioxidante capaz de reducir el ion superóxido a peróxido de hidrógeno (Ruíz-Ramírez *et al.* 2013; Ren, *et al.*, 2014). Por otro lado, la arginina tiene actividad antioxidante debido a su capacidad para eliminar radicales libres como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Ahmad *et al.*, 2015). Mientras que la glicina es un precursor del glutatión (glutamil-cisteinil-glicina), un tripéptido con potencial antioxidante mediado por: i) una reacción acoplada a la peroxidasa; ii) una regulación del sulfhidrilo celular y el equilibrio redox; y iii) una regulación de la expresión/activación de los factores de transcripción sensibles al estado redox (Haddad and Harb, 2005; Amin *et al.*, 2016).

Otro efecto de la Ang II relevante para la disfunción endotelial, es la disminución de la biodisponibilidad del ON (Li and Förstermann, 2013; González *et al.*, 2014). Al incrementar las concentraciones de ROS intracelular, estos pueden desacoplar a la eNOS, y como consecuencia esta enzima generará $O_2^{\bullet-}$ en vez de ON (Wang *et al.*, 2000; Li and Förstermann, 2013). Esto favorecerá el estado oxidante y vasoconstrictor del endotelio que, de mantenerse de manera prolongada, puede conducir al desarrollo de la hipertensión (Pignatelli *et al.*, 2018). Los resultados *in vitro* mostraron que la C4 evitó la disminución de los niveles de ON inducida por Ang II, mientras que *in vivo*, reguló la presión arterial. Estos resultados podrían deberse en parte, a la arginina, glicina y ácido aspártico en SF1 y SF3. Los tres aminoácidos tienen la capacidad de atenuar la hipertensión en diversos modelos murinos, a través de mecanismos que implican el aumento tanto de la eNOS como de su sustrato para sintetizar ON (El Hafidi *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2017). Por un lado, la glicina incrementa la expresión del mRNA de la eNOS así como también la producción de la proteína misma (Gómez-Zamudio *et al.*, 2015; Ruíz-Ramírez *et al.*, 2013). Por otro, la arginina además de ser el sustrato

de la eNOS (Hnia *et al.*, 2008), estimula la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt, lo que favorece la activación de la eNOS, la producción de ON y sus efectos vasodilatadores, mejorando así la función endotelial y la presión arterial (Ren *et al.*, 2014). Por último, pese a que el ácido aspártico no está directamente involucrado con la síntesis de ON, este aminoácido puede ser convertido en argininosuccinato por la argininosuccinato sintetasa. Posteriormente se convierte en arginina por la argininosuccinato liasa, de esta manera se favorece la disponibilidad del sustrato para la eNOS y con ello la producción de ON (Hou *et al.*, 2017).

Además de ser un potente vasodilatador, el ON derivado de la eNOS, es una molécula de señalización que juega un papel esencial en el remodelado vascular (Yan *et al.*, 2012). Al disminuir su biodisponibilidad, se promueve la proliferación de las células de músculo liso vascular y, por ende, aumenta el grosor de la capa media de los vasos, mientras que disminuye la luz de los mismos, contribuyendo así a la hipertensión (Gao *et al.*, 2014; Ghimire *et al.*, 2017). En los resultados obtenidos *in vivo*, la C4 revirtió el remodelado micro- y macrovascular inducido por la Ang II. Esto se relaciona estrechamente con el efecto de la glicina, arginina y ácido aspártico sobre su capacidad para aumentar la producción de ON por la eNOS (Gómez-Zamudio *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2017) y en consecuencia controlar la proliferación de las células de músculo liso vascular. Por otro lado, se ha reportado que la arginina incrementa la expresión del homólogo de la proteína 2 del regulador de la información silenciosa (SIRT-1) (Rizk *et al.*, 2014). Esta proteína funciona como una histona deacetilasa de la proteína activadora 1 (AP-1) por lo que modula la formación de la capa neointima a través de la reducción de la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular (Gao *et al.*, 2014).

La disfunción endotelial inducida en las arteriolas, capilares glomerulares y peritubulares conducen a la alteración en la función del riñón y contribuye al desarrollo de enfermedades renales agudas y crónicas (Guerrot y Bellien, 2014), como la glomeruloesclerosis, caracterizada por el aumento del volumen mesangial

(Anderson *et al.*, 1993, Orth *et al.*, 1994). La producción de ROS inducida por la Ang II conduce a la hiperplasia e hipertrofia de diferentes tipos celulares, aumenta la expresión de citocinas y moléculas de adhesión. Estas alteraciones promueven la síntesis de proteínas de la matriz extracelular a través de la activación de las células mesangiales y fibroblastos intersticiales y tubulares, la estimulación del inhibidor del activador del plasminógeno 1 y la infiltración y activación de macrófagos, que potencian aún más la inflamación y la fibrosis (Mezzano *et al.*, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001, 2006; Trejo *et al.*, 2018). En el presente trabajo, los ratones tratados con Ang II desarrollaron en riñón alteraciones estructurales como el depósito de fibras de colágeno, infiltración de células mononucleares (linfocitos, macrófagos y fibroblastos) y aumento del área mesangial y glomerular. El tratamiento con la C4 revirtió la mayoría de esos parámetros. Este resultado podría deberse al efecto de la glicina y arginina en la C4, que como ya se ha mencionado, ambos aminoácidos pueden controlar el evento inflamatorio a través de diversos mecanismos (Hnia *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2014; Amin *et al.*, 2016; Morais *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que la arginina incrementa la expresión de Nrf2 (Ramprasath *et al.*, 2012), un factor de transcripción que favorece la expresión de los genes citoprotectores como los de las enzimas de fase 2 (hemo oxigenasa-1, glutatión-S-transferasa A1 y NAD(P)H: quinona oxidorreductasa 1) (Korkina L., 2007), que pueden contrarrestar los daños fibrinogénicos y oxidativos (Oh *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2009, 2014).

Finalmente, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) está siendo reconocida como un desorden común presente en una gran variedad de enfermedades como la hipertensión (Brunt 2004). La NASH se caracteriza por la presencia de hígado graso, daño en los hepatocitos, fibrosis e inflamación (Brunt 2004, de Alwis y Day, 2008). En los resultados obtenidos *in vivo* se observó que todos los grupos desarrollaron hígado graso, lo cual no fue revertido por ninguno de los tratamientos. El desarrollo de hígado graso en estos casos posiblemente se debió a la edad de los animales, ya que se ha reportado que la prevalencia de hígado graso incrementa con la edad (Xiong *et al.*, 2014). Por otro lado, en el hígado, la estimulación del AT1R activa a la cinasa Janus 2 (JAK2), lo que

promueve la activación de Arhgef1, un factor intercambiador de nucleótidos responsable de la activación de RhoA, que en respuesta estimula a la cinasa Rho (ROK). La vía de la RhoA/Rho cinasa es crucial para el desarrollo de fibrosis en el hígado e hipertensión portal (Granzow *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se observó que la C4 revirtió el depósito de fibras de colágeno en la capsula de Glisson y en las trabéculas. Uno de los mecanismos por los que se obtuvo ese efecto quizá se deba a la arginina, ya que se ha reportado que este aminoácido disminuye la expresión de ROK (Chuang *et al.*, 2011), por lo que la disminución de esta cinasa podría contribuir al control de la fibrosis en este órgano.

Todo lo anterior, indica que el tratamiento con la C4 o sus componentes podría utilizarse como un tratamiento capaz de controlar de manera integral los parámetros de la disfunción endotelial y sus consecuencias.

10. CONCLUSION



Los efectos de las subfracciones SF1 y SF3 sugieren su uso potencial para el tratamiento de diversas patologías asociadas a la disfunción endotelial debido a su capacidad de controlar la inflamación, el estrés oxidativo, remodelado vascular, daño hepático y renal.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la capacidad de la SF1 y SF3 para regular la activación de la PCK inducida por la Ang II.
- Determinar el efecto de las SF1 y SF3 para controlar la activación de NF-κB inducida por Ang II.
- Evaluar el efecto de las SF1 y SF3 sobre el estrés oxidante *in vivo*.
- Evaluar el efecto de un extracto hidroalcohólico de *Cucumis sativus* estandarizado en las SF1 y SF3 para controlar la disfunción endotelial *in vivo*.

Article

Cucumis sativus Aqueous Fraction Inhibits Angiotensin II-Induced Inflammation and Oxidative Stress In Vitro

Celeste Trejo-Moreno ^{1,2}, Marisol Méndez-Martínez ^{1,2}, Alejandro Zamilpa ³ , Enrique Jiménez-Ferrer ³ , María Dolores Perez-García ³, Omar N. Medina-Campos ⁴, José Pedraza-Chaverri ⁴, María Angélica Santana ⁵, Fernando R. Esquivel-Guadarrama ², Aida Castillo ⁶, Jacquelynne Cervantes-Torres ⁷, Gladis Fragoso ⁷ and Gabriela Rosas-Salgado ^{2,*}

¹ Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos CP 62209, Mexico; trejomc@hotmail.com (C.T.-M.); mm.mary87@gmail.com (M.M.-M.)

² Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Leñeros S/N, Cuernavaca, Morelos CP 62350, Mexico; fernando.esquivel@uaem.mx

³ Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Republica de Argentina 1, Xochitepec, Morelos CP 62790, Mexico; azamilpa_2000@yahoo.com.mx (A.Z.); enriqueferrer_mx@yahoo.com (E.J.-F.); lola_as@yahoo.com.mx (M.D.P.-G.)

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico City CP 04510, Mexico; omarnoelmedina@gmail.com (O.N.M.-C.); pedrazachaverri@gmail.com (J.P.-C.)

⁵ Centro de Investigación en Dinámica Celular (IICBA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos CP 62209, Mexico; santana@uaem.mx

⁶ Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV del IPN), Mexico City CP 07360, Mexico; aidacast10@hotmail.com

⁷ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico City CP 04510, Mexico; jcervantes@iibiomedicas.unam.mx (J.C.-T.); gladis@unam.mx (G.F.)

* Correspondence: gabriela.rosas@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7048

Received: 2 February 2018; Accepted: 25 February 2018; Published: 28 February 2018

Abstract: Inflammation and oxidative stress play major roles in endothelial dysfunction, and are key factors in the progression of cardiovascular diseases. The aim of this study was to evaluate in vitro the effect of three subfractions (SFs) from the *Cucumis sativus* aqueous fraction to reduce inflammatory factors and oxidative stress induced by angiotensin II (Ang II) in human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) cells. The cells were cultured with different concentrations of Ang II and 0.08 or 10 µg/mL of SF1, SF2, or SF3, or 10 µmol of losartan as a control. IL-6 (Interleukin 6) concentration was quantified. To identify the most effective SF combinations, HMEC-1 cells were cultured as described above in the presence of four combinations of SF1 and SF3. Then, the effects of the most effective combination on the expression of adhesion molecules, the production of reactive oxygen species (ROS), and the bioavailability of nitric oxide (NO) were evaluated. Finally, a mass spectrometry analysis was performed. Both SF1 and SF3 subfractions decreased the induction of IL-6 by Ang II, and C4 (SF1 and SF3, 10 µg/mL each) was the most effective combination to inhibit the production of IL-6. Additionally, C4 prevented the expression of adhesion molecules, reduced the production of ROS, and increased the bioavailability of NO. Glycine, arginine, asparagine, lysine, and aspartic acid were the main components of both subfractions. These results demonstrate that C4 has anti-inflammatory and antioxidant effects.

Keywords: inflammation; ROS; angiotensin II; *Cucumis sativus*

1. Introduction

Inflammation and oxidative stress are two significant hallmarks of endothelial dysfunction and play a critical role in the pathogenesis of circulatory disorders such as hypertension, coronary artery disease, chronic heart failure, peripheral artery disease, and chronic renal failure. These diseases are the main causes of morbidity and mortality in the world [1]. Angiotensin II (Ang II) has been implicated in the pathology of endothelial dysfunction as a source of inflammation and oxidative stress [2,3]. Ang II binds to type-1 angiotensin receptors (AT1R) on endothelial cells and promotes the activation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) oxidase, which in turn increases the levels of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), a reactive oxygen species (ROS) that decreases the bioavailability of nitric oxide (NO), which is necessary to maintain vascular tone [4,5]. Additionally, $O_2^{\bullet-}$ uncouples endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and oxidizes tetrahydrobiopterin (BH4), its cofactor, leading to further production of $O_2^{\bullet-}$ instead of NO [6].

The presence of ROS is detected by proteins sensitive to the redox status of the cell; in turn, these proteins activate AKT (Protein kinase B), MAPKs (mitogen-activated protein kinases), and NF- κ B (Nuclear factor kappa B) [7–10], triggering inflammation and promoting the synthesis of IL-1 β , IL-6, TNF- α , C reactive protein, E-selectin, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), and MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), among other molecules [11–14].

Plant-derived products are attractive sources of new active ingredients for medicines, pharmacological tools, and to control various diseases improving the quality of life of patients suffering from long-lasting diseases [15]. Cucumber (*Cucumis sativus*) is a member of the Cucurbitaceae family, which includes species with therapeutic potential such as melon, squash, and pumpkin. It is a popular crop used in Indian traditional medicine since ancient times. Traditionally, this plant has been used to treat headaches and hyperlipidemia, and to prevent constipation. Seeds and the fruit have refreshing properties, soothing irritated skin and reducing swelling [16,17]. Moreover, cucumber has been reported to have antiinflammatory and antioxidant properties [17,18]. This study was aimed to evaluate the in vitro effect of the SF1, SF2, and SF3 subfractions from the *C. sativus* aqueous fraction to downregulate the inflammatory and oxidative effects induced by Ang II in human endothelial cells, and to identify the molecules potentially involved in these effects. SF1 and SF3, either alone or in combination, significantly downregulated the inflammatory and oxidative effects induced by Ang II in endothelial cells. Amino acids such as glycine, arginine, asparagine, lysine, and aspartic acid seem to be responsible for this effect.

2. Material and Methods

2.1. Plant Material and *Cucumis sativus* Subfractions

Cucumis sativus aerial parts, including fruits, were collected from an edible crop free from pesticides and fertilizers in Xochitepec, Mexico, from July through August. The plant material was kept away from light at room temperature and dried in an oven at 50 °C for 36 h. Extracts were obtained immediately once the material was completely dried. Dry plant material was ground in a Pulvex electric mill (Büchi R-114, Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland) until particles smaller than 4 mm were obtained. An exhaustive maceration process with ethanol/water (60:40 v/v) was performed at room temperature to obtain the hydroalcoholic extract. This extract was concentrated by reduced-pressure distillation under controlled temperature and then lyophilized. A sample of this extract (50 g) underwent bipartition with ethyl acetate/water, obtaining the aqueous fraction. This fraction was concentrated by reduced-pressure distillation under controlled temperature. Thirty-five grams of the *Cucumis sativus* aerial parts, including fruits, were collected from an edible crop free from pesticides and fertilizers in Xochitepec from July through August. The plant material was kept away from light at room temperature and dried in an oven at 50 °C for 36 h; aqueous fractions were suspended in methanol (700 mL) for 24 h; the liquid phase was filtered and concentrated in a rotary-evaporator (Laborota 4000, Heidolph, Schwabach, Germany), yielding the subfraction SF1, which was dried by lyophilization. On the other

hand, the organic phase was suspended in acetone (700 mL), yielding the subfractions SF2 (soluble phase) and SF3 (precipitate), which finally were concentrated under reduced pressure and lyophilized.

2.2. Thin-Layer Chromatography

To estimate the chemical profile of the subfractions under study, normal- and reverse-phase thin-layer chromatography (TLC) assays were performed using commercially available standards (rutin, quercetin, glucose, glycine, alanine, serine, valine, leucine, asparagine, aspartic acid, lysine, glutamic acid, and arginine). The systems dichloromethane:methanol (7:3 *v/v*), ethyl acetate:methanol:water:glacial acetic acid (7:2:2:0.5 *v/v/v/v*), and *n*-butanol:acetone:glacial acetic acid:water (35:35:10:20 and 70:70:20:10 *v/v/v/v*) were used as solvents for normal-phase TLC, while water:acetonitrile (7:3 *v/v*) was used for reverse-phase TLC. Once the plates were developed, spots were visualized with 4-hydroxybenzaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) and aminoethanol dimethylborate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for flavonoids, and ninhydrin (Merck) for amino acids, following the supplier's directions.

2.3. Mass Spectrometry

To identify the compounds responsible for the biological activities of SF1 and SF3, a mass spectrometry analysis was performed at the facilities of the Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (CIBIS, Xochitepec, Mexico). A 500 µg sample was diluted in trifluoroacetic acid 0.05% to a final concentration of 50 µg/mL. Glycine, arginine, lysine, leucine, isoleucine, aspartate, and glutamate (Sigma) diluted to the same concentration were used as standards. All samples were analyzed in a triple quadrupole TQD mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) coupled to an Acquity liquid chromatograph (Waters) through a combined electrospray-APCI Z-spray ion source. All samples were analyzed in positive and negative ion modes. Finally, amino acids were identified in the samples by mass spectra comparison with the standards.

2.4. Cell Culture

Human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) were provided by Aida Castillo from the Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, México City. The cells were cultured in MCDB-131 medium supplemented with fetal serum bovine (FBS) %, L-glutamine 10 mM, 100 U/mL of penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 ng/mL of endothelial growth factor, and 1 µg/mL of hydrocortisone (Sigma) at 37 °C under a CO₂ atmosphere (5%). All experiments were performed using passages 3 to 8. The cells were cultured in 24-well plates to a density of 5×10^5 cells/well in 500 µL of medium supplemented with Ang II at a concentration of 0, 8, 40, 200, 1000, or 5000 nM and 0.08 or 10 µg/mL of SF1, SF2, or SF3, either for 12 h to evaluate the antiinflammatory effect, or for 6 h to evaluate the antioxidant profile of the subfractions. As a control, HMEC-1 cells were treated with 10 µmol of losartan [19] instead of the subfractions. In some experiments, the subfractions SF1 and SF3 were combined at a concentration of 0.08 µg/mL each (C1), SF1 0.08 µg/mL and SF3 10 µg/mL (C2), SF1 10 µg/mL and SF3 0.08 µg/mL (C3), and SF1 and SF3 (10 µg/mL each) (C4). For ROS and NO determination, the cells were stimulated with Ang II 5000 nM.

2.5. Immunocytochemistry

HMEC-1 cells were cultured on poly-L-lysine-coated coverslips in 24-well plates under the conditions described above. By the end of culture time, the cells were washed three times with PBS (Phosphate Buffer solution) (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, and K₂HPO₄ 1.15 mM) and fixed in acetone for 15 min. Endogenous peroxidase was blocked with H₂O₂ 30% for 10 min. Then, the cells were incubated with PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 0.1%-Tween 20 0.05% (Sigma) to block unspecific binding sites. The cells were incubated with primary mouse anti-human anti-ICAM-1 and anti-E-selectin antibodies (1:100 and 1:50, respectively) (eBioscience, Waltham, MA, USA) overnight at 4 °C. The cells were washed with PBS and incubated with goat anti-mouse biotinylated IgG antibody (1:500) (Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 30 min at 37 °C, followed by incubation with HRP (horseradish peroxidase)-streptavidin (eBioscience). The chromogenic substrate 3,3'-diaminobenzidine (BioCare Medical, Pacheco, CA, USA) was added, and 5 min later the reaction was stopped by washing the slides with water. Then, the cells were counterstained with hematoxylin. Images were obtained with an ECLIPSE 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

2.6. Western Blot

HMEC-1 cells were washed with PBS and lysed by incubating with ice-cold RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) lysis buffer (Tris 20 mM, pH 7.4; NaCl 150 mM, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 1 mM, pH 7.4; Triton X-100 0.5%; SDS (Sodium dodecyl sulfate) 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%), using a cocktail of phosphatase and protease inhibitors (sodium fluoride (NaF) 25 mM; sodium pyrophosphate (NaPPi) 1 mM; sodium vanadate (NaVPO₄) 1 mM; phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM; pepstatin A 0.1 mg/mL; leupeptin 0.1 mg/mL; antipain 0.1 mg/mL; aprotinin 0.1 mg/mL) (Sigma) for 15 min. The lysates were scraped off the plates and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. Proteins in the supernatant were quantified by the Lowry method. Twenty micrograms of protein were denatured by boiling for 5 min in sample buffer, separated by SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) in acrylamide 10% gels and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck) using transfer buffer (Tris 25 mM, pH 8.5; glycine 193 mM; methanol 20%). Membranes were blocked for 1 h in blocking buffer TBS-T (Tris-buffered saline containing Tween-20) 0.1% with BSA, 2%. Thereafter, the membranes were incubated overnight with primary anti-E-selectin (Invitrogen) or anti- α -actin (Biolegend, San Diego, CA, USA) antibodies diluted 1:1000 or 1:3000, respectively, in blocking buffer. After washing three times for 5 min with TBS-T, the blots were incubated with goat anti-mouse (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) or anti-rabbit (Abcam, Cambridge, UK) antibodies, diluted 1:2500. Antibody binding was detected with the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate solution (Thermo Scientific). The bands were analyzed using the ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) and the anti-actin signal was used for data normalization.

2.7. ROS Quantification

Intracellular ROS levels were quantified by dihydroethidium (DHE), which is oxidized by superoxide to yield ethidium; the latter binds nuclear DNA and emits a red fluorescence (535 nm Ex; 610 nm Em). The substrates NADH (1 mM), succinate (5 mM), L-arginine (1 mM), and xanthine (1 mM) were added to identify ROS sources, along with the inhibitors: DPI (Diphenyleneiodonium) (0.1 mM) to inhibit NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase; antimycin (0.05 mM) for mitochondrial complex II; L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester) (1 mM) for eNOS; and allopurinol (0.02 mM) for xanthine oxidase.

Fifteen minutes later, the cells were incubated with DHE 20 μ M and washed three times with warm PBS. Then, the cells were placed in fresh medium, analyzed, and photographed in a Cytation 5 cell imager multimodal plate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA), using the Gen 5 software (Biotek Instruments) under a 20 \times objective. Finally, the intensity of DHE emission was quantified with Metamorph v. 6.1 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

2.8. ELISA

Cell culture medium was collected after a 12-h culture, and IL-6 concentration was measured by ELISA (OptEIA kit BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) following the manufacturer's directions. Briefly, 96-well plates were sensitized with the capture antibody overnight at 4 °C. The plates were blocked with PBS-FBS 10% for 1 h at room temperature. Then, either medium or the IL-6 standard was added and incubated at room temperature for 2 h, followed by incubation for 1 h at room temperature with the horseradish peroxidase-coupled detection antibody. The chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB) (Invitrogen) was added, and the reaction was stopped 30 min later with

H₂SO₄ 2N. Absorbance was determined at 450 nm at 37 °C using a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). IL-6 concentration was calculated according to a standard curve.

The results obtained were used to plot a concentration–response curve and to determine the maximal effect (E_{\max}) and effective 50% concentration (EC_{50}) values for each subfraction.

2.9. NO Quantification

NO levels were measured as nitrite/nitrate (final products of NO metabolism) by the Griess reaction [20]. A 100- μ L aliquot of the medium was placed in 96-well plates and incubated with 100 μ L of Griess reagent ((1-naphthyl)-ethylenediamine 0.1% and 1% sulfanilamide in phosphoric acid 2.5%) for 30 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm in a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices). The amount of NO in each sample was determined by a sodium nitrite standard curve.

2.10. Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SD (standard deviation). Significant differences among conditions were determined by ANOVA and the post-hoc Tukey test, with a significance value of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. SF1 and SF3 Controlled IL-6 Production

As seen in Figure 1, the production and release of IL-6 by endothelial cells exposed to the Ang II stimulus showed a concentration-dependent behavior, $E_{\max} = 31.4$ pg/mg and $EC_{50} = 14.9$ nM. Treatment with losartan, a pharmacological antagonist (a competitive inhibitor of AT1R), decreased the values of the pharmacological constants of Ang II, $E_{\max} = 19.7$ pg/mg and $EC_{50} = 5.8$ nM. On the other hand, both concentrations (0.08 and 10 μ g/mL) of SF1 and SF3 antagonized the effect of Ang II: $E_{\max} = 21.3$ pg/mg and $EC_{50} = 5.8$ nM (panel A); $E_{\max} = 20.4$ pg/mg and $EC_{50} = 4.3$ nM (panel D); $E_{\max} = 19.2$ pg/mg and $EC_{50} = 3.5$ nM (panel C); and $E_{\max} = 17.4$ pg/mg and $EC_{50} = 4.9$ nM (panel F). Finally, SF2 failed to control IL-6 production in any of the assessed concentrations: $E_{\max} = 24.7$ pg/mg and $EC_{50} = 4.4$ nM (panel B), and $E_{\max} = 27.0$ pg/mg and $EC_{50} = 4.0$ nM (panel E).

3.2. C4 Is the Best Combination to Control IL-6 Production

To identify the most effective combination of the subfractions to control the proinflammatory status, HMEC-1 cells were cultured with Ang II and four different combinations of SF1 and SF3. Concentration–response curves showed an $E_{\max} = 33.0$ pg/mg and $EC_{50} = 16.9$ nM for Ang II; losartan antagonized the effect of Ang II, $E_{\max} = 19.2$ pg/mg and $EC_{50} = 4.4$ nM (Figure 2). All four combinations decreased the value of these pharmacological constants; nevertheless, C4 was the most effective: $E_{\max} = 23.6$ pg/mg and $EC_{50} = 4.3$ nM (panel A); $E_{\max} = 18.1$ pg/mg and $EC_{50} = 3.1$ nM (panel B); $E_{\max} = 20.5$ pg/mg and $EC_{50} = 3.9$ nM (panel C); and $E_{\max} = 16.7$ pg/mg and $EC_{50} = 2.9$ nM (panel D).

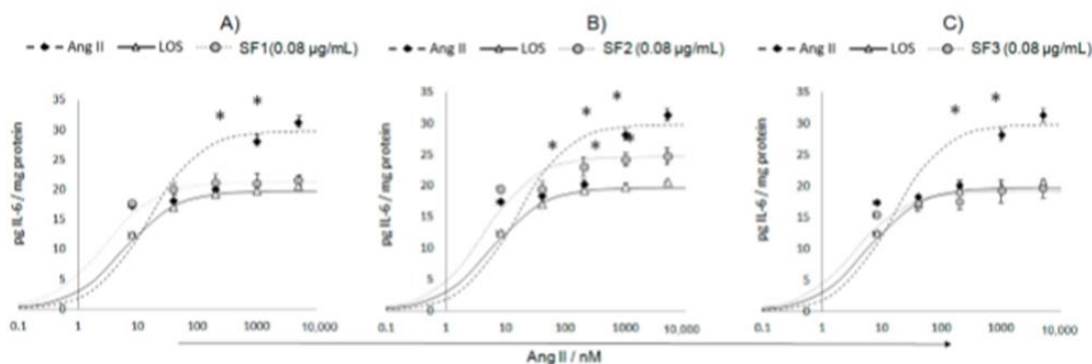


Figure 1. Cont.

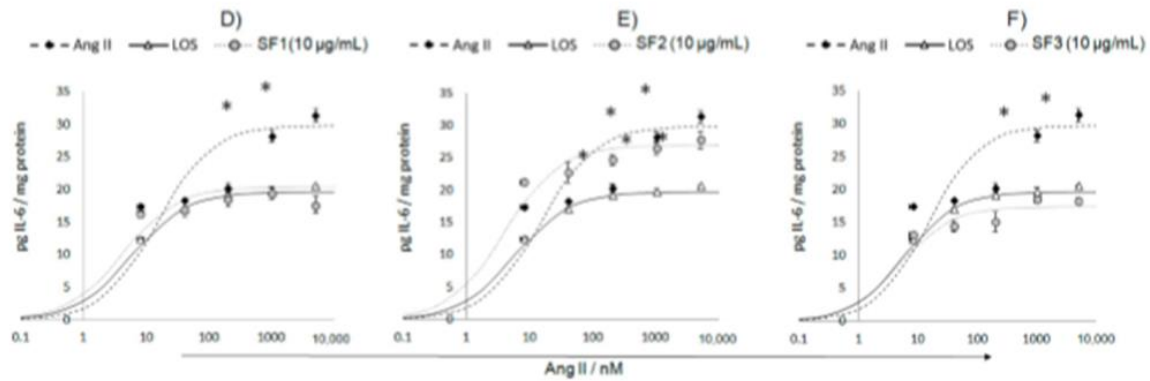


Figure 1. Concentration–response curves of the subfractions evaluated on Ang II (angiotensin II)-induced IL-6 (Interleukin 6) production, 12 h after treatment. (A–C) Effect of 0.08 µg/mL of SF1 (subfraction 1), SF2, and SF3; (D–F) Effect of 10 µg/mL of SF1, SF2, and SF3. Human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) cells were co-cultured with the concentrations of Ang II specified above. Losartan (LOS) was used as a positive control. Data are reported as mean ± SD (standard deviation) and were analyzed by ANOVA and the post-hoc Tukey test. $n = 5$, * $p < 0.05$ vs. control (Ang II-free).

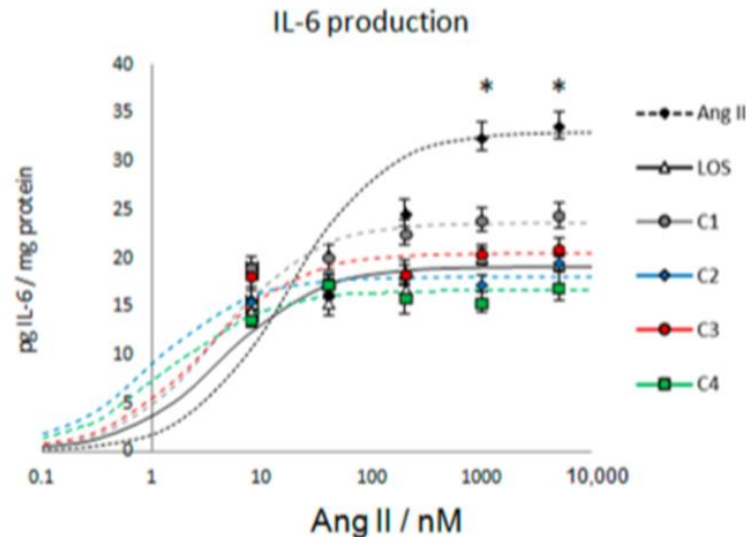


Figure 2. Concentration–response curves of the assessed combinations on Ang II-induced IL-6 production, 12 h after treatment. Losartan (LOS) was used as a positive control. C1 = 0.08 µg/mL of SF1 and 0.08 µg/mL of SF3; C2 = 0.08 µg/mL of SF1 and 10 µg/mL of SF3; C3 = 10 µg/mL of SF1 and 0.08 µg/mL of SF3; C4 = 10 µg/mL of SF1 and 10 µg/mL of SF3. Data are reported as mean ± SD and were analyzed by ANOVA and the post-hoc Tukey test. $n = 5$, * $p < 0.05$ vs. control (Ang II-free).

3.3. C4 Prevented E-Selectin and ICAM-1 Expression

Along with cytokine production, a well-known proinflammatory parameter induced by Ang II is the expression of adhesion molecules. Thus, the capacity of C4 to prevent the expression of E-selectin (Figure 3) and ICAM-1 (Supplementary Figure S1) was evaluated. Our results indicate that HMEC-1 cells expressed both adhesion molecules in the presence of Ang II 1000 and 5000 nM. This expression was diminished by C4, even at the highest Ang II concentration tested. Similar results were obtained with losartan.

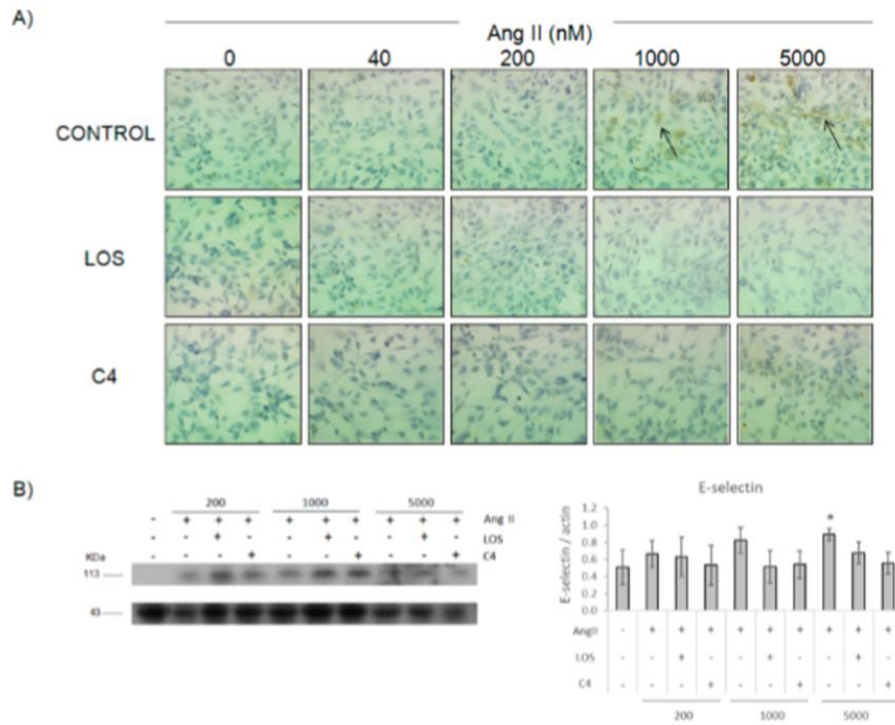


Figure 3. Effect of C4 on Ang II-induced E-selectin expression, 12 h after treatment. Immunocytochemistry (A). Western blot and expression relative to actin (B). Arrows indicate the E-selectin label. Microphotographs were taken with a 40× objective. LOS: Losartan; C4: Combination of SF1 and SF3, 10 µg/mL each. Data are reported as mean ± SD and were analyzed by ANOVA and the post-hoc Tukey test. *n* = 4, * *p* < 0.05 vs. control (Ang II-free).

3.4. C4 Favored NO Bioavailability

The decrease in NO bioavailability is a key marker of oxidative stress induced by Ang II. Thus, we assessed the capacity of C4 to prevent a reduction in NO availability by the Griess reaction. As shown in Figure 4, Ang II caused a small but significant reduction in NO bioavailability; this effect was abolished by C4, maintaining this parameter at levels similar to Ang II-free and losartan controls.

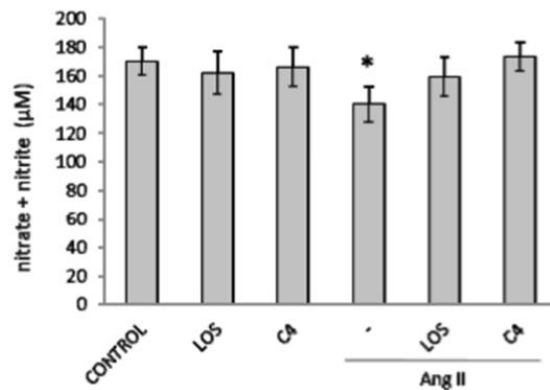


Figure 4. Effect of C4 on nitric oxide (NO) availability. HMEC-1 cells were stimulated with LOS or C4 or with Ang II 5000 nM plus LOS or C4. Data are reported as mean ± SD (standard deviation) and were analyzed by ANOVA and the post-hoc Tukey test. *n* = 5, * *p* < 0.05 vs. control (Ang II-free). LOS: Losartan; C4: Combination of SF1 and SF3, 10 µg/mL each.

3.5. C4 Prevented Ang II-Induced ROS Increase

Ang II promotes oxidative stress by inducing the activation of enzymes such as NADH oxidase, the respiratory chain, eNOS, and xanthine oxidase. Thus, we evaluated the effect of C4 on the production of ROS by these enzymes. As shown in Figure 5, Ang II significantly increased the generation of ROS by the four enzymes assessed. C4 significantly prevented ROS formation, reducing the levels of NADH oxidase-derived ROS by 78.3%, a value similar to those obtained with losartan (85.5%) and the selective inhibitor DPI (66.1%; Figure 5, panels A,B). With respect to mitochondrial ROS, C4 decreased their levels by 83.4%, while the decrease due to losartan was 72.6%, and that due to antimycin was 87.1% (Figure 5, panels C,D). Additionally, C4 reduced ROS production by eNOS (74.5%; Figure 5, panels E,F) and xanthine oxidase (87.7%; Figure 5, panels G,H) to a similar extent as losartan (81.3% and 90.9%), L-NAME (60.7%), and allopurinol (89.5%).

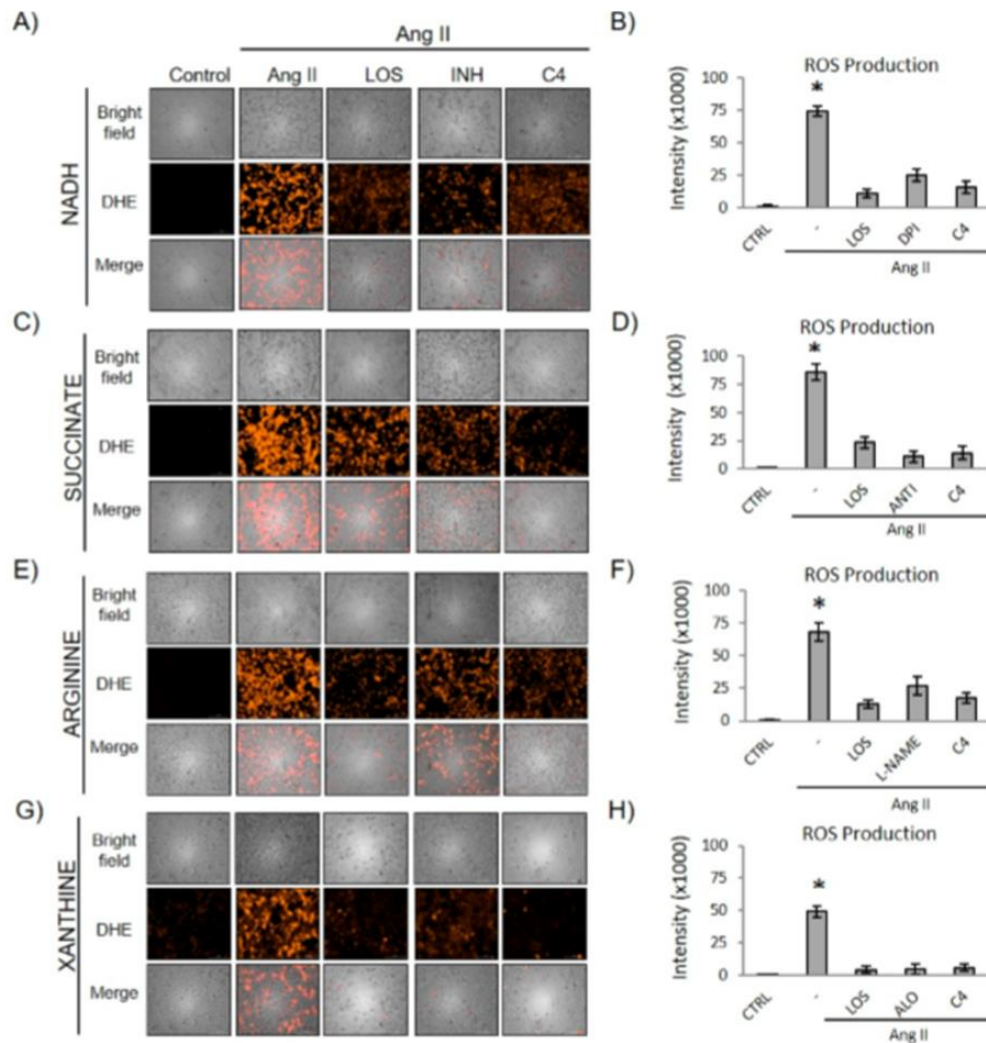


Figure 5. Effect of C4 on the production of $O_2\bullet^-$ from four different reactive oxygen species (ROS) sources, NADH (A,B), Succinate (C,D), Arginine (E,F) and Xanthine (G,H). HMEC-1 cells were stimulated with Ang II 5000 nM for 6 h. Representative microphotographs were taken with a 20 \times objective (A,C,E,G). Data are reported as mean \pm SD and were analyzed by ANOVA and the post-hoc Tukey test. $n = 5$, * $p < 0.05$ vs. control (Ang II-free), (B,D,G,H). LOS: Losartan; INH: Respective inhibitor; C4: Combination of SF1 and SF3, 10 μ g/mL each; DHE: Dihydroethidium; ROS: reactive oxygen species; ALO: allopurinol; CTRL: Control; DPI: Diphenyleneiodonium; NADH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ANTI: antimycin; L-NAME: N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester.

3.6. Identification of Major Compounds

To identify the compounds in SF1 and SF3 with potential biological effects, a thin-layer chromatography assay was performed. The results (Supplementary Figure S2) indicated that amino acids are the major compounds in the subfractions. Mass spectrometry results are shown in Table 1 and Supplementary Figure S3. Positive ionization produced precursor peaks with molecular weights of 58.84, 133.93, 146.97, and 157.01 Da, matching the glycine, aspartic acid, lysine, and arginine standards, respectively, being the former the major amino acid in both subfractions. On the other hand, negative ionization produced a precursor peak with a molecular weight of 132.98 Da, corresponding to the asparagine standard.

Table 1. Amino acids identified in the subfractions SF1 and SF3 from *Cucumis sativus* aqueous fraction by mass spectrometry.

Ion Mode	Precursor Peak (m/z)	Amino Acid	Molecular Formula	Reported Bioactivity	References
Positive	58.84–58.88	Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	Reduces TNF- α , IL-6, COX-2, and NF- κ B. Improves the bioavailability of NO. Increases GSH, SOD, and eNOS.	[21–27]
Negative	132.98	Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	Downregulates caspase-3, TNF- α , and TLR4 and its downstream signaling.	[28]
Positive	133.93–133.96	Aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	No activity reported.	-
Positive	146.97–147.00	Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	No activity reported.	-
Positive	175.01–175.06	Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	NO precursor. Reduces IL-17 and NF- κ B. Inhibits iNOS. Increases SOD and PI3K. Scavenger activity.	[29–32]

TNF- α : tumor necrosis factor α ; IL-6: Interleukin 6; COX-2: Cyclooxygenase-2; NF- κ B: Nuclear factor kappa B; NO: nitric oxide; GSH: Glutathione; SOD: superoxidase dismutase; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; TLR4: Toll-like receptor 4; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; PI3K: phosphoinositide 3-kinase.

4. Discussion

Inflammation and oxidative stress are strongly associated with the progression of endothelial dysfunction; in turn, the latter is the physiopathological substrate of several cardiovascular diseases with high impact on mortality indices such as myocardial infarction, cerebrovascular disease, and chronic renal failure [33–35]. Thus, treatments to control both conditions are emerging as key therapies against these high-impact diseases [1].

Whilst endothelial dysfunction was induced in HMEC-1 cells by adding Ang II to the culture medium in concentrations much larger than physiological levels, these concentrations proved to be the most effective conditions to induce endothelial dysfunction in vitro in this cell line. Several studies have used this Ang II dose-range to induce inflammatory and oxidative responses [36–40]. On the other hand, HMEC-1 cells were chosen as a model because they are employed in various studies to induce endothelial dysfunction, increasing the production of ROS and inflammatory factors [41–43].

The subfractions SF1, SF2, and SF3 from the *C. sativus* aqueous fraction were evaluated herein for their capacity to prevent Ang II-induced inflammation and oxidative stress in vitro. Losartan, an AT1R antagonist, is capable of inhibiting the downstream effects of its activation. Our findings indicate that SF1 and SF3 modulated several inflammatory and oxidative parameters as effectively as losartan. These results could be due to glycine and arginine, the main compounds detected in SF1 and SF3. Both amino acids have been reported to have anti-inflammatory effects since they inhibit the expression of IL-6, IL-1 β , IL-17, TNF- α , and cyclooxygenase 2, as well as macrophage infiltration; they also downregulate the activity of NF- κ B [21–24,29–31]. However, as shown by chromatography, other compounds, related to polysaccharides, were also present in the three subfractions; these compounds could also be exerting anti-inflammatory and anti-oxidant effects

as observed in other plants of the family Cucurbitaceae [44,45]. Thus, the overall effect of the assayed subfractions on endothelial dysfunction could be due to the combined effect of amino acids and polysaccharides present in these subfractions.

Ang II is an octapeptide; upon binding the receptor AT1R in the endothelial cell, it promotes the MAPK signaling cascade that leads to the activation of the inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase (IKK); in turn, IKK phosphorylates I κ B. After being phosphorylated, I κ B is degraded and NF- κ B translocates into the nucleus. NF- κ B is a transcription factor that controls the expression of genes involved in inflammation such as IL-6, E-selectin, and ICAM-1 [46]. It has been reported that when glycine binds its receptor (GlyR), which is an ionotropic or ligand-gated receptor, it contributes to hyperpolarizing cells such as macrophages, hindering its activation [25]. Other authors [21,47] have reported that this hyperpolarization inhibits the MAPK pathway. Then, the activation of NF- κ B induced by Ang II and its inflammatory consequences are blocked. GlyR is also expressed in endothelial cells [48,49]. Thus, glycine in SF1 and SF3 could interact with GlyR in endothelial cells, hyperpolarizing their membrane and blocking the Ang II-mediated MAPK signaling, and consequently inhibiting the activation of NF- κ B and the production of IL-6, E-selectin, and ICAM-1. L-Arginine is another amino acid which has exhibited anti-inflammatory properties in vivo and in vitro by diminishing the expression of inflammatory cytokines [29,50]. Recently, L-arginine was demonstrated to inhibit NF- κ B activation in Caco-2 cells by a mechanism involving its active transport by the cationic amino acid transporter CAT1. L-arginine also promotes the activity of eNOS to generate NO, increasing its bioavailability [50].

Ang II also has prooxidant effects and induces a decrease in NO bioavailability [5,13]. Upon binding AT1R, it triggers the signaling pathway that activates NADH oxidase to produce $O_2\bullet^-$ [4], increasing the intracellular concentration of this radical ion, and overcoming cellular antioxidant mechanisms (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase). The increase of ROS also results in eNOS uncoupling, which switches its activity on the same substrate to produce further $O_2\bullet^-$ instead of NO, increasing the prooxidative environment [6]. The results herein reported demonstrated that a combination of SF1 and SF3 (C4), 10 μ g/mL each prevented the decrease in NO levels. Glycine and arginine, the main amino acid components in both subfractions, could be responsible for this effect along with the polysaccharide content (which could not be identified). Glycine has been reported to increase the expression of eNOS mRNA and of the protein itself; thus, more enzyme is available to produce NO [23,26]. On the other hand, the substrate of eNOS is arginine [29]; consequently, SF1 and SF3 could act by simultaneously increasing the levels of the enzyme and its substrate to synthesize NO. In addition, arginine stimulates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [30], which favors eNOS activation, the production of NO, and its vasodilatory effects, thus improving endothelial function. Besides, exogenously administered L-arginine has proved to be able to attenuate Ang II-mediated hypertension in rats, reversing the vasoconstrictor effects of Ang II and restoring renal excretory function, probably by mechanisms involving a cellular increase of L-arginine uptake and NO production [51]. Although both amino acids have been reported to exert anti-inflammatory and anti-oxidant effects, the particular combination of each one, along with the presence of other (not yet identified) trace components must be relevant to the overall effect herein reported, since not all combinations were equally efficient to control endothelial dysfunction. Indeed, the C4 combination was the most effective in controlling IL-6 production, a cytokine well known for its capacity to promote inflammation. Human supplementation with any of these two amino acids has been demonstrated to modulate vascular dysfunction [52,53], and these results may support the potential use of a standardized *C. sativus* fraction to control these pathological conditions.

As previously mentioned, Ang II promotes oxidative stress by increasing ROS production. There are many potential sources of ROS in cells, including NADH oxidases, mitochondria, xanthine oxidase, and the impaired eNOS [4]. We showed that treating HMEC-1 cells with C4 (a combination of SF1 and SF3) significantly decreased the Ang II-induced ROS production from these sources. These results could be due to the effect of the amino acid constituents of C4 to improve antioxidant

defenses. Arginine and glycine have been reported to increase the amount of copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), an antioxidant enzyme capable of reducing the superoxide ion to hydrogen peroxide [26,30]. On the other hand, arginine has a proven antioxidant activity by its capacity to scavenge free radicals such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [26]. In addition, glycine is a precursor of glutathione (glutamyl-cysteinyl-glycine), a tripeptide with antioxidative effects mediated by (i) a peroxidase-coupled reaction; (ii) regulation of the cellular sulfhydryl and redox balance; and (iii) regulation of the expression/activation of redox-sensitive transcription factors [24,32].

In conclusion, the particular combination of different concentrations of glycine, arginine, and polysaccharides present in the aqueous fractions of *C. sativus* could be potentially useful to treat various pathologies associated with inflammation and oxidative stress, such as endothelial dysfunction.

5. Conclusions

Overall, this study demonstrates that the combination C4 from the SF1 and SF3 subfractions of the *C. sativus* aqueous fraction was efficient in reducing Ang II-induced inflammatory factors and oxidative stress in HMEC-1 cells.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/3/276/s1>, Supplementary Figure S1. Effect of C4 on Ang II-induced ICAM-1 expression, 12 h after treatment. Supplementary Figure S2. Thin-layer chromatography. Supplementary Figure S3. Mass spectrometry.

Acknowledgments: The authors thank Juan Francisco Rodríguez for helping in the preparation of this manuscript, Carlos Baez, Denisse Rosales Martinez and Beatriz Hernandez Tellez for their technical support, CONACYT (grant CB-2012-169011) for financial support and PRODEP for cover publication costs. Celeste Trejo Moreno is a doctoral student from Programa en Ciencias del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas and a CONACyT fellow. Zamilpa thanks foundation IMSS.

Author Contributions: C.T.-M. and G.R.-S. were responsible for experiment design, collection, analysis, and interpretation of data, and drafting the manuscript. M.M.-M., A.Z., O.N.M.-C., J.C.-T., M.D.P.-G., J.C.-T. and A.C. contributed to performing experiments. A.Z., E.J.-F., J.P.-C., G.F. and G.R.-S. contributed to the analysis and interpretation of the results. A.C., M.A.S., F.R.E.-G., G.F. and G.R.-S. helped to write the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Endemann, D.H.; Schiffrin, E.L. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1983–1992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jaimés, E.A.; Hua, P.; Tian, R.X.; Raji, L. Human glomerular endothelium: Interplay among glucose, free fatty acids, angiotensin II, and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2010**, *298*, F125–F132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Husain, K.; Hernandez, W.; Ansari, R.A.; Ferder, L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J. Biol. Chem.* **2015**, *6*, 209–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, W.; Wang, S.; Yan, L.; Madara, P.; Del Pilar Cintron, A.; Wesley, R.A.; Danner, R.L. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16899–16903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- González, J.; Valls, N.; Brito, R.; Rodrigo, R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J. Cardiol.* **2014**, *6*, 353–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, H.; Förstermann, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 161–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gloire, G.; Legrand-Poels, S.; Piette, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 1493–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nakajima, S.; Kitamura, M. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 162–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ma, X.; Dang, C.; Kang, H.; Dai, Z.; Lin, S.; Guan, H.; Liu, X.; Wang, X.; Hui, W. Saikosaponin-D reduces cisplatin-induced nephrotoxicity by repressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signalling pathways. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 399–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Ushio-Fukai, M.; Alexander, R.W.; Akers, M.; Yin, Q.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Griendling, K.K. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22699–22704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Costanzo, A.; Moretti, F.; Burgio, V.L.; Bravi, C.; Guido, F.; Levrero, M.; Puri, P.L. Endothelial activation by angiotensin II through NFκB and p38 pathways: Involvement of NFκB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *195*, 402–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Henke, N.; Schmidt-Ullrich, R.; Dechend, R.; Park, J.K.; Qadri, F.; Wellner, M.; Obst, M.; Gross, V.; Dietz, R.; Luft, F.C.; et al. Vascular endothelial cell-specific NF-κB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 268–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, W.; Li, Z.; Chen, Y.; Li, S.; Lv, Y.; Zhou, W.; Liao, M.; Zhu, F.; Zhou, Z.; Cheng, X.; et al. Autoantibodies targeting AT1 receptor from patients with acute coronary syndrome upregulate proinflammatory cytokines expression in endothelial cells involving NF-κB pathway. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bihl, J.C.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Xiao, X.; Ma, X.; Chen, Y.; Chen, S.; Zhao, B.; Chen, Y. Angiotensin-(1–7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vasc. Pharmacol.* **2015**, *73*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. De Sousa Falcão, H.; Leite, J.A.; Barbosa-Filho, J.M.; de Athayde-Filho, P.F.; de Oliveira Chaves, M.C.; Moura, M.D.; Ferreira, A.L.; de Almeida, A.B.; Souza-Brito, A.R.; de Fátima Formiga Melo Diniz, M.; et al. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: A review. *Molecules* **2008**, *13*, 3198–3223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kumar, D.; Kumar, S.; Singh, J.; Narender; Rashmi; Vashistha, B.; Singh, N. Free Radical Scavenging and Analgesic Activities of *Cucumis sativus* L. Fruit Extract. *J. Young Pharm.* **2010**, *2*, 365–368.
17. Mukherjee, P.K.; Nema, N.K.; Maity, N.; Sarkar, B.K. Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia* **2013**, *84*, 227–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Heidari, H.; Kamalinejad, M.; Noubarani, M.; Rahmati, M.; Jafarian, I.; Adiban, H.; Eskandari, M.R. Protective mechanisms of *Cucumis sativus* in diabetes-related models of oxidative stress and carbonyl stress. *Bioimpacts* **2016**, *6*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Yamamoto, S.; Zhong, J.; Yancey, P.G.; Zuo, Y.; Linton, M.F.; Fazio, S.; Yang, H.; Narita, I.; Kon, V. Atherosclerosis following renal injury is ameliorated by pioglitazone and losartan via macrophage phenotype. *Atherosclerosis* **2015**, *242*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **2001**, *5*, 62–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wang, H.D.; Lü, X.X.; Lu, D.X.; Qi, R.B.; Wang, Y.P.; Fu, Y.M.; Wang, L.W. Glycine inhibits the LPS-induced increase in cytosolic Ca²⁺ concentration and TNFα production in cardiomyocytes by activating a glycine receptor. *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, *30*, 1107–1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Almanza-Perez, J.C.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Blancas-Flores, G.; Campos-Sepulveda, A.E.; Roman-Ramos, R.; Garcia-Macedo, R.; Cruz, M. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, 534–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gómez-Zamudio, J.H.; García-Macedo, R.; Lázaro-Suárez, M.; Ibarra-Barajas, M.; Kumate, J.; Cruz, M. Vascular endothelial function is improved by oral glycine treatment in aged rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *93*, 465–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Amin, F.U.; Shah, S.A.; Kim, M.O. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. *Neurochem. Int.* **2016**, *96*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Froh, M.; Thurman, R.G.; Wheeler, M.D. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, *283*, G856–G863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ruiz-Ramírez, A.; Ortiz-Balderas, E.; Cardozo-Saldaña, G.; Diaz-Diaz, E.; El-Hafidi, M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin. Sci.* **2014**, *126*, 19–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Haddad, J.J.; Harb, H.L. L-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: A signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 987–1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Chen, S.; Liu, Y.; Wang, X.; Wang, H.; Li, S.; Shi, H.; Zhu, H.; Zhang, J.; Pi, D.; Hu, C.A.; et al. Asparagine improves intestinal integrity, inhibits TLR4 and NOD signaling, and differently regulates p38 and ERK1/2 signaling in weanling piglets after LPS challenge. *Innate Immun.* **2016**, *22*, 577–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hnia, K.; Gayraud, J.; Hugon, G.; Ramonatxo, M.; De La Porte, S.; Matecki, S.; Mornet, D. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor- κ B/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 1509–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ren, W.; Yin, J.; Wu, M.; Liu, G.; Yang, G.; Xion, Y.; Su, D.; Wu, L.; Li, T.; Chen, S.; et al. Serum amino acids profile and the beneficial effects of L-arginine or L-glutamine supplementation in dextran sulfate sodium colitis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Morais, S.R.; Brito, V.G.B.; Mello, W.G.; Oliveira, S.H.P. L-arginine modulates inflammation and muscle regulatory genes after a single session of resistance exercise in rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2018**, *28*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ahmad, A.; Sattar, M.Z.; Rathore, H.A.; Hussain, A.I.; Khan, S.A.; Fatima, T.; Afzal, S.; Abdullah, N.A.; Johns, E.J. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of L-arginine and NaHS: A comparative in vitro study. *Acta Pol. Pharm.* **2015**, *72*, 245–252. [[PubMed](#)]
33. Tanaka, S.; Masuda, T.; Kamiya, K.; Hamazaki, N.; Akiyama, A.; Kamada, Y.; Maekawa, E.; Noda, C.; Yamaoka-Tojo, M.; Ako, J. A single session of neuromuscular electrical stimulation enhances vascular endothelial function and peripheral blood circulation in patients with acute myocardial infarction. *Int. Heart J.* **2016**, *57*, 676–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kolmos, M.; Krawczyk, R.S.; Kruuse, C. Effect of high-intensity training on endothelial function in patients with cardiovascular and cerebrovascular disease: A systematic review. *SAGE Open Med.* **2016**, *4*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mitsides, N.; Cornelis, T.; Broers, N.J.H.; Diederens, N.M.P.; Brenchley, P.; van der Sande, F.M.; Schalkwijk, C.G.; Kooman, J.P.; Mitra, S. Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pastore, L.; Tessitore, A.; Martinotti, S.; Toniato, E.; Alesse, E.; Bravi, M.C.; Ferri, C.; Desideri, G.; Gulino, A.; Santucci, A. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* **1999**, *100*, 1646–1652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gräfe, M.; Auch-Schwelk, W.; Zakrzewicz, A.; Regitz-Zagrosek, V.; Bartsch, P.; Graf, K.; Loebe, M.; Gaehtgens, P.; Fleck, E. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ. Res.* **1997**, *81*, 804–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zuo, Z.; Zuo, P.F.; Tian, X.Y.; Ma, G.S. Adiponectin ameliorates angiotensin II-induced vascular endothelial damage. *Cell Stress Chaperones* **2014**, *19*, 705–713. [[CrossRef](#)]
39. Chen, Y.; Lin, J.R.; Gao, P.J. Mitochondrial division inhibitor Mdivi-1 ameliorates angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Sheng Li Xue Bao* **2016**, *68*, 669–676. [[PubMed](#)]
40. Cao, Y.; Zheng, L.; Liu, S.; Peng, Z.; Zhang, S. Total flavonoids from Plumula Nelumbinis suppress angiotensin II-induced fractalkine production by inhibiting the ROS/NF- κ B pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp. Ther. Med.* **2014**, *7*, 1187–1192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zhu, X.; Lei, Y.; Tan, F.; Gong, L.; Gong, H.; Yang, W.; Chen, T.; Zhang, Z.; Cai, W.; Hou, B.; et al. Vaccarin protects human microvascular endothelial cells from apoptosis via attenuation of HDAC1 and oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *818*, 371–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kurpios-Piec, D.; Grosicka-Maciąg, E.; Woźniak, K.; Kowalewski, C.; Kiernożek, E.; Szumiło, M.; Rahden-Staroń, I. Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *118*, 82–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mudaliar, H.; Pollock, C.; Ma, J.; Wu, H.; Chadban, S.; Panchapakesan, U. The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Song, Y.; Ni, Y.; Hu, X.; Li, Q. Effect of phosphorylation on antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita pepo*, *Lady godiva*) polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 41–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Raish, M. Momordica charantia polysaccharides ameliorate oxidative stress, hyperlipidemia, inflammation, and apoptosis during myocardial infarction by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *97*, 544–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wolf, G.; Wenzel, U.; Burns, K.D.; Harris, R.C.; Stahl, R.A.; Thaiss, F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B through AT₁ and AT₂ receptors. *Kidney Int.* **2002**, *61*, 1986–1995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lu, Y.; Zhu, X.; Li, J.; Fang, R.; Wang, Z.; Zhang, J.; Li, K.; Li, X.; Bai, H.; Yang, Q.; et al. Glycine prevents pressure overload induced cardiac hypertrophy mediated by glycine receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *123*, 40–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yamashina, S.; Konno, A.; Wheeler, M.D.; Rusyn, I.; Rusyn, E.V.; Cox, A.D.; Thurman, R.G. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr. Cancer* **2001**, *40*, 197–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Van den Eynden, J.; Ali, S.S.; Horwood, N.; Carmans, S.; Brône, B.; Hellings, N.; Steels, P.; Harvey, R.J.; Rigo, J.M. Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Front. Mol. Neurosci.* **2009**, *20*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Meng, Q.; Cooney, M.; Yepuri, N.; Cooney, R.N. L-arginine attenuates Interleukin-1 β (IL-1 β) induced Nuclear Factor Kappa-Beta (NF- κ B) activation in Caco-2 cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Das, S.; Mattson, D.L. Exogenous L-Arginine Attenuates the Effects of Angiotensin II on Renal Hemodynamics and the Pressure Natriuresis-Diuresis Relationship. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2014**, *41*, 270–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Brawley, L.; Torrens, C.; Anthony, F.W.; Itoh, S.; Wheeler, T.; Jackson, A.A.; Clough, G.F.; Poston, L.; Hanson, M.A. Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy. *J. Physiol.* **2004**, *554*, 497–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Heffernan, K.S.; Fahs, C.A.; Ranadive, S.M.; Patvardhan, E.A. L-arginine as a nutritional prophylaxis against vascular endothelial dysfunction with aging. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2010**, *15*, 17–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Acetone fraction from *Sechium edule* (Jacq.) S.w. edible roots exhibits anti-endothelial dysfunction activity

Celeste Trejo-Moreno^a, Gabriela Castro-Martínez^a, Marisol Méndez-Martínez^a, Jesús Enrique Jiménez-Ferrer^b, José Pedraza-Chaverri^c, Gerardo Arrellín^{a,d}, Alejandro Zamilpa^b, Omar Noel Medina-Campos^c, Galia Lombardo-Earl^b, Gerardo Joel Barrita-Cruz^a, Beatriz Hernández^e, Christian Carlos Ramírez^a, María Angélica Santana^f, Gladis Frago^g, Gabriela Rosas^{a,*}

^a Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos CP 62350, Mexico

^b Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos CP 62790, Mexico

^c Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México CP 04510, Mexico

^d Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Panamericana, Ciudad de México CP 03920, Mexico

^e Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México CP 04510, Mexico

^f Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62209, Mexico

^g Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México CP 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Cinnamic acid (PubChem CID: 444539)

palmitic acid (PubChem CID: 985)

linoleic acid (PubChem CID:5280450)

11-Z-hexadecenoic acid (PubChem CID 5312413)

2-palmitoylglycerol (PubChem CID 123409)

and linolenic acid methyl ester (PubChem CID:5319706)

Keywords:

Sechium edule

Endothelial dysfunction

Inflammation

Anti-oxidant

Angiotensin II

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: A recent ethnomedical survey on medicinal plants grown in Mexico revealed that *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae) is one of the most valued plant species to treat cardiovascular diseases, including hypertension. Fruits, young leaves, buds, stems, and tuberous roots of the plant are edible. Considering that endothelial dysfunction induced by Angiotensin II plays an important role in the pathogenesis of hypertension and is accompanied by a prooxidative condition, which in turn induces an inflammatory state, vascular remodeling, and tissue damage, and that *S. edule* has been reported to possess antioxidant, anti-inflammatory and antihypertensive activity, its capability to control endothelial dysfunction was also assessed. **Aim of the study:** To assess *in vivo* the anti-endothelial dysfunction activity of the acetone fraction (rSe-ACE) of the hydroalcoholic extract from *S. edule* roots.

Materials and methods: Endothelial dysfunction was induced in female C57BL/6J mice by a daily intraperitoneal injection of angiotensin II for 10 weeks. Either rSe-ACE or losartan (as a control) were co-administered with angiotensin II for the same period. Blood pressure was measured at weeks 0, 5, and 10. Kidney extracts were prepared to determine IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL17, IFN γ , TNF α , and TGF β levels by ELISA, along with the prooxidative status as assessed by the activity of antioxidant enzymes. The expression of ICAM-1 was evaluated by immunohistochemistry in kidney histological sections. Kidney and hepatic damage, as well as vascular tissue remodeling, were studied.

Results: The rSe-ACE fraction administered at a dose of 10 mg/kg was able to control hypertension, as well as the prooxidative and proinflammatory status in kidney as efficiently as losartan, returning mice to normotensive levels. Additionally, the fraction was more efficient than losartan to prevent liver and kidney damage. Phytochemical characterization identified cinnamic acid as a major compound, and linoleic, palmitic, and myristic acids as the most abundant non-polar components in the mixture, previously reported to aid in the control of hypertension, inflammation, and oxidative stress, three important components of endothelial

Abbreviations: Ab, antibody; AGII, angiotensin II; AT1R, angiotensin II receptor type 1; AT2R, angiotensin II receptor type 2; BHA, branch of hepatic artery; CMC, carboxymethylcellulose; DAP, diastolic arterial pressure; DHE, dihydroethidium oxidation; ED, endothelial dysfunction; Eth, ethidium; eNO, endothelium-derived nitric oxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-transferase; ICAM, intercellular adhesion molecule; IFN, interferon; IGF, insulin-like growth factor; IL, interleukin; LDL, low-density lipoprotein; L-NAME, NG-nitro-L-arginine methyl ester; MDA, malondialdehyde; NAD(P)H, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NBT, nitroblue tetrazolium; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; O $_2^{\cdot-}$, superoxide anion; ONOO $^-$, peroxynitrite; PAS, periodic acid-Schiff; PDGF, platelet-derived growth factor; RI, renal insufficiency; RT, room temperature; ROS, reactive oxygen species; rSe-ACE, acetone *Sechium edule* fraction; rSe-HA, hydroalcoholic root extract; SAH, systemic arterial hypertension; SAP, systolic arterial pressure; SOD, superoxide dismutase; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VLDL, very-low-density lipoprotein; VSMC, vascular smooth muscle cells; XO, xanthine oxidase

* Corresponding author.

E-mail address: gabriela.rosas@uaem.mx (G. Rosas).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.036>

Received 25 September 2017; Received in revised form 22 February 2018; Accepted 23 February 2018

Available online 01 March 2018

0378-8741/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

dysfunction.

In conclusion: this study demonstrated that rSe-ACE has anti-endothelial dysfunction activity in an experimental model and highlights the role of cinnamic acid and fatty acids in the observed effects.

1. Introduction

Endothelial dysfunction (ED) is the result of a misbalance in the synthesis, release, and/or effect of several factors in endothelial cells. It is indicative of vascular damage and it plays a critical role in the pathogenesis of cardiovascular disorders like hypertension, renal dysfunction, and cerebrovascular diseases, which are leading causes of death worldwide (Schmitt and Dirsch, 2009). ED has a multifactorial origin that may be associated to alterations in the levels of glucose, triglycerides, LDL, VLDL, leptin, ROS, endothelin-1, vascular endothelial growth factor, C-reactive protein, and IL-6 in blood. ED is characterized by a vasoconstrictive, prooxidative, proinflammatory, prothrombotic, and proliferative status and by vascular remodeling (Endemann and Schiffrin, 2004), being the liver and kidney the organs most frequently affected (Bosch et al., 2010; Henke et al., 2007). AGII, part of the renin-angiotensin-aldosterone system, is critical in the development of this pathology (Adya et al., 2015; Husain et al., 2015; Jaimes et al., 2010; Liu et al., 2015). AGII binds to its receptors (AT1R or AT2R) in endothelial cells and induces the coupling of NAD(P)H oxidase, leading to the production of the superoxide anion (O_2^-). In turn, superoxide can act at different levels promoting an inflammatory and prooxidative status. Superoxide can bind to nitric oxide (NO) to form peroxynitrite ($ONOO^-$), which causes inflammation secondary to a non-enzymatic conversion of arachidonic acid into prostaglandins. It can also uncouple endothelial nitric oxide synthase (eNOS), so the enzyme will stop synthesizing NO, which is important for relaxation of the vessels, and will synthesize O_2^- instead. The latter can act as a second messenger, inducing the expression of NF- κ B, leading to the production of proinflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules (Jaimes et al., 2010; Marchesi et al., 2008; Nishida et al., 2010; Schramm et al., 2012). Additionally, AGII induces the production of several growth factors, such as epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and insulin-like growth factor (IGF), all of which induce the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and extracellular matrix accumulation, leading to vascular remodeling (Gorman et al., 2014; Intengan and Schiffrin, 2001), which further contributes to hypertension.

Sechium edule, a member of the Cucurbitaceae family, is a Mexican plant cultivated since pre-Columbian times. Ethnomedical data indicate that it has been used to treat atherosclerosis, and as a hypotensive (Argueta et al., 1994; Ibarra-Alvarado et al., 2010). In Mexico, it is one of the most valued plants used to treat cardiovascular ailments, including hypertension (Ibarra-Alvarado et al., 2010). In previous studies, a hydroalcoholic extract from *S. edule* roots and its organic fractions showed antihypertensive activity; in particular, the acetone fraction had a relaxant effect on blood vessels (Lombardo-Earl et al., 2014; Lozoya, 1980). Herein, the study of this fraction was extended to its capability of controlling ED and hypertension in chronic conditions induced by AGII. Additionally, its antioxidant and antiinflammatory properties were determined, as well as its capacity to prevent tissue damage.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and fraction preparation

Sechium edule (Jacq.) Sw. roots were collected in the community of Tuxpanguillo, Veracruz, Mexico (18°47'00.5" N, 97°00'17.5" W, at 1721 m above mean sea level) in a period from April through May. Plant material was identified by Abigail Aguilar-Contreras (IMSSM,

National Medical Center, Mexico City). Voucher specimens were stored at this site for future reference (IMSSM-15549). The name of the plant (*Sechium edule*) was confirmed to be included in www.theplantlist.org (The plant list, 2013). Roots (2.3 kg) were dehydrated by freeze-drying and ground in a Pulvex electric mill until particles less than 4 mm in diameter were obtained. To obtain the hydroalcoholic root extract (rSe-HA), an exhaustive maceration process was conducted with an ethanol/water mixture (60:40) in a final volume of 11.5 L at room temperature (RT). This extract was concentrated by distillation under reduced pressure and controlled temperature, and then dried by freeze-drying. rSe-HA (92 g) was suspended in acetone (16 g) for 24 h (two times); upon filtration, the liquid phase was concentrated in a Heidolph rotary evaporator (Laborota 4000), yielding the acetone fraction (rSe-Ace).

2.2. GC-MS analysis

The chemical composition of the acetone fraction was determined by gas chromatography. The chromatograph was coupled with a quadrupole mass detector set in electron impact mode at 70 eV. Volatile compounds were resolved in a HP 5MS capillary column (25 m long, 0.2 mm i.d., 0.3 μ m film thickness). The oven temperature was set at 40 °C for 2 min, then programmed to rise from 40 °C to 260 °C at a speed of 10 °C/min, and then kept at 260 °C for 20 min. Mass detector parameters were set as follows: interphase temperature 200 °C and mass acquisition range 20–550. Injector and detector temperatures were set to 250 °C and 280 °C, respectively. One microliter of each fraction (3 mg/ml) was injected in splitless mode. The flow rate for the carrier gas (helium) was set to 1 ml/min. Volatile compounds were identified by comparing their mass spectra with those in the NIST 1.7 library.

2.3. HPLC analysis

HPLC data were acquired in a Waters 2695 separation module with a photodiode array detector and analyzed with the Empower Pro software (Waters Corporation, USA). Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm \times 250 mm i.d., 5- μ m particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). The mobile phase consisted of a trifluoroacetic acid aqueous solution 0.5% (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A solvent gradient was set as follows: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 14–15 min; 24–25 min, 80% B; 26–27 min, 100% B; 28–30 min, 0% B. Flow rate was maintained at 0.9 ml min⁻¹, and sample injection volume was 10 μ l. Absorbance was measured at 330 nm. Cinnamic acid was identified by comparing retention times and UV spectra with those of reference standards (Sigma-Aldrich, St Louis Mo, USA).

2.4. Animals and experimental groups

Female C57BL/6J mice (10-week-old) obtained from our animal facilities were used. Four groups of five mice each were housed and maintained under pathogen-free conditions in the animal facility at the Faculty of Medicine of the Autonomous University of Morelos (FM-UAEM) under constant temperature (21–23 °C) and humidity (45–50%) conditions, with a 12-h light/dark cycle. All experiments followed the guidelines in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and experimental protocols were reviewed and approved by the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit No. 005/2011) at the FM-UAEM.

Control mice were treated with saline solution only. The three

remaining groups were treated with AGII (i.p., 0.1 µg/kg daily for 10 weeks), either alone or coadministered with losartan (10 mg/kg) diluted in carboxymethylcellulose (CMC) 0.2% (Bastaki et al., 2017) or rSe-ACE (10 mg/kg) diluted in water orally for 10 weeks. Mice were regarded as hypertensive when blood pressure increased by 15% or more with respect to baseline blood pressure (systolic or diastolic). Mice were killed by CO₂ inhalation and exsanguinated at the end of the experiment.

2.5. Tissue preparation for biochemical analysis

Kidneys were homogenized in ice-cold HEPES buffer (HEPES 25 mM, EDTA 1 mM, and phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] 0.1 mM). Homogenates were centrifuged at 6000 × g for 5 min at 4 °C and supernatants were recovered. Protein concentration was determined by the Lowry method.

2.5.1. Measurement of O₂⁻ production

Dihydroethidium oxidation (DHE) to ethidium (Eth) was used to measure O₂⁻ production (Satoh et al., 2005). Briefly, supernatants (10 µl) were incubated with DHE (0.02 mM), salmon testis DNA (0.5 mg/ml), and the corresponding substrate for xanthine oxidase (XO), mitochondrial respiratory enzymes, or nitric oxide synthase (NOS). Eth-DNA fluorescence was measured at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 610 nm at 37 °C for 30 min using a multimode microplate reader (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT). Xanthine (0.1 mM) was used as a substrate for XO, and allopurinol (0.2 mM) was used as an inhibitor. Succinate (5 mM) was used as a substrate for mitochondrial O₂⁻ production, and antimycin (0.05 mM) was used to block the respiratory chain. L-arginine (L-Arg, 1 mM) was used as a substrate for NOS, while NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mM) was used to block NOS activity. A blank without sample was run to subtract background fluorescence from each sample reading. Enzyme activity is expressed with respect to control readings.

2.5.2. Activity of antioxidant enzymes

2.5.2.1. Glutathione peroxidase assay. The activity of renal glutathione peroxidase (GPx) was assayed by the method of Lawrence and Burk (1976) with some modifications (Satoh et al., 2005), measuring NADPH disappearance by optical density (OD) reading at 340 nm. GPx uses GSH to reduce tert-butyl hydroperoxide, thereby producing GSSG, which is readily reduced to GSH by GR using NADPH as a reducing equivalent donor. Blank reactions with the sample replaced by distilled water were subtracted from each assay reading. Data were expressed as units per mg protein.

2.5.2.2. Glutathione reductase assay. The activity of glutathione reductase (GR) was assayed using oxidized glutathione as a substrate (Carlberg and Mannervik, 1975). Briefly, GR reduces GSSG to GSH at the expense of NADPH; the disappearance of NADPH can be detected by reading OD at 340 nm.

2.5.2.3. Glutathione-S-transferase assay. The activity of glutathione-S-transferase (GST) was evaluated following the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture consisted of potassium phosphate buffer 50 mM (pH 6.5), reduced glutathione 2 mM, and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 1 mM. Supernatants (0.02 ml) were added to 0.98 ml of the reaction mixture, and absorbance was recorded at 340 nm for 3 min. Enzymatic activity was calculated as µmol CDNB conjugate formed/min/mg protein using a molar absorptivity of 9.6 × 10³ M/cm.

2.5.2.4. Superoxide dismutase assay. The total activity of Superoxide Dismutase (SOD) was evaluated using a previously reported method (Oberley and Spitz, 1984). Briefly, a competitive inhibition assay was

performed using a xanthine-XO system to reduce nitroblue tetrazolium (NBT). The percentage of NBT reduction in the sample-free control tube was 100%. The amount of protein that inhibited NBT reduction by 50% of the maximum reading was defined as one unit of SOD activity. Results were expressed as U/mg protein.

2.5.2.5. Lipid peroxidation assay. The content of malondialdehyde (MDA) was measured using a standard curve of tetramethoxypropane. Tissue supernatants (0.2 ml) were added to 0.65 ml of 1-methyl-2-phenylindole 10 mM in an acetonitrile/methanol mixture (3:1). The reaction was started by adding 0.15 ml of HCl 37% and incubated for 40 min at 45 °C. Then, the samples were centrifuged at 3000 × g for 5 min. OD was measured at 586 nm (Gérard-Monnier et al., 1998). Data were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.6. Blood pressure measurement

Mice were anesthetized with xylazine (10 mg/kg i.p.); then, systolic and diastolic arterial pressure data were recorded by the tail-cuff technique, using a LE5002 Panlab Non-Invasive Blood Pressure System (Leticia). Blood pressure was recorded at the beginning of the experiment (baseline) and every five weeks until the end of the experiment. To avoid circadian variations (Marques et al., 2011), all measurements were performed between 11:00 a.m. and 15:00 p.m.

2.7. Cytokine detection by ELISA

Kidneys were weighed and frozen at -80 °C until used. The organs were macerated in a frozen mortar with ice-cold PBS-PMSF (0.1%) 1:5 w/v. The suspensions were centrifuged, and the supernatants were recovered and frozen at -20 °C until used. Various ELISA kits were used to determine cytokine concentration, following manufacturer's instructions. Mouse IL1β, IL4, IL6, IL10, IFNγ, and TNFα ELISA kits were purchased from OptEIA™ BD, and Mouse IL17A and TGFβ ELISA kits were purchased from Applied Biosystems. Briefly, 96-well flat-bottomed ELISA plates were coated with the respective capture antibody and incubated overnight at 4 °C in carbonate buffer (pH 9.6). Non-specific binding sites were blocked by incubating for 30 min at RT with PBS-5% fetal bovine serum. Aqueous kidney extracts were added and incubated for 2 h at RT. Then, the plates were incubated with the corresponding detection anti-cytokine-HRP antibodies for 30 min at RT. Bound complexes were detected by reaction with tetramethylbenzidine substrate after 30 min of incubation in the darkness. The reaction was stopped with H₂SO₄ 2N and absorbance was measured at 450 nm at 37 °C in an ELISA plate reader (VERSAmax Molecular Devices). Cytokine concentration was calculated according to standard curves for each cytokine and reported as pg/mg protein.

2.8. Histopathology

After the last blood pressure measurement, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg i.p.) and perfused with ice-cold PBS (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, and K₂HPO₄ 1.15 mM). Kidneys and livers were removed. The organs were fixed in Zamboni solution (formaldehyde 2.0%, picric acid 0.2%, pH 7.0). Tissues were then dehydrated and embedded in paraffin. Tissue sections (5 µm) were transferred to poly-L-lysine-coated slides (Sigma) before being deparaffinized and rehydrated. For histopathological studies, the slides were stained with Masson trichrome stain (kidney and liver) or periodic acid-Schiff (PAS) stain (kidney). Masson trichrome method combines hematoxylin stain with a cytoplasmic stain, and a selective stain for connective tissue (Goldner, 1938). PAS stain detects polysaccharides (glycogen and mucosal substances such as glycoproteins, glycolipids and mucins) in tissues to identify alterations in the basement membrane (Feldman and Christian, 1981), which was used to determine the expansion of the mesangial matrix by the presence of increased amounts of periodic

acid-Schiff positive material in the mesangial region (Raij et al., 1984). All slides were observed under a Nikon ECLIPSE 80i microscope and analyzed using the Metamorph software, v. 6.1.

Glomerulosclerosis or hyalinization was defined as the disappearance of cellular elements from the tuft, collapse of capillary lumens, and folding of the glomerular basement membrane with entrapment of amorphous material, as proposed by Raij et al. (1984). Glomerular injury was also analyzed according to the method reported by the same author, with minor modifications. Briefly, 50–60 cortical glomeruli were evaluated in PAS-stained kidney slides from each group under a 100 × objective. Digitalized images were analyzed with the Metamorph software, v. 6.1. Mesangial area was determined by subtracting the capillary area from the total area. These values were expressed as percentage with respect to the total area.

Vascular remodeling was evaluated in the portal triad in Masson-stained liver slides. The total area and the luminal area of the branch of hepatic artery (BHA) were measured in 10 slides per group under the 40 × objective. The area corresponding to vessel thickness was determined by subtracting these two values. Lumen percentage, media thickness percentage, and media/lumen ratio were calculated to assess vascular remodeling (Intengan and Schiffrin, 2001).

2.9. Immunohistochemistry

Tissue slides were deparaffined, rehydrated, and incubated with H₂O₂ 3%, albumin 5%, and Tween 20-PBS 1%. After treatment, tissue sections were incubated overnight with rat anti-mouse ICAM-1

(eBioscience) diluted 1:100 in albumin 0.1% and Tween 20-PBS 0.05%. After wash with PBS, tissues were incubated with 50 µl of biotinylated goat anti-rat IgG (MP Biomedicals) antibody, followed by HRP-labeled streptavidin solution (MP Biomedicals) at 37 °C for 30 min, and developed with 3,3 diaminobenzidine (ZYMED, San Francisco, CA). The slides were counterstained with hematoxylin and photographed using a Nikon ECLIPSE 80i microscope. The images were analyzed with the Metamorph software, v. 6.1.

2.10. Statistics

Data are expressed as mean ± SD. Groups or treatments were compared by one-way ANOVA with a post-hoc Tukey-Kramer test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of the major polyphenolic compounds

The HPLC fingerprint of the bioactive fraction (Fig. 1A-B) shows cinnamic acid (12.4 min; $\lambda = 205, 280$ nm) as its major chemical constituent. The chemical structure of this aromatic acid was corroborated by comparison of nuclear magnetic data of the compound isolated from *S. edule* with previously described constituents (Lombardo-Earl et al., 2014).

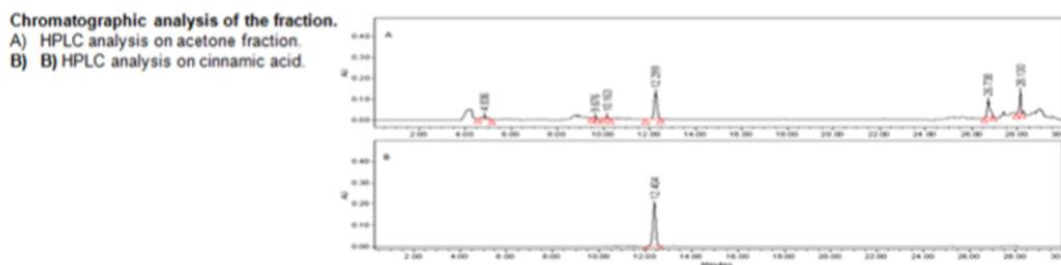


Table 1. Non-Polar phytochemicals identified in two retention times (RT) of the acetonic root extract of *Sechium edule* by GC-MS analysis

Retention Time	Pick No.	Corresponding compound	MW	RT	Molecular formula	Peak Area (%)	Reported Bioactivity
26.7 RT	1	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	228.37	29.9	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	4.3	Antioxidant, Hypocholesterolemic, anti-tumoral growth, renal protective effect
	2	Pentadecanoic acid	242.4	31.5	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	3.99	Activation of PPAR α and PPAR β , regulation of energy catabolism, lipid homeostasis and fatty acid oxidation (FAO).
	3	11-Z-Hexadecenoic acid	254.4	33.6	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	7.8	Antimicrobial and antioxidant activity.
	4	Hexadecanoic acid (palmitic acid)	256.4	34.08	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	22.4	Antioxidant, Hypocholesterolemic.
	5	9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	280.4	37.3	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	30.4	Anti-inflammatory, Cox 1 and Cox2 inhibition, Hypocholesterolemic.
	6	9,12-Octadecadienyl chloride (Linoleic acid chloride)	298.89	37.4	C ₁₈ H ₃₂ ClO	11.1	No activity reported.
	7	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(ethyl ester (2-Palmitoylglycerol)	330.5	43.35	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	19.9	No activity reported.
28.1 RT	1	(M)9-Oxononanoic acid	172.2	23.9	C ₉ H ₁₆ O ₃	10.4	No activity reported.
	2	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	228.37	30.1	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	28.8	Antioxidant, Hypocholesterolemic.
	3	14-Pentadecenoic acid	240.38	31.55	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	5.6	Antioxidant
	4	Pentadecanoic acid	242.4	31.6	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	2.9	Activation of PPAR α and PPAR β , regulation of energy catabolism, lipid homeostasis and FAO
	5	11-Z-Hexadecenoic acid	254.4	33.7	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	22.9	Antimicrobial and antioxidant activity.
	6	Hexadecanoic acid (palmitic acid)	256.4	34.0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	7.5	Antioxidant, Hypocholesterolemic.
	7	9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	280.4	37.2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	10.4	Anti-inflammatory, Cox 1 and Cox2 inhibition, Hypocholesterolemic.
	8	9,12,15, Octadecatrienoic acid, methyl ester (Linolenic acid methyl ester)	292.4	37.3	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	12.0	Anti-inflammatory, Hypocholesterolemic, Cancer preventive, Hepatoprotective, Antihistaminic, Antieczemic, Antiarthritic, Anticoronary,
	9	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(ethyl ester (2-Palmitoylglycerol)	330.5	43.35	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1.45	No activity reported.

Fig. 1. Chromatographic analysis of the fraction. A) HPLC analysis of the acetone fraction. B) HPLC analysis of cinnamic acid. The HPLC fingerprint of the bioactive fraction identifies cinnamic acid (12.4 min; $\lambda = 205, 280$ nm) as its major chemical constituent. Table 1 shows other non-polar phytochemicals identified in two retention times (RT) of the acetonic root extract of *Sechium edule* by GC-MS analysis.

3.2. Identification of non-polar compounds

Chemical analysis of the less polar composition by GC-MS identified palmitic acid, linoleic acid, linoleic acid chloride, 11-Z-hexadecenoic acid, 2-palmitoylglycerol, and linolenic acid methyl ester, among other fatty acids (Table 1).

3.3. rSe-ACE prevents the production of O_2^-

The O_2^- ion can be produced in the cell through different metabolic pathways, which imply different enzymes and substrates. To assess whether rSe-ACE was able to prevent O_2^- production and determine the main enzymes involved in the production of this radical ion, the capacity of kidney extracts to oxidize dihydroethidium (DHE) under different conditions was evaluated. Protein extracts were obtained from all mice groups and were exposed to a set of substrates and enzyme inhibitors before measuring O_2^- production (Fig. S.1). Only when kidney extracts were exposed to succinate, the percent change in production O_2^- increased significantly, 233.2 ± 26.7 in the AGII-treated group and 100 ± 1.7 in the control group ($P < 0.01$), a nearly 2.5-fold increase. Extracts from AGII/rSe-ACE- or AGII/losartan-treated mice did not show this increase (120.9 ± 36.7 and 167.7 ± 49.7 , respectively), being similar to the normotensive control group. On the other hand, when homogenates were incubated with succinate and antimycin, a mitochondrial respiration inhibitor, a 0.67-fold blunt in the fluorescence signal was observed. No differences were found when extracts were incubated with arginine or xanthine, nor with their respective inhibitors. These data provide evidence that the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase is involved in O_2^- production in response to chronic AGII administration. Also, the absence of significant differences between control mice (untreated) and AGII/rSe-ACE-treated mice indicate the antioxidant capacity of the fraction, being as effective as the control drug at the concentration employed. To determine whether the antioxidant capacity of rSe-ACE is related to the activation of antioxidant enzymes, the activity of GPx, GR, GST and SOD was also evaluated (Fig. S.1). However, none of these enzymes modified its activity after treatment, so the antioxidant effect of rSe-ACE is not through the activation of antioxidant enzymes.

3.4. rSe-ACE prevent vasoconstriction and hypertension

To evaluate whether rSe-ACE controls increased blood pressure, this parameter was evaluated at the beginning (week 0), the middle (week 5), and the end (week 10) of the experiment. Both systolic (SBP) and

diastolic (DBP) blood pressure gradually increased in mice chronically treated with AGII (Fig. 2). At week 5, SBP increased by 30.8% and DBP increased by 13%; by week 10, statistically significant ($P < 0.05$) increases of 46.6% in SBP and 73.1% in DBP were observed with respect to controls. It is noteworthy that no significant increase in blood pressure was observed in AGII/losartan- nor AGII/rSe-ACE-treated mice with respect to controls. This result shows that rSe-ACE is as effective as the pharmacological treatment to control hypertension.

3.5. rSe-ACE prevents inflammation

Considering that O_2^- production promotes inflammation, the anti-inflammatory capability of rSe-ACE in the kidney was evaluated. Kidneys were obtained after the last measure of blood pressure. Cytokine concentrations were evaluated by ELISA in tissue extracts, and ICAM-1 expression was assessed by immunohistochemistry. As shown in Fig. 3, AGII-treated mice showed a significant increase in the levels of IL1 β (21.7%), TNF α (26.7%), IL17A (30.6%), IL4 (19.6), IL10 (24.7%), and TGF β (35.9%), while no differences were observed in IL6 nor IFN γ . In contrast, no significant differences were found in AGII/losartan- nor AGII/rSe-ACE-administered mice with respect to control mice. ICAM-1 expression in kidneys is shown in Fig. S2. Higher ICAM-1 expression was observed in renal capsule cells (panel B), renal interstitial cells (panel F), and perirenal fat tissue (panel J) in kidneys from AGII-treated mice. Also, an inflammatory infiltrate was observed in the renal capsule and perirenal fat tissue (panels B and J). In contrast, ICAM-1 expression in all evaluated kidney regions was prevented in AGII/ rSe-ACE-treated mice. It is remarkable that rSe-ACE had a higher anti-inflammatory effect than losartan, because a moderate expression of ICAM-1 was observed in the kidney regions evaluated, particularly in the capsule and perirenal fat, from AGII/losartan-treated mice.

3.6. rSe-ACE prevents vascular remodeling

A chronicle vascular prooxidant status leads to vascular remodeling. To assess the capacity of rSe-ACE to control AGII-induced vascular remodeling, total and luminal cross section areas of the branch of hepatic artery (BHA) of the portal triad in liver slides were measured in control mice in and AGII-, AGII/rSe-ACE-, and AGII/losartan-treated mice (Fig. 4A-D). The key parameters to assess vascular remodeling were lumen percentage, media thickness percentage, and media/lumen ratio (Fig. 4H-J). Media thickness was calculated by subtracting luminal BHA area from the total BHA. As shown, neither total BHA vascular area, lumen area, nor media thickness (Fig. 4E, F and G, respectively) were

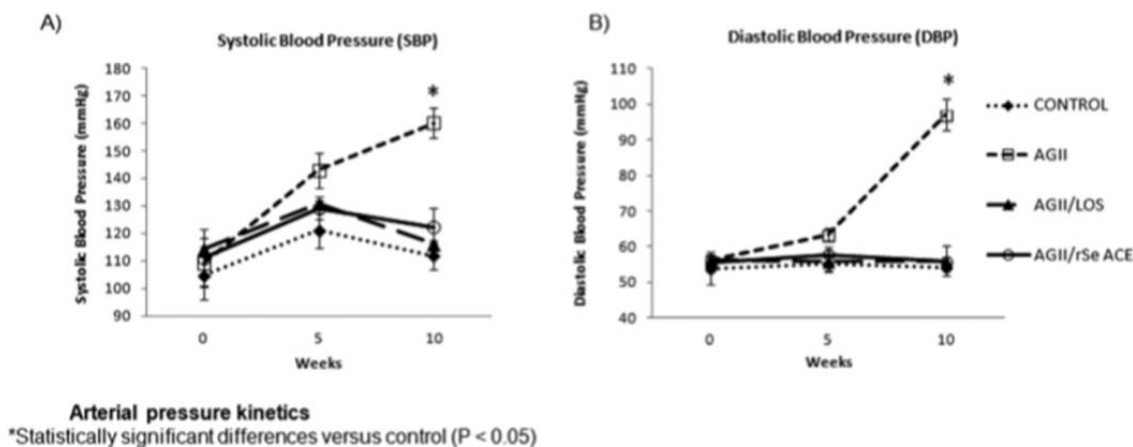
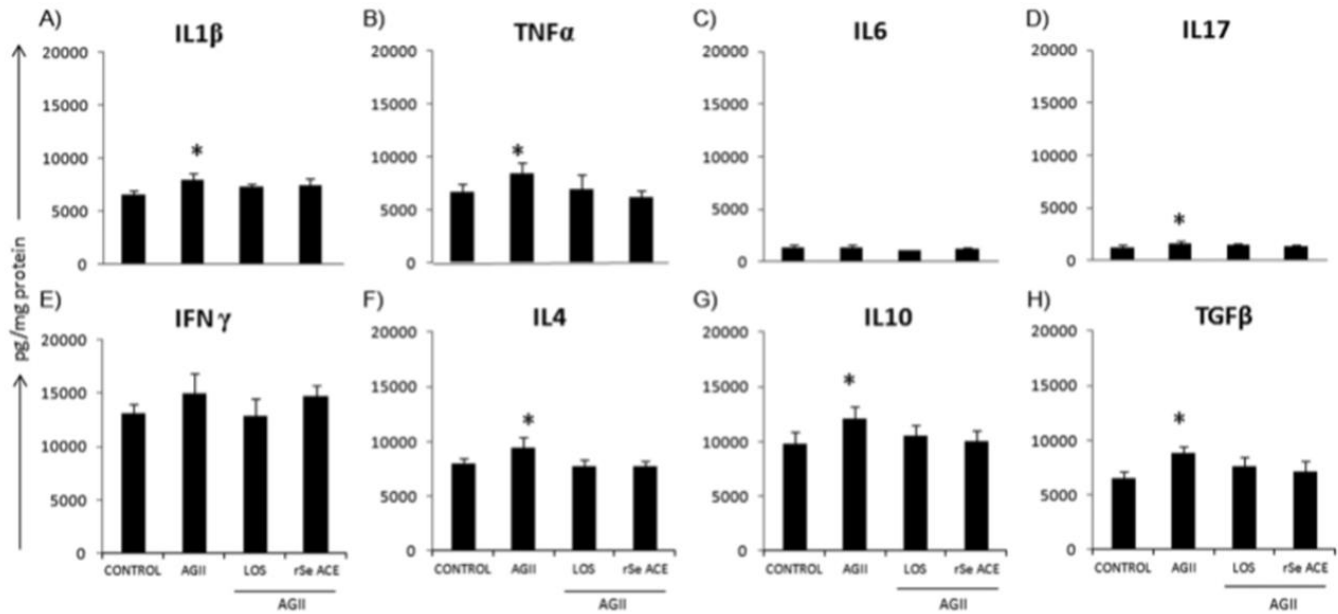


Fig. 2. Arterial pressure kinetics. Systolic and diastolic arterial pressure was measured in mice at weeks 0, 5, and 10. The AGII-treated group showed increases in both pressure readings at week 10, while the rSe-ACE-group maintained pressure values at the levels of the control group. Data are expressed as mean \pm SD and were analyzed by ANOVA and a post-hoc Tukey test. *Statistically significant differences with respect to control ($P < 0.05$). Data are representative of at least three independent experiments.



Kidney cytokine concentration.

*Statistically significant differences versus control ($P < 0.05$).

Fig. 3. Kidney cytokine concentration. Cytokine levels were determined in kidney aqueous extract 10 weeks after AGII administration and treatments. Six kidneys were analyzed per treatment. The control group was treated with saline solution only; AGII 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$; losartan 10 mg/kg, and rSe-ACE 10 mg/kg. Data are expressed as mean \pm SD and were analyzed by ANOVA-Tukey test. *Statistically significant differences with respect to control ($P < 0.05$).

affected by AGII (Fig. 4B) nor AGII/losartan (Fig. 4C) treatment. In contrast, AGII/rSe-ACE treated mice showed a significant increase ($P < 0.05$) in vascular area (2.3-fold) and lumen area (2.4-fold) (Fig. 4E and F, respectively) but not in media thickness ($P > 0.05$) (Fig. 4G). AGII- and AGII/losartan-treated mice exhibited a significant decrease ($P < 0.05$) in lumen percentage with respect to control mice (2-fold) (Fig. 4H) and a significant increase ($P < 0.05$) (about 1.19-fold) in media thickness and media/lumen ratio (2.7-fold) (Fig. 4I and J, respectively), indicative of hypertrophic vascular remodeling (Intengan and Schiffrin, 2001), a condition present in severe hypertension conditions, such as human secondary hypertension (Rajj et al., 1984). On the other hand, as shown in Fig. 4D, treatment with rSe-ACE prevented this status, since lumen percentage, media thickness, and media/lumen ratio showed no significant differences (Fig. 4H, I, and J, respectively) with respect to the control group, preventing vascular remodeling.

3.7. rSe-ACE prevents tissue damage

To assess the capacity of rSe-ACE to control tissue damage due to AGII-induced ED, histopathological studies were performed with Masson trichrome stain in liver (Fig. 5) and kidney (Fig. 6), and PAS stain in kidney to evaluate glomerular status (Fig. 7).

3.7.1. rSe-ACE prevents non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

In liver, three main pathologic alterations were found in AGII-treated mice: 1) steatosis with perivascular pattern, which originates from the central vein of the hepatic lobule (Fig. 5B); 2) thickening of the trabeculae (Fig. 5F) and of the Glisson's capsule (Fig. 5N and R); and 3) lymphocytic microabscesses with necrosis at the center (Fig. 5J). All these alterations, steatohepatitis, inflammation, and fibrosis are pathological characteristics of NASH. The thickening of trabeculae and Glisson's capsule are due to fiber deposition and the infiltration of mononuclear cells such as lymphocytes, macrophages, fibroblasts, and fibrocytes (Fig. 5N), which indicates the chronicity of the inflammatory

event and the ongoing repairing process. No improvement was observed in the AGII/losartan-treated group with respect to AGII-treated mice (Fig. 5C, G, K, O and S). In contrast, a reduction in AGII-induced steatosis, fiber deposition, cell infiltration to parenchyma (Fig. 5D, H and L, respectively) and Glisson's capsule (Fig. 5 P, T) was observed in rSe-ACE-treated mice.

3.7.2. rSe-ACE prevents glomerulosclerosis

Glomerulosclerosis is a condition often induced by ED (Anderson et al., 1993; Orth et al., 1994), thus, AGII-induced renal damage was evaluated in all mice groups by examining Masson trichrome-stained perirenal fat (Fig. 6A-D), capsules (Fig. 6E-H), perivascular connective tissue (Fig. 6I-L), and cortical glomeruli (Fig. 6M-P). Additionally, the type of infiltrating cells in the capsule (Fig. S. 3) was determined by PAS staining, and a morphometric analysis of the glomerulus was performed (Fig. 7).

As shown in Fig. 6, the AGII-treated group exhibited renal damage characterized by renal capsule thickening (panel F) due to edema, fiber deposition and infiltration of mononuclear cells (mainly lymphocytes and macrophages), characteristic of chronic kidney diseases (CKD) like glomerulosclerosis (Karanovic et al., 2016). Additionally, perivascular fibrosis (panel J), congestion of the tubulointerstitial zone (panel N), and points of mononuclear infiltration (mainly lymphocytes) among perirenal fat adipocytes (panel B) were observed. As shown in the figure, a decrease in the inflammatory process in perirenal fat and renal capsule (panels C and G, respectively) was observed in the losartan-treated mice, although this treatment did not modify the damage to perivascular connective tissue nor the congestion surrounding cortical glomeruli (panel O) induced by AGII (panel K). The rSe-ACE fraction controlled the thickening in perirenal fat and renal capsule (panels D and H, respectively); remarkably, it also diminished the amount of perivascular connective tissue (panel L), preventing the congestion surrounding cortical glomeruli (panel P). These parameters were similar in AGII-rSe-ACE-treated mice and control animals (panels I and

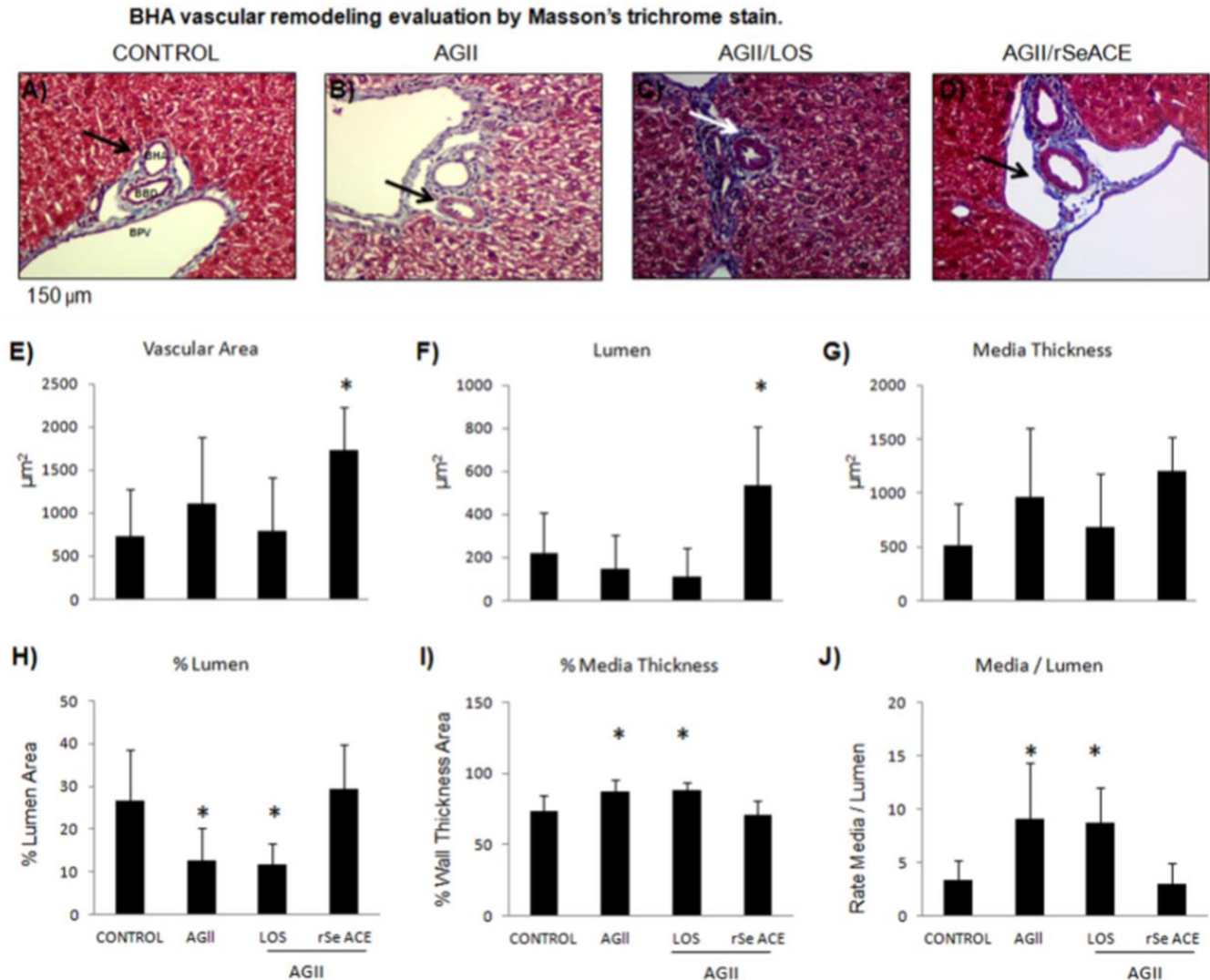


Fig. 4. BHA vascular remodeling evaluation by Masson trichrome stain. A–D) Mouse hepatic portal triad after treatments. E) BHA total area. F) BHA lumen area. G) Thickness of BHA tunica media. H) Lumen and tunica media. I) Percentage with respect to the BHA total area. J) Media area/lumen area ratio. rSe ACE prevented, on one hand, the increase in media thickness percentage, and on the other the decrease in lumen area with respect to the total area and maintained the media/lumen ratio with no significant differences with respect to controls; this ratio was significantly increased in AGII-treated mice. 40 × microphotographs. Branch of portal vein (BPV); branch of hepatic artery (BHA); branch of biliary duct (BBD). Data are expressed as mean ± SD and were analyzed by ANOVA and a post-hoc Tukey–Kramer test. *Statistically significant differences with respect to control ($P < 0.05$).

M, respectively).

Mice treated with AGII exhibited renal capsule thickening, which may be associated to the infiltration of inflammatory cells (mainly lymphocytes, macrophages, and plasmatic cells, and in a lesser extend basophiles and neutrophils) (Fig. S.3B). In losartan-treated mice, infiltration of lymphocytes, macrophages, and fibroblasts was observed (Fig. S.3C). On the other hand, infiltration of inflammatory cells was substantially diminished in mice treated with the rSe-ACE fraction (Fig. S.3D).

Glomerulosclerosis, characterized by an increase in glomerular area (37.0%, Fig. 7E), reduced vascular area (52.1%, Fig. 7F), and increased mesangial area (16.1%, Fig. 7G) was clearly found in AGII-treated mice. In the losartan-treated group, vascular area was significantly reduced (27.4%, Fig. 7F) and mesangial area was significantly increased (8.5%, Fig. 7G), even though glomerular area (Fig. 7E) did not exhibit significant differences with respect to controls. In contrast, although the rSe-ACE fraction administration failed to prevent the AGII-induced increase in glomerular area (Fig. 7E), vascular and mesangial areas did not show significant differences (Fig. 7F and G, respectively) with

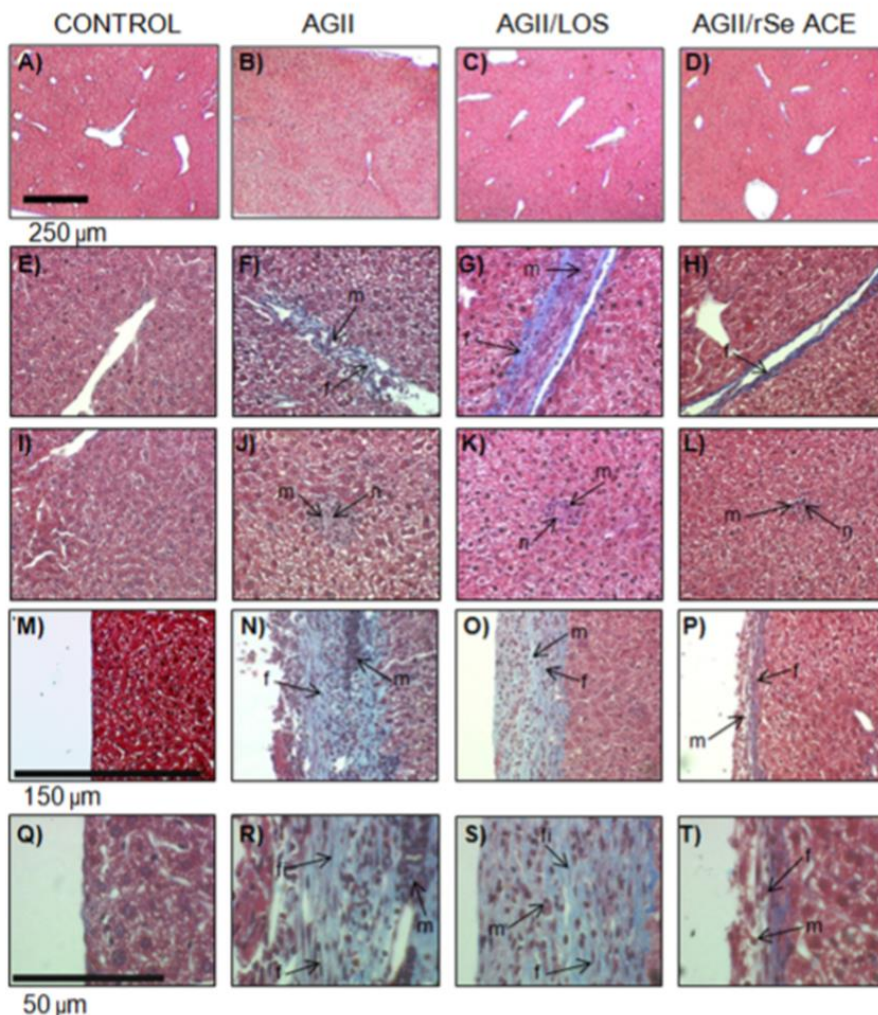
respect to controls. These results imply that although glomeruli are 24.1 times larger than in control mice, the proportion between mesangial and vascular area is conserved, which means that kidney should be working properly, and that the fraction was more efficient than losartan in preventing glomerulosclerosis.

As shown in Fig. 7B, AGII also induces glomerulonephritis, evident in mesangial matrix (Fig. 7G) and glomerulus vascular region hypertrophy (Fig. 7F). The rSe-ACE fraction was able to prevent glomerulonephritis even better than losartan, a finding that points to its effectiveness in preventing renal damage associated to AGII-induced ED.

4. Discussion

This study provides clear evidences of the efficacy of rSe-ACE to prevent ED (and its associated pathologies) induced by chronic AGII administration.

Previous studies showed that both rSe-HA and losartan were able to interfere with the binding of AGII with its receptor, preventing its hypertensive effects (Lombardo-Earl et al., 2014). The rSe-ACE fraction,



Hepatic damage evaluation by Masson's trichrome stain. A-D) Hepatic parenchyma 4X. E-H) trabeculae. J-L) Microabscess. M-P) Glisson's capsule 10X. Q-T) Glisson's capsule 40X

Fig. 5. Hepatic damage evaluation by Masson trichrome stain. A-D) Hepatic parenchyma 4 × . E-H) Trabeculae. J-L) Microabscess. M-P) Glisson's capsule 10 × . Q-T) Glisson's capsule 40 × . AGII-treated group showed steatosis, mononuclear cell infiltrate, fiber deposits and thickening, along with lymphocytic microabscesses, being AGII- and AGII/losartan-treated mice the most severely affected. rSe-ACE prevented severe liver damage. 4 × (bar = 250 µm), 40 × (bar = 150 µm) and 100 × (bar = 50 µm) microphotographs. m: inflammatory mononuclear cells; f: fibroblasts; fi: fibrocytes; n: necrosis.

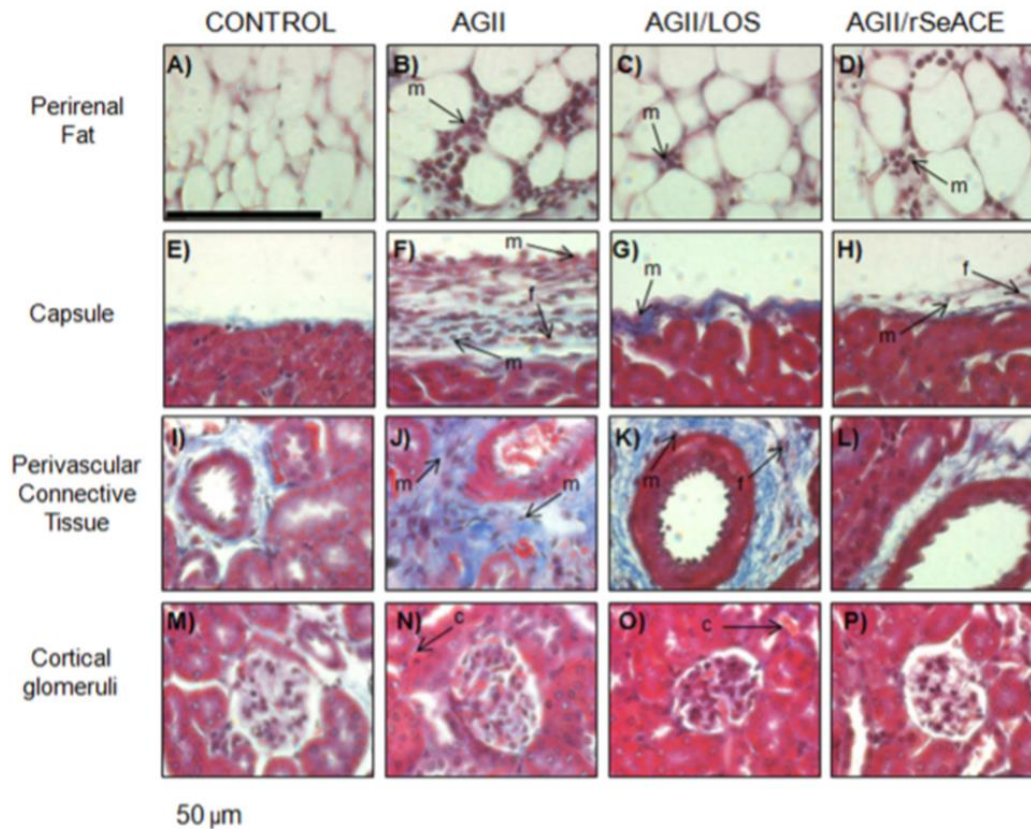
derived from the rSe-HA extract, was found to be enriched in cinnamic acid methyl ester, which could be responsible for the antihypertensive effects in an acute, AGII-induced hypertension model. In this study, the effects of orally administered rSe-ACE on ED pathologies induced by chronic administration of AGII in mice were further characterized.

In this model, ED is induced by AGII binding to the AT1R receptor on endothelial cells, which activates NAD(P)H oxidase through PKC, inducing the production of ROS ($O_2^{\cdot-}$) and leading to a prooxidative status. This reduces the bioavailability of nitric oxide (NO), causing vasoconstriction. PKC activates the NFκB transcription factor and the production of proinflammatory cytokines (Jaimes et al., 2010; Marchesi et al., 2008; Nishida et al., 2010; Schramm et al., 2012), which ultimately lead to vascular remodeling and tissue damage. As demonstrated in our study, AGII-treated mice exhibited higher levels of inflammatory and non-inflammatory cytokines in kidney (Fig. 3), a target tissue for ED (Bosch et al., 2010; Henke et al., 2007; Rajendran et al., 2013); inflammatory cytokines in ED could be produced not only by endothelial cells and VSMC, but also by artery-associated cells such as neutrophils, mastocytes, and lymphocytes (Sprague and Khalil, 2009). As shown in Fig. S.3, these cells were recruited to the inflamed kidney

by AGII administration, where they mediate a proinflammatory, prooxidative status leading to vascular remodeling and damage (Brazin et al., 2014; Guasti et al., 2008; Hallersund et al., 2011).

The rSe-ACE extract effectively controlled the prooxidant and proinflammatory status, as well as vasoconstriction, vascular remodeling, and tissue damage, despite the concomitant administration of AGII. This protective effect was higher than that of losartan, since the latter only controlled oxidative stress, hypertension, and the production of proinflammatory cytokines, but not ICAM-1 expression, vascular remodeling, tissue injury, proinflammatory cell infiltrate, nor glomerular damage.

Cinnamic acid was identified as the main component of rSe-ACE along with other less polar fatty acids, specifically palmitic, linoleic, linoleic acid chloride, 11-Z-hexadecenoic acid, 2-palmitoylglycerol, and linolenic acid methyl ester (Fig. 1, Table 1). These compounds have been reported to show anti-inflammatory properties (Bartolome et al., 2013). Cinnamic acid can reduce the concentration of ROS ($O_2^{\cdot-}$) by two different mechanisms: by reacting with the radicals through its electron-rich double bonds (Azzu and Brand, 2010), acting thus as a scavenger, and by preventing ROS production by mitochondrial



Renal damage evaluation by Masson's trichrome stain. A-D) Perirenal fat tissue. E-H) Renal capsule. I-L) Perivascular connective tissue. M-P) Cortical glomerulus.

Fig. 6. Renal damage evaluation by Masson's trichrome stain. A-D) Perirenal fat tissue. E-H) Renal capsule. I-L) Perivascular connective tissue. M-P) Cortical glomerulus. Inflammatory damage due to edema and the presence of mononuclear cells and fibroblasts is observed in fat tissue, capsule and perivascular tissue, being AGII-treated mice the most severely affected. rSe-ACE ameliorated these damage patterns with higher efficiency than losartan. 100 × microphotographs. m: mononuclear cells; f: fibroblasts; c: congestion.

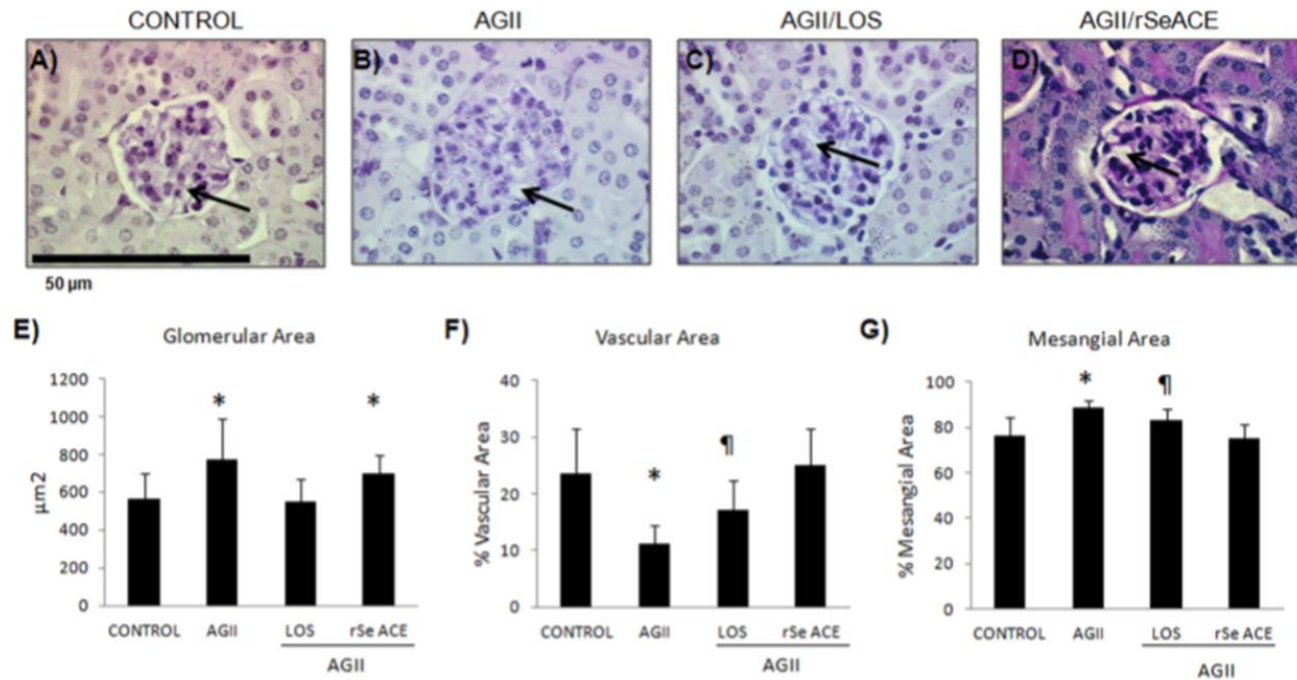
enzymes like succinate dehydrogenase, since cinnamic acid was demonstrated to activate uncoupled proteins (UCP) via its 2-alkenal group (Echtay et al., 2003). UCP are a subfamily of mitochondrial proteins that decrease ROS production by uncoupling mitochondrial enzymes, thus preventing oxidative damage (Azzu and Brand, 2010; Brand et al., 2004). In our study, rSe-ACE was found to reduce ROS production by succinate dehydrogenase, probably due to its high content of cinnamic acid.

The role of growth factors like TGF β in ED has been related to extracellular matrix deposition, promoting VSMC hypertrophy and hyperplasia, leading to vascular remodeling and fibrosis (Gibbons et al., 1992; Ruiz-Ortega et al., 2006). The latter are key factors in the pathogenesis of renal and hepatic diseases and were observed in hepatic tissues from AGII-treated mice (Figs. 4 and 5) but not in renal tissues (Figs. 6 and 7). AGII administration also induces the expression of adhesion molecules like E- and P-selectins, VCAM-1, and ICAM-1 (Chen et al., 2015; da Cunha et al., 2005; Liang et al., 2015), which along with the proinflammatory environment would favor the recruitment and activation of monocytes, which could migrate to the media and adventitia layers of the blood vessels, releasing effector molecules and further contributing to tissue damage (Marchesi et al., 2008; Nishida et al., 2010; Touyz, 2004). In this study, AGII increased ICAM-1 expression in the renal capsule, renal interstice, and perirenal fat; this effect was extensively prevented in rSe-ACE-treated mice, while only a reduction in ICAM-1 expression was attained in losartan-treated mice. The effects of rSe-ACE could be mediated by cinnamic acid and other

less polar fatty acids, which individually have been proved to exert anti-inflammatory and antioxidant effects (Kersten et al., 2000; Nunn et al., 2007), acting synergistically to prevent tissue damage.

It has been reported that the inability of the endothelium to couple hemodynamic events efficiently is related to the low bioavailability of nitric oxide (NO). This molecule acts as a second messenger and its absence contributes to hypertension and abnormal vascular remodeling (Rudic and Sessa, 1999). Treatment with AGII induced hypertension in mice comparable with grades 2 and 3 of the human disease (Mansia et al., 2007; Savoia et al., 2011). Considering that rSe-ACE was able to control the increase in ROS, it is possible that this treatment increased NO bioavailability, regulating hypertension (the main pathology resulting from ED) and vascular remodeling. Moreover, rSe-ACE not only prevented vascular remodeling but also induced a compensatory enlargement in the branch of hepatic portal vein and in the lumen of blood vessels, without increasing the thickness of the media and maintaining the relation media/lumen with no statistically significant differences with the control group. This represents an adaptive response to preserve the normal blood flow and could be related with NO availability mediated by the antioxidant activity of the fraction, as discussed above.

Another point that merits comments is the capability of the rSe-ACE fraction to control non-alcoholic steatohepatitis (NASH) induced by the chronic administration of AGII (Fig. 5). NASH progression is characterized by fatty liver, damage to hepatocytes, fibrosis, and inflammation (Brunt, 2004; de Alwis and Day, 2008). The



Renal damage evaluation by PAS stain. A-D) glomeruli. E-G) Glomerular area and glomerular vascular and mesangial area percent age. *Statistically significant differences versus control ($P < 0.05$). ¶ Statistically significant differences versus control and AGII.

Fig. 7. Renal damage evaluation by PAS stain. A-D) Glomeruli. E-G) Glomerular area and glomerular vascular and mesangial area percentage. Glomeruli from AGII- and AGII/losartan-treated mice (B and C) showed expansion of mesangial cells and collapse of glomerular vasculature. rSe-ACE (D-G) restored glomerular vasculature to the status of the control group. Arrows indicate vascular areas. 100 × microphotographs. Data are expressed as mean ± SD and were analyzed by ANOVA and a post-hoc Tukey test. *Statistically significant differences with respect to control ($P < 0.05$). ¶ Statistically significant differences with respect to control and AGII.

pathophysiological hallmark of NASH and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is insulin resistance (IR), which increases the flux of free fatty acids from the adipose tissue to non-adipose organs, resulting in an abnormal fat metabolism that leads to an accumulation of hepatic triglycerides (Bugianesi et al., 2005). AGII exerts its action on insulin-sensitive tissues such as liver, where it has effects on insulin receptors (Morris et al., 2013; Olivares-Reyes et al., 2009; Togashi et al., 2000), favoring lipid accumulation in hepatocytes and impairing the oxidative capacity of the mitochondria, leading to an increased ROS generation and its consequences (Rolo et al., 2012). rSe-ACE was capable of controlling NASH, probably through the synergistic action of cinnamic acid and other less polar fatty acids. Previous studies have shown that cinnamic acid is not only able to control the production of ROS, which play an important role in NASH induction, but it also alleviates insulin resistance *in vivo* and *in vitro* (Huang et al., 2009; Huang and Shen, 2012; Lakshmi et al., 2009). On the other hand, other less polar fatty acids in the rSe-ACE fraction probably contributed to control the inflammatory status.

It is well known that AGII, via AT1R, participates in the pathogenesis of renal diseases through the increased production of ROS (for instance, by promoting hyperplasia/hypertrophy in several cell types; upregulating the expression of cytokines, cell adhesion molecules and TGFβ). All these alterations would increase the synthesis of extracellular matrix proteins through the activation of mesangial cells and interstitial and tubular fibroblasts, the stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and the infiltration and activation of macrophages, which would further increase inflammation, fibrosis, and ROS production (Mezzano et al., 2001; Ruiz-Ortega et al., 2001, 2006). In this study, AGII-treated mice developed structural alterations like

edema, deposit of collagen fibers and infiltration of mononuclear cells (lymphocytes, mastocytes, neutrophils, and macrophages), all of which were controlled by the administration of rSe-ACE.

Finally, our results indicate that AGII administration induced glomerulosclerosis (a chronic kidney disease) by increasing mesangial volume (Anderson et al., 1993; Orth et al., 1994) (Fig. 7). AGII has been reported to activate mesangial and tubular cells and interstitial fibroblasts, increasing the expression and synthesis of extracellular matrix proteins mediated by the release of TGFβ; AGII also participates in the inflammatory response, inducing the activation of mononuclear cells and increasing the levels of proinflammatory mediators (Mezzano et al., 2001), conditions that were observed in AGII-treated mice. TGFβ is thought to be fibrogenic, either directly or indirectly, through the induction of connective tissue growth factor (Meguid et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2001, 2006). Recent studies demonstrated that the activation of Nrf2 protects various tissues and organs against fibrosis via inhibition of TGF/Smad signaling (Oh et al., 2012). Nrf2 is a transcription factor that regulates the expression of genes encoding phase-2 enzymes (heme oxygenase-1, glutathione-S-transferase A1, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1) (Korkina, 2007), which can counteract inflammatory, fibrinogenic, and oxidative damages. There is considerable experimental evidence suggesting that Nrf2 signaling plays a protective role in renal injuries caused by various pathologic conditions (Choi et al., 2009, 2014). The cinnamic acid present in rSe-ACE has been reported to induce Nrf2 dissociation from Keap 1, leading to Nrf2 translocation to the nucleus, favoring the expression of ARE-regulated cytoprotective genes (Korkina, 2007); therefore, it is possible that some of the effects observed by the rSe-ACE extract could be mediated by these actions of cinnamic acid.

Altogether, these results show that rSe-ACE could control the wide range of effects of AGII and could be used as a comprehensive treatment for ED, being probably one of the most promissory approaches to prevent fibrosis in progressive renal diseases.

5. Conclusion

The results reported in this study indicate that rSe-ACE is able to control ED and associated pathologies such as hypertension, renal and liver damage, being a good candidate for the development of a phytochemical medicine for ED, avoiding the need for polydrug treatments, frequently required to control these pathologies.

Acknowledgements

The authors thank Biol. Nancy Arias García for animal care, Raquel Guerrero Alquicira and Pedro Medina for slide preparation and their valuable help in histological procedures, and Juan Francisco Rodriguez for copyediting this manuscript. The project was supported by CONACyT Básica 2012-169011. Zamilpa A. thanks Foundation IMSS.

Celeste Trejo-Moreno (e-mail: trejomc@hotmail.com) performed hepatic and renal damage studies and glomerular injury studies and drafted the manuscript. Gabriela Castro (e-mail: gcm_19@hotmail.com) induced endothelial dysfunction and performed blood pressure measurements. Marisol Méndez-Martínez (e-mail: mm.mary87@gmail.com) performed cytokine detection. Jesús Enrique Jiménez Ferrer (e-mail: enriqueferrer_mx@yahoo.com) provided the plant material and assisted data analyses. José Pedraza Chaverri (e-mail: pedrazachaverri@gmail.com) designed the antioxidant assays. Gerardo Arrellín (e-mail: garrellin@up.edu.mx) analyzed the immunohistological studies. Alejandro Zamilpa (e-mail: azamilpa_2000@yahoo.com.mx) performed the phytochemical analysis and characterized the chemical constituents. Omar Medina-Campos (e-mail: omar-noelmedina@gmail.com) assisted the antioxidant assays. Galia Lombardo-Earl (e-mail: galia100000@yahoo.com.mx) collected plant material and obtained the extract. Gerardo Joel Barrita-Cruz (e-mail: barritaj@hotmail.com) discussed the results and designed the study. Beatriz Hernández (e-mail: bhernandezt12@gmail.com) performed the immunohistological assays. Christian Carlos Ramírez (e-mail: chari_ouka@hotmail.com) performed the vascular remodeling studies. María Angélica Santana (e-mail: santana@uaem.mx) helped to draft the manuscript. Gladis Fragozo (email: gladis@unam.mx) drafted the manuscript and analyzed data. Gabriela Rosas (e-mail: gabyrosas62@hotmail.com) designed the overall study, analyzed data, and drafted the manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.036>.

References

Adya, R., Tan, B.K., Randeve, H.S., 2015. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. *J. Diabetes Res.* 2015, 648239.

Anderon, P.W., Do, Y.S., Hsueh, W.A., 1993. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension* 21 (1), 29–35.

Argueta, V.A., Cano, A.L., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina Tradicional mexicana. Inst. Nac. Indig.; México 1994 (1), 393–394.

Azzu, V., Brand, M.D., 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 35 (5), 298–307.

Bartolome, A.P., Villaseñor, I.M., Yang, W.C., 2013. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 340215.

Bastaki, S.M.A., Padol, I.T., Amir, N., Hunt, R.H., 2017. Effect of Aspirin and ibuprofen either alone or in combination on gastric mucosa and bleeding time and on serum prostaglandin E2 and thromboxane A2 levels in the anaesthetized rats *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-3110-1>.

Bosch, J., Abalde, J.G., Fernández, M., García-Pagán, J.C., 2010. Hepatic endothelial

dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J. Hepatol.* 53 (3), 558–567.

Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., Parker, N., 2004. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37 (6), 755–767.

Brazin, J., Malliaris, S., Groh, B., Mehrara, B., Hidalgo, D., Otterburn, D., Silver, R.B., Spector, J.A., 2014. Mast cells in the periprosthetic breast capsule. *Aesthetic Plast. Surg.* 38 (3), 592–601.

Brunt, E.M., 2004. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 24 (1), 3–20.

Bugianesi, E., McCullough, A.J., Marchesini, G., 2005. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42 (5), 987–1000.

Carlberg, L., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.

Chen, W.D., Chu, Y.F., Li, X.D., Gao, P.J., 2015. Angiotensin II induces expression of inflammatory mediators in vascular adventitial fibroblasts. *Sheng Li Xue Bao.* 25 (6), 603–610 (6).

Choi, H.K., Pokharel, Y.R., Lim, S.C., Han, H.K., Ryu, C.S., Kim, S., Kwak, M.K., Kang, K.W., 2009. Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor- β 1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240 (3), 377–384.

Choi, B.H., Kang, K.S., Kwak, M.K., 2014. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules* 19 (8), 12727–12759.

da Cunha, V., Tham, D.M., Martin-McNulty, B., Deng, G., Ho, J.J., Wilson, D.W., Rutledge, J.C., Vergona, R., Sullivan, M.E., Wang, Y.X., 2005. Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation. *Atherosclerosis* 178 (1), 9–17.

de Alwis, N.M.W., Day, C.P., 2008. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J. Hepatol.* 48 (Suppl 1), S104–S112.

Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22 (16), 4103–4110.

Endemann, D.H., Schiffrin, E.L., 2004. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (8), 1983–1992.

Feldman, D.L., Christian, J.J., 1981. The development of an acth-induced renal glomerular lesion in *Mus musculus*. An ultrastructural study. *J. Pathol.* 134 (3), 181–197.

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. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183.

Gibbons, G.H., Pratt, R.E., Dzau, V.J., 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 90 (2), 456–461.

Goldner, J., 1938. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am. J. Pathol.* 14 (2), 237.

Gorman, J.L., Liu, S.T., Slopock, D., Shariati, K., Hasanee, A., Olenich, S., Olfert, L.M., Haas, T.L., 2014. Angiotensin II evokes angiotensin II-like signals within skeletal muscle through co-ordinated effects on skeletal myocytes and endothelial cells (9). *PLoS One* 9 (1), e85537. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085537>.

Guasti, L., Marino, F., Cosentino, M., Maio, R.C., Rasini, E., Ferrari, M., Castiglioni, L., Klersy, C., Gaudio, G., Grandi, A.M., Lecchini, S., Venco, A., 2008. Prolonged statin-associated reduction in neutrophil reactive oxygen species and angiotensin II type 1 receptor expression: 1-year follow-up. *Eur. Heart J.* 29 (9), 1118–1126.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.

Hallersund, P., Elfvin, A., Helander, H.F., Fändriks, L., 2011. The expression of renin-angiotensin system components in the human gastric mucosa. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 12 (1), 54–64.

Henke, N., Schmidt-Ullrich, R., Dechend, R., Park, J.K., Qadri, F., Wellner, M., Obst, M., Gross, V., Dietz, R., Luft, F.C., Scheidert, C., Müller, D.N., 2007. Vascular endothelial cell-specific NF- κ B suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ. Res.* 3 (101), 268–276 (3).

Huang, D.W., Shen, S.C., Wu, J.S.B., 2009. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.* 57 (17), 7687–7692.

Huang, D.W., Shen, S.C., 2012. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism by modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Funct. Foods* 4 (1), 358–366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.005>.

Husain, K., Hernandez, W., Ansari, R.A., Ferder, L., 2015. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J. Biol. Chem.* 26 (6), 209–217.

Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D.M., Hernández-Sandoval, L., Martínez, M., 2010. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm. Biol.* 48 (7), 732–739. <http://dx.doi.org/10.3109/13880200903271280>.

Intengan, H.D., Schiffrin, E.L., 2001. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581–587.

Jaimes, E.A., Hua, P., Tian, R.X., Raji, L., 2010. Human glomerular endothelium: interplay among glucose, free fatty acids, angiotensin II, and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 298, F125–F132. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00248.2009>.

Karanovic, D., Grujic-Milanovic, J., Miloradovic, Z., Ivanov, M., Jovovic, D., Vajic, U.J., Zivotic, M., Markovic-Lipkovic, J., Mihailovic-Stanojevic, N., 2016. Effects of single and combined losartan and tempol treatments on oxidative stress, kidney structure

- and function in spontaneously hypertensive rats with early course of proteinuric nephropathy. *PLoS One* 25 (11), e0161706 (8).
- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 25 (405), 421–424 (6785).
- Korkina, L.G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53 (1), 15–25.
- Lakshmi, B.S., Sujatha, S., Anand, S., Sangeetha, K.N., Narayanan, R.B., Katiyar, C., Kanauija, A., Duggar, R., Singh, Y., Srinivas, K., Bansal, V., Sarin, S., Tandon, R., Sharma, S., Singh, S., 2009. Cinnamic acid, from the bark of *Cinnamomum cassia*, regulates glucose transport via activation of GLUT4 on I6 myotubes in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. *J. Diabetes* 1 (2), 99–106.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 (71), 952–958 (4).
- Liang, B., Wang, X., Zhang, N., Yang, H., Bai, R., Liu, M., Bian, Y., Xiao, C., Yang, Z., 2015. Angiotensin-(1-7) Attenuates Angiotensin II-Induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 Expression via the MAS Receptor Through Suppression of P38 and NF- κ B Pathways in HUVECs. *Cell Physiol. Biochem.* 35 (6), 2472–2482.
- Liu, H., Chen, T., Li, N., Wang, S., Bu, P., 2015. Role of SIRT3 in Angiotensin II-induced human umbilical vein endothelial cells dysfunction. *BMC Cardiovasc. Disord.* 30, 15–81.
- Lombardo-Earl, G., Roman-Ramos, R., Zamilpa, A., Herrera-Ruiz, M., Rosas-Salgado, G., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E., 2014. Extracts and fractions from edible roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with antihypertensive activity. *Evid. Based Complement Altern. Med.* 2014, 594326. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/594326>.
- Lozoya, X., 1980. Mexican medicinal plants used for treatment of cardiovascular diseases. *Am. J. Chin. Med.* 8 (1–2), 86–95.
- Mansia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kjeldsen, S.E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R.E., Struijker, B.H.A., Zanchetti, A., European Society of Hypertension; European Society of Cardiology, 2007. 2007 ESH-ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Blood Press.* 16 (3), 135–232.
- Marchesi, C., Paradis, P., Schiffrin, E.L., 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 367–374.
- Marquez, F.Z., Campain, A.E., Davern, P.J., Yang, Y.H., Head, G.A., Morris, B.J., 2011. Genes influencing circadian differences in blood pressure in hypertensive mice. *PLoS One.* 6, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019203>.
- Meguid, El, Nahas, A., Bello, A.K., 2005. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 22–28 (365), 331–340 (9456).
- Mezzano, S.A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., 2001. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635–638.
- Morris, E.M., Fletcher, J.A., Thyfault, J.P., Rector, R.S., 2013. The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. *Mol. Cell Endocrinol.* 378 (1), 29–40.
- Nishida, M., Kitajima, N., Saiki, S., Nakaya, M., Kurose, H., 2010. Regulation of Angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF- κ B. *Nitric Oxide* 25, 112–117.
- Nunn, A.V., Bell, J., Barter, P., 2007. The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. *Nucl. Recept.* 25. <http://dx.doi.org/10.1186/1478-1336-5-1>.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R., 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457–464.
- Oh, C.J., Kim, J.Y., Min, A.K., Park, K.G., Harris, R.A., Kim, H.J., Lee, I.K., 2012. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 671–682.
- Olivares-Reyes, J.A., Arellano-Plancarte, A., Castillo-Hernandez, J.R., 2009. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302 (2), 128–139.
- Orth, S.R., Weinreich, T., Bönlisch, S., Weih, M., Ritz, E., 1994. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp. Nephrol.* 3 (1), 23–33.
- Raij, L., Azar, S., Keane, W., 1984. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 26, 137–143.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., Nishigaki, I., 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9 (10), 1057–1069.
- Rolo, A.P., Teodoro, J.S., Palmeira, C.M., 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 52 (1), 59–69.
- Rudic, R.D., Sessa, W.C., 1999. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (3), 673–677.
- Ruiz-Ortega, M., Rupérez, M., Esteban, V., Rodríguez-Vita, J., Sánchez-López, E., Carvajal, G., Egido, J., 2006. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (1), 16–20.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Rupérez, M., Egido, J., 2001. Pro-inflammatory actions of angiotensins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 321–329.
- Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y., Arakawa, S., Horike, H., Komai, N., Sasaki, T., Tsujioka, K., Makino, H., Kashiwara, N., 2005. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 288, F1144–F1152.
- Savoia, C., Sada, L., Zezza, L., Pucci, L., Lauri, F.M., Befani, A., Alonzo, A., Volpe, M., 2011. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *Int. J. Hypertens.* 2011, 281240.
- Schmitt, C.A., Dirsch, V.M., 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide* 2, 77–91.
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T.J., 2012. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vasc. Pharmacol.* 56 (5–6), 216–231.
- Sprague, A.H., Khalil, R.A., 2009. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 15 (78), 539–552 (6).
- The Plant List, 2013. A Working List of All Plant Species** <www.theplantlist.org>.
- Togashi, N., Ura, N., Higashiura, K., Murakami, H., Shimamoto, K., 2000. The contribution of skeletal muscle tumor necrosis factor-alpha to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *J. Hypertens.* 18, 1605–1610.
- Touyz, R.M., 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248–252.

13. REFERENCIAS

- Ahmad, A.; Sattar, M.Z.; Rathore, H.A.; Hussain, A.I.; Khan, S.A.; Fatima, T.; Afzal, S.; Abdullah, N.A.; Johns, E.J. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of L-arginine and NaHS: A comparative in vitro study. *Acta Pol. Pharm.* 2015, 72, 245–252.
- Almanza-Perez, J.C.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Blancas-Flores, G.; Campos-Sepulveda, A.E.; Roman-Ramos, R.; Garcia-Macedo, R.; Cruz, M. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed. Pharmacother.* 2010, 64, 534–540.
- Amin, F.U.; Shah, S.A.; Kim, M.O. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. *Neurochem. Int.* 2016, 96, 1–12.
- Anderson, P.W., Do, Y.S., Hsueh, W.A., 1993. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension* 21 (1), 29–35.
- Balasuriya, N., Rupasinghe, V. 2011. Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease.*1(5):172-188.
- Barhoumi, T., Kasal, D.A., Li, M.W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M.F., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2011. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension.* 57(3):469-76.
- Bernatova, I. 2014. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int.* 2014:598271.
- Böhm, F., Pernow, J. 2007. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 1;76(1):8-18.
- Brown NJ, Vaughan DE. 2000. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med.* 45:419-29.
- Brunt, E.M., 2004. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 24 (1), 3–20.

- Cai, H., Harrison, D.G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87:840-4.
- Carlström M, Brown RD, Yang T, Hezel M, Larsson E, Scheffer PG, Teerlink T, Lundberg JO, Persson AE. 2013. L-arginine or tempol supplementation improves renal and cardiovascular function in rats with reduced renal mass and chronic high salt intake. *Acta Physiol (Oxf).* 207(4):732-41. doi: 10.1111/apha.12079.
- Chen J, Ma X, Yang Y, Dai Z, Wu Z, Wu G. 2018. Glycine enhances expression of adiponectin and IL-10 in 3T3-L1 adipocytes without affecting adipogenesis and lipolysis. *Amino Acids.* doi: 10.1007/s00726-018-2537-3.
- Chen, S.; Liu, Y; Wang, X.; Wang, H.; Li, S.; Shi, H.; Zhu, H.; Zhang, J.; Pi, D.; Hu, C.A.; et al. Asparagine improves intestinal integrity, inhibits TLR4 and NOD signaling, and differently regulates p38 and ERK1/2 signaling in weanling piglets after LPS challenge. *Innate Immun.* 2016, 22, 577–587.
- Cho, E., Piao, X., Jang, M., Baek, S., Kim, H, Kang, K., Kwon, S., Park, J. 2008. The effect of steaming on the free amino acid contents and antioxidant activity of Panax ginseng. *Food Chemistry.* 107, 876–882.
- Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. 2018. *Front Immunol.* 9:294. doi: 10.3389/fimmu.2018.00294.
- Choi, H.K., Pokharel, Y.R., Lim, S.C., Han, H.K., Ryu, C.S., Kim, S., Kwak, M.K., Kang, K.W., 2009. Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor- β 1 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240 (3), 377–384.
- Choi, B.H., Kang, K.S., Kwak, M.K., 2014. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules* 19 (8), 12727–12759.

- Chuang SM, Juan YS, Long CY, Huang CH, Levin RM, Liu KM. 2011. The effect of L-arginine on bladder dysfunction following ovariectomy in a rabbit model. *Int Urogynecol J.* (11):1381-8. doi: 10.1007/s00192-011-1468-2.
- Coronel, I., Arellano-Mendoza, M.G., del Valle-Mondragon, L., Vargas-Robles, H., Castorena-Torres, F., Romo, E., Rios, A., Escalante, B. 2010. L-arginine and antioxidant diet supplementation partially restores nitric oxide-dependent regulation of phenylephrine renal vasoconstriction in diabetics rats. *J Ren Nutr.* 20:158-68.
- Das,S.; Mattson, D. L. Exogenous L- Arginine Attenuates the Effects of Angiotensin II on Renal Hemodynamics and the Pressure Natriuresis-Diuresis Relationship. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*2014,41,270–278
- Davignon, J., Ganz, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 109, 27-32.
- de Alwis, N.M.W., Day, C.P., 2008. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J. Hepatol.* 48, S104–S112.
- Dhawan, V., Handu, S.S., Nain, C.K., Ganguly, N.K. 2005. Chronic L-arginine supplementation improves endothelial cell vasoactive functions in hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys. *Mol Cell Biochem.* 269:1-11.
- Díaz, L., Briones, J., Basilio A. 2013. Insuficiencia renal aguda (IRA) y terapia de reemplazo renal temprano (TRR). *Rev. Asoc. Mex. Med. Crit. Ter. Int.* 27: 237-244.
- Doller, A., Gauer, S., Sobkowiak, E., Geiger, H., Pfeilschifter, J., Eberhardt, W. 2009. Angiotensin II induces renal plasminogen activator inhibitor-1 and cyclooxygenase-2 expression post-transcriptionally via activation of the mRNA-stabilizing factor human-antigen R. *Am J Pathol.* 174:1252-63.
- Douillette, A., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S.P., Clément, J.F., Chénard, V., Moreau, P., Servant, M.J. 2006. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I κ B kinase complex. *J Biol Chem.* 281:13275-84.
- El Hafidi, M., Pérez, I., Zamora, J., Soto, V., Carvajal-Sandoval, G., Baños, G. 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood

pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:R1387-93.

Endemann, H., Schiffrin, L. 2004. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc Nephrol.* 15:1983-92.

Esteller, A. 2005. Biology of the vascular wall and metabolic syndrome. *Nutr Hosp.* 20(1):5-17.

Feng, L., Gan, L., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Tang, L., Kuang, S.Y., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q. 2017. Gill structural integrity changes in fish deficient or excessive in dietary isoleucine: Towards the modulation of tight junction protein, inflammation, apoptosis and antioxidant defense via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling pathways. *Fish Shellfish Immunol.* 63:127-138.

Filho, A.G., Kinote, A., Pereira, D.J., Rennó, A., dos Santos, R.C., Ferreira-Melo, S.E., Velloso, L.A., Bordin, S., Anhô, G.F., Moreno Junior, H. 2013. Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 700(1-3):201-9.

Förstermann, U., y Sessa, C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33(7):829-37.

Froh, M.; Thurman, R.G.; Wheeler, M.D. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002, 283, G856–G863.

Gao P, Xu TT, Lu J, Li L, Xu J, Hao DL, Chen HZ, Liu DP. 2014. Overexpression of SIRT1 in vascular smooth muscle cells attenuates angiotensin II-induced vascular remodeling and hypertension in mice. *J Mol Med (Berl).* 92(4):347-57.

Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? 2017. *Am J Physiol Cell Physiol.* 312(3):C254-C262.

Gill, N.S., Garg, M., Bansal, R., Sood, S., Muthuraman, A., Bali, M., Sharma, P.D. 2009. Evaluation of antioxidant and antiulcer potential of *Cucumis sativum* L. seed extract in rats. *Asian J Clin Nutr* 1:131–138.

- Gloire, G.; Legrand-Poels, S.; Piette, J. 2006. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493–1505.
- Goldner, J., 1938. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am. J. Pathology*, 14(2), 237.
- Gómez-Zamudio, J.H.; García-Macedo, R.; Lázaro-Suárez, M.; Ibarra-Barajas, M.; Kumate, J.; Cruz, M. Vascular endothelial function is improved by oral glycine treatment in aged rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015, 93, 465–473.
- González, J.; Valls, N.; Brito, R.; Rodrigo, R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J. Cardiol.* 2014, 6, 353–366.
- Gorman, J.L., Liu, S.T., Slopock, D., Shariati, K., Hasanee, A., Olenich, S., Olfert, I.M., Haas, T.L., 2014. Angiotensin II evokes angiogenic signals within skeletal muscle through co-ordinated effects on skeletal myocytes and endothelial cells. *PLoS One*. 9;9:e85537. doi: 10.1371/journal.pone.0085537.
- Gräfe M, Auch-Schweik W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E. 1997. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res.* 81(5):804-11.
- Granzow, M., Schierwagen, R., Klein, S., Kowallick, B., Huss, S., Linhart, M., Mazar IG, Görtzen J, Vogt A, Schildberg FA, Gonzalez-Carmona MA, Wojtalla A, Krämer B, Nattermann J, Siegmund SV, Werner N, Fürst DO, Laleman W, Knolle P, Shah VH, Sauerbruch T, Trebicka J. 2014. Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology.* 60(1):334-48. doi: 10.1002/hep.27117.
- Guerrot D, Bellien J. 2014. Editorial: renal endothelial dysfunction: evolving concepts and perspectives. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 14(1):1-2.
- Guo, F., Chen, X.L., Wang, F., Liang, X., Sun, Y.X., Wang, Y.J. 2011. Role of angiotensin II type 1 receptor in angiotensin II-induced cytokine production in macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 31:351-61.

- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 8:2003-14.
- Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., Harrison, D.G. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* 204:2449-2460.
- Haddad, J.J.; Harb, H.L. L- γ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: A signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol. Immunol.* 2005, 42, 987–1014.
- Harrison, G.D., Guzik, T., Lob, H., Madhur, M., Marvar, P., Thabet, S., Vinh, A., Weyand, C. 2011. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension.* 57:132-140.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M.Y., Oskoueian, E. 2011. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. *Int J Mol Sci.* 12:3422-31.
- Hnia, K.; Gayraud, J.; Hugon, G.; Ramonatxo, M.; De La Porte, S.; Matecki, S.; Mornet, D. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor- κ B/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers. *Am. J. Pathol.* 2008, 172, 1509–1519.
- Hoch, N.E., Guzik, T.J., Chen, W., Deans, T., Maalouf, S.A., Gratzel, P., Weyand, C., Harrison, D.G. 2009. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296:R208-16.
- Hoesel, B., Schmid, J.A. 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 12:86.
- Hou E, Sun N, Zhang F, Zhao C, Usa K, Liang M, Tian Z. 2017. Malate and Aspartate Increase L-Arginine and Nitric Oxide and Attenuate Hypertension. *Cell Rep.* 19(8):1631-1639. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.071.

- Indra, M.R., Karyono, S., Ratnawati, R., Malik, S.G. 2013. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes*. 6:275.
- Intengan, H.D., Schiffrin, E.L., 2001. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581–587.
- Irani, K. 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.* 87, 179–183.
- Jaimes, E.A., Hua, P., Tian, R.X., Raij, L. 2010. Human glomerular endothelium: interplay among glucose, free fatty acids, angiotensin II, and oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 298(1):F125-32.
- Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kim, O.K., Kim, H.W., Ohigashi, H. 2002. Suppressive Effects of Edible Thai Plants on Superoxide and Nitric Oxide Generation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 3:215-223.
- Kho, M.C., Lee, Y.J., Cha, J.D., Choi, K.M., Kang, D.G., Lee, H.S. 2014. *Gastrodia elata* Ameliorates High-Fructose Diet-Induced Lipid Metabolism and Endothelial Dysfunction. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014:101624.
- Kietadisorn, R., Juni, P., Moens, L. 2012. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1;302:E481-95.
- Kim HJ, Hart J, Knatz N, Hall MW, Wewers MD. 2004. Janus kinase 3 down-regulates lipopolysaccharide-induced IL-1 beta-converting enzyme activation by autocrine IL-10. *J Immunol*. 172(8):4948-55.
- Klabunde, R. 2005. Cellular structure and function de *Cardiovascular Physiology Concepts*. Editor Lippincott W. Segunda edición. ISBN-10 1451113846. 41-56 pp.
- Kolka y Bergman. 2012. The Barrier Within: Endothelial Transport of Hormones. *Physiology* 27:237-247.

- Kolmos, M.; Krawczyk, R.S.; Kruuse, C. Effect of high-intensity training on endothelial function in patients with cardiovascular and cerebrovascular disease: A systematic review. *SAGE Open Med.* 2016, 4, 1–13.
- Korkina, L.G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53 (1), 15–25.
- Kumar, D., Kumar, S., Singh, J., Narender, Rashmi, Vashistha, B., Singh, N. 2010. Free Radical Scavenging and Analgesic Activities of *Cucumis sativus* L. Fruit Extract. *J Young Pharm.* 2(4):365-8.
- Kuo, Y.H., Ikegami, F., Lambein, F. 2003. Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of *Panax ginseng*. *Phytochemistry.* 62(7):1087-91.
- Lanz, T., Ding, Z., Ho, P., Luo, J., Agrawal, N., Srinagesh, H., Axtell, R., Zhang, H., Platten, M., Wyss-Coray, T., Steinman, L. 2010. Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF- β . *J Clin Invest.* 120(8):2782–2794.
- Lee, O.H., Kim, K.I., Han, C.K., Kim, Y.C., Hong, H.D. 2012. Effects of acidic polysaccharides from *gastrodia* rhizome on systolic blood pressure and serum lipid concentrations in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Int J Mol Sci.* 13:698-709.
- Lemarié, C. A. y Schiffrin, E. L. 2010. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 1(1):19-31.
- Li, H.; Förstermann, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013, 13, 161–167.
- Liang, B., Wang, X., Zhang, N., Yang, H., Bai, R., Liu, M., Bian, Y., Xiao, C., Yang, Z. 2015. Angiotensin-(1-7) Attenuates Angiotensin II-Induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 Expression via the MAS Receptor Through Suppression of P38 and NF- κ B Pathways in HUVECs. *Cell Physiol. Biochem.* 35, 2472–2482.
- Lombardo-Earl, G., Roman-Ramos, R., Zamilpa, A., Herrera-Ruiz, M., Rosas-Salgado, G., Tortoriello, J., Jiménez-Ferrer, E. 2014. Extracts and Fractions from

Edible Roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with Antihypertensive Activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:594326.

Lu Y, Zhu X, Li J, Fang R, Wang Z, Zhang J, Li K, Li X, Bai H, Yang Q, Ben J, Zhang H, Chen Q. 2017. Glycine prevents pressure overload induced cardiac hypertrophy mediated by glycine receptor. *Biochem Pharmacol.* 123:40-51.

Lyle, A.N., Griendling, K.K. 2006. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda).* 21:269-80.

Ma, X.; Dang, C.; Kang, H.; Dai, Z.; Lin, S.; Guan, H.; Liu, X.; Wang, X.; Hui, W. 2015. Saikosaponin-D reduces cisplatin-induced nephrotoxicity by repressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signalling pathways. *Int. Immunopharmacol.* 28, 399–408.

Machha, A., Mustafa, M.R. 2005. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46(1):36-40.

Marchesi, C., Paradis, P., Schiffrin, E. L. 2008. Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences.* 29:367-374.

Margetic, S. 2012. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb).* 22(1):49-62.

Maron BA, Michel T. 2012. Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ J.* 76(11):2497-512.

Márques, J., Sabán, R.J. y de la Torre, N. 2009. El endotelio sano y enfermo. Capítulo 3 en *Control Global Del Riesgo Cardiometabólico*. Editor Sabán R.J. Vol.1. Ediciones Díaz de Santos. 81-105 pp. ISBN 978-84-7978-878-0.

Martini F, Timmons M, Tallitsch R. 2009. Human anatomy, Chap 22 The Cardiovascular System Vessels and Circulation. Editor Pearson Benjamin Cummings. Sexta edición. ISBN-13: 978-0321632012.

- Matsumoto, S., Gotoh, N., Hishinuma, S., Abe, Y., Shimizu, Y., Katano, Y., Ishihata, A. 2014. The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *Nutrients*. 6(3):1236-50.
- Méndez M.M. 2014. Evaluación de la capacidad de dos extractos de diferente polaridad de *Cucumis sativus* para controlar las patologías asociadas a la obesidad e inducir un ambiente inmunoregulator en un modelo murino de obesidad. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Meng Q, Cooney M, Yepuri N, Cooney RN. 2017. L-arginine attenuates Interleukin-1 β (IL-1 β) induced Nuclear Factor Kappa-Beta (NF- κ B) activation in Caco-2 cells. *PLoS One*. 12(3):e0174441.
- Mezzano, S.A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., 2001. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635–638.
- Mi, X.S., Feng, Q., Lo, A.C., Chang, R.C., Lin, B., Chung, S.K., So, K.F. 2012. Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by *Lycium barbarum* polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension. *PLoS One*. 7:e45469.
- Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 5, 62–71.
- Mitsides, N.; Cornelis, T.; Broers, N.J.H.; Diederens, N.M.P.; Brenchley, P.; van der Sande, F.M.; Schalkwijk, C.G.; Kooman, J.P.; Mitra, S. Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease. *PLoS ONE* 2017, 12, 1–15.
- Miyazawa, N., Okazaki, M., Ohga, S. 2008. Antihypertensive effect of *Pleurotus nebrodensis* in spontaneously hypertensive rats. *J Oleo Sci*. 57(12):675-81.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. 2002. Effects of angiotensin II infusion on the expression

and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 8;90(4):E58-65.

Montezano, A.C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F.J., Touyz, R.M. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2014 16(6):431.

Morais, S.R.; Brito, V.G.B.; Mello, W.G.; Oliveira, S.H.P. L-arginine modulates inflammation and muscle regulatory genes after a single session of resistance exercise in rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 2018, 28, 425–435.

Morgan, M.J., Liu, Z.G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 21:103-15.

Mukherjee, P.K., Nema, N.K., Maity, N., Sarkar, B.K. 2013. Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia.* 84:227-36.

Muniyappa, R. y Sowers, J. 2013. Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.*14(1): 5–12.

Nadar S, Blann AD, Lip GY. 2004. Antihypertensive therapy and endothelial function. *Curr Pharm Des.* 10(29):3607-14.

Nakai, K., Kawato, T., Morita, T., Iinuma, T., Kamio, N., Zhao, N., Maeno, M. 2013. Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT(1) receptor in osteoblasts. *Biochimie.* 95:922-33.

Nakajima, S.; Kitamura, M. 2013. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 162–174.

Nishida, M., Kitajima, N., Saiki, S., Nakaya, M., Kurose, H. 2010. Regulation of Angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF- κ B. *Nitric Oxide.* 25(2):112-7.

Núñez, O. 2013. Efecto de tres extractos con diferente polaridad de *Cucumis sativus* (pepino) sobre la hipertensión arterial y sus patologías asociadas en un modelo murino. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- Oh, C.J., Kim, J.Y., Min, A.K., Park, K.G., Harris, R.A., Kim, H.J., Lee, I.K., 2012. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 671–682.
- Olszanecki, R., Gebaska, A., Kozlovski, V. y Gryglewski, R.J. 2002. Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal Of Physiology And Pharmacology.* 53:571.
- Orth, S.R., Weinreich, T., Bönisch, S., Weih, M., Ritz, E., 1994. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp. Nephrol.* 3 (1), 23–33.
- Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, B., Ndebele, K. 2014. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int J Inflam.* 2014:689360.
- Palloshi, A., Fragasso, G., Piatti, P., Monti, L.D., Setola, E., Valsecchi, G., Galluccio, E., Chierchia, S.L., Margonato, A. 2004. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *Am J Cardiol.* 93:933-5.
- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. 1999. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation.* 12;100(15):1646-52.
- Paust, H.J., Turner, J.E., Steinmetz, O.M., Peters, A., Heymann, F., Hölscher, C., Wolf, G., Kurts, C., Mittrücker, H.W., Stahl, R.A., Panzer, U. 2009. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 20:969-79.
- Pedras, M.S.C., Chunalá, P.B., Suchy, M. 2003. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry* 64: 949–956.

- Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, J. A. y Robles-Díaz, G. 2006. Receptores para la angiotensina II, diferentes a los clásicos receptores membranales AT₁ y AT₂: características y su papel en el funcionamiento celular. *REB*. 25(2):55-60.
- Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. 2018. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiol Pol*. doi: 10.5603/KP.a2018.0071.
- Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(3):645-51.
- Radenković M, Stojanović M, Potpara T, Prostran M. 2013. Therapeutic approach in the improvement of endothelial dysfunction: the current state of the art. *Biomed Res Int*. 252158.
- Ramprasath T, Kumar PH, Puhari SS, Murugan PS, Vasudevan V, Selvam GS. 2012. L-Arginine ameliorates cardiac left ventricular oxidative stress by upregulating eNOS and Nrf2 target genes in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 428(3):389-94.
- Ren, W.; Yin, J.; Wu, M.; Liu, G.; Yang, G.; Xion, Y.; Su, D.; Wu, L.; Li, T.; Chen, S.; et al. Serum amino acids profile and the beneficial effects of L-arginine or L-glutamine supplementation in dextran sulfate sodium colitis. *PLoS ONE* 2014, 9, 1–13.
- Renna, N.F. 2013. Oxidative stress, vascular remodeling, and vascular inflammation in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013:710136.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kwon, J., 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE* 2000, pe1.
- Rizk SM, El-Maraghy SA, Nassar NN. 2014. A novel role for SIRT-1 in L-arginine protection against STZ induced myocardial fibrosis in rats. *PLoS One*. 9(12):e114560. doi: 10.1371/journal.pone.0114560.

- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Rupérez, M., Egido, J., 2001. Pro-inflammatory actions of angiotensins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 321–329.
- Ruiz-Ortega, M., Rupérez, M., Esteban, V., Rodríguez-Vita, J., Sánchez-López, E., Carvajal, G., Egido, J., 2006. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (1), 16–20.
- Ruiz-Ramírez, A.; Ortiz-Balderas, E.; Cardozo-Saldaña, G.; Diaz-Diaz, E.; El-Hafidi, M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin. Sci. (Lond.)* 2014, 126, 19–29.
- Salahuddin, M., Jalalpure, S.S. 2010. Antidiabetic activity of aqueous fruit extract of *Cucumis trigonus* Roxb. in streptozotocin-induced-diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 127:565-7.
- Santeliz, C.H., Romano, E. L., González, C. A. y Hernández, H. H. 2008. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial.
- Schiffrin, E.L., Park, J.B., Pu, Q. 2002. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 20:71-8.
- Schiffrin EL. 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 43(1):19-29.
- Schiffrin, E.L. 2013. The immune system: role in hypertension. *Can J Cardiol.* 29 :543-8.
- Schiffrin, E.L., Touyz, R.M. 2003. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol.* 42:911-3.
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T.J. 2012. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol.* 56(5-6):216-31.
- Schwingshackl, L., Christoph, M., Hoffmann, G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function-A Systematic Review and Meta-Analysis. 2015. *Nutrients.* 7(9):7651-75.

- Shao, J., Nangaku, M., Miyata, T., Inagi, R., Yamada, K., Kurokawa, K., Fujita, T. 2003. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension*. 42:31-8.
- Silva, P.M. 2010. From endothelial dysfunction to vascular occlusion: role of the renin-angiotensin system. *Rev Port Cardiol*. 29(5):801-24.
- Singh, N., Sood, S., Muthuraman, A., Garg, M., Kumar, R., Bali, M., Harma P. 2010. Antioxidant, Anti-inflammatory and Analgesic Potential of *Cucumis sativus* Seed Extract. *Lat. Am. J. Pharm.* 29 : 927-32.
- Tabet, F., Schiffrin, E.L., Callera, G.E., He, Y., Yao, G., Ostman, A., Kappert, K., Tonks, N.K., Touyz, R.M. 2008. Redox-sensitive signaling by angiotensin II involves oxidative inactivation and blunted phosphorylation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res*. 103:149-58.
- Tan, S., Zhou, S., Luo, Y. 2014. Baicalein pretreatment confers cardioprotection against acute myocardial infarction by activating the endothelial nitric oxide synthase signaling pathway and inhibiting oxidative stress. *Mol Med Rep*. 9:2429-34.
- Tanaka, S.; Masuda, T.; Kamiya, K.; Hamazaki, N.; Akiyama, A.; Kamada, Y.; Maekawa, E.; Noda, C.; Yamaoka-Tojo, M.; Ako, J. A single session of neuromuscular electrical stimulation enhances vascular endothelial function and peripheral blood circulation in patients with acute myocardial infarction. *Int. Heart J*. 2016, 57, 676–681.
- Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. 2012. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 15;16(4):363-73.
- Touyz, R.M., Yao, G., Viel, E., Amiri, F., Schiffrin, E.L. 2004a. Angiotensin II and endothelin I regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, 22:1141-9.

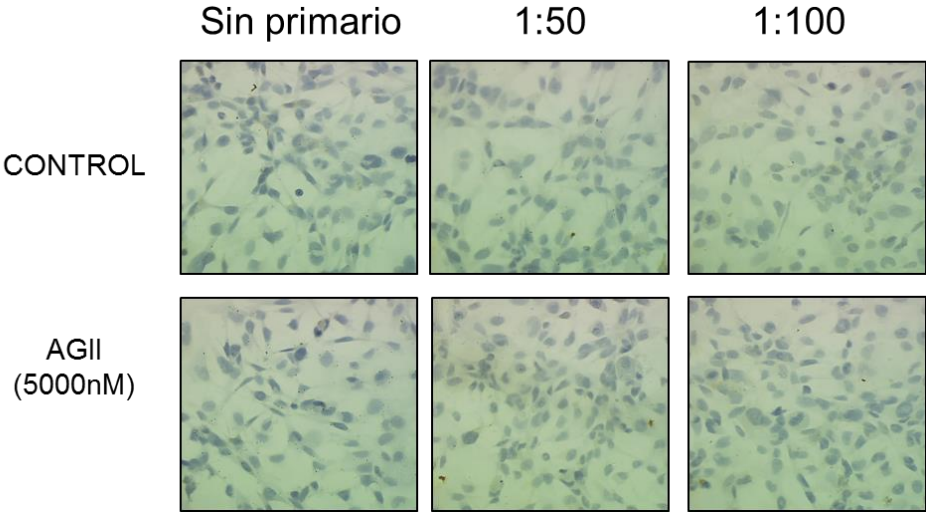
- Touyz, R.M. 2004b. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 44:248-52.
- Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Perez-Garcia MD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santana MA, Esquivel-Guadarrama FR, Castillo A, Cervantes-Torres J, Fragoso G, Rosas-Salgado G. Cucumis sativus Aqueous Fraction Inhibits Angiotensin II-Induced Inflammation and Oxidative Stress In Vitro. *Nutrients*. 10(3). pii: E276.
- Urso, C., Caimi, G. 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Minerva Med.*102(1):59-77.
- Van den Eynden, J.; Ali, S.S.; Horwood, N.; Carmans, S.; Brône, B.; Hellings, N.; Steels, P.; Harvey, R.J.; Rigo, J.M. Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Front. Mol. Neurosci.* 2009, 20, 2–9.
- Venegas-Pont, M., Manigrasso, M.B., Grifoni, S.C., LaMarca, B.B., Maric, C., Racusen, L.C., Glover, P.H., Jones, A.V., Drummond, H.A., Ryan, M.J. 2010. Tumor necrosis factor-alpha antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 56:643– 649.
- Versteeg, H., Heemskerk, W., Levi, M., Reitsma, H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* (1):327-58.
- Wang, B., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Kuang, S.Y., Jiang, J., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Liu, Y., Zhou, X.Q. 2015. Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF-κB, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine. *Aquat Toxicol.* 158:125-37.
- Wang, H.D.; Lü, X.X.; Lu, D.X.; Qi, R.B.; Wang, Y.P.; Fu, Y.M.; Wang, L.W. 2009. Glycine inhibits the LPS-induced increase in cytosolic Ca²⁺ concentration and TNFα production in cardiomyocytes by activating a glycine receptor. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 1107–1114.

- Wang, L., Xu, R., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Tu, Y., Zeng, X. 2010. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*. 123, 1259–1266.
- Wattanapitayakul, S.K., Weinstein, D.M., Holycross, B.J., Bauer, J.A. 2000. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J*. 14:271-8.
- Wolf, G.; Wenzel, U.; Burns, K.D.; Harris, R.C.; Stahl, R.A.; Thaiss, F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 2002, 61, 1986–1995.
- Xiong X, Wang X, Lu Y, Wang E, Zhang Z, Yang J, Zhang H, Li X. 2014. Hepatic steatosis exacerbated by endoplasmic reticulum stress-mediated downregulation of FXR in aging mice. *J Hepatol*. 60(4):847-54.
- Xu, F.L., You, H.B., Li, X.H., Chen, X.F., Liu, Z.J., Gong, J.P. 2008. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. *Am J Surg*. 196(1):139-48.
- Yagi, S., Akaike, M., Aihara, K., Ishikawa, K., Iwase, T., Ikeda, Y., Soeki, T., Yoshida, S., Sumitomo-Ueda, Y., Matsumoto, T., Sata, M. 2010. Endothelial nitric oxide synthase-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via reduced oxidant injury. *Hypertension*. 55(4):918-23.
- Yamashina, S.; Konno, A.; Wheeler, M.D.; Rusyn, I.; Rusyn, E.V.; Cox, A.D.; Thurman, R.G. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr. Cancer* 2001, 40, 197–204.
- Yan J, Tie G, Messina LM. 2012. Tetrahydrobiopterin, L-arginine and vitamin C actsynergistically to decrease oxidative stress, increase nitricoxide and improve blood flow after induction of hindlimbischemia in the rat. *Mol Med*. 18:676-84.

Yu HR, Tsai CC, Chang LS, Huang HC, Cheng HH, Wang JY, Sheen JM, Kuo HC, Hsieh KS, Huang YH, Yang KD, Hsu TY. 2017. I-Arginine-Dependent Epigenetic Regulation of Interleukin-10, but Not Transforming Growth Factor- β , Production by Neonatal Regulatory T Lymphocytes. *Front Immunol.* 8:487.

Zhou, X., Han, D., Xu, R., Wu, H., Qu, C., Wang, F., Wang, X., Zhao, Y. 2016. Glycine protects against high sucrose and high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Oncotarget.* 7:80223-80237.

14. ANEXO 1. Inmunocitoquímica para VCAM-1.



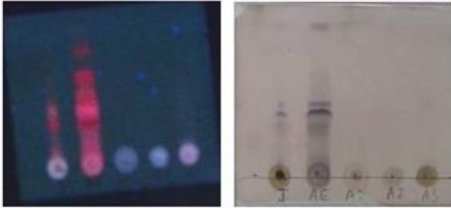
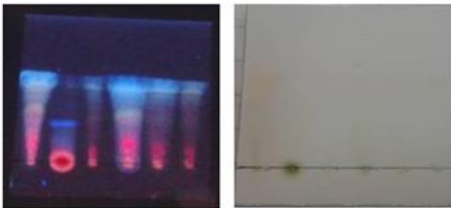
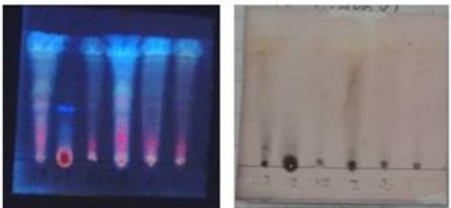
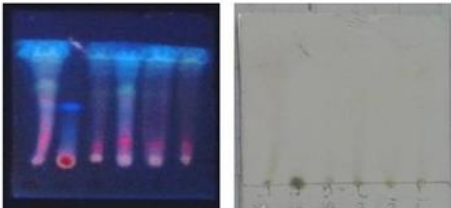
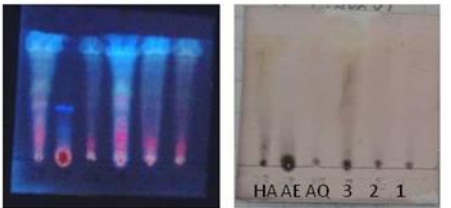
Efecto de la AngII sobre la expresión de VCAM-1. La AngII no induce la expresión de VCAM-1 pese a la concentración de 5000nM.

14. ANEXO 2. Cromatografías en capa fina (CCF) de las subfracciones de *Cucumis sativus*

Condiciones	Placas	Muestras
A) Fase Normal Sistema: CH ₃ Cl ₂ : MeOH Proporción 7:3 Revelador: 4 Hidroxibenzaldehído (Flavonoides)		HA=Hidroalcolólico AE=Acetato de Etilo AQ=Acuoso 3=Sobrenadante 2=Sólido 1 1=Sólido 2
B) Fase Normal Sistema: AcOEt:MeOH:H ₂ O:Hac Proporción 7:2:2:0.5 Revelador: Naftol (Polisacáridos)		1=Hidroalcolólico 2= Acetato de Etilo 3=Acuoso 4=Acuoso 5= Sobrenadante 1 (F1) 6=Sobrenadante 2 (F1) 7= F2 8= F3 9=Sólido 1
C) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H ₂ O Proporción 35:35:1:2 Revelador: Ninhidrina (Aminoácidos)		AQ= Acuoso 1= F1 2= F2 3= F3 G= Glicina A= Ácido aspártico L= Leucina I= Isoleucina
D) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H ₂ O Proporción 70:70:10:20 Revelador: 4-hidroxibenzaldehído (Flavonoides)		HA=Hidroalcolólico AE=Acetato de Etilo SN=F1 R=Rutina S2= F3 S1=F2 L=Lignano V=Valina
E) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H ₂ O Proporción 70:70:10:20 Revelador: Flavonoides (Flavonoides)		HA=Hidroalcolólico AE=Acetato de Etilo SN=F1 R=Rutina S2= F3 S1=F2 L=Lignano V=Valina
F) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H ₂ O Proporción 35:35:1:2 Revelador: Para alcaloides		1=Hidroalcolólico 2=Sobrenadantes 3=Sólido 2.2 4=Sólido 1 5= Prolina 6= Leucina 7= Valina

Anexo 2. Cromatografía en Capa Fina. Se colocaron las muestras y se corrieron bajo diferentes sistemas de polaridad, finalmente se revelaron para visualizar diferentes tipos de moléculas. CH₃Cl₂: Diclorometano; MeOH: Metanol; H₂O: Agua; CH₃CN: Acetonitrilo; AcOEt: Acetato de etilo; Hac : Ácido acético glacial; nBuOH: n-butanol.

Continuación del ANEXO 2. Cromatografías en Capa Fina (CCF) de las subfracciones de *Cucumis sativus*

Condiciones	Placas	Muestras
<p>G) Fase Normal Sistema: CH₃Cl : MeOH Proporción 9 : 1 Revelador: 4 Hidroxibenzaldehído</p>		<p>I=Hidroalcolólico AE= Acetato de Etilo 1=Sólido 1 2=Sólido 2 3=Sobrenadante</p>
<p>H) Fase Reversa Sistema: H₂O : CH₃CN Proporción 7: 3 Revelador: Flavonoides</p>		<p>1=Hidroalcolólico 2=Acetato de etilo 3=Acuoso 4=Sobrenadante 2 5= Sólido 2 6= Sólido 1</p>
<p>I) Fase Reversa Sistema: H₂O : CH₃CN Proporción 7: 3 Revelador: 4 Hidroxibenzaldehído</p>		<p>1=Hidroalcolólico 2=Acetato de etilo 3=Acuoso 4=Sobrenadante 2 5= Sólido 2 6= Sólido 1</p>
<p>J) Fase Reversa Sistema: H₂O : CH₃CN Proporción 7: 3 Revelador: Naftol</p>		<p>1=Hidroalcolólico 2=Acetato de etilo 3=Acuoso 4=Sobrenadante 2 5= Sólido 2 6= Sólido 1</p>
<p>K) Fase Reversa Sistema: H₂O : CH₃CN Proporción 7: 3 Revelador: 4 Hidroxibenzaldehído</p>		<p>HA=Hidroalcolólico AE= Acetato de Etilo AQ=Acuoso 3=Sobrenadante 2=Sólido 1 1=Sólido 2</p>

CH₃Cl₂: Diclorometano; MeOH: Metanol; H₂O: Agua; CH₃CN: Acetonitrilo; AcOEt: Acetato de etilo; Hac : Ácido acético glacial; nBuOH: n-butanol.

Continuación del ANEXO 2. Cromatografías en Capa Fina (CCF) de las subfracciones de *Cucumis sativus*

Condiciones	Placas	Muestras
<p>L) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H₂O Proporción 35:35 : 1: 2 Revelador: Ninhidrina</p>		<p>1=Hidroalcolólico 2=Sobrenadantes 3=Sólido 2.2 4=Sólido 1 5= Prolina 6= Leucina 7= Valina</p>
<p>M) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H₂O Proporción 35:35:1:2 Revelador: Flavonoides</p>		<p>1=Hidroalcolólico 2=Sobrenadantes 3=Sólido 2.2 4=Sólido 1 5= Prolina 6= Leucina 7= Valina</p>
<p>N) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H₂O Proporción 7: 7 : 1: 2 Revelador: Ninhidrina</p>		<p>HA=Hidroalcolólico AE= Acetato de Etilo SN=Sobrenadantes S2= Sólido 2.2 S1=Sólido 1 L=Lignano V=Valina</p>
<p>O) Fase Normal Sistema: nBuOH:acetona:Hac:H₂O Proporción 7: 7 : 1: 2 Revelador: Ninhidrina</p>		<p>HA=hidroalcohólico A= 6 dimetilamino purina (dimetil adenina) G= guanosina 5'-O-3' Thiotrifosfato L= lignano</p>
<p>P) Fase normal Agua:acetonitrilo Proporción 8:2 Ninhidrina</p>		<p>HA AE Solido amarillo Solido 1 Fenilalanina Treonina</p>

CH₃Cl₂: Diclorometano; MeOH: Metanol; H₂O: Agua; CH₃CN: Acetonitrilo; AcOEt: Acetato de etilo; Hac : Ácido acético glacial; nBuOH: n-butanol.