



## **INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

### **POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Análisis *in vitro* e *in vivo* de un concentrado de jugo de pitaya (*Stenocereus huastecorum*) sobre la respuesta antiapoptótica, inmunomoduladora y vasoactiva**

Tesis que presenta

**Yadira Yazbe Ramírez Rodríguez**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectoras de la Tesis:**

**Dr. Lina Raquel Riego Ruiz**

**Dr. Daniela Joyce Trujillo Silva**

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2023



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis *in vitro* e *in vivo* de un concentrado de jugo de pitaya (*Stenocereus huastecorum*) sobre la respuesta antiapoptótica, inmunomoduladora y vasoactiva**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yadira Yazbe Ramírez Rodríguez** y aprobada el **16 de noviembre del 2023** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dra. Lina Raquel Riego Ruíz**  
Codirectora de la tesis

---

**Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva**  
Codirectora de la tesis

---

**Dr. Samuel Lara González**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular y en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales y en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz y la Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (862378) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

## Dedicatorias

Con profunda gratitud, elevo mi corazón a Dios en este momento de celebración y culminación de mi arduo esfuerzo al completar mi tesis de doctorado. En cada etapa de este desafiantre viaje académico, su gracia y dirección han sido mi refugio y mi fuerza. A través de las noches de estudio, los desafíos intelectuales y las ocasiones de duda, la presencia divina ha iluminado mi camino y me ha sostenido con la determinación necesaria para llegar hasta aquí.

Agradezco sinceramente por la sabiduría que me ha brindado, por las oportunidades que ha puesto en mi camino y por la perseverancia que me ha concedido para superar obstáculos. Reconozco que este logro no hubiera sido posible sin su amor y respaldo constante.

Que este logro sea un tributo a la gloria de Dios y un recordatorio de la importancia de la fe y la perseverancia en todos los aspectos de la vida.

Agradezco con humildad y reverencia por esta etapa cumplida, y confío en que seguirá guiando mi camino en el futuro. Amén.

Es con un profundo sentido de gratitud que dedico este párrafo a mi amada familia.

Su apoyo incondicional y cariño constante han sido el cimiento sobre el cual he construido mi camino hacia la culminación de mi tesis de doctorado. Cada uno de ustedes ha sido mi fuente de inspiración, aliento y fortaleza durante esta travesía académica. Su comprensión en los momentos de ausencia, sus ánimos en las horas de desánimo y su amor inquebrantable han sido el motor que me impulsó a seguir adelante.

A través de los desafíos y sacrificios compartidos, hemos forjado una unión indestructible que ha sostenido mi determinación hasta el final.

Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, y se refleja en el esfuerzo y el amor que han invertido en mí. De corazón, les agradezco por ser mi faro en este viaje y por compartir este momento de triunfo conmigo. Su apoyo ha sido el ingrediente esencial en mi éxito, y les dedico mi tesis con el más profundo agradecimiento y amor.

## Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (IPICYT).

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

A la Dra. Daniela Trujillo por su incansable orientación y dedicación en cada fase de mi investigación. Su sabiduría, paciencia y apoyo fueron esenciales para la realización de este proyecto de doctorado. Siempre le estaré agradecida.

A la Dra. Lina Riego por su apoyo y experiencia que fueron fundamentales para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

A la Dra. Karina Robledo por su apoyo, consejos y amistad brindada desde el inicio del posgrado.

Al Dr. Nicolas Gómez por sus enseñanzas y apoyo incondicional.

Al Dr. Samuel Lara por la retroalimentación que me brindó en cada semestre, el cual fue de gran aporte a mi proyecto.

Al Dr. Roberto Salgado por su generosidad y confianza al prestarme su equipo de laboratorio que fue esencial para mi proyecto, así como por su valiosa retroalimentación, que enriqueció significativamente mi investigación.

Al Dr. Ricardo Tanguma por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir como en casa, así como brindarme su conocimiento, orientación y apoyo a lo largo de mi tesis de doctorado.

Al Dr. Roberto Valle por sus valiosas enseñanzas y por transmitirme su apasionada dedicación a la investigación.

A la M.C. Ana Romero por el apoyo técnico que nos brindó.

A la Dra. Araceli Patrón y al M.C. Alberto Barrera por las facilidades otorgadas para el uso de sus equipos de laboratorio.

A Rafael por su apoyo, amor y paciencia.

Al laboratorio 8 y a mis compañeros de generación por brindarme su amistad, apoyo y grandes experiencias en todo este tiempo.

Y a todas esas personas que me brindaron su cariño, amistad y apoyo incondicional. Dulce Arciniega, Ana Hernández, Ale Medina, Guadalupe Donjuán, Valeria Escandón, Juan Carlos Gámez, Rodolfo y Graciela Lomelí, Ana Valadez, Diana Ambriz y Sophia Barrientos.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xiv
Abstract	xv
Introducción	1
Antecedentes	2
Justificación	5
Objetivo general	5
Objetivos particulares	5
<b>Capítulo 1</b>	6
Efecto antiapoptótico e inmunomodulador del CJP	
Materiales y métodos	6
Resultados y discusión	11
Conclusión	19
<b>Capítulo 2</b>	20
Evaluación del efecto vasoactivo del CJP en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	
Materiales y métodos	25
Resultados y discusión	34
Conclusión	53
Referencias	54
Anexos	63

## **Lista de tablas**

1. Regulación hormonal de la presión arterial

21

## Lista de figuras

<b>1.</b> Índice de apoptosis.	12
<b>2.</b> Marcadores inflamatorios por inmunohistoquímica.	15
<b>3.</b> Marcadores inflamatorios mediante Western blot.	16
<b>4.</b> Efecto de la administración del CJP sobre la farmacocinética y viabilidad celular del platino en ratas con nefrotoxicidad inducida por CP.	18
<b>5.</b> Diagrama que muestra las principales componentes de una arteria	22
<b>6.</b> Efecto relajante del CJP en anillos aislados de aorta torácica de ratas Wistar macho precontraídos con fenilefrina (Phe, 10 µM) y la evaluación de su mecanismo de acción.	37
<b>7.</b> Efecto de las fracciones del CJP sobre anillos aislados de aorta torácica y arteria mesentérica de ratas Wistar macho previamente contraídos con fenilefrina (Phe, 10 µM).	40
<b>8.</b> Efecto de la fracción 1 (F1) del CJP sobre las corrientes de los canales de Ca <sup>2+</sup> dependiente de voltaje (Cav) en células aisladas del músculo liso de aorta torácica y arteria mesentérica de rata Wistar macho.	42
<b>9.</b> Efecto del CJP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar Kioto (WKY).	45
<b>10.</b> Perfilamiento por HPLC-PDA a 480 nm del CJP y la fracción 1	47
<b>11.</b> Perfilamiento por HPLC-PDA a 254 nm del CJP y la fracción 1	48
<b>12.</b> Espectro de absorción UV-Vis y espectro FTIR del CJP y la fracción 1	50
<b>10.</b> Perfilamiento por RNM 1 H a 400 MHz del CJP y la fracción 1	52

## Anexos

<b>Anexo 1.</b> Niveles de creatinina sérica, malondialdehído (MDA) renal, porcentaje de daño tubular, nitritos y nitratos como indicadores de los niveles de óxido nítrico y de la expresión de la proteína óxido nítrico sintasa endotelial	63
<b>Anexo 2.</b> Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental del estudio.	64
<b>Anexo 3.</b> Análisis histológico	65
<b>Anexo 4.</b> Ensayo piloto de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) administradas con CJP	66
<b>Anexo 5.</b> Artículos publicados	67

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ATP-Na<sub>2</sub></b>	Adenosina 5'-trifosfato sal disódica hidratada
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	Ion bario
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de bario
<b>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub></b>	Ácido glutámico
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Glucosa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Canales Ca<sub>v</sub></b>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<b>Cbc</b>	carbacol
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	Ácido acético acuoso
<b>CJP</b>	Concentrado de jugo de pitaya
<b>Cmax</b>	Concentración máxima
<b>CMLV</b>	Células de músculo liso vascular
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CP</b>	Cisplatino
<b>Cs<sup>+</sup></b>	Ion cesio
<b>CsCl</b>	Cloruro de cesio
<b>CsOH</b>	Hidróxido de cesio
<b>DTT</b>	DL-Ditiotreitol
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
<b>EGTA</b>	Etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N , N , N' , N' -ácido tetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>F1</b>	Fracción 1
<b>FTIR</b>	Infrarrojos por transformada de Fourier
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>H<sup>+</sup></b>	Ion hidrógeno
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IRA</b>	Insuficiencia renal aguda
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>L-NAME</b>	Éster metílico de la N -nitro-L-arginina
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>MIF</b>	Factor inhibidor de la migración
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>Nph</b>	Nifedipino
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>OH</b>	Hidróxido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>Phe</b>	Fenilefrina
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonino
<b>Prp</b>	propranolol
<b>Pt</b>	Platino
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno

<b>SF</b>	Solución fisiológica
<b>SHR</b>	Ratas espontáneamente hipertensas
<b>TBT</b>	Terbutelina
<b>TEA</b>	Tetraetilamonio
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>Tmax</b>	Tiempo máximo
<b>TMPO</b>	1,1,3,3 tetrametoxipropano
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral α
<b>UASLP</b>	Universidad Autónoma de San Luis Potosí
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>WKY</b>	Wistar Kyoto
<b>XTT</b>	(2,3-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)

## Resumen

### Análisis *in vitro* e *in vivo* de un concentrado de jugo de pitaya (*Stenocereus huastecorum*) sobre la respuesta antiapoptótica, inmunomoduladora y vasoactiva

Actualmente, la falta de acceso a fármacos ha impulsado el interés en la medicina tradicional. En un modelo de nefrotoxicidad por cisplatino, demostramos que un concentrado de jugo de pitaya (CJP) ejerce nefroprotección asociado a cambios en la síntesis de óxido nítrico, con efectos en la hemodinámica renal, particularmente vasodilatador. Este hallazgo nos motivó a: 1) continuar evaluando el papel del CJP sobre la respuesta apoptótica e inmune y 2) analizar su impacto vasodilatador en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, junto con la identificación de sus compuestos bioactivos responsables. En la respuesta inmune se analizaron diversas proteínas pro y antiinflamatorias por Western blot e inmunohistoquímica y se realizó un ensayo de TUNEL para determinar apoptosis. Para el estudio de vasoactividad, se evaluó el efecto del CJP en ensayos *in vitro* sobre la tensión en anillos aórticos y mesentéricos de ratas Wistar macho, e *in vivo* sobre ratas espontáneamente hipertensas. Además, el CJP y su fracción vasoactiva (F1) se analizaron por HPLC-PDA, resonancia magnética nuclear, FTIR y espectrometría UV-Vis. El CJP redujo el índice de apoptosis en 2.5 en el tejido renal, e incrementó ~24% los niveles de interleucina 6, una proteína antiinflamatoria. En cuanto al efecto vasodilatador, el CJP y su F1 causaron vasodilatación del ~80% en anillos de aorta y mesentérica. El CJP y F1 redujeron las corrientes de canales de calcio voltaje-dependientes un ~64%. En el modelo *in vivo*, el CJP redujo la presión arterial ~25%, durante 120 h. El perfil químico del CJP y F1 no reveló betalaínas ni compuestos fenólicos como causa del efecto vasoactivo. Aunque los compuestos bioactivos en el CJP requieren una identificación precisa, se confirma su efecto antiapoptótico, inmunomodulador y vasodilatador, señalando la necesidad de continuar investigando para aislar y caracterizar los componentes responsables.

**Palabras clave:** Cisplatino, nefrotoxicidad, hipertensión arterial, vasodilatación, *Stenocereus huastecorum*, compuestos bioactivos, canales de calcio dependientes de voltaje.

## Abstract

### ***In vitro and in vivo analysis of a pitaya juice concentrate (*Stenocereus huastecorum*) on the antiapoptotic, immunomodulatory and vasoactive response***

Currently, the lack of access to pharmaceuticals has driven interest in traditional medicine. In cisplatin-induced nephrotoxicity model, we demonstrated that a pitaya juice concentrate (PJC) provides nephronprotection associated with changes in nitric oxide synthesis, with effects on renal hemodynamics, particularly vasodilation. This finding motivated us to: 1) further evaluate the role of PJC in apoptotic and immune responses, and 2) analyze its vasodilator impact in different *in vitro* and *in vivo* models, along with the identification of its responsible bioactive compounds. In the immune response, various pro- and anti-inflammatory proteins were analyzed by Western blot and immunohistochemistry. A TUNEL assay was conducted to determine apoptosis. For the vasoactivity study, the effect of PJC on *in vitro* assays was evaluated on tension in aortic and mesenteric rings from male Wistar rats, and *in vivo* on spontaneously hypertensive rats. Additionally, PJC and its vasoactive fraction (F1) were analyzed by HPLC-PDA, nuclear magnetic resonance, FTIR, and UV-Vis spectrometry. PJC reduced the apoptosis index by 2.5 in renal tissue and increased interleukin-6 levels, an anti-inflammatory protein, by ~24%. Regarding the vasodilator effect, PJC and its F1 caused ~80% vasodilation in aortic and mesenteric rings. PJC and F1 reduced voltage-dependent calcium channel currents by ~64%. In the *in vivo* model, PJC reduced blood pressure by ~25% for 120 h. The chemical profile of PJC and F1 did not reveal betalains or phenolic compounds as the cause of the vasoactive effect. Although the bioactive compounds in PJC require precise identification, their antiapoptotic, immunomodulatory, and vasodilator effects are confirmed, pointing out the need for further research to isolate and characterize the responsible components.

**Key words:** Cisplatin, nephrotoxicity, arterial hypertension, vasodilatation, *Stenocereus huastecorum*, bioactive compounds, voltage-dependent calcium channels.

## **1. Introducción**

Los medicamentos representan una de las innovaciones más significativas en el ámbito de la atención médica, desempeñando un papel fundamental en el avance de la humanidad en lo que respecta a la prevención, tratamiento y recuperación de la salud<sup>1</sup>. La síntesis de medicamentos es una actividad común en la sociedad actual, sin embargo, la entrega oportuna de fármacos en diversas regiones se ve comprometida<sup>1</sup>. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de un tercio de la población mundial no tiene acceso a medicamentos, especialmente en países subdesarrollados, por lo que dependen esencialmente de las plantas para el cuidado primario de su salud<sup>2</sup>. Debido a esto, se ha incrementado el interés en la aplicación de estrategias alternativas como el uso de la medicina tradicional a base de plantas medicinales como terapia coadyuvante para el control y prevención de diversas enfermedades.

Los productos naturales y sus actividades biológicas son actualmente un tema de gran interés en las industrias farmacéutica, naturista y cosmética. La mayoría de estos estudios se centran en diversas especies de plantas, siendo su objetivo principal la búsqueda de compuestos bioactivos, especialmente aquellos que demuestren propiedades cardioprotectoras, anticancerígenas, nefroprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras, hepatoprotectoras, entre otras<sup>3</sup>. México alberga una riqueza biológica y una diversidad de ecosistemas. Dentro de este contexto, sobresale una amplia variedad de plantas que poseen un gran valor para la humanidad, especialmente en lo que respecta a la producción de medicamentos. En este país, se han identificado alrededor de 4,000 especies de plantas con propiedades medicinales, lo que representa un 15% del total a nivel mundial. Sin embargo, es crucial destacar que solo un 5% de estas especies ha sido objeto de estudios químicos, farmacológicos y biomédicos, lo que subraya la relevancia de este campo de investigación aún por explorar<sup>4</sup>.

La pitaya es un fruto endémico de las zonas áridas y semiáridas de México perteneciente a la familia cactácea del género *Stenocereus*. Este fruto tiene forma esférica u ovoide, con areolas espinosas y caducas, semillas pequeñas y comestibles, y una pulpa que va desde el color naranja hasta el rojo-púrpura<sup>5</sup>.

García-Cruz et. al (2017) evaluaron el contenido de compuestos bioactivos en la pulpa de diferentes especies de pitaya (*Stenocereus pruinosus*, *Stenocereus stellatus* y *Stenocereus griseus*), encontrando principalmente betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y compuestos fenólicos<sup>5</sup>.

Las betalaínas son considerados pigmentos, con diversas actividades biológicas destacando sus propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas<sup>16</sup>. Por otro lado, los compuestos fenólicos también se han asociado con actividades antialérgicas, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, antihipertensivas y cardioprotectoras<sup>5-7</sup>. Luna-Morales et. al, en el 2001, realizaron estudios etnobotánicos de *Stenocereus* en localidades de la Mixteca Baja, y reportaron que este fruto, consumido fresco o en mermelada, se ha asociado con actividades de protección inmunológica, antimicrobiana y antioxidante; además de su uso para tratar patologías como diabetes mellitus e hipertensión arterial (HTA)<sup>8</sup>. Sin embargo, estos efectos reportados no cuentan con estudios científicos, solo con estudios etnobotánicos mediante entrevistas.

## 2. Antecedentes

En el 2018, Alvarado-Sizzo et. al, mediante un estudio taxonómico, caracterizaron una nueva especie de pitaya, *S. huastecorum*<sup>9</sup>, especie que fue utilizada por nuestro grupo de investigación para evaluar el efecto de un concentrado de jugo de pitaya (CJP) en ratas Wistar macho con nefrotoxicidad inducida por cisplatino (CP), quimioterapéutico utilizado en la práctica clínica en México, en el tratamiento de una amplia gama de neoplasias malignas (cáncer de cabeza y cuello, pulmón, testículos, ovarios, mama, entre otros). No obstante, su aplicación clínica se ve limitada por la presencia de efectos adversos graves, entre los que destaca la nefrotoxicidad. Se estima que entre el 20% y el 35% de los pacientes experimentan insuficiencia renal aguda (IRA) después de recibir CP<sup>10,11</sup>. La IRA por CP es mediada a través de varios mecanismos citotóxicos, siendo los principales el estrés oxidativo, apoptosis e inflamación<sup>11</sup>. El CP se acumula en las mitocondrias de las células epiteliales del túbulo renal proximal generando especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno, el radical

hidroxilo, el anión superóxido y el peroxinitrito<sup>12</sup>. Las EROs interactúan con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, causando daños a la célula. Aunque estas especies son productos normales del metabolismo celular, el problema surge cuando las concentraciones de EROs se incrementan induciendo un estrés oxidante<sup>13</sup>. Este estrés a su vez activa una cascada inflamatoria, mediada por la vía de transducción de señales del factor nuclear κB (NF-κB). La activación de NF-κB desencadena la producción de citoquinas y enzimas proinflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, interleucinas (IL), óxido nítrico (ON) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>14</sup>, que eventualmente puede producir una alteración en la permeabilidad de la mitocondria, provocando una liberación de citocromo c, así como la activación de las caspasas 3 y 9, enzimas que desempeñan un papel crucial en la inducción de la apoptosis celular<sup>15</sup>.

Derivado de los efectos biológicos (antioxidantes y antiinflamatorios) que se les han atribuido a los compuestos bioactivos contenidos en las diferentes especies de *Stenocereus*, como betalaínas y compuestos fenólicos, junto con los mecanismos responsables del desarrollo de IRA en el riñón expuesto a CP; se generó un interés por evaluar si un CJP (*S. huastecorum*) protege al riñón del desarrollo de nefrotoxicidad inducido por CP. Observamos que en ratas Wistar macho, que fueron administradas con 6 mg/Kg i.p de CP, desarrollaron IRA, caracterizada por un aumento en los niveles de creatinina sérica, malondialdehído (biomarcador de lipoperoxidación) y un aumento en el daño tubular (Anexo 1A-C, respectivamente), comparados con el grupo vehículo (V). La administración de 400 mg/mL de CJP (v.o) en el grupo tratado con CP impidió el aumento de creatinina, malondialdehído y daño tubular, sugiriendo que el co-tratamiento de CP + CJP preserva la integridad funcional y estructural del riñón, mediante la protección contra el estrés oxidativo inducido por el quimioterapéutico.

El mecanismo molecular responsable del efecto renoprotector del CJP que identificamos no se relacionó con su capacidad antioxidante, sino más bien con su capacidad para modular la generación de ON en el tejido renal mediante un incremento en los niveles de la proteína ON sintasa endotelial (eNOS; Anexo 1D, respectivamente). El ON es un radical libre que actúa como regulador de distintos

procesos fisiológicos y patofisiológicos en el sistema inmune, muscular, nervioso y cardiovascular. Es sintetizado a partir de L-arginina por una familia de isoenzimas conocidas como óxido nítrico sintasa (NOS)<sup>16,17</sup>. La acción inmunológica del ON manifiesta una respuesta bimodal; dependiendo de su concentración, será la respuesta obtenida. La producción de ON a través de la iNOS es favorecida en los procesos inflamatorios. Estas isoenzimas inducibles son estimuladas por diversos factores inmunológicos como NF-κB, TNF-α, factor inhibidor de la migración (MIF), y lipopolisacárido bacteriano (LPS), en una variedad de tipos celulares, entre ellos macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y células endoteliales<sup>17,18</sup>. Una vez activadas, estas células producen, por tiempo prolongado, una gran cantidad de ON con objeto de combatir agentes infecciosos y células tumorales. No obstante, una producción excesiva de ON puede provocar efectos adversos, como la reducción de la actividad de la eNOS, lo que conlleva a una diminución en las concentraciones de ON en la microcirculación y, por ende, afecta la perfusión órgano-terminal. Estos problemas de perfusión local generan un aumento en la producción de radicales libres, especialmente peroxinitrito, que, en combinación con citoquinas, amplifican el proceso inflamatorio local o sistémico, dando lugar a alteraciones morfológicas y bioquímicas características de la apoptosis<sup>17</sup>. En el ámbito cardiovascular el ON generado por la eNOS, localizada en el endotelio vascular, actúa como un potente relajante del músculo liso de arteriolas y arterias, por estimulación de la homeostasis del calcio y disminución del contenido intracelular del mismo, convirtiendo al ON en una molécula esencial en la regulación de la presión arterial<sup>16</sup>.

En este sentido y de acuerdo con las diversas funciones descritas del ON y nuestros resultados previos<sup>19</sup>; podemos sugerir que el CJP contiene compuestos bioactivos con propiedades vasoactivas que mantienen una perfusión renal adecuada.

Este efecto, a su vez, podría estar causando la reducción de la concentración renal de platino y contrarrestando los efectos hemodinámicos provocados por el CP, aumentando tanto el flujo sanguíneo renal como la tasa de filtración glomerular. Sin embargo, se requieren estudios de vasoactividad para confirmar

este efecto atribuido al CJP. Además, es crucial evaluar el papel del CJP en la modulación de la inflamación y apoptosis en el modelo de nefrotoxicidad inducido por CP.

### **3. Justificación**

El ON desempeña un papel importante como regulador de varias funciones fisiológicas, incluyendo la modulación inmunológica, apoptótica y vasodilatadora. En nuestro estudio, al observar un aumento significativo de ON en los animales tratados con CJP, decidimos continuar con el modelo experimental de nefrotoxicidad inducida por CP para evaluar el impacto del CJP en la inflamación y apoptosis generada en este modelo. Por otra parte, para examinar el efecto vasodilatador del CJP, optamos por emplear otro modelo experimental, *tanto in vitro como in vivo*, que nos permitiera evaluar de manera más eficiente los cambios en la tensión arterial, así como el mecanismo de acción involucrado en este efecto.

### **4. Objetivo general**

Evaluar el efecto antiapoptótico, inmunomodulador y vasoactivo de un concentrado de jugo de pitaya (*S. huastecorum*) en modelos *in vitro* e *in vivo*, así como la identificación de los compuestos bioactivos responsables.

#### **4.1. Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto del CJP sobre la apoptosis y respuesta inmune en un modelo experimental de nefrotoxicidad por CP.
- Evaluación del efecto vasoactivo del CJP y sus fracciones, en modelos *in vivo* e *in vitro*.
- Extracción de compuestos bioactivos del CJP.
- Fraccionamiento y perfilamiento de los compuestos bioactivos del CJP y sus fracciones con vasoactividad.

## 5. Capítulo 1

### Efecto antiapoptótico e inmunomodulador del CJP

#### **Materiales y métodos**

##### *Reactivos*

El fluoruro de fenilmethylsulfonilo (PMSF) y 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Una solución de formaldehido al 37% y metanol se adquirieron de Fermont (Monterrey, NL, México). Los anticuerpos de ratón anti-NGAL (#Cat. 515876), anti-Nrf2 (#Cat. 365949), anti-eNOS/NOS (#Cat. 610296), anti-IL6 (#Cat. 57315), anti-NF-κB p50 (#Cat. 8414) , anti-IL-10 (#Cat. 365858), anti-catalasa (#Cat. 271803), anti-superóxido dismutasa (#Cat. 271014), anti-glutatión peroxidasa (#Cat. 271014) y anti-actina (#Cat. 47778-HRP) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EE. UU.). El anti-NF-κB p65 (#Cat. 610868) se adquirió de BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.), mientras que anti-TNF-α (#Cat. 1793) se adquirió de Abcam, plc. (Cambridge, Reino Unido). El anti-ratón conjugado con peroxidasa (#Cat. 115-035-003) se adquirió de Jackson ImmunoResearch, Inc. (West Grove, PA, EE. UU.). El sustrato occidental Luminata Forte HRP se adquirió de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El sistema Mouse/Rabbit Polydetector Plus HRP/DAB se adquirió de Bio SB (Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Todos los demás reactivos utilizados eran de calidad analítica y están disponibles comercialmente.

##### *Diseño experimental*

En el Anexo 2, se presenta un diagrama de flujo que muestra los diseños experimentales. Estos diseños pueden ser revisados en detalle en el manuscrito titulado “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” que se encuentra publicado en el volumen 160, página 4 de la revista Food Research International del año 2022.

### *Análisis de Western Blot*

La extracción de proteínas se llevó a cabo individualmente en 100 miligramos de tejido renal de cinco ratas por grupo. El análisis de Western blot se efectuó siguiendo los mismos pasos previamente detallados<sup>20</sup>. Las membranas fueron incubadas durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios para NGAL, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, NF-κB p50, NF-κB p65, IL-10, TNF-α (a una dilución de 1:500), eNOS, IL-6 (a una dilución de 1:3000), Nrf2 (a una dilución de 1:2000) y β-actina-HRP (a una dilución de 1:10.000). Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante dos horas con los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con peroxidasa (a una dilución de 1:5000), Nrf2, eNOS y TNFα (a una dilución de 1:3000). Tras el lavado, se llevó a cabo la revelación de la transferencia inmunológica utilizando el sustrato Luminata Forte HRP (Merck Millipore) para la detección de la quimioluminiscencia, la cual fue registrada mediante una película de autorradiografía. La cuantificación de la densidad de la banda de proteínas se realizó utilizando el software ImageJ (U. S. National Institutes of health).

### *Apoptosis*

Se llevó a cabo un ensayo TUNEL con el fin de evaluar el índice de apoptosis, utilizando un kit de imágenes Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher), según las indicaciones del fabricante, en cinco ratas de cada grupo. Se desparafinaron, permeabilizaron y expusieron secciones de tejido renal de 5 μm a los reactivos TUNEL. La ruptura del ADN se detectó mediante una tinción positiva del núcleo, utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica Q 500 W). El recuento de núcleos apoptóticos se realizó en 6 a 10 campos para cada rata con un aumento de 40X. Los resultados se presentan como porcentaje de células TUNEL positivas por campo.

### *Inmunohistoquímica*

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo siguiendo los procedimientos previamente detallados<sup>21</sup>. Las secciones del riñón fueron incubadas durante la

noche a una temperatura de 4 °C con anticuerpos de ratón anti-p65, anti-NF-κB y anti-IL-6 (a una dilución de 1:500) en una solución de PBS. Tras retirar el anticuerpo primario y realizar lavados repetidos con PBS, los portaobjetos fueron tratados con reactivos Bio SB, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron examinadas utilizando un microscopio LEICA DM 1000 (Leica Microsystems) y las imágenes se capturaron con un aumento de 40X. Se llevó a cabo un análisis semiautomático empleando el software ImageJ (U. S. National Institutes of health) en diez campos aleatorios por rata para la detección del color. Los resultados se presentan como porcentaje del área teñida. Para el control negativo, se utilizó suero preinmune de cabra en lugar del anticuerpo primario.

#### *IL-6 sérica*

Las muestras de suero fueron sometidas a un análisis para detectar la presencia de IL-6 utilizando métodos estándar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich, utilizando un kit ELISA de IL-6 para ratas LEGEND MAX™ (#Cat. 437107, Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Despues, se agregaron 50 µL de las muestras de suero y se incubaron en la placa a temperatura ambiente durante 2 horas, con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se retiró el contenido y se lavó la placa 4 veces con un tampón de lavado 1X. Luego, se añadieron 100 µL de la solución de anticuerpos de detección de IL-6 de rata y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido del retiro del contenido y 4 lavados con tampón de lavado 1X. Además, se introdujeron 100 µL de la solución de avidina-HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Después de descartar y lavar el plato 5 veces, se adicionaron 100 µL de la solución de sustrato F y se dejaron incubar durante 10 min en la oscuridad. Para detener la reacción, se añadieron 100 µL de solución de parada en cada pocillo. Finalmente, la absorbancia se registró a una longitud de onda de 450 nm.

### *Farmacocinética del CP*

Se llevó a cabo este ensayo con el propósito de investigar si la administración de CJP afecta la farmacocinética del CP, midiendo la concentración de platino (Pt) en distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10, 30, 60, 90 y 120 min) en ratas sometidas o no a tratamiento con CJP. La medición de las concentraciones de Pt se realizó como se detalló previamente<sup>22</sup>, utilizando espectroscopia de absorción atómica con un autoanalizador que incluía un horno de grafito (SpectrAA 220-GTA-110, Varian, Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.). Las muestras de sangre obtenidas de ratas a las que se administró CP y CP+CJP (n=3) se sometieron a centrifugación a 11,180 g a 4 °C durante 10 min y, posteriormente, el plasma se ultrafiltró a 11,180 g a 4 °C durante 30 min, utilizando Vivaspin 2 (30.000 Da, GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.).Después, el ultrafiltrado se congeló para cuantificar el contenido de Pt. Se utilizó una solución estándar de Pt para absorción atómica (con una concentración de 1000 µg/mL de alta pureza en HCl al 5%) para establecer la curva de calibración, la cual fue lineal en el rango de concentración de 0 a 10 µg/mL. El coeficiente de variación para el ensayo fue inferior al 4%.

### *Viabilidad celular*

La línea celular HeLa (cáncer de cuello uterino) fue adquirida de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Las células se cultivaron regularmente en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (Gibco BRL) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera compuesta por un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 95 % de aire con alta humedad. La recolección de las células se realizó utilizando tripsina al 0,025% y ácido etilendiaminotetraacético al 0,01% (Gibco BRL).

Se evaluó el efecto del CJP y CP en la proliferación celular utilizando el kit de ensayo XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), el cual se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla a un tinte de formazán naranja por parte de las células que están metabólicamente activas. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: las células viables se sembraron en placas de 96 pocillos, con 100 µl de medio de cultivo RPMI por pocillo, a una

densidad de  $1.5 \times 10^4$  células. Tras el tratamiento, se retiró el medio y se añadió la solución XTT a cada pocillo, seguido de un periodo de incubación de 1 a 2 horas en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Un lector de placas de microtitulación midió los valores de absorbancia a una longitud de onda de 492 y 690 nm utilizando Varioskan Lux (Thermo Fisher). Los resultados se expresan en forma de porcentaje de reducción de XTT.

Se expusieron células HeLa a CJP y CP durante 96 horas con concentraciones que variaban de 0 a 350 µg/mL de CJP y durante 24 horas con concentraciones que oscilaban entre 0 y 200 µg/mL de CP. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo XTT. Los valores de la concentración de los fármacos necesarios para inhibir el 50% del crecimiento celular (IC50) se determinaron a partir de las curvas de supervivencia. Los experimentos se llevaron a cabo en tres réplicas y en ensayos independientes.

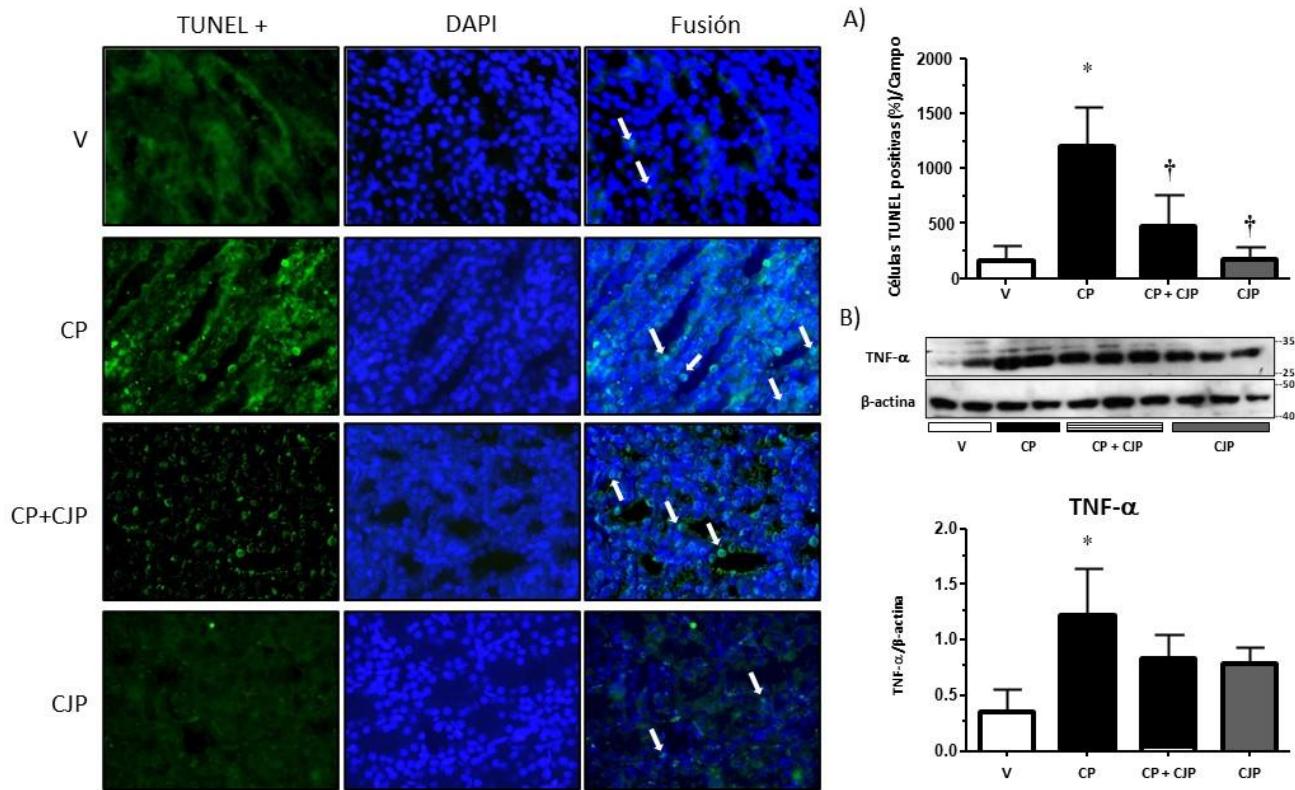
#### *Análisis estadístico*

Todos los datos se presentan como la media ± desviación estándar (DE). La significancia estadística entre los grupos se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una dirección y las diferencias entre los grupos se evaluaron utilizando la prueba de Bonferroni. Los valores se consideraron significativos si p < 0,05. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

## Resultados y discusión

CJP redujo la apoptosis asociada con la regulación sobre TNF- $\alpha$  en la nefrotoxicidad inducida por CP. El CP desencadena necrosis, apoptosis y necroptosis a través de EROS mediante vías de estrés intrínsecas (mitocondrial y retículo endoplásmico) y extrínsecas, dependiendo de la dosis. Investigaciones *in vitro* han demostrado que una dosis más baja de CP induce apoptosis, mientras que niveles más altos causan muerte celular necrótica<sup>23</sup>. En secciones de tejido renal, evaluamos el índice de apoptosis en cada grupo utilizando un kit comercial (Fig. 1). Las imágenes de la izquierda revelan células TUNEL positivas (verde), la tinción nuclear DAPI en las imágenes del medio (azul) y la confirmación de la tinción nuclear en las imágenes de la derecha (fusión). La Fig. 1A indica un índice apoptótico significativamente mayor en los riñones del grupo tratado con CP en comparación con el grupo de control (grupo V). Interesantemente, la administración del CJP redujo considerablemente la muerte celular inducida por CP en las ratas tratadas con CP; sin alcanzar niveles basales ( $1202 \pm 359$  vs.  $476 \pm 288$ ). Por último, la administración solo de CJP no incrementó el número de células apoptóticas en comparación con el grupo V. Resultados similares se observaron en otro estudio previo sobre cultivos de células epiteliales de riñón tratados con betanina<sup>24</sup>.

Por otra parte, el TNF- $\alpha$  desempeña un papel inflamatorio y puede actuar como una vía clave que conduce a la apoptosis mediante receptores de muerte celular. Además, es una de las citocinas principales que activan la respuesta inflamatoria<sup>25</sup>. Por lo tanto, evaluamos su expresión en nuestro modelo experimental. En los animales tratados con CP, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína de TNF- $\alpha$  ( $1,22 \pm 0,44$  vs.  $0,35 \pm 0,22$ ). Aunque notamos una disminución numérica en el grupo tratado con CJP, no se observaron diferencias significativas según ANOVA (Fig. 1B); además, V y CJP por sí solos no mostraron diferencias. Este resultado sugiere que el CJP tiene efecto antiapoptótico, pero no a través de la inhibición de TNF- $\alpha$ , sino más bien podría estar modulando otras vías apoptóticas, como el receptor de la muerte 1 de TNF- $\alpha$ , caspasas, citocromo c, la proteína Smac/DIABLO, entre otras vías<sup>26</sup>.



**Figura 1.** Índice de Apoptosis. Microfotografía representativa de la tinción TUNEL de células apoptóticas de los riñones de todos los grupos de animales (aumento 40X n = 6–10 campos por rata). Células TUNEL positivas (verde e izquierda). Tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, azul y medio) y colocalización (derecha). (A) Los resultados se presentan como porcentaje de células TUNEL positivas ( $\Rightarrow$ ). (B) Western blot del factor nuclear tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y análisis densitométrico. Cada banda representa una rata tratada individualmente y la imagen muestra 2 o 3 ratas representativas del estudio. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, n = 5. V (solución salina isotónica, ip), CP (cisplatino; 6 mg/kg, ip), CP + CJP (6 mg/kg + 400 mg/mL de concentrado de jugo de pitaya) y CJP (400 mg/mL). Las barras representan la media  $\pm$  DE de 6 a 10 campos por rata, n = 5. \* p < 0,05 vs. V, † p < 0,05 vs. CP. Aumento original 40X.

*Nota:* De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.10 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).

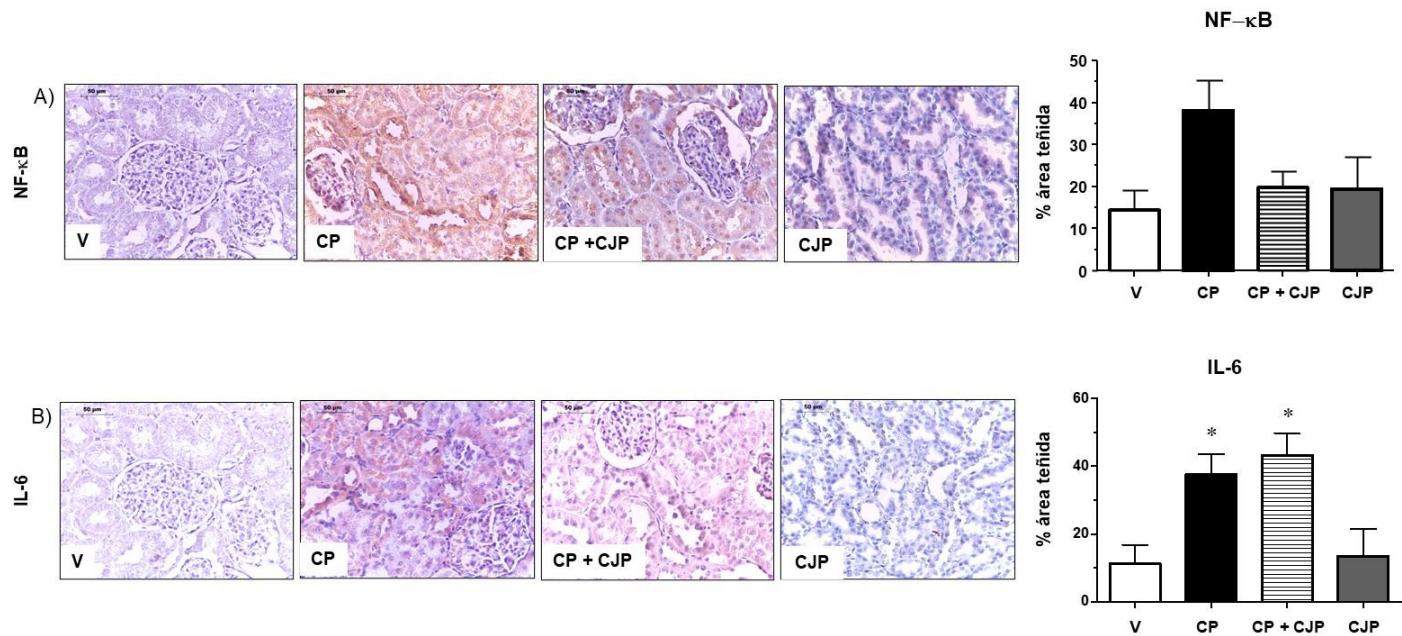
*CJP redujo la inflamación inmune causada por la nefrotoxicidad inducida por CP.*

NF-κB es un regulador fundamental en la transcripción de células inflamatorias que puede ser activado por el tratamiento con CP, estimulando neutrófilos, macrófagos y linfocitos a través de EROs. Una vez que NF-κB se encuentra activo, puede perpetuar el daño al inducir la síntesis de genes proinflamatorios como citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, que incluyen interleucinas, amplificando así la lesión resultante de la inflamación. La variante más común de NF-κB es el heterodímero p65:p50, donde la subunidad p50 puede estar implicada en el daño del ADN, mientras que la subunidad p65 participa en la respuesta inflamatoria del organismo<sup>27,28</sup>. En un estudio, la inhibición farmacológica de NF-κB, mediante un compuesto de diamina aromática, mejoró de manera significativa la función renal y la necrosis tubular aguda. Además, se correlacionó con una reducción significativa de mediadores proinflamatorios como IL-1β, IL-6 y TNF-α en la nefrotoxicidad inducida por CP<sup>29</sup>.

Derivado de estas observaciones, en nuestro estudio se mostró que la expresión de NF- κB e IL-6 por inmunohistoquímica en tejido renal, junto con el análisis de Western blot (NF-κB p50, NF-κB p65, IL-6 e IL-10) y niveles séricos de IL-6 de los animales de todos los grupos estudiados. Particularmente, en los resultados por inmunohistoquímica, en Figura 2A, se observa una marcada tinción para NF-κB (paneles superiores de p50) e IL-6 (paneles inferiores, Fig. 2B) en ratas tratadas con CP; sin embargo, el CJP no logró reducir la intensidad de la tinción de NF-κB e IL-6. Cuando las ratas recibieron tratamiento dual, los niveles de NF-κB no difirieron de los observados en el grupo de control, mientras que los niveles de IL-6 fueron más altos que en el grupo V, pero no mostraron diferencias en comparación con el grupo tratado solo con CP.

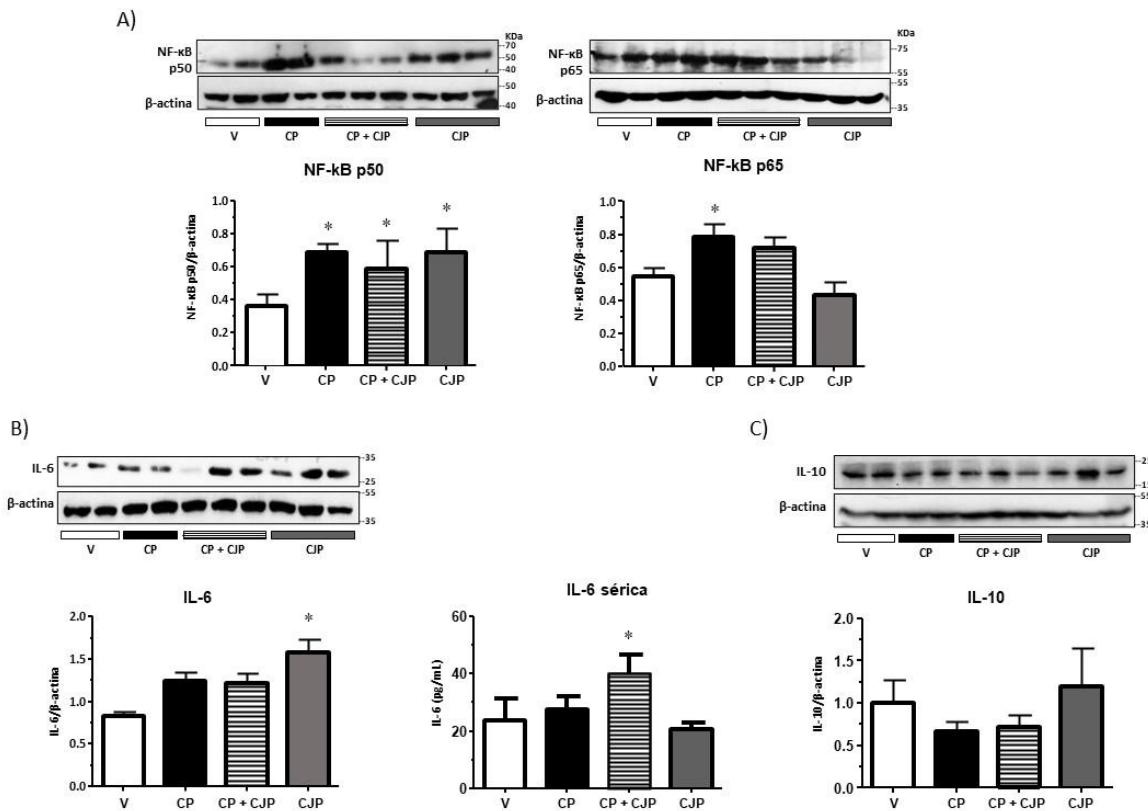
Además, el análisis de Western blot para NF-κB p50 y NF-κB p65 (Fig. 3A) reveló un incremento significativo en el grupo tratado con CP en comparación con el grupo V. Sin embargo, no se observaron cambios significativos cuando los animales fueron tratados con CP + CJP, donde los niveles fueron similares en el grupo tratado solo con CJP. El análisis de Western blot para IL-6 mostró un ligero aumento en las ratas tratadas con CP; sin embargo, no se identificaron diferencias

estadísticamente significativas mediante ANOVA, y se observaron resultados similares en el grupo de tratamiento dual. De manera interesante, el grupo tratado solo con CJP exhibió un aumento significativo en los niveles de la proteína IL-6 en comparación con el grupo V (Fig. 3B). Por el contrario, los niveles circulantes de IL-6 mostraron un aumento significativo únicamente en el grupo de tratamiento dual (Fig. 3B). Estos hallazgos pueden sugerir una regulación diferencial de IL-6 en el riñón. En este sentido, Mitazaki et al. (2013) consideraron a la IL-6 como una citocina antiinflamatoria crítica que puede proteger contra la nefrotoxicidad por CP manteniendo una función protectora en tejidos sometidos a estrés oxidativo<sup>30</sup>. Además, Mitazaki et al. (2009) informaron que en animales con knockout de IL-6 sometidos a nefrotoxicidad por CP, mostraron una progresión predominante de la disfunción renal en la etapa temprana, lo que indica que la IL-6 desempeña un papel renoprotector en la progresión de la lesión renal aguda<sup>31</sup>. En este sentido, en nuestro estudio observamos una regulación positiva de los niveles de IL-6 en el grupo CP + CJP, así como en el grupo CJP, lo que podría indicar un efecto protector para contrarrestar la disfunción y la progresión del daño renal. Por último, se midieron los niveles de la proteína antiinflamatoria IL-10, y se observó una reducción numérica en el grupo tratado con CP en comparación con los grupos V y CP + CJP ( $0,66 \pm 0,11$  vs.  $1,01 \pm 0,27$ ;  $0,78 \pm 0,15$  vs.  $1,01 \pm 0,27$ , Fig. 3C); sin embargo, este cambio no fue estadísticamente significativo según ANOVA.



**Figura 2.** Marcadores inflamatorios por inmunohistoquímica. (A) Cuantificación del área de tinción determinada como % del área positiva del factor nuclear B (NF-κB) en los paneles de la izquierda (B) e inmunohistoquímica y cuantificación del área de tinción determinada como % del área positiva de interleucina 6 (IL-6) en los paneles derechos. Ratas tratadas con V (solución salina isotónica; ip), CP (cisplatino; 6 mg/kg, ip), CP + CJP (6 mg/kg + 400 mg/mL del concentrado de jugo de pitaya) y CJP (400 mg/mL). Aumento original 40X, diez campos por rata. Barra = 50 μm. Las barras representan la media de diez campos ± DE (n = 5). \* p < 0,05 vs. V.

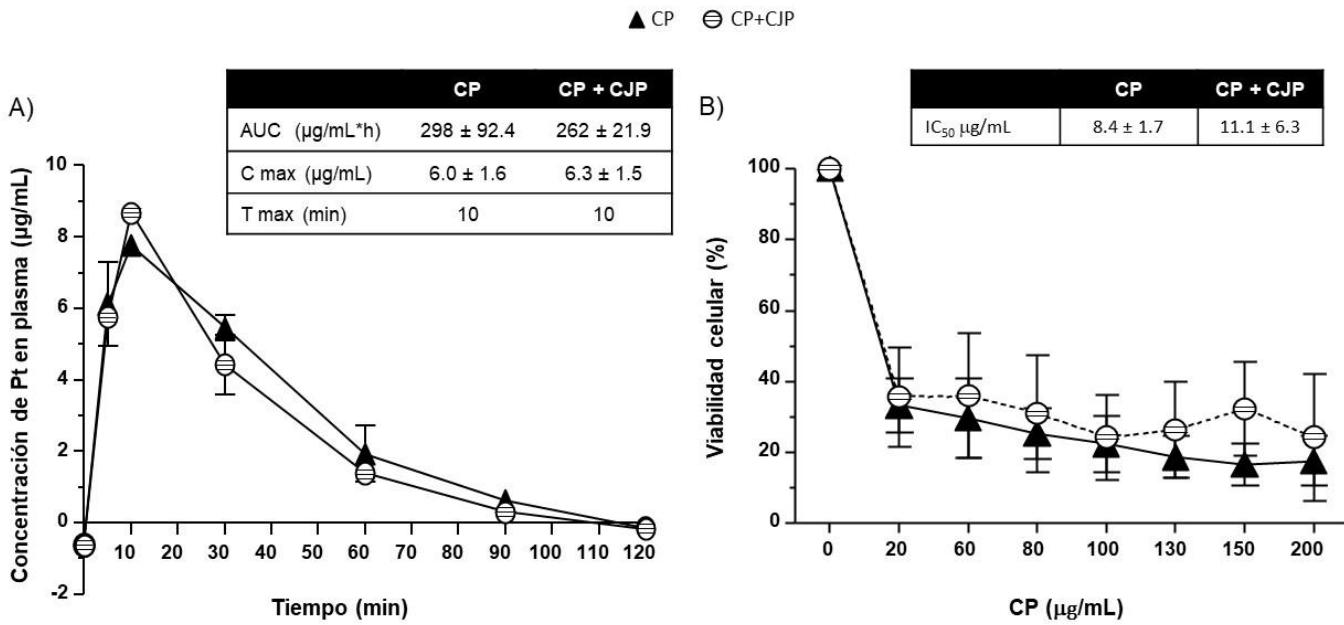
*Nota:* De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.11 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).



**Figura 3.** Marcadores inflamatorios mediante Western blot . (A) Análisis de las subunidades p50 (izquierda) y p65 (derecha) del potenciador de cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas (NF-κB) y análisis densitométrico. Cada banda representa una rata tratada individualmente y la imagen muestra 2 o 3 ratas representativas del estudio. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, n = 5. (B) Imágenes representativas de Western blot de interleucina-6 (IL-6) y análisis densitométrico. Cada banda representa una rata tratada individualmente y la imagen muestra 2 o 3 ratas representativas del estudio. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, n = 5 (B) y niveles séricos de IL-6 (pg/mL), (C) imágenes representativas de Western blot de interleucina-10 (IL-10) en homogeneizados renales y análisis densitométrico. Cada banda representa una rata tratada individualmente y la imagen muestra 2 o 3 ratas representativas del estudio. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, n = 5. V (solución salina isotónica, ip), CP (cisplatino; 6 mg/kg, ip), CP + CJP (6 mg/kg + 400 mg/mL del concentrado de jugo de pitaya) y CJP (400 mg/mL). Las barras representan la media  $\pm$  DE (n = 5). \* p < 0,05 vs. V. Nota: De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.11 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).

*CJP no interfirió con la farmacocinética de CP.* Para verificar que la mejora en la función renal observada fue resultado de la administración de CJP y no de ninguna alteración en la farmacocinética de CP que pudiera reducir su disponibilidad, se evaluó la concentración de Pt en plasma en distintos intervalos de tiempo en los grupos tratados con CP y CP + CJP (Experimento 3, Anexo 2). Como se ilustra en la Fig. 4A, el CJP no alteró la farmacocinética de CP. Ambos grupos mostraron áreas bajo la curva (AUC) y valores de concentración máxima (Cmax) similares, así como tiempos máximos (Tmax) de Pt en plasma idénticos.

*CJP no interfirió con el efecto citotóxico de CP en cultivos de células HeLa.* Además, para demostrar que los efectos protectores observados en la nefrotoxicidad de CP se debieron a la administración de CJP y no a un cambio en el efecto citotóxico de CP que podría reducir la muerte celular, determinamos el índice de proliferación de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de CP ( 0 a 200 µg/mL) más CJP (0 a 350 µg/mL). Como muestra la Fig. 4 B, CJP no modificó la viabilidad celular inducida por CP; ambos grupos tuvieron la misma puntuación de viabilidad celular y valores de IC<sub>50</sub> ( $8,4 \pm 1,7$  vs.  $11,1 \pm 6,3$  µg/mL), respectivamente. Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto renoprotector observado en ratas tratadas con CP se debió a la administración de CJP.



**Figura 4.** Efecto de la administración del CJP sobre la farmacocinética y viabilidad celular del platino en ratas con nefrotoxicidad inducida por CP. (A) Farmacocinética, concentración de platino (Pt) en plasma. Se muestran los valores del área bajo la curva (AUC), la concentración máxima de Pt (Cmax) y el tiempo máximo de Pt (Tmax). (B) La actividad antiproliferativa (porcentaje de viabilidad celular) se evaluó en células HeLa expuestas a CJP (0 a 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 96 h y CP (0 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); durante 24 h. Los valores de  $IC_{50}$  se obtuvieron de las curvas de supervivencia. Todos los valores se expresan como medias  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). ▲ CP (cisplatino; 6 mg/kg, ip), Θ CP + CJP (6 mg/kg + 400 mg/mL de concentrado de jugo de pitaya).

Nota: De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.8 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).

## **Conclusiones**

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el CJP atenúa la toxicidad renal en un modelo experimental de nefrotoxicidad por CP, protegiendo tanto la función como la estructura renal, reduciendo la apoptosis y modulando citoquinas, sin alterar la viabilidad celular ni la farmacocinética de CP. Una parte de esta protección conferida por el CJP se relaciona con un incremento en la producción de NO, el cual, al ser una molécula vasoactiva, posiblemente contrarreste los efectos hemodinámicos inducidos por el CP. En vista de estas observaciones y considerando la escasez de estudios sobre el fruto de *S. huastecorum*, lo siguiente fue evaluar el efecto vasoactivo del CJP, identificar la biomolécula específica responsable de tal efecto, así como su mecanismo de acción (capítulo 2).

Finalmente, el CJP podría servir como coadyuvante en el tratamiento de la lesión renal causada por trastornos que involucren cambios hemodinámicos significativos, como la hipertensión o enfermedades cardiovasculares. Además, nuestros hallazgos podrían impulsar el desarrollo de bioproductos con aplicaciones biotecnológicas tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica.

## 6. Capítulo 2

### **Evaluación del efecto vasoactivo del CJP en modelos *in vivo* e *in vitro***

La HTA es una enfermedad crónico-degenerativa que ha ido en aumento a nivel mundial en los últimos años. Se estima que en México más de 30 millones de personas viven con HTA, lo que hace que este padecimiento ocupe el tercer lugar en gastos por padecimiento en las instituciones de salud pública y colocando a México como el país con la prevalencia más alta de HTA en todo el mundo<sup>32,33</sup>. La HTA es la principal causa de insuficiencia cardiaca, enfermedad renal y accidente cerebrovascular; provocada por un aumento anormal persistente de la tensión de la sangre en las arterias ( $>130/80 \text{ mmHg}$ )<sup>33,34</sup>.

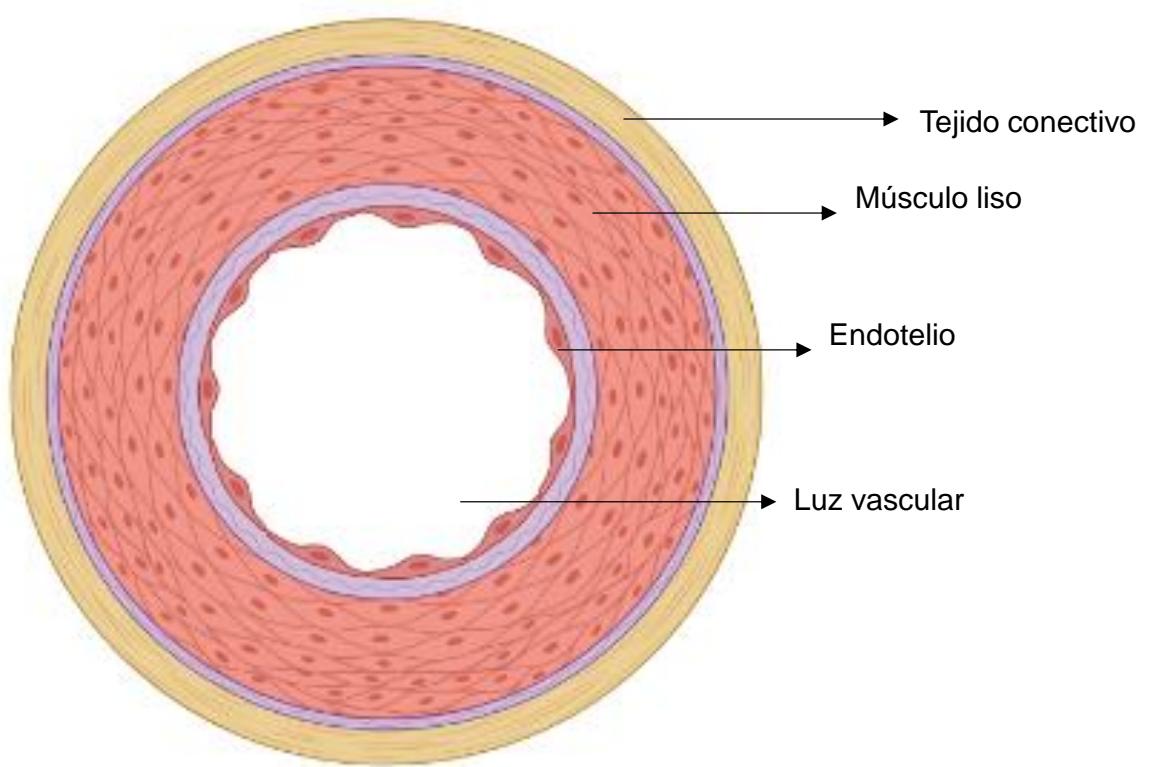
En el cuerpo humano, la presión arterial (PA) está determinada por tres factores: el gasto cardíaco, el volumen sanguíneo y la resistencia vascular sistémica, de forma que la modificación de cualquiera de estos produce cambios en el nivel de la PA. La regulación de estos factores depende de la acción de dos sistemas: la regulación nerviosa y la regulación hormonal<sup>35</sup>.

El sistema nervioso regula la PA a través de dos mecanismos reflejos aferentes al sistema cardiovascular: reflejos quimiorreceptores que controlan los cambios químicos en la sangre (concentraciones de  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}^+$ ), y los reflejos barorreceptores que se encargan de monitorizar el grado de distensión (cambios mecánicos) de las paredes de los vasos sanguíneos, producido por la presión del flujo sanguíneo<sup>36</sup>. Mientras, el sistema hormonal regula la PA alterando el gasto cardíaco, ajustando el volumen sanguíneo o cambiando la resistencia vascular sistémica (Tabla 1)<sup>36</sup>. En los vasos sanguíneos, la regulación de estos sistemas se produce a través del músculo liso y del endotelio vascular (Fig. 5)<sup>37</sup>.

En el endotelio vascular se sintetizan y liberan agentes vasodilatadores y vasoconstrictores. Los agentes vasodilatadores (factores relajantes) incluyen: NO, factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, por sus siglas en inglés), prostaglandinas, adenosina, amoníaco, radicales de oxígeno y ácido araquidónico. Los agentes vasoconstrictores (factores de contracción) incluyen: endotelina, tromboxano A<sub>2</sub>, angiotensina II, prostaglandinas, serotonina y radicales de oxígeno<sup>37</sup>.

**Tabla 1.** Regulación hormonal de la presión arterial

Regulación hormonal de la presión arterial (PA)		
Factores que influyen sobre la PA	Hormona	Efecto sobre la PA
Gasto cardíaco		
Aumento de la frecuencia cardíaca y la contractilidad	Noradrenalina Adrenalina	Aumenta
Resistencia vascular sistémica		
Vasoconstricción	Endotelina Vasopresina Noradrenalina Adrenalina	Aumenta
Vasodilatación	Péptido natriurético auricular Prostaciclina Bradiquinina Óxido nítrico	Disminuye
Volumen sanguíneo		
Incrementa el volumen sanguíneo	Aldosterona Vasopresina	Aumenta
Disminuye el volumen sanguíneo	Péptido natriurético auricular	Disminuye



**Figura 5.** Diagrama que muestra las principales componentes de una arteria

Estos agentes responden a diferentes estímulos que modifican la PA (pérdida de sangre, deshidratación, estimulación simpática, alto consumo de sal) desencadenando vías de señalización en las células del músculo liso vascular (CMLV) que tienen como objetivo estimular canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ )<sup>36</sup>.

El estado contráctil de los vasos sanguíneos depende en primer lugar de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , concentración que es determinada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (retículo sarcoplásmico y mitocondria), y  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ). Estos canales  $\text{Ca}_v$  se abren ante la despolarización del potencial de membrana induciendo la contracción muscular, mientras que la hiperpolarización los cierra generando relajación. Por lo tanto, el estado eléctrico de la membrana plasmática es fundamental en el mantenimiento del tono vascular<sup>38</sup>.

El potencial de reposo de las CMLV está mantenido por la actividad de canales de  $\text{K}^+$ , que se encuentran abiertos en un estado con potencial habitual entre -40 y -50 mV, infundiéndo un flujo continuo de iones de  $\text{K}^+$  a la célula. Si se bloquean estos canales, la célula se despolariza, abriendo los canales  $\text{Ca}_v$ , entonces entra  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula y se eleva el tono vascular, es decir vasoconstricción. Por el contrario, si se abren más canales de  $\text{K}^+$  se produce una hiperpolarización, el cierre de los canales  $\text{Ca}_v$  y por lo tanto se induce una relajación<sup>35,37-39</sup>.

El estudio fisiopatológico de la HTA ha propiciado a través de los años el desarrollo de diversos tratamientos antihipertensivos como diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores de canales de calcio, beta-bloqueadores, precursores de NO, entre otros<sup>32</sup>. A pesar de la amplia gama de fármacos antihipertensivos disponibles, la OMS señala que aproximadamente dos tercios de la población afectada por HTA vive en países en desarrollo y carece de acceso a la medicina moderna. En consecuencia, dependen en gran medida del consumo de plantas para atender sus necesidades de atención primaria de salud<sup>40</sup>. Esta situación, combinada con el incremento en la prevalencia de la HTA relacionada con hábitos alimenticios poco saludables, ha despertado un creciente

interés en el uso de productos naturales como terapia complementaria para el control y prevención de esta enfermedad.

Diversos estudios se han enfocado en describir las propiedades de protección vascular de diferentes compuestos bioactivos de origen natural como los carotenoides en el jugo de zanahoria<sup>41</sup>, los flavonoides en el extracto del almizclillo<sup>6</sup>, los polifenoles en el té verde<sup>42</sup> y los nitratos en el jugo de betabel<sup>43</sup>.

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación utilizó un CJP (*S. huastecorum*) para evaluar su efecto sobre un modelo de nefrotoxicidad inducido por CP. Parte de la protección observada, se asoció con el incremento en la producción de NO en el tejido renal, así como el aumento en la expresión de la eNOS (Anexo 1D-E), sugiriendo que el CJP puede ejercer efectos vasoactivos contrarrestando la vasoconstricción generada por el quimioterapéutico<sup>44</sup>. Estos resultados, aunado a que no hay estudios que evidencien la propiedad vasodilatadora de la pitaya, nos conducen a llevar a cabo la identificación de los compuestos vasoactivos presentes en el CJP y evaluar su efecto vasodilatador en modelos *in vitro* e *in vivo*, así como determinar su mecanismo de acción.

## **Materiales y métodos**

### **Reactivos**

Fenilefrina (Phe), carbacol (Cbc), tetraetilamonio (TEA), nifedipino (Nph), propranolol (Prp), éster metílico de la N -nitro-L-arginina (L-NAME), terbutelina (TBT), DL- Ditiotreitol (DTT), colagenasa tipo F, papaína, y diferentes sales de grado analítico fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EE. UU.). El ácido trifluoroacético grado HPLC fue adquirido en reactivos analíticos Karal (León, Gto., México). El alcohol metílico grado reactivo ACS fue adquirido en CTR SCIENTIFIC (Monterrey, Nuevo León, México). El ácido acético glacial grado reactivo fue adquirido en Jalmek Científica (San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México). Para el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), los reactivos fueron usados de grado analítico (Sigma Chemical Company).

### *Obtención del concentrado de jugo de pitaya (CJP)*

Los frutos de pitaya (*S. huastecorum*), sin espinas, se obtuvieron durante la temporada de abril-mayo del 2019 en el mercado de Santa María del Río, San Luis Potosí (21°48'N 100°45'O). Se seleccionaron frutos aparentemente sanos, sin daño, ni manchas. Se pesaron 5 kg de pitaya con cáscara, la cual fue retirada manualmente con la ayuda de un cuchillo de acero inoxidable; y sin cáscara (2.7 kg). El jugo de pitaya se extrajo usando un colador con un tamiz y un poro de diámetro de 1.0 mm para recuperar las semillas (1.6 L). Finalmente, el jugo fue colocado en una centrífuga (BECKMAN COULTER, Avanti J-20i) por 10 min a 15,000 x g a 10°C<sup>45</sup>. El sobrenadante fue usado como el CJP (1.1 L). Quinientos cincuenta mL del sobrenadante fueron almacenados en alícuotas de 50 mL a -80°C y protegido de la luz hasta su uso, los otros 550 mL fueron liofilizados en alícuotas de 25 mL para el desarrollo de los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

### *Estudios in vitro*

#### *Animales*

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho, con un peso comprendido entre 250-350 g, obtenidas del Centro de Animales de la Facultad de Medicina de

la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la UASLP, San Luis Potosí, México, con número BGFMUASLP-13-22. El alimento y agua se suministraron “ad libitum” hasta el día del experimento.

#### *Obtención del tejido*

Los animales fueron sacrificados después de ser anestesiados con éter dietílico (1.5 mL). Tras el sacrificio de cada animal, se extrajo la porción torácica de la aorta (arteria de primer orden) y el lecho mesentérico (arteria de segundo orden), posteriormente se colocaron en una placa de disección que contenía solución fisiológica (SF, en mM/ L: 135 NaCl, 4.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 5 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) a un pH de 7.4, se les retiró el exceso de tejido conectivo y adiposo perivascular.

#### *Contractilidad en anillos de aorta torácica*

De cada aorta obtuvimos 4 anillos de 3-4 mm de longitud cada uno, para ser montados individualmente en cámaras de vidrio para órgano aislado con SF a 37 °C y a un pH de 7.4. Un extremo del anillo fue sujetado al fondo del baño y el otro a un transductor de tensión FT.03 (Grass Instruments Co, Quincy, MA, EE. UU) conectado a un Polígrafo Grass modelo 79D, a través de ganchos de acero inoxidable. Los diferentes tratamientos se aplicaron directamente a cada uno de los baños. Las mediciones de tensión de cada uno de los anillos se adquirieron en tiempo real y se analizaron con un software diseñado en el Departamento de Fisiología y Biofísica (Facultad de Medicina, UASLP). Se aplicó una carga pasiva de 1 g al inicio de los experimentos, y los anillos aórticos se dejaron equilibrar durante 30 min.

Como primer experimento, se realizó una curva dosis-respuesta del CJP liofilizado (1-100 mg/mL; SF como disolvente) en presencia de endotelio. Al inicio de cada experimento los anillos fueron precontraídos con un agonista adrenérgico, Phe (10 mM a 10 µM, 15 min). Una vez alcanzado el estado estacionario de la contracción se agregó Cbc (10 mM a 10 µM, 5 min), un vasodilatador que actúa a nivel endotelio, con el objetivo de verificar la presencia de endotelio. Después, los

anillos son lavados con SF y nuevamente contraídos con Phe. Una vez estabilizada la contracción, la mitad de los anillos recibieron concentraciones crecientes de CJP de manera individual y la otra mitad SF como control. El efecto se registró por 30 min. Con estas mediciones se obtuvo la concentración media máxima eficaz ( $EC_{50}$ ), la cual se utilizó para los siguientes ensayos.

Una vez establecida la  $EC_{50}$ , se realizaron experimentos en anillos aórticos de ratas Wistar macho previamente contraídos con Phe (10  $\mu$ M), para evaluar el o los mecanismos de acción implicados en el efecto vasorelajante del CJP. Estos experimentos se desarrollaron a través de: 1) el desnudamiento del endotelio de los anillos aórticos, utilizando carbógeno al 5% (2 min), 2) de la pre-incubación (10 min) de los anillos aórticos con un bloqueador de canales de  $K^+$  no selectivo (TEA; 20mM), 3) y de un bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Nph; 10 mM). Estos últimos dos experimentos se llevaron a cabo sin endotelio, en donde la eficacia de eliminación fue confirmada por la ausencia de relajación ante la acción de Cbc (10  $\mu$ M) e histología de los anillos, teñidos con hematoxilina-eosina.

Los controles se llevaron a cabo para cada experimento, en ausencia del antagonista. La integridad del músculo liso se evaluó mediante la contracción con Phe (10  $\mu$ M) después de los tratamientos. Se utilizaron al menos cinco ratas para cada grupo de experimentos.

Siguiendo la metodología de la curva dosis-respuesta del CJP, se realizó un ensayo biodirigido con las fracciones obtenidas por cromatografía de fase reversa (metodología descrita más adelante), con el objetivo de encontrar la fracción responsable del efecto vasorelajante de CJP. Se evaluaron 4 concentraciones de cada fracción (10, 20, 40 y 80 mg/mL) en anillos aórticos precontraídos con Phe (10  $\mu$ M) sin endotelio. También se evaluó la integridad del músculo liso y se usaron al menos cinco ratas para cada grupo de experimentos.

#### *Contractilidad de anillos de arteria mesentérica*

Para determinar el efecto vasoactivo en arterias de menor tamaño (resistencia), se obtuvo la arteria mesentérica, se cortaron 3 segmentos (ramas de segundo orden) de aproximadamente 1 mm de largo, montándose individualmente en un sistema

para registro isométrico mediante un micro-transductor AE801 (Sensor One Technologies, Oakland, California) con dos cables de cobre (diámetro exterior de 40 µm; aproximadamente 1 cm de longitud). Los alambres pasaban por el lumen de cada anillo, uno fijado a un micrómetro para ajustes de longitud y el otro conectado a un transductor de fuerza. Los cambios de tensión se registraron en la grabadora de laboratorio LINSEIS L6512B (Robbinsville, Nueva Jersey). Una vez montados los anillos mesentéricos (SF a 37 °C), se distendieron hasta un diámetro de luz óptimo para el desarrollo de tensión activa (8-10 mg, durante 10 min).

Para evaluar el efecto vasorelajante en los anillos mesentéricos, se utilizó una concentración de 5 mg/mL de la fracción vasoactiva del CJP (F1), dosis establecida en un experimento previo utilizando diferentes concentraciones de la F1 (1-10 mg/ml). A los anillos se les retiró el endotelio insertando un hilo de seda (0.070mm de diámetro) en el lumen y realizando movimientos de fricción contra la pared arterial, otras vías vasodilatadoras se bloquearon por una pre-incubación con diferentes fármacos con el objetivo de crear una contracción sostenida con Phe (10 mM a 100µM, 3 min); propranolol, un bloqueador de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Prp, 10µM, 15 min) y el éster metílico de la N -nitro-L-arginina, un bloqueador de la eNOS (L-NAME, 100µM, 5 min). La falta de funcionalidad endotelial se confirmó farmacológicamente por la ausencia de relajación después de la adición de Cbc (2 mM a 10µM) en la meseta por contracción inducida por Phe (100µM), al igual que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, observando la ausencia de relajación después de añadir terbutalina (TBT, 1 µM), un agonista  $\beta$ -adrenérgico. Los controles se llevaron a cabo para cada experimento, agregando el vehículo de la fracción, SF. La integridad del músculo liso también se evaluó mediante la contracción con Phe (100µM) después de los tratamientos. Se utilizaron nueve ratas para los experimentos.

### *Aislamiento de células de músculo liso de aorta torácica y arteria mesentérica para registro de patch-clamp*

La aorta torácica y la arteria mesentérica, limpias de tejido adiposo y conectivo, se colocaron por separado en una solución salina de disociación (en mM: 55 NaCl, 6 KCl, 80 C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>, 80 NaOH, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> y 10 HEPES). Despues, se cortó el tejido en tiras y se transfirió a un tubo falcón que contenía 700 µL de solución salina de disociación adicionada con DTT (5 mM), papaína (1.4 mg/mL) y albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) (2 mg/mL), previamente incubada a 37 °C por 10 min. Las células fueron digeridas mediante un baño de agitación a 120 rpm a 37°C durante 32 min (aorta torácica) y 12 min (arteria mesentérica). Posteriormente, las tiras del tejido se transfirieron a otro tubo con 700 µL de solución salina, 1.4 mg/mL de colagenasa tipo F y 100 mM de CaCl<sub>2</sub>. Se incubó a 37°C durante 12 min (aorta torácica) y 6 min (arteria mesentérica). Finalmente, el tejido se colocó en una solución salina de disociación libre de enzimas y con la ayuda de una punta de micropipeta de 1 mL, las células fueron disociadas.

### *Registros electrofisiológicos*

Las CMLV, de aorta torácica y arteria mesentérica fueron colocadas directamente en el fondo de la cámara experimental y observadas con un microscopio invertido (Zeiss Axio Vert.A.1). Se esperaron 10 min para que las células se adhirieran al fondo de vidrio de la cámara antes de iniciar los experimentos. Las células fueron registradas en la modalidad de célula completa utilizando micropipetas preparadas con capilares de vidrio de borosilicato (WPI, Saratosa, FL, USA). Las pipetas tenían una resistencia de 2-3 mΩ, después de llenarlas con la solución interna. Las corrientes iónicas fueron registradas con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La adquisición y generación de los protocolos de pulsos de voltaje se realizó utilizando la interfaz Digidata 1440A (Molecular Devices) y el software pCLAMP 10 (Molecular Devices). Las corrientes fueron filtradas y sujetas a sustracción de fuga (P/4) a través del amplificador, digitalizadas y los archivos fueron almacenados para su posterior análisis.

Para aislar las corrientes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , las pipetas se llenaron con una solución alta en  $\text{Cs}^+$  (en mM: 132.5 CsCl, 3 ATP-Na<sub>2</sub>, 0.1 GTP, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA y 10 HEPES), pH 7.2 (ajustado con CsOH). Se utilizaron iones Ba<sup>2+</sup> para registrar las corrientes a través de los canales de Ca<sup>2+</sup>. La solución basada en Ba<sup>2+</sup> consistió en (mM): 10 BaCl<sub>2</sub>, 150 NaCl, 5.4 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> y 5 HEPES, pH7.4 (ajustado con NaOH). Para estos experimentos se utilizó la concentración media de la F1 (20 mg/mL) y como control Nph (1μM). Se utilizaron 9 ratas para cada grupo de experimentos.

### *Estudios in vivo*

#### *Animales*

Para los experimentos se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar Kyoto (WKY, control), de 20 semanas de edad (300-400 g), obtenidas en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los experimentos se desarrollaron en la Facultad de Ciencias (UASLP) manteniendo a los animales a temperatura (18–22 °C) e iluminación constante (ciclo de 12 h de luz/oscuridad), alimentados con comida estándar y agua “*ad libitum*” y aclimatados durante dos semanas.

#### *Efecto del CJP en ratas SHR y WKY*

Derivado del efecto vasodilatador observado en los experimentos *in vitro*, este efecto fue evaluado en ratas SHR y WKY.

Dieciocho ratas SHR, fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos: el grupo vehículo (V, n=6) recibió 1 mL de agua por vía oral (v.o.); el segundo grupo recibió 10 mg/kg de nifedipino (v.o.), disuelto en etanol; control positivo (Nph, n=6); y finalmente, el tercer grupo recibió 400 mg/mL de CJP (v.o.), disuelto en agua (CJP, n=6). Además, incluimos un grupo de ratas WKY (normotensas) + CJP (WKY+CJP, n=4). El tratamiento fue una dosis única al inicio de 5 días de experimento.

A todos los grupos estudiados se les tomó la PA (Sistólica, PAS; diastólica, PAD) cada 24 h por 2 semanas, con el sistema de medición de presión arterial en cola CODA (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, EUA). Una vez que las ratas alcanzaron una PA alta estable, fueron administradas de acuerdo con los grupos

descritos previamente. La PA se tomó a los 0 min y a la 1, 24, 48 y 120 h de la administración del V, Nph o CJP. La dosis del CJP se estableció previamente con un grupo piloto de animales ( $n=3$ ), el cual fue administrado con dosis crecientes de CJP (0, 200, 400 y 600 mg/mL), monitoreando la PA a las 0, 1, 24, y 48 hrs después de su administración.

Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y con el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la UASLP, San Luis Potosí, México (OFICIO/FQ/CICUAL/146/16).

#### *Identificación de compuestos bioactivos*

##### *Fraccionamiento del CJP*

El fraccionamiento del CJP se realizó por cromatografía en columna de fase reversa (8 cm h x 8 cm d.i.), eluída por gravedad (250 g de sílica Chromabond® Sorbent C18). Veinte gramos de CJP liofilizado se disolvió en 20 mL de CH<sub>3</sub>COOH 1%; se eluyó utilizando las siguientes mezclas: CH<sub>3</sub>COOH 1%, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 98:2, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 95:5, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 90:10, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 80:20, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 70:30, CH<sub>3</sub>COOH 1%-MeOH 50:50, y MeOH 100%; para obtener una fracción por polaridad. Las fracciones con menos de 5% de MeOH se recuperaron por liofilización, y las fracciones con una proporción >5% de MeOH, primero se sometieron a destilación a presión reducida en un rotaevaporador (100 mBar, 40 min a 50°C ) y después se liofilizaron. Las 8 fracciones obtenidas (F1-F8) se almacenaron a -20°C, protegidas de la luz hasta su uso. Con estas fracciones, se realizó un ensayo biodirigido *in vitro* (descrito más adelante) con el objetivo de encontrar la fracción vasoactiva y así, realizar su perfilamiento para la identificación de el o los compuestos.

#### *Perfilamiento de compuestos bioactivos por HPLC-PDA*

Muestras independientes de 250 mg de CJP y de la fracción vasoactiva (F1), se disolvieron en 10 mL de una mezcla de ácido trifluoroacético acuoso (TFA) 0.1%-MeOH 80:20. La mezcla resultante se centrifugó a 4,500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y filtrado por una membrana de polipropileno (0.45 µm) para su análisis por HPLC-PDA.

Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (1200 HPLC Agilent chromatograph), equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA, Agilent G1315D). La separación se llevó a cabo utilizando una columna Purospher® STAR RP 5 µm (250 x 4.6 mm, Merck-Sigma) y un gradiente de elución, usando como disolvente A, TFA 0.1%; y disolvente B, MeOH. El gradiente de elución optimizado para separar los compuestos fue: 0 % B, 0 min; 5% B, 15 min; 15% B, 25 min; 100% B, 30-35 min; y 0% B, 40-45 min. Se utilizó un flujo de 0.4 mL/min y longitudes de onda de detección de 254 y 480 nm, con un volumen de inyección de 50 µL.

#### Caracterización por espectroscopía UV-Vis

Los espectros de las muestras se midieron en el rango de 200 a 800 nm utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 900 UV-VIS-NIR. De CJP y F1 se tomaron 4 mg, se disolvieron en 1 mL de agua desionizada y se colocaron en celdas de polipropileno de 1 cm. Se determinaron los parámetros: absorbancia y longitud de onda de máxima de absorción.

#### Caracterización por FTIR

Se tomaron 10 mg del CJP y F1 para su caracterización por infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), mediante la técnica ATR, en el rango de 400-4000 cm<sup>-1</sup>, empleando un equipo Thermo Scientific Nicolet i50.

#### Perfilamiento por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de RMN se realizó en el Instituto de Química de la UNAM. Los espectros de RMN se adquirieron en un equipo Bruker Ascend III 400 MHz a una

concentración de 40 mg/mL de CJP y F1, disueltos en D<sub>2</sub>O + TFA-d 99.9:0.1. Los datos se procesaron usando Mnova NMR software versión 6.0.

#### *Análisis estadísticos*

Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM). Se realizó prueba de normalidad usando el test Shapiro Wilk y la significancia estadística entre los grupos, se evaluó mediante ANOVA de una vía y para las diferencias entre grupos se utilizó la prueba de Turkey-Kramer. Los valores se consideraron significativos p < 0,05. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

## Resultados y discusión

### *Efecto relajante del CJP en anillos aislados de aorta torácica y la evaluación de su mecanismo de acción*

Alimentos como la tuna<sup>46</sup>, la flor de jamaica<sup>47</sup> y el betabel<sup>48</sup> se han asociado con actividad antihipertensiva, relacionada al contenido y tipo de compuestos bioactivos de estos alimentos, como las betalaínas, antocianinas y compuestos fenólicos. En un estudio previo, analizamos la presencia de diferentes compuestos en el fruto de la pitaya (*S. huastecorum*) por espectrómetro de masas en tandem de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC-PDA-ESIMS), se identificaron, indicaxantina, un tipo de betaxantina con reportes de actividad vasodilatadora<sup>44,49</sup>. Actualmente la pitaya no cuenta con estudios que le atribuyan una propiedad antihipertensiva. Por lo tanto, un objetivo de este trabajo es evaluar el efecto relajante del CJP en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Para iniciar, se evaluó el efecto del CJP sobre anillos aislados de aorta torácica, mediante una curva dosis-respuesta del CJP (1-100 mg/mL, n=6) y establecer la EC<sub>50</sub>. Observamos que el CJP provocó una relajación de manera dosis-dependiente en anillos aórticos con endotelio, previamente contraídos con Phe (10 µM), alcanzando una relajación máxima del 66 ± 3.4% con una dosis de 100 mg/mL, establecimos una EC<sub>50</sub> de 36 ± 2.9 mg/mL, concentración que indujo una relajación del 34 ± 2% (Fig. 6A). Cabe mencionar que en los siguientes experimentos se empleó una dosis de 36 mg/mL de CJP.

**Papel del endotelio en la vasodilatación por el CJP.** Con el fin de caracterizar el o los mecanismos de acción implicados en el efecto relajante del CJP, se evaluó el papel del endotelio sobre la respuesta vasodilatadora del CJP. El endotelio vascular es un regulador esencial de la PA, vinculado principalmente a la liberación local de factores de vasoconstricción como la endotelina, y factores de vasorelajación como la prostaciclina y el NO<sup>50</sup>. Al respecto, Mamadou Sarr et al. (2009), analizaron el efecto relajante de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* en anillos aislados de aorta torácica, en donde su análisis fitoquímico reveló la presencia de ácidos fenólicos y antocianinas. En este estudio observaron que *H. sabdariffa* (10<sup>-4</sup>-10<sup>-1</sup>mg/mL) produjo una relajación dosis-dependiente en los anillos

aislados de aorta torácica con endotelio, previamente contraídos con norepinefrina ( $1 \mu\text{M}$ ), alcanzando una relajación máxima del  $66\% \pm 8\%$ , sin embargo, al retirarle el endotelio a los anillos, observaron que el efecto relajante disminuyó significativamente ( $24 \pm 0.5\%$ ), sugiriendo que el endotelio tiene un papel importante en el mecanismo de relajación de *H. sabdariffa*<sup>47</sup>.

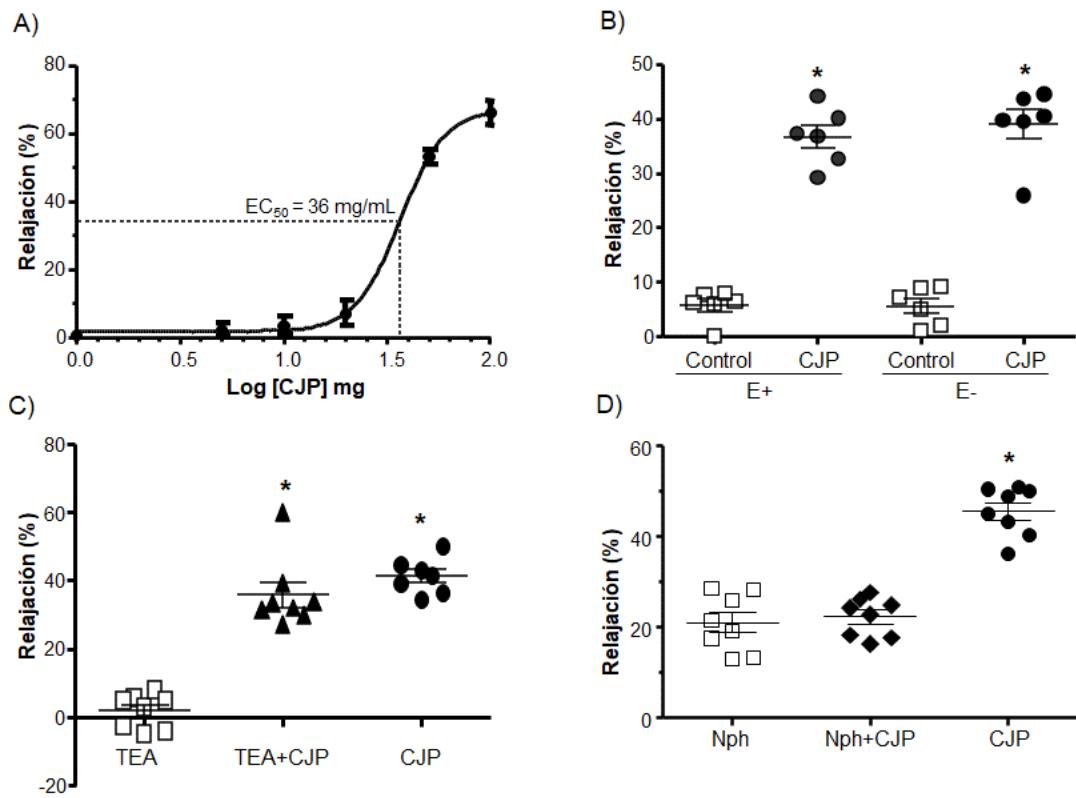
De manera opuesta en nuestro estudio, como observamos en la Fig. 6B, la administración del CJP ejerció un efecto relajante similar en anillos de aorta torácica con (E+) y sin (E-) endotelio en un  $38 \pm 6\%$  y  $40 \pm 5\%$  ( $n=5$ ; círculos color negro), respectivamente; comparados con anillos tratados con SF como control (círculos color blanco); los anillos de este experimento fueron previamente contraídos con  $10 \mu\text{M}$  de Phe. Debido a que el efecto vasodilatador no se modificó al eliminar el endotelio, este resultado sugiere que el efecto relajante, ejercido por la administración del CJP, no es dependiente del endotelio. Cabe mencionar que la eliminación del endotelio fue revisado por la ausencia de relajación ante la acción de Cbc ( $10\mu\text{M}$ ) y corroborado mediante histologías de los anillos aórticos (Anexo 3).

**Activación de canales de K<sup>+</sup>.** Una vez que observamos que el efecto relajante del CJP era independiente del endotelio, se procedió a evaluar si la vasodilatación ejercida del CJP era a través de la activación de los canales de K<sup>+</sup>, otro de los mecanismos de regulación de la PA. Se sabe que el efecto relajante de diversas plantas medicinales esta mediado por mecanismos de apertura de canales de K<sup>+</sup><sup>47,51,52</sup>. El potencial de reposo de las CMLV está mantenido por la actividad de estos canales, que se encuentran abiertos al potencial habitual de las CMLV, induciendo un continuo eflujo de K<sup>+</sup> a la célula. La apertura de más canales de K<sup>+</sup> hiperpolariza la membrana de las células, provocando la inhibición de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales Ca<sub>v</sub> y por lo tanto, la relajación vascular<sup>38,49</sup>.

Para este ensayo, se evaluó la tensión de anillos aislados de aorta torácica de rata Wistar macho, precontraídos con Phe ( $10 \mu\text{M}$ ), en presencia y ausencia de  $20 \text{ mM}$  de TEA, un bloqueador no selectivo de los canales de K<sup>+</sup>. La Fig. 6C muestra el porcentaje de relajación que presentaron los anillos tratados solo con TEA (control,  $2 \pm 2\%$ ; cuadros color blanco), TEA + CJP ( $37 \pm 3\%$ ; triángulos color negro) y los

tratados solo con CJP ( $39 \pm 2\%$ ; círculos color negro). Estos resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre los anillos tratados con TEA + CJP y los tratados exclusivamente con CJP, sugiriendo que el CJP produce vasodilatación, pero no mediante la activación de canales de  $K^+$ .

**Efecto del CJP sobre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje ( $Ca_v$ ).** Los canales  $Ca_v$  han sido una diana importante en el tratamiento de la HTA. Gran parte del  $Ca^{2+}$  activador de las proteínas contráctiles en las CMLV entra a través de estos canales durante la despolarización del potencial de membrana, provocando la contracción del músculo liso<sup>38,53</sup>. En la patogenia de la HTA se ha observado una sobre expresión de los canales  $Ca_v$  provocando un mayor flujo de entrada de  $Ca^{2+}$  a las CMLV, impulsando el desarrollo de un tono vascular anormal y una resistencia vascular periférica elevada<sup>54</sup>. De ahí la importancia del diseño de terapias antihipertensivas que ayuden a modular la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células. Al respecto, la participación de los canales  $Ca_v$  en este trabajo fue evaluada mediante la inhibición de su actividad mediante un bloqueador selectivo, llamado Nph, en anillos aislados de aorta torácica. En la Fig. 6D se muestra el porcentaje de relajación obtenido con el tratamiento de Nph (control, 200 mM; cuadros color blanco), Nph + CJP (rombos color negro) y CJP (círculos color negro), donde se observó que los anillos que recibieron Nph presentaron una relajación esperada del  $21 \pm 2\%$  y reportada previamente<sup>55</sup>, resultados similares se obtuvieron con el tratamiento de Nph + CJP ( $24 \pm 2\%$ ). Mientras que cuando los anillos son expuestos exclusivamente al CJP muestran una vasodilatación del  $46 \pm 2\%$ , es decir, el efecto de CJP es inhibido al bloquear los canales  $Ca_v$ , indicándonos que el efecto relajante del CJP es debido en parte al bloqueo de los canales  $Ca_v$ .



**Figura 6.** Efecto relajante del CJP en anillos aislados de aorta torácica de ratas Wistar macho precontraídos con fenilefrina (Phe, 10  $\mu$ M) y la evaluación de su mecanismo de acción. (A) Curva logarítmica dosis-respuesta (1-100 mg/mL) para evaluar el efecto vasodilatador del CJP ( $n=6$ ). La concentración efectiva máxima media (EC<sub>50</sub>) se obtuvo ajustando las curvas individuales de respuesta a dosis logarítmicas de CJP. (B) Efecto de 36 mg/mL del CJP en anillos de aorta torácica con el endotelio intacto (E+) y sin endotelio (E-); solución fisiológica como control ( $n=5$ ). (C) Efecto de 36 mg/ml de CJP en anillos de aorta torácica en presencia y ausencia de tetraetilamonio (TEA, 20 Mm) ( $n=7$ ). (D) Efecto de 36 mg/ml de CJP en anillos de aorta torácica en presencia y ausencia de nifedipino (Nph, 200 nM) ( $n=7$ ). La relajación se calculó como un porcentaje de la contracción inicial. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  vs. control.

### *Efecto de las fracciones del CJP sobre anillos aislados de aorta torácica y arteria mesentérica*

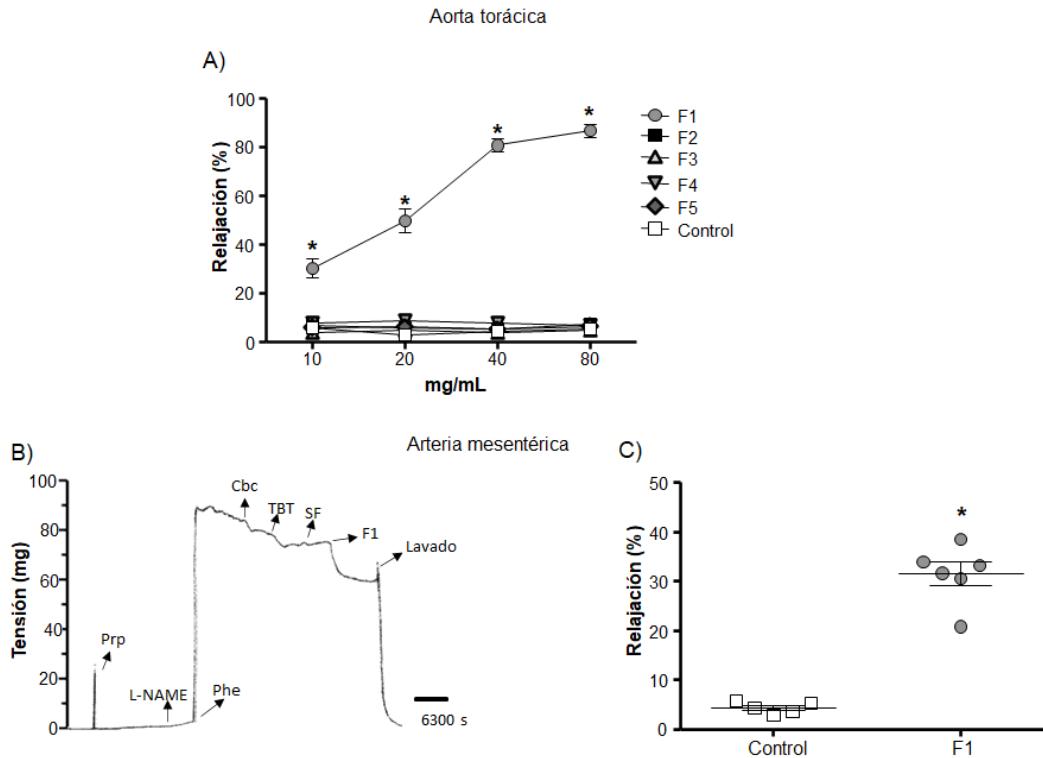
Mediante un ensayo biodirigido (como se describe en metodología), se evaluaron individualmente las fracciones obtenidas del CJP, con el objetivo de identificar la fracción con efecto vasoactivo. De las 5 fracciones evaluadas (F1-F5) solo la F1 mostró vasoactividad. Cabe mencionar que de la F6-F8 la muestra fue insuficiente para su evaluación. En la Fig. 7A, se muestra que la F1 provocó una relajación dosis-dependiente en los anillos aórticos, la cual alcanzó una relajación máxima de  $81 \pm 3.4\%$  con una concentración de 40 mg/mL, mientras que las otras fracciones (F2-F5) no mostraron ningún efecto vasoactivo al igual que el control (SF). Este resultado era esperado, debido a que se encuentra bien documentado que los extractos exhiben una concentración más elevada de compuestos en comparación con la planta o fruto original<sup>56</sup>.

Por otro lado, al evaluar la integridad de los anillos al final de los ensayos, observamos que la concentración más alta (80 mg/mL) de la F1 daña la integridad del anillo, impidiendo que estos vuelvan a contraer al añadir Phe (10  $\mu$ M), por lo que esta concentración no fue considerada para realizar los siguientes experimentos.

Cabe mencionar que obtener las fracciones por polaridad ha sido una metodología ampliamente usada<sup>47,56,57</sup> ya que ofrece oportunidades para identificar de manera destacada y más dirigida los compuestos asociados al efecto de interés.

**Efecto de F1 en anillos aislados de arteria mesentérica.** Los vasos sanguíneos se clasifican según su función: de conductancia, de resistencia, de intercambio y de capacitancia o almacenamiento. Los vasos de conductancia se encargan principalmente de conducir la sangre oxigenada al cuerpo; un ejemplo es la aorta torácica. Los vasos de resistencia, incluyen arterias pequeñas, arteriolas y esfínteres precapilares, en las paredes de estos vasos existe mayor número de CVML, por lo que una de sus principales funciones es controlar el tono vascular, generando una resistencia periférica al flujo sanguíneo y siendo este uno de los factores que determina la PA<sup>37,39</sup>. Por esta razón, una vez observado el efecto vasodilatador de F1 en anillos de aorta torácica, nuestro interés fue el efecto

vasoactivo de la F1 en arterias de resistencia. Los anillos mesentéricos sin endotelio fueron previamente incubados con Prp ( $\beta$ -bloqueante) y L-NAME (inhibidor de eNOS), después contraídos con Phe, seguido de la administración de F1 (5mg/mL, dosis previamente establecida) como se observa en la Fig. 7B, donde se muestra un registro fisiológico representativo de la tensión en anillos mesentéricos y las flechas indican la adición de diferentes tratamientos, destacando la vasodilatación generada por la F1. Como se observa en la Fig. 7C, F1 causó relajación sobre los anillos mesentéricos en comparación con los anillos del grupo control (SF;  $31 \pm 2\%$  cuadros color blanco vs.  $4 \pm 1\%$ , círculos color gris), lo que corrobora que el CJP ejerce un efecto vasodilatador y lo hace tanto en vasos sanguíneos de conductancia como de resistencia.

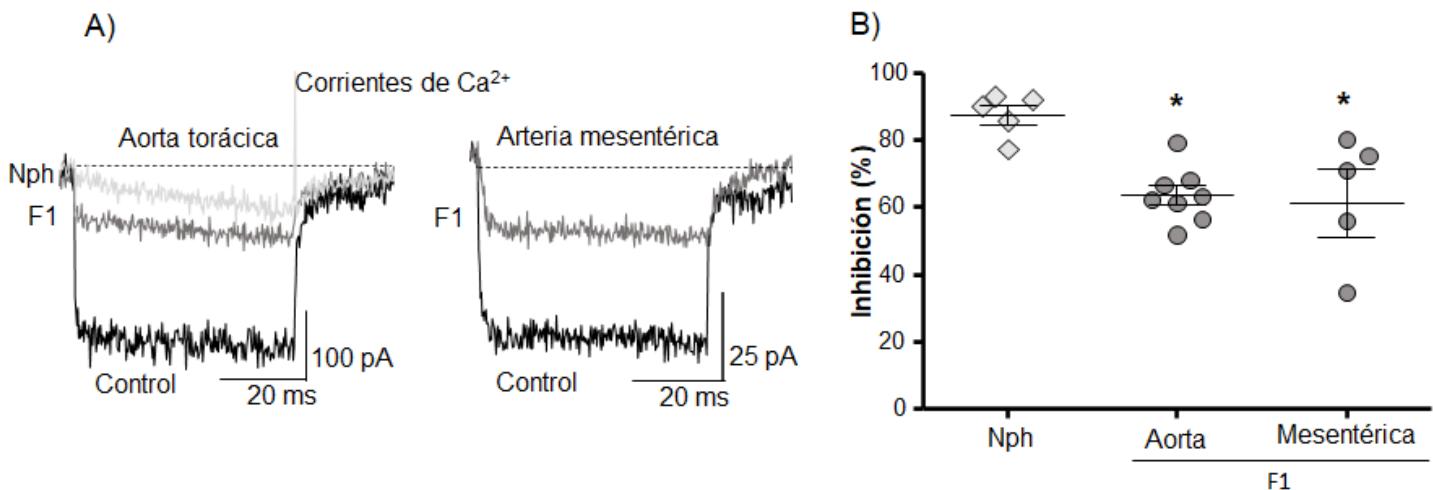


**Figura 7.** Efecto de las fracciones del CJP sobre anillos aislados de aorta torácica y arteria mesentérica de ratas Wistar macho previamente contraídos con fenilefrina (Phe, 10  $\mu$ M). (A) Porcentaje de relajación de diferentes concentraciones (10-80 mg/mL) de cinco fracciones del CJP y de solución fisiológica (control) sobre anillos aislados de aorta torácica (n=5). La fracción 1 (F1) del CJP induce relajación dosis-dependiente versus el resto de las fracciones. (B) Registro fisiológico representativo de la tensión, en miligramos (mg), en respuesta al tratamiento con 5 mg/mL de F1 y solución fisiológica como control sobre anillos de arteria mesentérica. El eje de las X representa el tiempo en segundos (s) y el eje de las Y representa la tensión de los anillos en miligramos. (C) Porcentaje de relajación de los registros fisiológicos (n=9). La relajación se calculó como un porcentaje de la contracción inicial. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \*p<0.05 vs. control.

### *Efecto de F1 del CJP sobre la actividad de los canales Ca<sub>v</sub>.*

Para determinar si el mecanismo de acción del CJP es a través de los canales Ca<sub>v</sub>, establecimos evaluar el efecto de F1, sobre las corrientes de bario (a través de canales Ca<sub>v</sub>) en miocitos recién aislados y provenientes de aorta torácica y mesentérica por patch clamp. En la Fig. 8A se pueden observar trazos representativos de las corrientes de bario a través de los canales Ca<sub>v</sub> en ausencia (control) y en presencia de 20 mg/mL de F1 y, 1 µM de Nph (bloqueador selectivo de canales Ca<sub>v</sub>). Al evaluar estos resultados observamos que las corrientes mediante canales Ca<sub>v</sub> tuvieron una inhibición del 88 ± 3% al agregar Nph (trazo y rombos color gris claro). Mientras que la incubación con F1 mostró una inhibición de las corrientes del 65 ± 3% y 63 ± 8% en miocitos de aorta torácica y miocitos de arteria mesentérica, respectivamente (Fig. 8B; trazos y círculos color gris oscuro); demostrando, que F1 tiene un efecto inhibidor significativo sobre los canales Ca<sub>v</sub>, lo que reafirma que estos canales Ca<sub>v</sub> participan en el efecto vasodilatador del CJP.

En México existe una gran variedad de plantas medicinales que se consumen para controlar la HTA<sup>58</sup>, dos de ellas (no endémicas), el eucalipto (*Eucalyptus*) y la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), las cuales cuentan con estudios que demuestran en el caso de eucalipto que un metabolito presente, el 1,8-cineol (3 mM), produce una inhibición máxima del 26.7 ± 5.9% sobre las corrientes de bario a través de canales Ca<sub>v</sub> en miocitos traqueales de ratas Wistar macho<sup>59</sup>, mientras que en otro estudio, emplean un extracto acuoso de *H. sabdariffa* (5mg/mL), el cual indujo una reducción máxima de las corrientes de los canales Ca<sub>v</sub> del 24.4% en cardiomioцитos ventriculares aislados de ratas Wistar macho<sup>57</sup>. La inhibición ejercida sobre las corrientes de canales Ca<sub>v</sub> por ambos extractos acuosos son parciales (~25%) en comparación de la F1 usada en este estudio, que inhibió más del 50% estas corrientes, lo cual nos permite sugerir que el o los compuestos presentes en F1 podrían ser un buen antagonista de estos canales.



**Figura 8.** Efecto de la fracción 1 (F1) del CJP sobre las corrientes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) en células aisladas del músculo liso de aorta torácica y arteria mesentérica de rata Wistar macho. (A) Trazos representativos de corrientes de canal de  $\text{Ca}_v$  registradas a +20 mV desde un potencial de retención de -90 mV en ausencia (control) y presencia de 20 mg/mL de F1, y 1  $\mu\text{M}$  de nifedipino (Nph). (B) Porcentaje de inhibición de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a Nph y a 20 mg/mL de F1. Los datos son medios  $\pm$  SEM, n = 9 celdas. Milivoltios (mV), picoamperes (pA), milisegundos (ms). \* p < 0,05 vs. Nph.

### *Efecto del CJP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)*

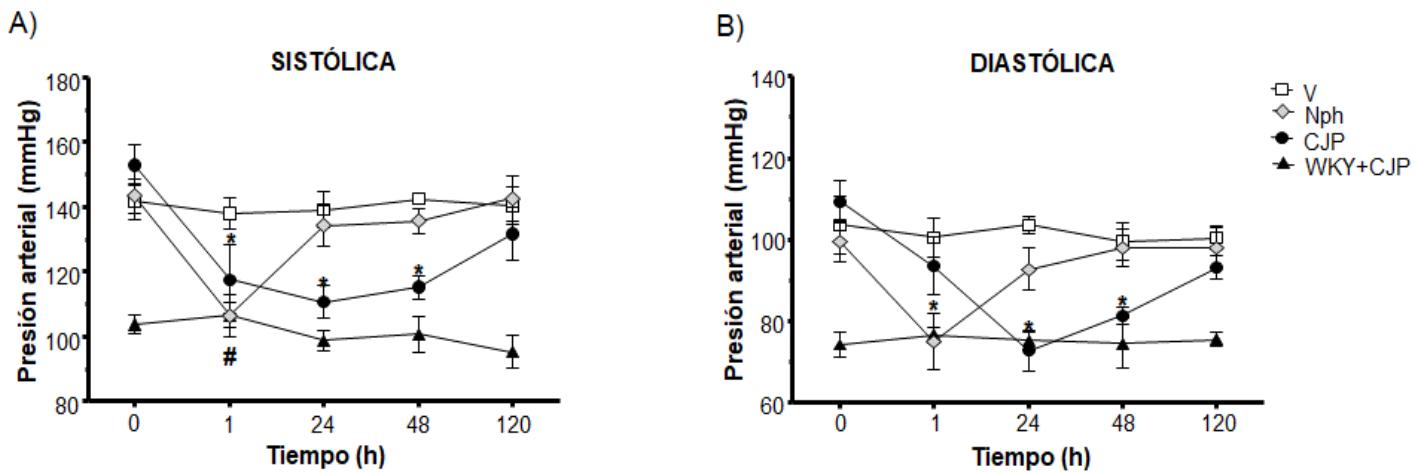
Una vez establecido el efecto de CJP en ensayos *in vitro*, evaluamos la respuesta del CJP en un modelo *in vivo*. La rata SHR es una de las cepas endogámicas más utilizadas como modelo animal para el estudio de la HTA esencial humana; cabe mencionar que este modelo cuenta con su control normotenso, la rata Wistar Kyoto (WKY). Esta cepa se utiliza como modelo animal para el estudio de ateroesclerosis, evaluación de fármacos antihipertensivos, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, resistencia a la insulina, entre otros<sup>60</sup>. Previamente, se estableció la dosis del CJP necesaria para disminuir las cifras de PA en un 20%, mediante un ensayo piloto con ratas SHR, donde se observó y como era esperado, los animales SHR que recibieron SF mostraron PA alta (PAS 147 ± 6 mmHg, PAD 105 ± 5 mmHg) durante las 48 h del experimento. Mientras que los animales que fueron administrados con dosis crecientes del CJP tuvieron una disminución significativa en su PAS y PAD: 200 mg/mL del 25 ± 55% y 29 ± 1%; 400 mg/mL del 25 ± 3% y 28 ± 1%; y 600 mg/mL del 32 ± 2% y 28 ± 1%, respectivamente (Anexo 4). Como se observa en las gráficas A y B del Anexo 4, la administración de 400 mg/mL de CJP indujo vasodilatación a partir de la primera hora, efecto que se sostuvo hasta las 48 h después de su administración. Mientras, las dosis de 200 y 600 mg/mL mostraron efecto hasta las 48 h y 24 h, respectivamente.

Una vez que se determinó usar la dosis de 400 mg/mL con la prueba piloto previamente mencionada, incluimos grupos experimentales con tres diferentes tratamientos en ratas SHR (V, Nph y CJP), además de un grupo control WKY administrado con CJP. Observamos que el grupo que recibió V conservó su PA elevada durante todo el ensayo (PAS 139 ± 1 mmHg, PAD 102 ± 1 mmHg). El grupo que recibió Nph (10 mg/kg), uno de los fármacos más utilizados para tratar la HTA y el dolor de pecho (angina) en la práctica clínica<sup>61</sup>, presentó una disminución del 21 ± 3% en su PAS y del 24 ± 3% en su PAD una hora después de la administración del fármaco, efecto que desapareció a las 24 h, es decir, las ratas recuperaron las cifras altas de PA. Resultados que se han mostrado en otros estudios *in vivo*, donde evaluaron el porcentaje de relajación producido por este fármaco, el cual produjo una disminución de la PAS de ~28% en ratas hembras

Wistar hipertensas (inducidas con propranolol)<sup>62</sup> y una disminución de la PAS del 17 % y del 27% en la PAD en ratas SHR<sup>61,63</sup>

Interesantemente, los animales SHR que recibieron el CJP disminuyeron  $20 \pm 2\%$  su PAS y  $19 \pm 3\%$  su PAD respectivamente a los 60 min de la administración. Además, este efecto de reducción se mantuvo por 48 h en la PAS (~25%) y la PAD (~22%). El grupo WKY + CJP mostró cifras de PA normal (PAS  $107 \pm 2$  mmHg, PAD  $77 \pm 2$  mmHg) (Fig. 9). Sugiriendo que el CJP ejerce un efecto antihipertensivo sostenido por 48 h, que pudiera derivar en un antagonista potencialmente más estable para la regulación de la PA.

Sin embargo, para poder atribuirle ese efecto se necesitan realizar más estudios *in vivo* en animales SHR administrados con F1 o bien administrar el compuesto responsable, una vez identificado y aislado.

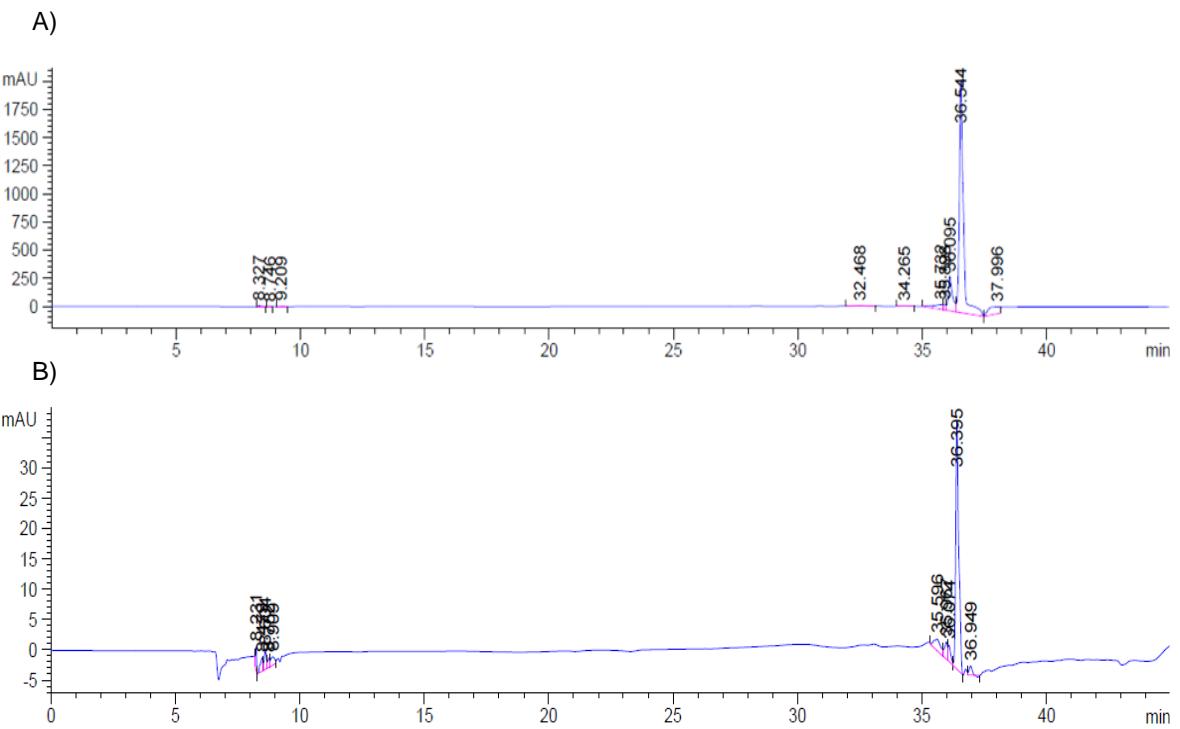


**Figura 9.** Efecto del CJP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar Kioto (WKY). Monitoreo de la presión arterial (mmHg), de manera no invasiva, a las 0,1, 24, 48 y 120 hrs en ratas SHR administradas con vehículo (V), con 400 mg/mL de CJP (CJP) y 10 mg/kg de nifedipino (Nph). Además de ratas Wistar Kyoto administradas con 400 mg/mL de CJP (WKY+CJP) como control. (A) Presión arterial sistólica (B) Presión arterial diastólica. Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). #  $p<0.05$  vs. Nph 0 h, \*  $p<0.05$  vs. CJP 0 h.

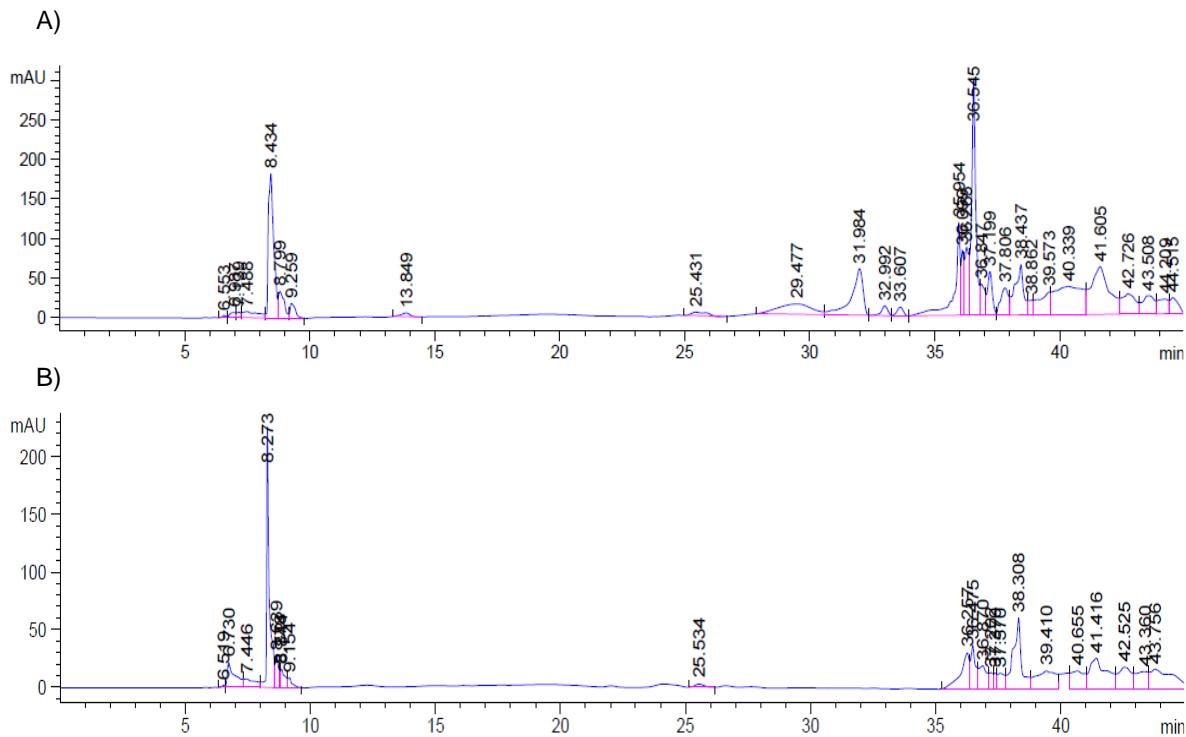
### *Identificación de los constituyentes bioactivos*

**Perfilamiento del CJP y F1 por HPLC-PDA.** Previamente, se ha reportado la presencia de betalaínas, ácidos fenólicos y flavonoides en los frutos de especies del género *Stenocereus*<sup>64</sup>. *Stenocereus huastecorum* es una especie descrita recientemente y a la fecha, existe sólo un reporte acerca de sus constituyentes químicos y de sus propiedades farmacológicas<sup>44</sup>. En este reporte previo, mediante un análisis por UPLC-PDA-ESIMS se identificaron compuestos fenólicos y betalaínas. Las betalaínas pueden ser subdivididas en dos tipos: betacianinas y betaxantinas. Para el caso de *S. huastecorum*, se identificaron ambos tipos de betalaínas, siendo las betacianinas las más abundantes (betaína, filocactina e isofilocactina)<sup>44</sup>. Sin embargo, estudios acerca de la composición química de otras especies del género *Stenocereus* han demostrado que las betaxantinas son más abundantes que las betacianinas<sup>65</sup> y las más comunes son indicaxantina e isoindicaxantina<sup>5,44</sup>.

En este estudio se realizó un perfil de metabolitos mediante HPLC-PDA del CJP (Fig. 10A) y de F1 (Fig. 10B) a 480 nm para detectar betalaínas<sup>66</sup>; y a 254 nm para detectar fenólicos y flavonoides (Fig. 11A-B)<sup>5</sup>. Los resultados del perfilamiento indicaron que, a 480 nm, los cromatogramas del CJP vs. la F1 mostraron sólo 1 pico principal con tiempo de retención (tr) de 36.4 min. Sin embargo, la absorbancia del pico observado en la F1 fue 45 veces menor que la absorbancia del mismo pico en CJP. Esto sugirió que la concentración de betalaínas en la F1 disminuyó significativamente. Los perfiles de HPLC-PDA a 254 nm mostraron la pérdida de picos con tr's de 29.5, 31.9 y 36.6 min en el cromatograma de F1 con respecto a CJP. Y una disminución en la absorbancia de los picos con tr's entre 36.0-36.5 y 41.4 min, sugiriendo también una disminución de la cantidad de compuestos con residuos aromáticos como los fenólicos y flavonoides, producto del proceso de separación cromatográfica.

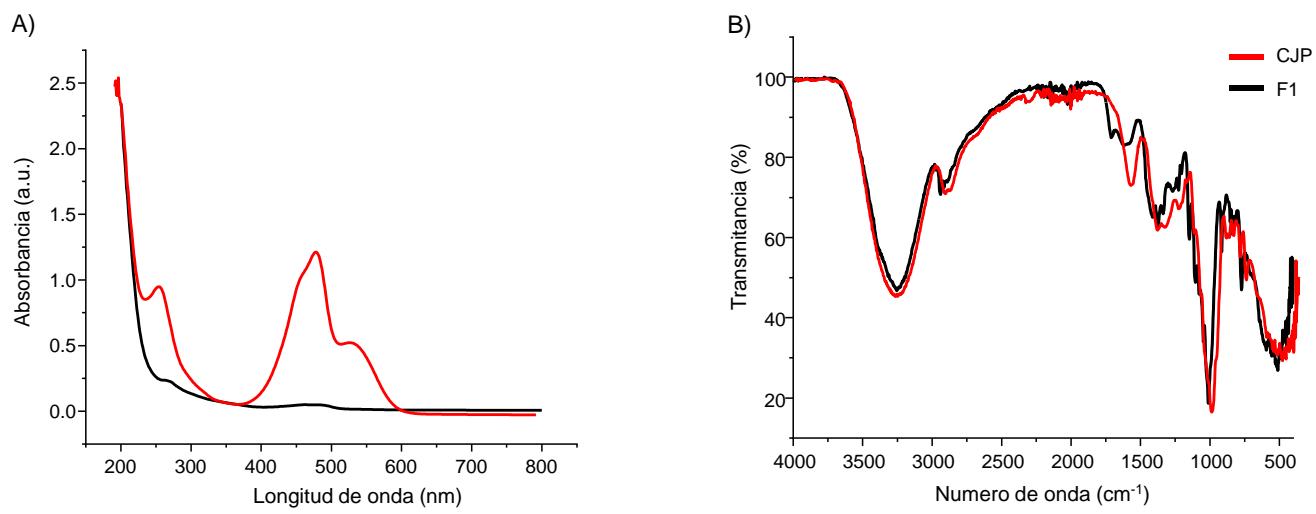


**Figura 10.** Perfilamiento por HPLC-PDA a 480 nm de (A) CJP, (B) Fracción 1 (F1, CH<sub>3</sub>COOH 1%).



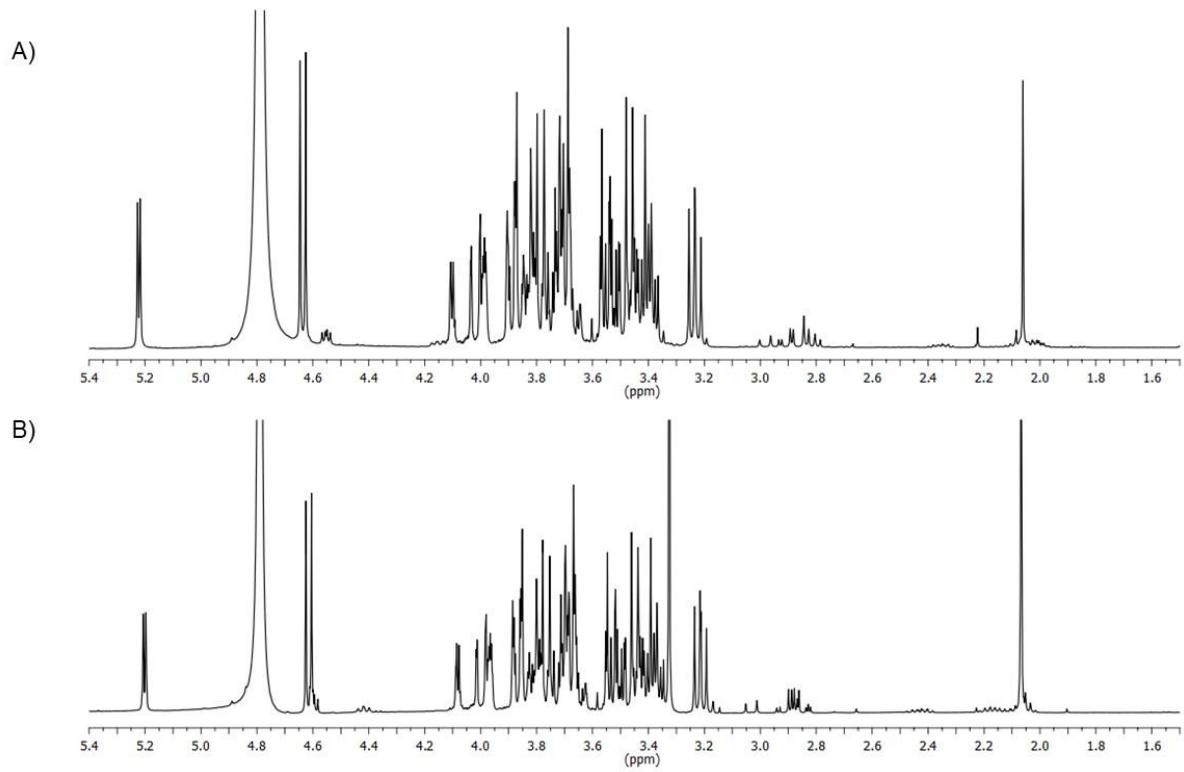
**Figura 11.** Perfilamiento por HPLC-PDA a 254 nm de (A) CJP, (B) Fracción 1 (F1, CH<sub>3</sub>COOH 1%).

**Caracterización del CJP y la F1 por FTIR y espectroscopía UV-Vis.** Como parte de un proceso rutinario de identificación y elucidación estructural de productos naturales bioactivos, y con el fin de corroborar las inferencias realizadas a partir de los análisis de HPLC-PDA, se obtuvieron los datos espectroscópicos de UV-Vis (Fig. 12A) y FTIR (Fig. 12B), del CJP y F1. El espectro de UV-Vis de CJP mostró dos picos de absorción máxima, cercanos a 485 y 530 nm, que son característicos de las betalaínas, siendo el primero, único en las betaxantinas, y el segundo pico, distintivo de las betacianinas<sup>5,67</sup>. En contraste, el espectro de UV-Vis de F1 no mostró picos con absorbancia máxima entre 485-530 nm, y sólo se observó un pequeño pico cercano a 280 nm. Sin embargo, debido a la elevada concentración de la muestra (4 mg/mL), se deduce que la cantidad de compuestos fenólicos y/o flavonoides es muy pequeña en F1. Mientras que , en los perfiles de FTIR de CJP y F1, se observaron espectros muy similares, con bandas de intensidad media para grupos –OH en 3250 cm<sup>-1</sup> y bandas de estiramiento C–O entre 1022-1010 cm<sup>-1</sup>. Sin embargo, el uso de esta técnica también evidenció la ausencia en ambas muestras, de grupos carbonilo de ácidos carboxílicos (–COOH), presentes en las betalaínas y los fenólicos; y de grupos carbonilo de cetona, presentes en la gamma pirona de los flavonoides<sup>68,69</sup>. Hasta el momento, con estos resultados podemos afirmar que el efecto vasodilatador observado del CJP y su fracción vasoactiva no está relacionado con betalaínas o compuestos fenólicos como se creía en un inicio.



**Figura 12.** (A) Espectro de absorción UV-Vis y (B) Espectro FTIR del CJP y la fracción 1 (F1, CH<sub>3</sub>COOH 1%).

**Análisis de RMN del CJP y F1.** Adicionalmente, con el fin de obtener información acerca de la naturaleza química del(los) constituyente(s) bioactivo(s) en F1, se hizo un perfil de RMN de  $^1\text{H}$ , comparando con el CJP. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en las dos muestras fueron muy similares, e indicaron que CJP (Fig. 13A) tiene un constituyente mayoritario, también presente en F1 (Fig. 13B), el cual podría ser el compuesto responsable del efecto vasodilatador del CJP. La comparación de los datos de RMN de  $^1\text{H}$ : desplazamiento químico ( $\delta\text{H}$ ) y el valor de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), de CJP y F1, con los descritos en la literatura para betalaínas, fenólicos y flavonoides; indicaron que este tipo de metabolitos especializados son minoritarios en *S. huastecorum*, debido a la ausencia de señales características de protones aromáticos y olefínicos con  $\delta\text{H} > 6$  ppm en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de CJP y la F1<sup>70-72</sup>. En los espectros de ambas muestras se observó un conjunto de señales en el rango  $\delta\text{H}$  2.0-5.3 ppm. La comparación de estos datos experimentales, con los descritos para otras clases de metabolitos, indicaron que se trata de un compuesto de tipo sacárido o glicosídico debido a las señales dobles a  $\delta\text{H}$  5.22 (d,  $J = 3.8$  Hz) y 4.64 (d,  $J = 8.0$  Hz) en el espectro de CJP (Fig. 10A), y las señales dobles a  $\delta\text{H}$  5.20 (d,  $J = 3.8$  Hz) y 4.62 (d,  $J = 8.0$  Hz) en el espectro de F1 (Fig. 10B); características de los protones anoméricos de los residuos monosacáridos. Las señales con multiplicidades de doblete y doble de dobletes en los espectros de las dos muestras, comprendidas entre  $\delta\text{H}$  3.2-4.2, constituyen los protones remanentes del sistema de espín de cada unidad sacárida y apoyan su naturaleza glicosídica<sup>73-75</sup>. Las señales simples a  $\delta\text{H}$  2.06-2.07 sugieren la presencia de un grupo acetato como residuo de acilación<sup>76,77</sup>. Con el fin de elucidar la estructura molecular del componente mayoritario y bioactivo, presente en F1, se plantean como perspectivas: 1) realizar la adquisición de datos de espectrometría de masas de baja y alta resolución por la técnica ESI-MS, así como estudios de fragmentación empleando experimentos MS/MS o MSn; 2) la adquisición de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , y bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC, NOESY y TOCSY; y 3) determinar el valor de su rotación óptica específica (RO).



**Figura 13.** Perfilamiento por RNM 1 H a 400 MHz. (A) CJP, (B) Fracción 1 (F1, CH<sub>3</sub>COOH 1%).

## **Conclusiones**

El presente estudio muestra que el CJP ejerce un efecto vasorelajante en anillos aislados de aorta torácica y arterias mesentéricas. Efecto vasodilatador que se produce es independiente del endotelio vascular e independiente de la activación de los canales de  $K^+$ . Interesantemente, se mostró una relación directa entre el efecto vasodilatador del CJP y la inhibición de los canales  $Ca_v$ , permitiéndonos establecer la inhibición de los canales de  $Ca_v$  como uno de los mecanismos acción del CJP para ejercer el efecto vasodilatador de este extracto. La relevancia de estos hallazgos sobre el efecto vasoactivo se confirmó mediante la observación de una reducción de la PA en ratas SHR tratadas con el CJP. Lo interesante es que este efecto de reducción se mantuvo hasta por un periodo de 48 horas.

Dado nuestros resultados prometedores, existen desafíos por delante y nichos de investigación relevantes en el control de la vasoactividad y este extracto. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios *in vivo*, así como identificar los compuestos específicos responsables de este efecto vasodilatador. Se plantea un amplio nicho de investigación para la purificación e identificación de estos compuestos, generando la posibilidad del diseño o síntesis de nuevos fármacos o terapias coadyuvantes a la medicina moderna con base en el fruto de la pitaya para el tratamiento de la HTA.

## Referencias

1. Oscanoa TJ. Acceso y usabilidad de medicamentos : Propuesta para una definición operacional. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(1):119-126.
2. World Health Organization. *WHO Medicines Strategy 2004-2007: Countries at the Core.*; 2004.
3. Ekiert HM, Szopa A. Biological Activities of Natural Products. *Molecules*. 2020;25(5769):1-7. doi:10.3390/molecules25235769
4. Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2010;41(4).
5. García-Cruz L, Dueñas M, Santos-Buelgas C, Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y. Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. Pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chem*. 2017;234:111-118. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.174
6. Correa S, Puebla P, Carrón R, Martín M, San Román L, Guerrero M. Perfil vasodilatador de comuestos flavonoides y fenilbutanoides aislados de *Croton Shiedeanus* Schlecht. *Investig Orig*. 2008;56(4):291-301.
7. Jajja A, Sutyarjoko A, Lara J, et al. Beetroot supplementation lowers daily systolic blood pressure in older, overweight subjects. *Nutr Res*. 2014;34(10):868-875. doi:10.1016/j.nutres.2014.09.007
8. Luna Morales, César del C.; Aguirre R. JR. Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mixteca en México. *Interc*. 2001;26 (January 1, 2001):18-24.  
<http://www.redalyc.org/pdf/339/33905204.pdf>
9. Alvarado-Sizzo H, Casas A, González-Rodríguez A, Arreola-nava HJ, Terrazas T. Clave dicotómica y distribución del complejo de especies de *Stenocereus griseus* ( Cactaceae ). *Rev Mex Biodivers*. 2019;90:1-16. doi:<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2675>
10. Fang C yan, Lou D yong, Zhou L qin, et al. Natural products : potential

- treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(12):1-19. doi:10.1038/s41401-021-00620-9
11. Ramírez-Rodríguez Y, Ramírez V, Robledo-Márquez K, et al. Stenocereus huastecorum-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects. *Food Res Int.* 2022;160. doi:10.1016/j.foodres.2022.111337
  12. Rosete P, Ledesma R, Mancilla B, Galindo E. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir México.* 1999;12(4):300-304.
  13. Prabhu VV, Kannan N, Guruvayoorappan C. 1,2-Diazole prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental rats. *Pharmacol Reports.* 2013;65(4):980-990. doi:10.1016/S1734-1140(13)71079-X
  14. Kumar P, Sulakhiya K, Barua CC, Mundhe N. TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* 2017;431(1-2):113-122. doi:10.1007/s11010-017-2981-5
  15. Rodríguez Lombardero S. *Caracterización Funcional de SKY1 y Su Papel En La Resistencia de Las Levaduras a Cisplatino.* Universidad de La Coruña; 2012.
  16. Rosete PG, Ledesma RL, Mancilla BE, Galindo EZ. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *medigraphic Artemisa.* 1999;3(4):300-304.
  17. Duarte Mote J, Espinosa López RF, Díaz Meza S, et al. Óxido nítrico: Metabolismo e implicaciones clínicas. *Med Interna Mex.* 2008;24(6):397-406.
  18. Durazo-quiroz F. El óxido nítrico en medicina. *medigraphic Artemisa.* 2007;143(5):401-405.
  19. Ramírez-Rodríguez Y, Ramírez V, Robledo-Márquez K, et al. Stenocereus huastecorum-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects. *Food Res Int.* 2022;160(May). doi:10.1016/j.foodres.2022.111337

20. Ramírez V, Trujillo J, Valdes R, et al. Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Physiol*. 2009;297(4):F932-F942. doi:10.1152/ajprenal.00252.2009
21. Trujillo J, Molina-Jijón E, Medina-Campos ON, et al. Renal tight junction proteins are decreased in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24(7):520-528. doi:10.3109/15376516.2014.948248
22. Pérez-Rojas JM, Cruz C, García-López P, et al. Renoprotection by-a-mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic Res*. 2009;43(11):1122-1132. doi:10.1080/10715760903214447
23. Hwa Lee R, Mi Song J, Young Park M, Kyung Kang S, Keun Kim Y, Sup Jung J. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells11Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; SAPK/JNK, stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(8):1013-1023. doi:10.1016/S0006-2952(01)00748-1
24. Sutariya B, Saraf M. Betanin, isolated from fruits of *Opuntia elatior* Mill attenuates renal fibrosis in diabetic rats through regulating oxidative stress and TGF-β pathway. *J Ethnopharmacol*. 2017;198(January):432-443. doi:10.1016/j.jep.2016.12.048
25. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362-374. doi:10.1038/nri3834
26. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity : Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008;73(9):994-1007. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>
27. Zhao K, Wen L. DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF-κB signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;2:8924-8931.
28. Yonghui Yu, Yu Wa and CH. The Biological Functions of NF-κB1 (p50) and its Potential as an Anti-Cancer Target. *Curr Cancer Drug Targets*.

- 2009;9(4):566-571. doi:10.2174/156800909788486759
29. Ozkok A, Ravichandran K, Wang Q, Ljubanovic D, Edelstein CL. NF-κB transcriptional inhibition ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury (AKI). *Toxicol Lett.* 2016;240(1):105-113. doi:10.1016/j.toxlet.2015.10.028
  30. Mitazaki S, Hashimoto M, Matsuhashi Y, et al. Interleukin-6 modulates oxidative stress produced during the development of cisplatin nephrotoxicity. *Life Sci.* 2013;92(12):694-700. doi:10.1016/j.lfs.2013.01.026
  31. Mitazaki S, Kato N, Suto M, Hiraiwa K, Abe S. Interleukin-6 deficiency accelerates cisplatin-induced acute renal failure but not systemic injury. *Toxicology.* 2009;265:115-121. doi:10.1016/j.tox.2009.10.005
  32. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades Cardiovasculares. Published 2019. [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)
  33. Secretaría de Salud. En México, más de 30 millones de personas padecen hipertensión arterial: Secretaría de Salud. Gobierno de México. Published 2023. <https://www.gob.mx/salud/articulos/en-mexico-mas-de-30-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial-secretaria-de-salud>
  34. American Heart Association. Hypertension. American Heart Association. Published 2023. <https://www.heart.org/en/health-topics/high-blood-pressure/the-facts-about-high-blood-pressure>
  35. Lahera V, Cachofeiro V, de las Heras N. Regulación de la presión arterial. In: Fernández-Tresguerres JA, Ruiz CA, Cachofeiro V, et al., eds. *Fisiología Humana, 4e.* McGraw-Hill Education; 2016.  
<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1132161968>
  36. Gerard J. Tortora BD. *Principios de Anatomía y Fisiología.* Editorial.; 2013.
  37. Prasad K. Structure and Function of Various Vascular Beds. *Textb Angiol.* Published online 2000:3-10. doi:10.1007/978-1-4612-1190-7\_1
  38. Aiello EA. Canales de potasio ( $K^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ) en músculo liso vascular. *Hipertensión.* Published online 2015:87-92. [www.saha.org.ar/1/pdf/libro-hipertension/Cap.019.pdf](http://www.saha.org.ar/1/pdf/libro-hipertension/Cap.019.pdf)
  39. Cruz Mérida A, León Hernández FJ, Hernández y Hernández H. Regulación normal de la presión arterial sistémica. *Rev Mex Cardiol.* 2004;15(1):30-41.

- <http://www.medigraphic.com/pdfs/cardio/h-2004/h041e.pdf>
- 40. Vergara-Galicia J, Ortiz-andrade R, Rivera-leyva J, et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism ☆. *Fitoterapia*. 2010;81(5):350-357. doi:10.1016/j.fitote.2009.10.009
  - 41. Wolak T, Paran E. Can carotenoids attenuate vascular aging? *Vascul Pharmacol.* Published online 2013:1537-1891. doi:10.1016/j.vph.2013.07.006
  - 42. Potenza M, Marasciulo F, Tarquinio M, et al. EGCG , a green tea polyphenol , improves endothelial function and insulin sensitivity , reduces blood pressure , and protects against myocardial I / R injury in SHR. *Am J Physiol Metab.* 2019;229(5):1378-1387. doi:10.1152/ajpendo.00698.2006.
  - 43. Coles LT, Clifton PM. Effect of beetroot juice on lowering blood pressure in free-living, disease-free adults: A randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J.* 2012;11(1):1. doi:10.1186/1475-2891-11-106
  - 44. Ramírez-Rodríguez Y, Ramírez V, Robledo-Márquez K, Rojas-Morales P PCJ, Medina-Campos ON, Pérez-Rojas J, Flores-Ramírez R, Riego-Ruiz L TJ. Renoprotective effect of a pitaya extract (*Stenocereus* spp.) on the cisplatin-nephrotoxicity in rats (manuscript in revision). *Food Funct.*
  - 45. Fernández-López JA, Roca MJ, Angosto JM, Obón JM. Betaxanthin-Rich Extract from Cactus Pear Fruits as Yellow Water-Soluble Colorant with Potential Application in Foods. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018;73(2):146-153. doi:10.1007/s11130-018-0664-3
  - 46. Ramírez-Rodríguez Y, Martínez-Huéamo M, Pedraza-Chaverri J, Ramírez V, Martínez-Tagüeña N, Trujillo J. Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. *Food Chem.* 2020;312(July 2019):126073. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126073
  - 47. Sarr M, Ngom S, Kane MO, et al. In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from *Hibiscus sabdariffa* on rat thoracic aorta. *Nutr Metab.* 2009;6:1-12. doi:10.1186/1743-7075-6-45

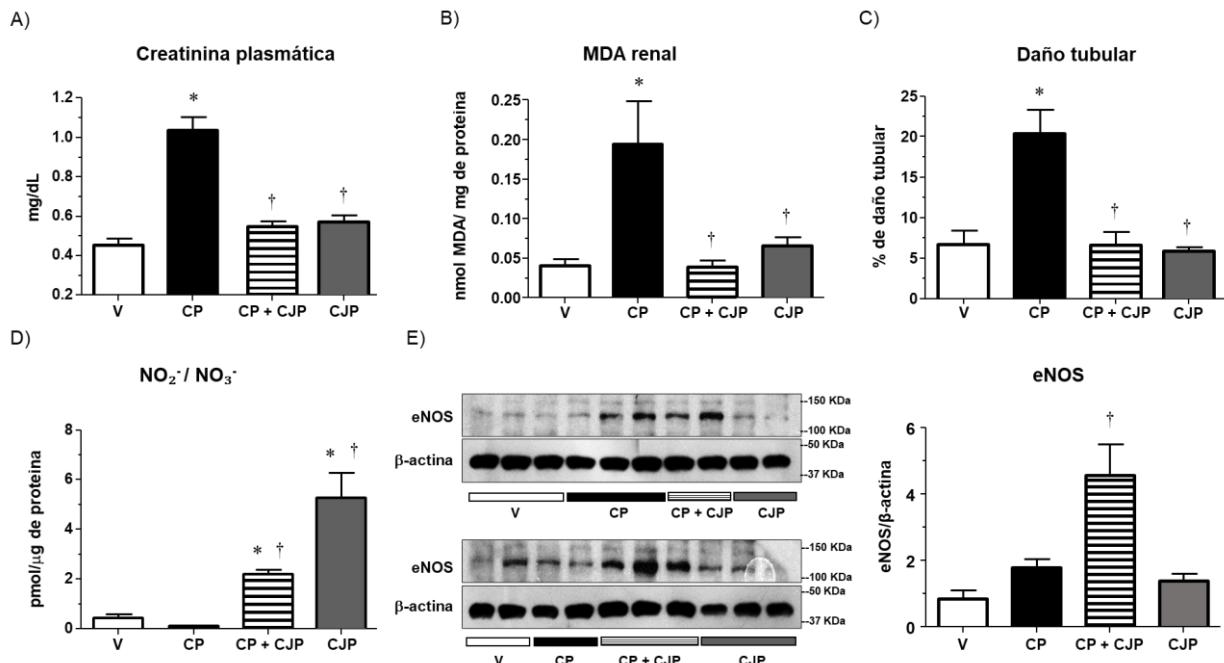
48. Hadipour E, Taleghani A, Tayarani-Najaran N, Tayarani-Najaran Z. Biological effects of red beetroot and betalains: A review. *Phyther Res.* 2020;34(8):1847-1867. doi:10.1002/ptr.6653
49. Aldassano SB, Esoriere LT, Otundo AR, Erio RS, Ivrea MAL. Inhibition of the Mechanical Activity of Mouse Ileum by Cactus Pear ( Opuntia Ficus Indica , L , Mill . ) Fruit Extract and Its Pigment Indicaxanthin. *Química Aliment agrícola.* 2010;58:7565-7571. doi:10.1021/jf100434e
50. Aekthammarat D, Tangsucharit P, Pannangpetch P, Sriwantana T, Sibmooh N. Moringa oleifera leaf extract enhances endothelial nitric oxide production leading to relaxation of resistance artery and lowering of arterial blood pressure. *Biomed Pharmacother.* 2020;130(May):110605. doi:10.1016/j.biopha.2020.110605
51. Gilani AH, Khan A ullah, Jabeen Q, Subhan F, Ghafar R. Antispasmodic and blood pressure lowering effects of Valeriana wallichii are mediated through K<sup>+</sup> channel activation. 2005;100:347-352. doi:10.1016/j.jep.2005.05.010
52. Hassan A, Hassan M, Hussain K, Khan A ullah, Arshad S. Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of Ficus carica. *Ethnopharmacol J.* 2008;119:1-5. doi:10.1016/j.jep.2008.05.040
53. Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, et al. Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. *Vasc Pharmacol.* 2016;44(3):131-142. doi:10.1016/j.vph.2005.10.005.Vascular
54. Bhullar SK, Shah AK, Dhalla NS. Store-operated calcium channels : Potential target for the therapy of hypertension. 2019;20(3):139-151. doi:10.31083/j.rcm.2019.03.522
55. Xie H hui, Zhang X fei, Chen Y yuan, Shen F ming, Su D feng. Synergism of Hydrochlorothiazide and Nifedipine on Blood Pressure Variability Reduction and Organ Protection in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res.* 2008;31(4):685-691.
56. Belović MM, Gironés-Vilaplana A, Moreno DA, et al. Tomato (*Solanum Lycopersicum L.*) Processing Main Product (Juice) and By-Product (Pomace) Bioactivity Potential Measured as Antioxidant Activity and Angiotensin-

- Converting Enzyme Inhibition. *J Food Process Preserv.* 2016;40(6):1229-1237. doi:10.1111/jfpp.12707
57. Alsayed M.A. et al. Nutrients Aqueous Fraction from Hibiscus sabdariffa Relaxes Mesenteric Arteries of Normotensive and Hypertensive Rats through Calcium Current. *Mdpi.* 2020;12:1782.
58. Esquivel-gutiérrez ER, Noriega-cisneros R, Bello-gonzález MA, Saavedra- A. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas.* 2012;14(1):42-52.
59. Pereira-Gonçalves Á, Ferreira-da-Silva FW, de Holanda-Angelin-Alves CM, Cardoso-Teixeira AC, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2018;470(12):1803-1813. doi:10.1007/s00424-018-2201-5
60. Rivera CC, Hernández RG, Marin HS. Manejo reproductivo de las colonias de Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR) y su control Normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev Electron Vet.* 2013;14(11B):1-22.
61. Rakusan K, Cicutti N, Kazda S, Turek Z. Effect of nifedipine on coronary capillary geometry in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 1994;24(2):205-211. doi:10.1161/01.HYP.24.2.205
62. Brito SDR, Barber Fox MO, Gutiérrez EB. Volemia y excreción urinaria en ratas hipertensas tratadas con nifedipina o diuréticos. *Rev Cuba Investig Biomed.* 2001;20(2):99-103.
63. Turek Z, Kubat K, Kazda S, Hoofd L, Rakusan K. Improved myocardial capillarisation in spontaneously hypertensive rats treated with nifedipine. *Cardiovasc Res.* 1987;21(10):725-729. doi:10.1093/cvr/21.10.725
64. García-cruz L, Valle-guadarrama S, Salinas-moreno Y, Luna-morales C. Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of Stenocereus pruinosus and Stenocereus stellatus fruit. *Postharvest Biol Technol.* 2016;111:69-76.

65. Castro-Enriquez D, Montaño-Leyva B, Toro-Sánchez C, et al. Effect of Ultrafiltration of Pitaya Extract (*Stenocereus thurberi*) on Its Phytochemical Content, Antioxidant Capacity, and UPLC-DAD-MS Profile Daniela. *Molecules*. 2020;25(281):1-13. doi:10.3390/molecules25020281
66. Abelardo J, Morales-morales J, Araujo-s J, et al. Evaluation of Natural Pigments Production in Response to Various Stress Signals in Cell Lines of *Stenocereus queretaroensis*. *Plants*. 2022;11(2948):1-17. doi:<https://doi.org/10.3390/plants11212948>
67. Marañón-Ruiz VF, Rizo de la Torre L del C. Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z. *Superf y Vacío*. 2011;24(4):113-120.
68. Piattelli M, Minale L, Prota G. Isolation , structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron*. 1964;20(1964):2325-2329. doi:[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97621-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97621-5)
69. Chauhan SP, Sheth NR, Rathod IS, Suhagia BN, Maradia RB. Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochem Rev*. 2013;12(1):35-45. doi:10.1007/s11101-012-9248-2
70. Horie T, Ohtsuru Y, Shibata K, Yamashita K, Tsukayama M, and Kawamura Y. <sup>13</sup>C NMR spectral assigment of the a-ring of polyoxygenated flavones. *Phytochemistry*. 1998;47(5):865-874.
71. Wybraniec S, Nowak-wydra B, Mizrahi Y. C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron*. 2006;47:1725-1728. doi:10.1016/j.tetlet.2006.01.046
72. Stintzing FC, Kugler F, Carle R, Conrad J. First <sup>13</sup>C-NMR assignments of betaxanthins. *Helv Chim Acta*. 2006;89(5):1008-1016. doi:10.1002/hlca.200690077
73. Bautista E, Fragoso-serrano M, Pereda-miranda R. Jalapinoside, a Macroyclic Bisdesmoside from the Resin Glycosides of *Ipomea purga* , as a Modulator of Multidrug Resistance in Human Cancer Cells. *Nat Prod Res*. 2015;78:168-172. doi:10.1021/np500762w
74. Giner L, Feng J, Kiemle DJ. NMR Tube Degradation Method for Sugar

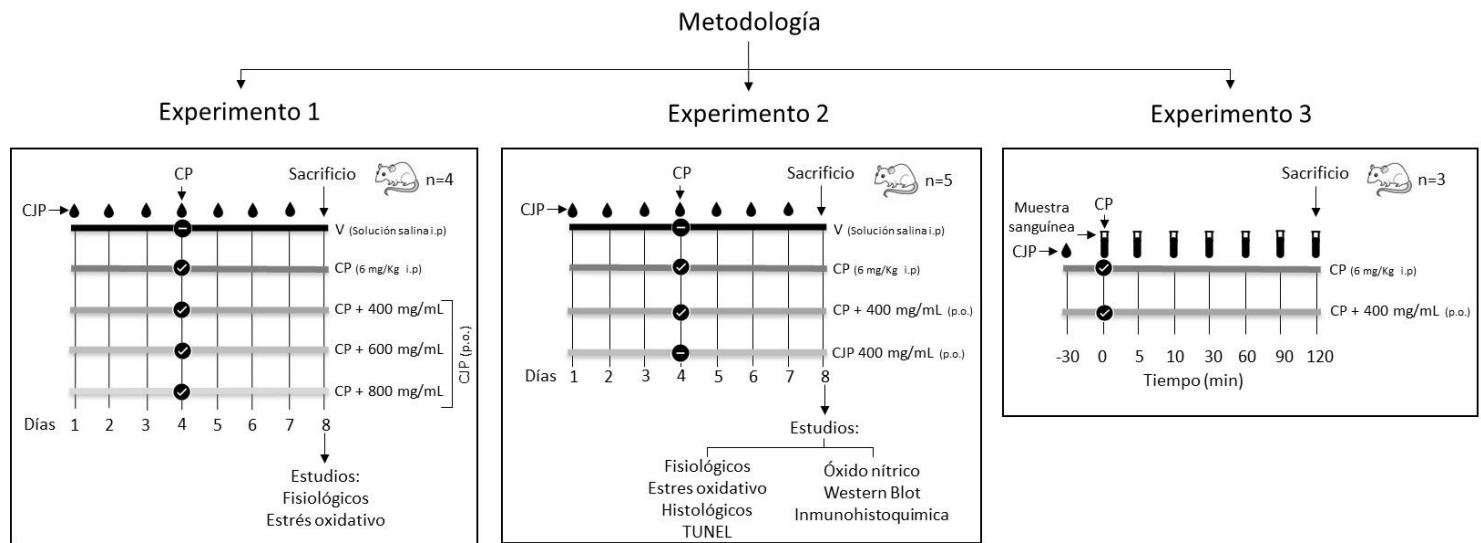
- Analysis of Glycosides. *Nat Prod Res.* 2016;79:2413-2417.  
doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00180
75. Brown D, Bauer J, Osborn HMI, Kuemmerle R. A Solution NMR Approach To Determine the Chemical Structures of Carbohydrates Using the Hydroxyl Groups as Starting Points. *ACS omega.* 2018;3:17957-17975.  
doi:10.1021/acsomega.8b02136
76. Bautista E, Calzada F, Yepez-mulia L, Chavez-Soto M, Ortega A. Incomptines C and D , Two Heliangolides from Decachaeta incompta and Their Antiprotozoal Activity. *Planta Med.* 2012;78:1698-1701.
77. Toscano A, Fragoso-serrano M, Ortiz-pastrana N, et al. Amarisolide F , an Acylated Diterpenoid Glucoside and Related Terpenoids from Salvia amarissima. *Nat Prod Res.* 2019;82:631-635.  
doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00565

## Anexos



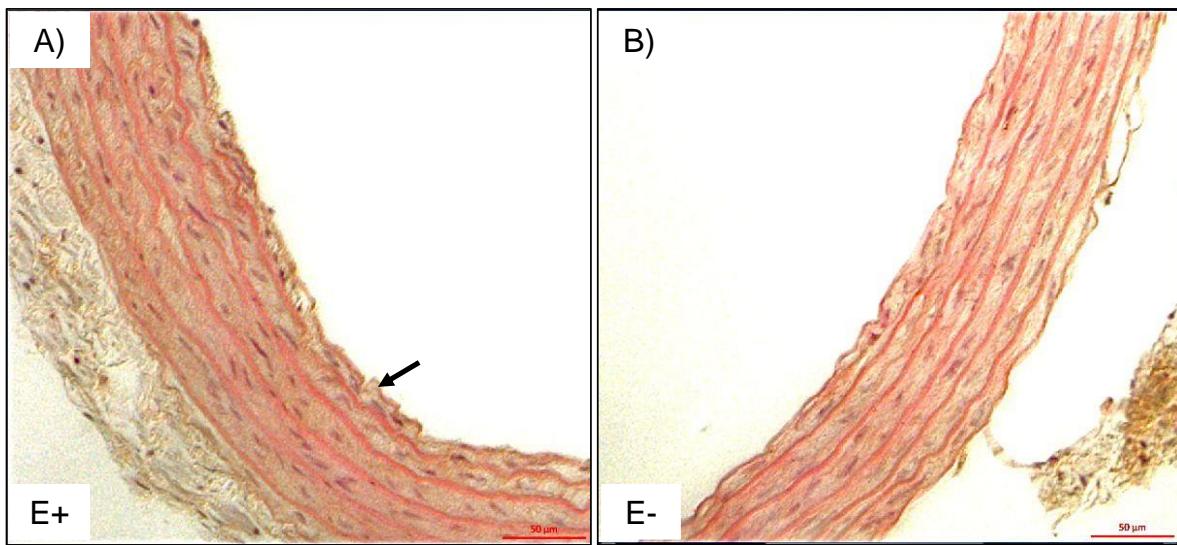
**Anexo 1.** Niveles de (A) creatinina sérica, (B) malondialdehído (MDA) renal, (C) porcentaje de daño tubular, (D) nitritos y nitratos como indicadores de los niveles de óxido nítrico (NO) y (E) de la expresión de la proteína óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en homogeneizados renales tratados con vehículo (V), 6 mg/kg de cisplatino (CP), 6 mg/kg de CP + 400 mg/mL de concentrado de jugo de pitaya (CP + CJP) y 400 mg/mL de concentrado de jugo de pitaya (CJP). Los valores son los promedios ± error. estándar ( $n = 5$ ). \*  $p < 0.05$  vs. V, †  $p < 0.05$  vs. CP.

*Nota:* De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.9-10 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).

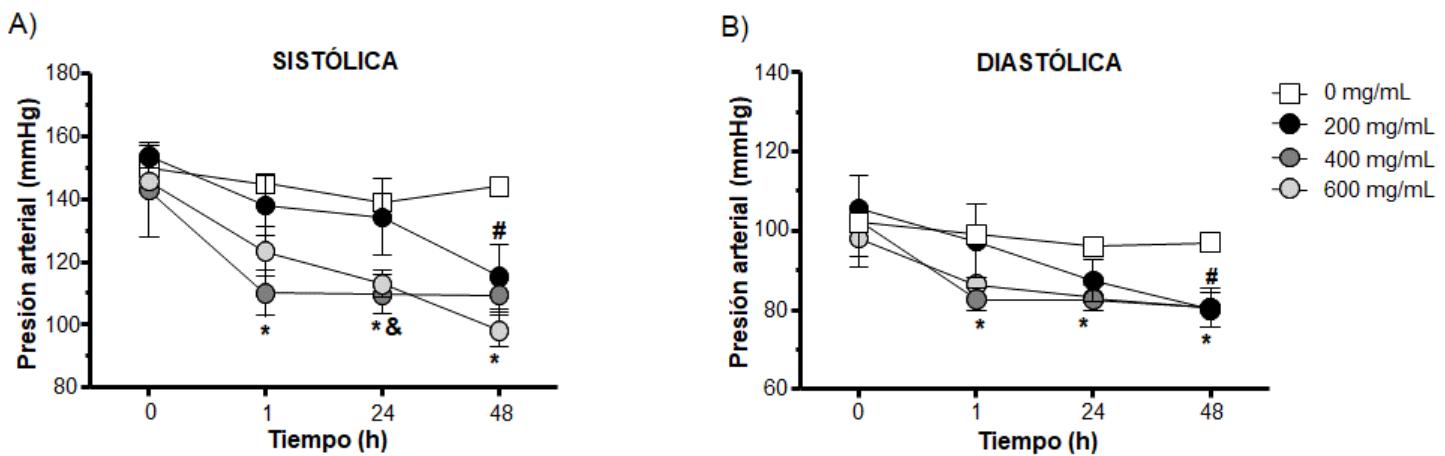


**Anexo 2.** Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental del estudio. Experimento 1, estudio de dosis del CJP utilizando 400, 600 y 800 mg/mL. Experimento 2, estudio de dosis del CJP utilizando 400 mg/mL y Experimento 3, estudio de farmacocinética de CP.

*Nota:* De “*Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects” de Y. Ramírez-Rodríguez, et.al., 2022, *Food Research International*, 169, p.4 (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>).



**Anexo 3.** Análisis histológico. Cortes teñidos con hematoxilina-eosina de anillos aislados de aorta torácica. Imágenes representativas de (A) anillo aórtico con endotelio (E+, → ) y (B) anillo aórtico sin endotelio (E-).



**Anexo 4.** Ensayo piloto de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) administradas con CJP. Monitoreo de la presión arterial (mmHg), a las 0, 1, 24 y 48 hrs en ratas SHR administradas con dosis crecientes de CJP (0, 200, 400, 600 mg/mL). (A) Presión arterial sistólica (B) Presión arterial diastólica. Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). #  $p<0.05$  vs. 200 mg/ml 0 h, \*  $p<0.05$  vs. 400 mg/ml 0 h, &  $p<0.05$  vs. 600 mg/ml 0 h.

## Anexo 5. Artículos publicados

1. Ramírez-Rodríguez, Y., Ramírez, V., Robledo-Márquez, K., Rojas-Morales, P., Arango, N., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N., Pérez-Rojas J. M., Flores-Ramírez, R., Riego-Ruiz, L., & Trujillo, J. (2022). *Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects. *Food Research International*, 160, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>
2. Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huélamo, M., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagüeña, N., & Trujillo, J. (2020). Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. *Food Chemistry*, 312, 126073. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126073
3. Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A.F., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International*, 147, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>
4. Trujillo, J., Pérez Miranda, S., Ramírez-Hernández, A., Muñiz-Ramírez, A., García-Campoy, A.H., & Ramirez-Rodríguez, Y. (2023). Mexican Desert: Health and Biotechnological Properties Potential of Some Cacti Species (Cactaceae). En D.R. Aguillón-Gutiérrez, C. Torres-León, & J. A. Aguirre-Joya. (Ed.), *Aromatic and medicine plants of drylands and deserts* (89-117). CRC Press, Taylor & Francis Group.  
Doi: 10.1201/9781003251255-3
5. Ramírez-Rodríguez, Y., Robledo-Márquez, K., Espinosa-Tanguma, R., Valle-Aguilera, R., Rodríguez-Menchaca, A. A., Saderi, N., Salgado-Delgado, R., García-Rojas, N., Ramírez, V., Bautista-Redonda, F., Winkler, R., Riego-Ruiz, L., & Trujillo, J. Vasoactive effect of a pitaya juice concentrate associated with calcium channel blockade: identification of vasoactive compounds. *Food Research International*. ENVIADO