



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera *Morus alba* L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental

**D. MASOUD AKBARIAGHDAM**

**2024**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera *Morus alba* L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental

Autor: D. MASOUD AKBARIAGHDAM

Director/es: D. Noemí Marín Atucha, D<sup>a</sup> Ana Pagán Bernabéu y D. Joaquín García-Estañ López





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Masoud Akbariaghdam

doctorando del Programa de Doctorado en

Integración y Modulación de Señales en Biomedicina

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera *Morus alba* L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental

y dirigida por,

D./Dña. Noemí Marín Atucha

D./Dña. Ana Pagán Bernabéu

D./Dña. Joaquín García-Estañ López

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 23 de SEPTIEMBRE de 202024

Firmado por  
AKBARIAGHDAM

Fdo.: MASOUD -  
\*\*\*\*6248\* el

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

# Índice

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	11
Resultados previos en relación con el extracto y variedad de morera.....	13
Enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial.....	15
Modelos experimentales de hipertensión arterial.....	16
Función renal.....	18
Hemostasia.....	19
Modelos experimentales de hipertensión arterial.....	21
Modelo de hipertensión L-NAME.....	21
Óxido nítrico (NO).....	23
Estrés oxidativo.....	25
Estrés oxidativo e hipertensión arterial.....	26
Flavonoides.....	28
<i>Morus alba</i> .....	33
Componentes de las hojas de morera.....	34
Efectos de <i>Morus alba</i> en el sistema cardiovascular.....	36
Efectos de <i>Morus alba</i> en la hipertensión arterial.....	41
<b>Objetivos</b> .....	44
<b>Métodos</b> .....	46
Animales.....	46
Extractos de hojas de morera.....	47
Cultivos celulares.....	48
Protocolos experimentales para el estudio in vitro en cultivos celulares.....	50

Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera.....	50
Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera.....	53
Análisis de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivo celular.....	53
Análisis de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante de cultivo celular.....	54
Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de los extractos de morera.....	58
Grupos experimentales para el estudio <i>in vivo</i> .....	61
Protocolos experimentales en los estudios crónicos.....	61
Protocolos experimentales en el estudio agudo.....	62
Estudios metabólicos <i>in vivo</i> y obtención de muestras.....	63
Medida de la presión arterial en rata anestesiada. Extracción de muestras de sangre, tejidos y eutanasia.....	64
Estudio de la reactividad vascular en anillos aórticos de rata.....	65
Muestras de sangre, plasma y tejido.....	67
Estudio de la agregación plaquetaria.....	67
Estudio histopatológico.....	69
Métodos estadísticos.....	74
<b>Resultados</b> .....	76
Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera.....	76
Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera.....	77
Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de los extractos de morera.....	79
Análisis de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante de cultivo celular.....	81
Presión arterial.....	83

Hemograma.....	85
Reactividad vascular.....	86
Agregación plaquetaria.....	91
Estudio anatomopatológico.....	97
Función renal en jaulas metabólicas.....	101
<b>Discusión.....</b>	<b>102</b>
<b>Sumario de resultados.....</b>	<b>112</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>114</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>130</b>

## Resumen

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2023), las enfermedades del sistema cardiovascular son una de las principales causas de muerte en los países occidentales. De ellas, la hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo muy importante para la enfermedad cardiovascular y una preocupación para la salud pública. Desde hace décadas se han logrado importantes descubrimientos tanto en la fisiopatología como en el tratamiento de la hipertensión mediante una panoplia de fármacos entre los que se encuentran los que afectan al sistema renina-angiotensina (SRAA), los diuréticos, antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y bloqueantes de los canales de calcio, entre otros (Hall 2024). desde hace años, muchos estudios epidemiológicos han observado que el uso de alimentos ricos en polifenoles y flavonoides en la dieta tiene efectos beneficiosos en algunas enfermedades crónicas como la HTA (García-Estañ 2019). En general, a más ingestión de flavonoides menos propensión de padecer daños cardiovasculares (Atucha 2022; Vargas 2018). Estudios recientes de nuestro laboratorio (Paredes 2018a y 2018b) han demostrado que algunos flavonoides tienen un efecto beneficioso como agentes antihipertensivos en varios modelos animales de HTA. En esta tesis nos propusimos evaluar el efecto de los extractos de morera *Morus alba* L. en un modelo de HTA experimental por déficit de óxido nítrico.

### **Métodos:**

Se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley, divididas en grupos control, hipertensas a las que se les trató con un tratamiento de seis semanas de duración de un inhibidor de la síntesis de NO (L-NAME) en el agua de bebida, hipertensas tratadas con un

extracto de *Morus alba* L e hipertensas tratadas simultáneamente con captopril. Después de seis semanas de tratamiento, se midió presión arterial y función renal, además de la función vascular endotelial en aorta y la función de agregación plaquetaria.

### **Resultados:**

Los experimentos han mostrado que el extracto de *Morus alba* L es seguro para su uso en animales. Previene el desarrollo de la hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico, aunque sin normalizarla completamente. Igualmente reduce la excesiva respuesta vasoconstrictora a fenilefrina en anillos aórticos y mejora la vasodilatación a acetilcolina, ambos efectos dependientes del aumento de la producción de óxido nítrico. Además, el extracto de *Morus alba* L redujo la mayor agregación plaquetaria a ADP y colágeno de los animales hipertensos, aunque sin llegar a normalizarla. Igualmente, el extracto mejoró las alteraciones morfológicas renales de los animales hipertensos.

### **Conclusiones:**

El extracto de *Morus alba* L tiene efecto antihipertensor, mejora la reactividad vascular, la agregación plaquetaria y las alteraciones morfológicas renales en un modelo de hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico. Estos efectos están relacionados con un aumento de los efectos del óxido nítrico.

**Palabras clave:** hipertensión arterial, óxido nítrico, L-NAME, *Morus alba* L, reactividad vascular, agregación plaquetaria.

## Abstract

According to the World Health Organization (WHO 2023), cardiovascular diseases are one of the main causes of death in Western countries. Of these, arterial hypertension (HTN) is a very important risk factor for cardiovascular disease and has long been a global public health problem. For decades, important discoveries have been made both in the pathophysiology and in the treatment of hypertension through a range of drugs including those that affect the renin-angiotensin system (RAAS), diuretics,  $\alpha$ -adrenergic antagonists and calcium channel blockers, among others (Hall 2024). For years, many epidemiological studies have observed that the use of foods rich in polyphenols and flavonoids in the diet has beneficial effects on some chronic diseases such as HTN (García-Estañ 2019). In general, a higher intake of flavonoids is associated with a lower risk of cardiovascular disease (Atucha 2022; Vargas 2018). Recent studies from our laboratory (Paredes 2018a and 2018b) have shown that some flavonoids have a beneficial effect as antihypertensive agents in several animal models of hypertension. The main objective of this thesis was to evaluate the effect of mulberry extracts *Morus alba* L. in an experimental hypertension model due to nitric oxide deficiency.

### **Methods:**

Male Sprague-Dawley rats were used, divided into control groups, hypertensive rats treated with a six-week treatment of an inhibitor of NO synthesis (L-NAME) in the drinking water, hypertensive rats treated with an extract of *Morus alba* L. and hypertensive rats treated simultaneously with captopril. After six weeks of

treatment, blood pressure and renal function were measured, as well as endothelial vascular function in the aorta and platelet aggregation function.

### **Results:**

Experiments have shown that Morus alba L extract is safe for use in animals. It prevents the development of arterial hypertension due to nitric oxide deficiency, although it does not completely normalize it. It also reduces the excessive vasoconstrictive response to phenylephrine in aortic rings and improves vasodilation to acetylcholine, both effects dependent on the increase in nitric oxide production. In addition, Morus alba L extract reduced the increased platelet aggregation to ADP and collagen in hypertensive animals, although it did not normalize it. Likewise, the extract improved the renal morphological alterations in hypertensive animals.

### **Conclusions:**

Morus alba L extract has an antihypertensive effect, improves vascular reactivity, platelet aggregation and renal morphological alterations in a model of arterial hypertension due to nitric oxide deficiency. These effects are related to an increase in the effects of nitric oxide.

**Keywords:** arterial hypertension, nitric oxide, L-NAME, Morus alba L, vascular reactivity, platelet aggregation.

## Introducción

Las plantas medicinales se han usado y se usan ampliamente como tratamiento terapéutico, gracias a su bajo coste y fácil acceso. La morera (*Morus alba* L), que tiene su origen en Asia, es una de estas especies. El cultivo de morera se usa tradicionalmente como planta medicinal en Asia, aunque durante mucho tiempo su cultivo era necesario para servir como alimento a los gusanos de seda (*Bombix mori*). Con la aparición de los tejidos sintéticos, su cultivo cayó en desuso, aunque su uso medicinal continúe. Las especies de *Morus* son ricas en compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, que actúan como antioxidantes y promueven efectos beneficiosos en la salud. Estos compuestos fitoquímicos difieren entre las especies de morera, aunque las moléculas de interés están presentes en toda la planta, hojas, tallos, corteza y raíz. Además de la utilidad del árbol de la morera en sí y el aprovechamiento de su excelente madera, en la actualidad existe un gran interés por su uso en la alimentación humana y animal, además de su posible uso terapéutico (Rodrigues 2019).

En Murcia, la Real Orden del 3 de mayo de 1892 dio origen a la Estación Sericícola de Murcia, que se encargó de difundir los avances agronómicos relacionados con la cría del gusano de seda y de la morera. Esto permitió a los productores de seda acceder a variedades nuevas de moreras y gusanos que mejoraban la producción y eran más saludables. Murcia se consolidó como un importante núcleo para la producción y distribución de plantas de morera, manteniendo sus instalaciones en la antigua Estación hasta mediados del siglo XX. Hoy, esta antigua Estación Sericícola alberga el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA). La cría del gusano de seda fue el motor

principal detrás de las actividades de conservación, reproducción, investigación y divulgación relacionadas con la seda. El Banco de Germoplasma del IMIDA resguarda 36 clones de moreras del género *Morus*, de los cuales 23 son variedades locales o autóctonas de Murcia. Se identifican cuatro especies: *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus indica* y *Morus multicaulis*, siendo la mayoría de los clones de la morera blanca (*Morus alba*), originaria de Asia, Europa y América del Norte. Tradicionalmente, la reproducción de esta especie en el IMIDA se realizaba por semilla, con el objetivo de producir hojas para alimentar al gusano de seda. Esto permitió la selección mediante híbridos fértiles de variedades que aumentaban la supervivencia del gusano de seda. Puede que estas variedades seleccionadas tengan en sus hojas una mezcla de polifenoles más potente para su uso médico. La conservación de variedades o clones con características deseables para la hoja, alimentación, productos farmacéuticos, fruto o madera, se realiza mediante la utilización de esquejes semileñosos con ayuda de hormonas que facilitan el enraizamiento. Esto permite que, una vez seleccionado el clon con las características medicinales buscadas, se puedan cultivar árboles con características y composición fitoquímica semejante, que asegure su efecto funcional.

Polifenoles, antocianinas y flavonoides son los componentes de interés del género *Morus*. Los polifenoles desempeñan papeles clave en el crecimiento, la regulación y la estructura de las plantas y varían ampliamente dentro de las diferentes plantas. Estas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente están involucradas en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de los patógenos. Estos compuestos se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides son compuestos que las plantas

generan como metabolitos secundarios y desempeñan múltiples funciones, como la acción antifúngica y bactericida, la quelación de metales, la protección contra la radiación ultravioleta, así como su papel en la coloración y el control de auxinas, además de regular el crecimiento y la diferenciación. El cuerpo humano no puede producir estas sustancias, por lo que deben obtenerse de la alimentación o en forma de suplementos. Se distribuyen ampliamente en plantas, frutas, verduras, diversas bebidas y complementos alimenticios y hoy representan un componente sustancial de la dieta humana. En general, se han descrito multitud de efectos farmacológicos de interés en patología humana, como los efectos antioxidantes y promotores de la salud cardiovascular y metabólica. Así, se ha descrito que los flavonoides mejoran la función endotelial al aumentar la liberación de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) e inhibir la producción de sustancias proinflamatorias. También estimulan la diuresis y natriuresis, lo que puede contribuir a su efecto antihipertensivo, al disminuir el volumen plasmático.

### **Resultados previos en relación con el extracto y variedad de morera.**

La colección de germoplasma del IMIDA es la más completa de España. En este contexto, el equipo de Biotecnología del IMIDA conduce un proyecto en el que se están caracterizando las 36 variedades de morera. Así, se han llevado a cabo varios estudios para caracterizar el potencial de las diferentes variedades de *Morus alba* L de la colección, que se obtuvieron en el pasado por hibridación para la cría del gusano de seda. Se ha comenzado por analizar el efecto antioxidante de unos 20 extractos etanólicos de hoja en el modelo preclínico de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). En este estudio se midió la capacidad de supervivencia tras la aplicación de un estrés

oxidativo agudo en gusanos alimentados con los extractos a dosis crecientes. Todos los extractos analizados presentaron actividad antioxidante significativa en el modelo *in vivo* de *C. elegans*. Cuatro extractos destacaron por su potencial antioxidante (los llamaremos a partir de ahora extracto A, B, C y D), siendo el extracto D, el más antioxidante de todos e incluso más que el control de ácido ascórbico. La dosis óptima fue de 100 mg/mL. Posteriormente, se compararon extractos etanólicos de las cuatro variedades de morera más antioxidantes (extracto A, B, C y D), en un modelo de ratones obesos. A los ratones obesos se les dió una dieta rica en grasas suplementada con los extractos de morera, y a las 5 semanas se les sacrificó y se analizaron diferentes parámetros metabólicos. Aunque todos los extractos fueron efectivos, de nuevo con el extracto D se obtuvieron los mejores resultados. Podemos destacar una mejora en la respuesta a una sobrecarga de glucosa, disminución del porcentaje de grasa abdominal y cutánea, disminución de los triglicéridos plasmáticos y disminución de los marcadores de inflamación en hígado (Leyva-Jiménez 2020). Los 4 extractos utilizados en el modelo animal de obesidad se analizaron por HPLC, para medir las cantidades de polifenoles del extracto de cada variedad de morera. Se observó que todos contenían una cantidad importante de polifenoles, variando la cantidad en cada uno de ellos. Se detectaron, entre otros, ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, flavonoides (quercetina, rutina) y ácidos grasos como el linoléico. El extracto D, con los mejores resultados en el modelo de ratón obeso, no destacó por tener mayor cantidad de ninguno de los polifenoles identificados. Eso hizo pensar que es la interacción de varios de ellos la que produce el efecto positivo, no uno en particular.

En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto del extracto específico de morera del IMIDA, en otras funciones fundamentales para prevenir la enfermedad cardiovascular, como la presión arterial, la función vascular, la función renal y la agregación plaquetaria.

### **Enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial.**

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, especialmente en la sociedad occidental. Muchos trabajos epidemiológicos han encontrado una relación inversa entre la ingestión de flavonoides y la mortalidad por ECV (Hooper et al 2008; Ried et al 2012). El efecto antioxidante de los flavonoides es uno de los principales mecanismos de acción de los flavonoides y otros polifenoles. Existen fuertes evidencias, en modelos experimentales *in vitro* y en animales de experimentación, de que algunos flavonoides inducen efectos vasodilatadores que mejoran la disfunción endotelial y la resistencia a la insulina, ejercen efectos antiagregantes y ateroprotectores de las plaquetas y reducen la presión arterial (Jiménez 2012; García-Estañ 2019; Atucha 2022). A pesar de interactuar con múltiples objetivos, los flavonoides son muy seguros y esto es de gran importancia para su uso en humanos.

La hipertensión arterial está asociada a la disfunción renal y es una de las causas más frecuentes de enfermedad renal en el mundo desarrollado. Un objetivo importante en el tratamiento de la hipertensión, junto con la reducción de la presión arterial, es la protección renal (Hall 2024). El efecto antihipertensivo y protector renal de algunos flavonoides (quercetina, rutina) y polifenoles se atribuye a sus propiedades antioxidantes, sobre todo, aunque se han descrito otros mecanismos

como un aumento de la producción de óxido nítrico (NO), inhibición de la inflamación o disminución de las actividades de kinasas renales (Vargas 2018).

### **Modelos experimentales de hipertensión arterial.**

El modelo de hipertensión por tratamiento crónico con L-NAME es un modelo frecuentemente usado para el estudio de la disfunción endotelial y para analizar el papel del NO en el control de la presión arterial. En ratas tratadas crónicamente con L-NAME (un inhibidor de la síntesis de NO) se produce hipertensión, disfunción endotelial, activación del sistema renina-angiotensina (SRA) y aumento del estrés oxidativo (García-Estañ 2006; Alcaraz 2007). Este modelo se acompaña de remodelado vascular, muy evidente en el corazón, en los vasos de conducción y de resistencia. Así, se ha descrito hipertrofia ventricular, fibrosis miocárdica, engrosamiento de la pared aórtica y remodelado de los vasos mesentéricos (Paredes 2018a; 2018b). Recientemente, se ha descrito disminución de la expresión proteica de la enzima constitutiva de la NOS en vasos sanguíneos y disminución de los niveles plasmáticos de NO, contribuyendo probablemente a una vasodilatación disminuida, un aumento de la resistencia vascular y una mayor presión arterial. También se ha descrito en ratas L-NAME un aumento de los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, incluyendo peroxinitritos, un potente oxidante de los sistemas biológicos, que produce alteración de la respuesta vasoactiva a los vasodilatadores (Alcaraz 2007). Los productos derivados del estrés oxidativo no sólo disminuyen la biodisponibilidad del NO, alterando la relajación vascular, sino que también producen mayores niveles de superóxido ( $O_2^-$ ), un vasoconstrictor, en vez del vasodilatador NO. Además del aumento de  $O_2^-$  en tejidos vasculares, también se ha encontrado un

aumento de uno de los principales productos de la peroxidación lipídica, como es el malondialdehído (MDA) y ambos se han relacionado con la activación del SRA que se produce en este modelo.

En un estudio previo de nuestro grupo (Paredes 2018a) en el modelo L-NAME de hipertensión arterial, mostramos que algunos flavonoides, especialmente la apigenina, eran efectivos para reducir la presión arterial elevada asociada al déficit crónico de NO. Una importante característica de este estudio, es que usamos una dosis baja, lejos de la usada normalmente para estudios animales o humanos, elegida en base a un futuro uso comercial en humanos. Nuestros resultados indicaron que, como en otros estudios previos, el efecto antihipertensivo se debió tanto a efectos vasodilatadores como antioxidantes. Así, estos flavonoides (alguno de ellos ya presentes en el mercado en forma de suplementos nutricionales) podrían ser útiles como ingredientes de comidas funcionales. Sin embargo, en el modelo de hipertensión espontánea, el modelo SHR, estos mismos flavonoides tuvieron un efecto moderado, produciéndose sobre todo en etapas tempranas de la hipertensión, pero no cuando la HTA está instaurada (Paredes 2018b). En cualquier caso, ambos estudios sugieren que los efectos de estos flavonoides pueden estar relacionados con una combinación de mecanismos antioxidantes y vasodilatadores. La diferencia de efecto entre ambos modelos es importante, resaltando la importancia de utilizar más de un modelo de hipertensión experimental para poder valorar los efectos cardiovasculares de los extractos.

Algunos, pocos, estudios publicados hablan en favor del beneficio de los extractos de *Morus* que acabamos de comentar. Así, se ha descrito que el extracto etanólico de *Morus alba*, en un efecto dependiente de la dosis, reduce la presión

arterial en animales SHR (Park 2019), al parecer por un efecto sobre el remodelado vascular. Ni el óxido nítrico, ni la función renal ni la reactividad vascular fueron estudiados aquí. Sin embargo, en otro estudio, los efectos sobre el NO del extracto de *Morus* han sido analizados en ratones deficientes en la sintasa de NO con resultados negativos (Carrizo 2016). En otros estudios, en diabetes mellitus, se ha descrito la mejora de la vasodilatación *in vitro* (Naowaboot 2009) o la inhibición del enzima de conversión de la angiotensina o la activación del GABA (un neurotransmisor inhibidor) como posibles razones del efecto antihipertensor transitorio en animales con hipertensión SHR (Yang 2012).

### **Función renal.**

Muchos de los polifenoles también ejercen acciones renoprotectoras que pueden ser de interés en enfermedades como la glomerulonefritis, la nefropatía diabética y la insuficiencia renal inducida químicamente (Vargas 2018). Además de afectar a varias funciones renales que promueven la excreción de agua y sodio, lo que pueden contribuir a su conocido efecto antihipertensivo. Los flavonoides previenen el daño renal asociado con la hipertensión arterial, tanto disminuyendo la presión arterial lo que en sí reduce la carga hemodinámica sobre el riñón, como actuando directamente sobre el parénquima renal. Se ha visto que muchos de estos efectos tienen que ver con múltiples vías de señalización que se sabe que producen daño renal y, además, son independientes de sus efectos hipotensores (Estruch 2013; Sebastian 2017). Estas sustancias también atenúan la función de barrera endotelial renal alterada por la hiperglucemia, la excreción de microalbúmina urinaria y la hiperfiltración glomerular que resulta de una reducción de la lesión por podocitos, un

factor determinante para la albuminuria en la nefropatía diabética. Varios flavonoides han mostrado efectos protectores renales contra muchos agentes nefrotóxicos que con frecuencia causan daño renal agudo (IRA) o enfermedad renal crónica (ERC), como LPS, gentamicina, alcohol, nicotina, plomo o cadmio. Los flavonoides también mejoran el daño renal inducido por cisplatino o metotrexato, lo que demuestra acciones importantes en la quimioterapia, los efectos anticancerígenos y renoprotectores (Vargas 2018). También se ha observado un efecto profiláctico beneficioso de los flavonoides contra la IRA inducida por procedimientos quirúrgicos como la isquemia/reperfusión o el *bypass* cardiopulmonar. En varios modelos murinos de ERC, la función renal alterada mejoró significativamente mediante la administración de flavonoides de diferentes fuentes, solos o en combinación con células madre. En humanos, se descubrió que los flavanoles de cacao tienen efectos vasculoprotectores en pacientes en hemodiálisis. Además, los flavonoides desarrollan actividad antitumoral contra las células de carcinoma renal sin efectos tóxicos en las células normales, lo que sugiere un posible papel terapéutico en pacientes con carcinoma renal (Vargas 2018).

### **Hemostasia.**

Los trastornos trombóticos se caracterizan por un aumento en la probabilidad de la formación de trombos innecesarios que podrían deberse a la activación de la cascada de coagulación o las plaquetas circulantes. Las plaquetas o los trombocitos juegan un papel esencial en la hemostasia, pero la función anormal de las plaquetas conduce al desarrollo de una serie de complicaciones cardiovasculares, incluidos los trastornos trombóticos. En condiciones patológicas, las plaquetas se asocian con el

desarrollo de diferentes trastornos trombóticos, que incluyen aterosclerosis, trombosis arterial y accidente cerebrovascular, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar; por lo tanto, las plaquetas son el objetivo de una serie de estrategias antitrombóticas. Los flavonoides, un gran grupo de polifenoles expresados ubicuamente en frutas y verduras, han atraído una atención considerable debido a sus beneficios para la salud humana, incluida la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Sánchez 2018). Se ha descrito que los flavonoides reducen la actividad plaquetaria al atenuar la activación del receptor GPIIb-IIIa inducido por el agonista, la movilización de  $Ca^{2+}$  libre intracelular, la exocitosis de gránulos, así como la activación de diferentes moléculas de señalización, como las proteínas quinasas o fosfolipasas activadas por mitógeno (López 2018).

Como se ha comentado, el género *Morus* ha sido usado tradicionalmente en China, Corea, Japón y otros países asiáticos como infusión (“herbal tea”) y como hierba medicinal. Se han descrito efectos antiarterioscleróticos, antihipertensivos, antiobesidad, antidiabéticos, protectores hepáticos, entre otros (Thaipitakwong 2018). Menos estudiado es su efecto antitrombótico, sobre todo en extractos de hoja, donde solamente se ha publicado un estudio describiendo el efecto agudo *in vitro* de un extracto etanólico. Estos autores encuentran que la preincubación con el extracto *in vitro* en plaquetas lavadas, produce una inhibición de la agregación en respuesta a colágeno (Kim 2014). Hasta donde nosotros conocemos, no hay estudios publicados sobre el efecto de la administración de extractos de *Morus alba* sobre la función plaquetaria y la hemostasia sanguínea.

En este estudio, nos planteamos poner de manifiesto las propiedades cardiovasculares, renales y antiagregantes de extractos de morera, en un modelo de

hipertensión arterial experimental, por déficit de óxido nítrico, que permita dilucidar un posible papel protector de la morera frente a las enfermedades cardiovasculares, como posible ingrediente funcional tanto en la prevención como en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

### **Modelos experimentales de hipertensión arterial**

Para comprender la patogenia de la hipertensión arterial (HTA), los investigadores han utilizado diversos modelos animales, tanto genéticos como inducidos, que simulan la hipertensión experimental (Dornas 2011). Estos modelos presentan muchas similitudes con la enfermedad en humanos, lo que facilita el análisis de los factores que contribuyen a su desarrollo y mantenimiento. Su relevancia radica en que permiten investigar las causas y los mecanismos que provocan la progresión de la enfermedad. Además, son de gran utilidad para el análisis de posibles intervenciones terapéuticas de interés (Lahera 1997).

### **Modelo de hipertensión L-NAME**

En este modelo de HTA, se inhibe la producción de NO mediante el uso de un inhibidor de su síntesis como el L-NAME o el L-NNA (Fortepiani 1999a y b; García-Estañ 1999), drogas que actúan sobre la sintasa de NO (NOS). El más usado es el L-NAME (L-NG-Nitroarginina metil éster), una droga no selectiva que induce una importante elevación de la PA, además de otras importantes alteraciones de la función cardiovascular y renal. Entre estas características, se incluyen la vasoconstricción renal, la disminución del filtrado glomerular, una reducción en la respuesta excretora a variaciones en la presión de perfusión renal (conocido como el mecanismo de

diuresis y natriuresis de presión), así como una mayor retención de agua y sodio (Lahera 1997; García-Estañ 1999; Fortepiani 1999a y b).

Los mecanismos que provocan la disfunción renal en la hipertensión L-NAME aún no son conocidos completamente. Sin embargo, se sabe que el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempeña un papel fundamental (García-Estañ 1999) en la hipertensión y en la disfunción renal y sistémica tras la disminución de la producción de óxido nítrico (NO). Esta relación parece ser dependiente de la angiotensina II (Ang-II) actuando en receptores AT1 (Lahera 1997; García-Estañ 1999; Fortepiani 1999a). Experimentos han mostrado que el uso crónico de bloqueadores de estos receptores puede prevenir la vasoconstricción renal y disminuir la presión arterial elevada. Sin embargo, algunas alteraciones, como la reducción del flujo sanguíneo papilar renal que caracteriza a este modelo, no se revertirán completamente (Ortiz 1998; Jover 2001).

La hipertensión inducida por L-NAME puede ser revertida mediante el uso de antagonistas de calcio, que bloquean la vasoconstricción provocada por la angiotensina II. Se ha observado que los calcio antagonistas T son más efectivos que los L para reducir la resistencia preglomerular, también por la inhibición de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o por un antagonista de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, como el prazosín (Kung 1995). Por otro lado, Biancardi y cols (2007), demostraron que en la vasoconstricción en respuesta a L-NAME también contribuye un mayor tono simpático, que juega un destacado papel en el inicio y en el mantenimiento de la hipertensión.

Las alteraciones en la función vascular en arterias de conducción, como la aorta, son significativas en este modelo de hipertensión. La administración crónica de L-NAME incrementa la reactividad vascular de la aorta ante vasoconstrictores, inhibe la vasodilatación inducida por acetilcolina y reduce los niveles de GMPc, que actúa como efector del óxido nítrico (Bund 2003; Luscher 1992; Intengan 2000).

Esta vasoconstricción periférica y la resultante elevación de las resistencia vasculares periféricas se ha relacionado también con un aumento del estrés oxidativo (EO) y más potente señal de calcio en experimentos realizados con células del músculo liso (Romero 1999; Forstermann 2010). Finalmente, es importante destacar que la hipertensión inducida por L-NAME es de gran relevancia, ya que permite investigar qué ocurre tras una deficiencia crónica de NO. La disfunción vascular asociada se usa como modelo de enfermedad vascular (Puddu 2000; Triggle 2012). Asimismo, es útil para estudiar las lesiones renales, que son muy parecidas a las que se observan en la hipertensión en humanos.

También se ha visto que entre los flavonoides, la quercetina ejerce un efecto antihipertensor en la hipertensión inducida por L-NAME, aunque esta eficacia no ha sido confirmada en todos los estudios (Duarte 2002; Paredes 2018a).

### **Óxido nítrico (NO).**

El Premio Nobel de Medicina y Fisiología 1998 fue para Furchgott, Ignarro y Murad por el descubrimiento del óxido nítrico (NO), una pequeña molécula que revolucionó la medicina. Su gran capacidad de difusión le permite ser un segundo mensajero en la comunicación intercelular. Así, el NO producido por todo tipo de células (endoteliales, neuronas o inflamatorias) modula las funciones de las células

diana (Moncada 1988; Moncada 1991). El efecto se realiza activando la enzima GMP cíclico sintasa, lo que aumenta el GMP cíclico que introduce el calcio hacia el interior de los almacenes (retículo sarcoplásmico) del músculo liso vascular, con la consiguiente relajación vascular y por lo tanto, vasodilatación (Medina 2004; Muscará 1999). El NO se forma desde el aminoácido L-arginina que se convierte en L-citrulina y NO. El enzima es la sintasa de NO (NOS, nitric oxide synthase) (Alderton 2001) y necesita calmodulina (CaM). La síntesis de NO se inhibe por sustancias estructuralmente similares a L-arginina, como el L-NAME o el L-NMMA.

El óxido nítrico (NO) desempeña un papel crucial en la regulación de la función renal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El óxido nítrico se libera continuamente en el glomérulo renal, donde regula el tono de sus arteriolas y la contracción en las células mesangiales (Bachman 1994). Además, sus funciones incluyen la modulación de la reactividad vascular, la hemodinámica renal, la regulación de la secreción intrarenal de renina, la inhibición de la reabsorción tubular de sodio, el control de la irrigación medular y la participación en el mecanismo de diuresis de presión (Reid 1992; García-Estañ 1999). El efecto global del óxido nítrico (NO) en el riñón consiste en la excreción de agua y sodio, siendo fundamental para poder adaptarse a las variaciones en la ingesta de sal. Por lo tanto, los defectos en la homeostasis del NO pueden llevar a un aumento en la retención de agua y sodio, provocando una retención de volumen (Mount 2006).

## **Estrés oxidativo (EO)**

Las estructuras biológicas requieren oxígeno para cubrir sus necesidades energéticas, lo que genera radicales libres. En bajas concentraciones, estos radicales pueden desempeñar funciones fisiológicas, pero su acumulación excesiva puede provocar daño celular si no se neutralizan por los sistemas antioxidantes generales. El EO se define como un desajuste del estado redox celular. Este desajuste puede ser causado tanto por fallos en los mecanismos antioxidantes como por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son compuestos químicos que contienen oxígeno y se caracterizan por su alta reactividad. Cuando sus niveles aumentan, pueden interactuar con proteínas, ADN, lípidos de membrana y otras moléculas, causando daños celulares significativos y generando más radicales reactivos (Wilcox 2002).

A bajas concentraciones, las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como mensajeros secundarios que regulan procesos biológicos al modular enzimas, proteínas y moléculas de señalización intracelular (Bedard 2007). Numerosas de estas especies son radicales libres, entre las que se encuentra el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el óxido nítrico (NO), el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y los radicales lipídicos, debido a su contenido de electrones desapareados. Otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el ácido hipocloroso (HOCl), aunque no son radicales libres, pueden transformarse fácilmente en ellos. Las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) incluyen compuestos como el NO (Bedard 2007). La interacción entre el superóxido y el NO genera peroxinitrito, lo que inactiva el NO y suprime su función biológica. Este fenómeno es más probable cuando hay altos niveles de superóxido y óxido nítrico, junto con una disminución en la actividad antioxidante. El

peroxinitrito puede generar F2-isoprostanos, que tienen propiedades vasoconstrictoras y antinatriuréticas (Matés 1999). Además, el peroxinitrito puede cruzar las membranas celulares, provocando la oxidación de lípidos y proteínas, lo que contribuye al daño celular.

En situaciones de isquemia cerebral, la falta de oxígeno en el cerebro promueve la formación de peroxinitrito al restablecerse el flujo sanguíneo, contribuyendo al daño neuronal. Este también afecta a las mitocondrias, alterando la respiración celular, reduciendo la producción energética y afectando al metabolismo calcio fosfato, lo que eventualmente desencadena la apoptosis (Lum 2001; Yung 2006). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regula el tono vascular, provocando contracción o relajación según el tipo de vaso sanguíneo y las condiciones, y puede afectar la función endotelial y la permeabilidad de las células endoteliales (Redón 2003; Zalba 2001). El radical hidroxilo es extremadamente reactivo y prácticamente no se difunde porque reacciona de inmediato con cualquier compuesto en su entorno. En general, los radicales libres pueden interactuar con casi todas las moléculas, incluyendo por supuesto el NO (Escobales 2005; Xu 2006; Touyz 2004; Heistad 2006).

### **Estrés oxidativo e hipertensión arterial**

El EO, caracterizado por un aumento excesivo de especies reactivas de oxígeno (ROS) que sobrepasa la capacidad del sistema antioxidante, está implicado en la patofisiología de varias enfermedades que afectan al riñón y al sistema cardiovascular, como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la enfermedad aterosclerótica, y la insuficiencia cardíaca (Escobales 2005; Montezano 2012; Papageorgiou 2013). El incremento de la producción de ROS en los vasos sanguíneos,

particularmente del anión superóxido, juega un papel clave en las alteraciones asociadas con la HTA, disminuyendo la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Esto ocurre porque el superóxido se combina con el NO formando peroxinitrito, el cual oxida el ácido araquidónico, generando F-2 isoprostanos que actúan como potentes vasoconstrictores y antinatriuréticos. Además, el aumento de la producción de superóxido en los vasos sanguíneos perjudica la función endotelial y la capacidad de relajación dependiente del endotelio, lo cual es una característica típica de la hipertensión arterial (Zalba 2001; Redón 2003).

El estrés oxidativo (EO) también contribuye al aumento de la permeabilidad del endotelio vascular y favorece la adhesión de leucocitos, además de estimular la expresión de factores angiogénicos como el VEGF (Berry 2000). Las especies reactivas de oxígeno (ROS), asimismo, incrementan los niveles de calcio intracelular libre, lo que desempeña un papel importante en la alteración de la contractilidad vascular que caracteriza a la hipertensión.

En el contexto de la hipertensión arterial, el EO está involucrado en la patogénesis de diversas formas de esta enfermedad. Estudios en pacientes con distintos tipos de hipertensión han mostrado un aumento de ROS, aunque su papel exacto en la hipertensión no se comprende completamente. Algunos debaten si la reducción de la antioxidación es causa o consecuencia del EO (Inagi 2006; Crimi 2007).

La mayor parte de los estudios sobre cómo afecta el EO en las enfermedades cardiovasculares se enfocan en los mecanismos vasomotores que dependen del óxido nítrico en el endotelio. Sin embargo, otras áreas menos investigadas incluyen el papel del EO en la función endotelial dependiente, los mecanismos antitrombóticos,

la regulación vasomotora que no es dependiente del NO (incluyendo sus efectos en los canales de potasio).

## **Flavonoides**

El nombre de los flavonoides proviene del latín *flavus* (amarillo), y son la subclase más abundante de polifenoles en el reino vegetal. Fueron identificados por un científico húngaro llamado Albert Szent-Györgyi, galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1937. Szent-Györgyi aisló una sustancia llamada citrina de la cáscara de limón, demostrando que su consumo ayudaba a regular la permeabilidad capilar. A esta sustancia y a compuestos similares los denominó "vitamina P" debido a su relación con la permeabilidad. Más tarde, se evidenció que estos mismos compuestos también presentaban características análogas a la vitamina C, mejorando su proceso de absorción y protegiéndola de la oxidación, lo que llevó a que fueran referidos como vitamina C2. Sin embargo, investigaciones posteriores no lograron verificar que los flavonoides fueran verdaderas vitaminas, y estas nomenclaturas fueron discontinuadas hacia 1950.

El interés por el estudio de los flavonoides disminuyó durante los años 40, pero resurgió décadas más tarde, especialmente en los años 90, cuando estudios epidemiológicos sugirieron que un mayor consumo de flavonoides estaba asociado con una menor incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Tapas 2008; Quiñones 2012).

Los flavonoides son un amplio grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en diversas plantas, incluidas aquellas destinadas al consumo humano. Estos compuestos se producen a partir de los constituyentes químicos básicos,

aunque no parecen ser esenciales para la vida (García-Estañ 2019). A pesar de esto, desempeñan un papel importante tanto en el ámbito fisiológico como en el ecológico, y además son de gran interés comercial por sus múltiples aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica (Tapas 2008; Middleton 2000; Ross 2002). Los flavonoides han captado la atención de nutricionistas y farmacólogos por varias razones:

- Su abundancia y niveles en verdura y frutas contribuyen significativamente a los beneficios saludables de estos alimentos.
- Alimentos entre los que se incluyen los cítricos, el té, el vino y el chocolate negro son especialmente ricos en flavonoides y se conocen bien sus efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular.
- Varias plantas medicinales, que se ha visto que son abundantes en flavonoides, se han utilizado a lo largo de la historia y continúan siendo consideradas como alternativas potenciales a la medicina convencional.
- Numerosos extractos de alimentos y plantas ricos en flavonoides (como el vino, el té y los cítricos) se distribuyen como suplementos nutricionales. La diosmina y la quercetina, flavonoides de los más usados, se encuentran en ciertos países disponibles como complementos nutricionales, productos de venta libre e incluso en formulaciones farmacéuticas.
- Estos compuestos rara vez causan efectos secundarios y, en dosis altas, tienen una vida media relativamente larga (Paredes 2005).

Los flavonoides se sintetizan en las plantas a partir de los aminoácidos tirosina y fenilalanina. Este proceso tiene lugar durante la fotosíntesis, donde facilitan el transporte de electrones (Raj 2001). De acuerdo con sus propiedades estructurales, podemos dividir a los flavonoides (García-Estañ 2001):

1) Flavanonas: compuestos como hesperidina, naringina, naringenina y eriodictiol. Se hallan en grandes concentraciones en ciertas plantas aromáticas, como la menta y en los cítricos.

2) Flavonas: incluyen diosmetina, apigenina, luteolina y tangeretina. Perejil y apio son las principales fuentes comestibles de flavonas.

3) Flavonoles: como quercetina y kaempferol. Las frutas y las verduras son las fuentes principales, aunque también las podemos encontrar en el vino y en el té.

4) Flavanoles o flavan-3-oles: ejemplos son las catequinas y epicatequinas. Estos pueden encontrarse como monómeros (catequinas), dímeros condensados, oligómeros (procianidinas) o como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Las principales fuentes alimenticias de catequinas incluyen el chocolate, el té y el vino.

5) Antocianinas: como cianidina, delphinidina y malvidina. Son compuestos solubles en agua y altamente pigmentados que forman uno de los grupos más relevantes de pigmentos en las plantas. Se hallan en el vino tinto, en ciertos cereales y, en mayor medida, en frutas.

6) Isoflavonas: como genisteína, daidzeína y gliciteína. Como pueden actuar sobre los receptores de estrógenos, se clasifican como fitoestrógenos. Se encuentran

predominantemente en leguminosas, con la soja y sus derivados como su fuente principal.

Hay otros polifenoles no flavonoides como los estilbenos (resveratrol), los ácidos fenólicos (ácido gálico), las saponinas (ginsenósidos), la curcumina y los taninos. En cada categoría de flavonoides, hay una gran diversidad de compuestos que se distinguen por la cantidad y la disposición de los grupos hidroxilo, además de la presencia de grupos funcionales adicionales como metilos, azúcares o ácidos orgánicos.

De interés para esta tesis doctoral, los extractos de *Morus alba* contienen una variedad de flavonoides prenilados (sanggenon C, morin, morusin kuwanon G), flavonoles (isoquercitrina, quercetina, kaempferol, rutin), y alcaloides (1-deoxynojirimycin) (Batiha 2023).

Los flavonoides experimentan un potente metabolismo y una gran parte de ellos es eliminada a través de la orina. Su biotransformación ocurre en dos etapas: primero, en el hígado mediante las reacciones de fase I, donde se añaden grupos polares; y luego en el colon, a través de reacciones de fase II, en las que los flavonoides no absorbidos son degradados por microorganismos. Tanto los flavonoides como sus metabolitos derivados del colon se conjugan con ácido glucurónico, sulfatos o glicina. Estos compuestos solubles en agua se excretan por la orina (Batiha 2023). Debido a estos procesos, las formas que llegan al torrente sanguíneo y a los tejidos periféricos son distintas de las presentes en los alimentos, lo que dificulta la identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica. Los productos de esta absorción, mayor en el intestino delgado que en el

colon (Scalbert 2000), son principalmente glucurónidos y sulfatos, algunos con metilaciones en el grupo catecol (Tsao 2010). Tras el consumo de alimentos ricos en flavonoides, las concentraciones plasmáticas no superan la concentración micromolar, lo que requiere una ingesta regular para mantener niveles elevados. Las concentraciones máximas suelen alcanzarse entre 1 y 2 horas después de la ingesta, salvo en los que necesitan degradarse antes de ser absorbidos (D'Archivio 2007).

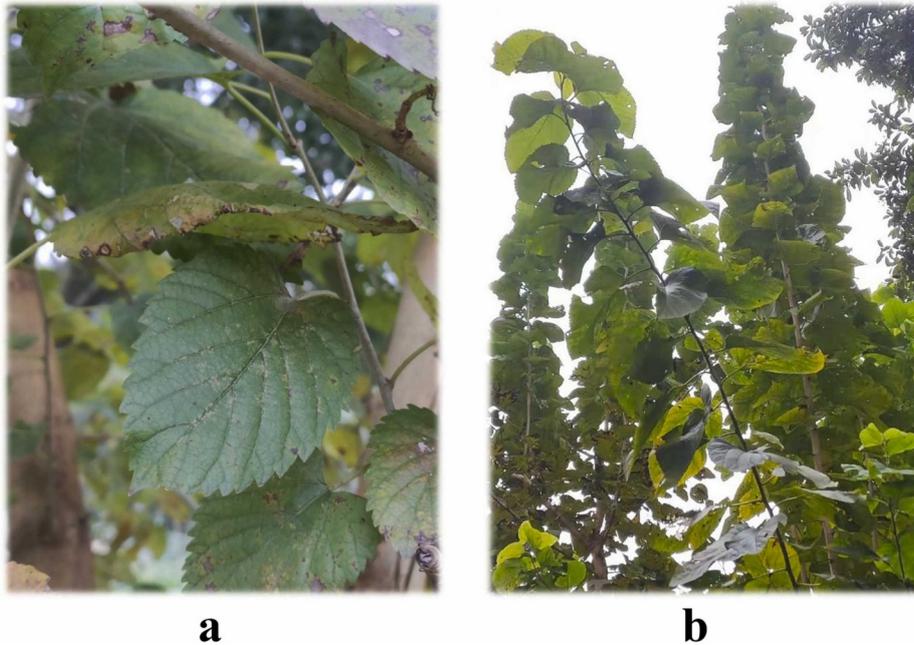
Los polifenoles se encuentran principalmente en tejidos donde han sido metabolizados, como el hígado, el estómago, el intestino, el colon y los riñones (Hollman 2004). El endotelio es probablemente uno de los primeros lugares donde actúan los flavonoides. Diversos estudios realizados en humanos han demostrado que la absorción de flavonoides desde la dieta es del 1 al 5% de la dosis consumida, mientras que esta absorción aumenta considerablemente (entre el 5 y el 40%) al consumir suplementos o productos farmacéuticos enriquecidos.

Los flavonoides presentan una amplia gama de efectos bioquímicos y farmacológicos que pueden tener un impacto positivo en la salud, especialmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Esto se debe principalmente a su capacidad para reducir el estrés oxidativo y mejorar la biodisponibilidad del óxido nítrico (Grasi 2010; González-Gallego 2007; Quiñones 2013; Pietta 2000). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que un mayor consumo de flavonoides en la dieta está vinculado a una menor incidencia de cáncer y afecciones cardiovasculares (Galleano 2010). Este beneficio radica en gran medida en sus propiedades antioxidantes, las cuales también explican su acción vasodilatadora y vasoprotectora, además de sus efectos antitrombóticos, antilipémicos, antiateroscleróticos,

antiinflamatorios, antiapoptóticos, antiisquémicos, antiarrítmicos y antihipertensivos (Agrawak 2011).

### ***Morus alba*.**

*Morus alba*, comúnmente conocida como morera o sang shu, tiene una rica historia de uso tanto en forraje como en medicina tradicional (figura 1). Numerosos esfuerzos de investigación, reflejados en revisiones publicadas (Butt 2008; Devi 2013), han explorado las características de esta especie. Originaria de China y cultivada extensamente en Japón y Corea, *Morus alba* L. pertenece a la familia Moraceae (Alonzo 1999; Suttie 2005). En la medicina tradicional china se han



**Figura 1.** Fotos de *Morus alba*. (a) Hojas de *Morus alba* L., (b) Vista aérea de *Morus alba* L. (Tomada de Zhang 2022).

empleado varias partes de *Morus alba*, incluidas hojas, frutos y corteza, para tratar diversos problemas de salud como fiebre, protección del hígado, mejora de la vista, fortalecimiento de las articulaciones, facilitación de la diuresis y descenso de la presión arterial. (Bae 2007). En particular, en Corea y Japón, las personas con diabetes

consumen hojas de morera como suplemento antihiper glucemiante (Katsube 2006). Reconocidas por su eficacia contra la presión arterial alta, la resaca y los niveles de azúcar en sangre relacionados con la diabetes, las hojas de morera se han convertido en un recurso valioso (Machii 2002). La popularidad del té de morera, especialmente en el este y sudeste de Asia, va en aumento. Sorprendentemente, este té es rico en ácido  $\gamma$ -aminobutírico (2,7 mg·g<sup>-1</sup> de peso seco), superando diez veces al té verde. Este compuesto es reconocido por sus propiedades reductoras de la presión arterial (Suttie 2005). Los estudios fitoquímicos han revelado una amplia gama de compuestos en *Morus alba*, incluidos terpenoides, alcaloides, flavonoides (chalconas y antocianinas), ácidos fenólicos, estilbenos y cumarinas. El creciente interés en los químicos polifenólicos del género *Morus* está impulsado por sus diversos efectos biológicos, que abarcan actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, antinociceptivas, anti envejecimiento, antianémicas, antibacterianas y antioxidantes. Los frutos de *Morus nigra* se recomiendan para la prevención y el tratamiento de enfermedades graves, como diabetes, cáncer, infecciones bacterianas, aterosclerosis, hiperlipidemia, enfermedades neurológicas, inflamación e hipertensión. Además, estas frutas realzan los medicamentos con su sabor y color naturales.

### **Componentes de las hojas de morera.**

Los flavonoles son los principales flavonoides de las hojas de morera y presentan variaciones regionales. Las hojas de *Morus* contienen ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, isómero del ácido cafeoilquínico y glucósido del ácido cafeoilquínico como derivados del ácido

cafeoilquínico (Sánchez-Salcedo, 2015). Los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de las hojas son la rutina y la quercetina 3-(6-malonilglucósido), destacados glucósidos de flavonol. Más allá de su importancia antioxidante, estos compuestos poseen propiedades terapéuticas, mitigan el estrés oxidativo en el hígado y mejoran la hiperglucemia. Mornigrol E, Mornigrol F y morusina, fenólicos prenilados que se encuentran en toda la planta de morera, particularmente concentrados en la corteza de la raíz, contribuyen al rico perfil de flavonoides. Además, el extracto etanólico de *Morus alba* revela tres glucósidos de flavonol principales, a saber, quercetina 3-(6-malonilglucósido), rutina e isoquercitrina (Katsube 2006). Sus contenidos son 9,0, 5,7 y 1,9 mg·g<sup>-1</sup> de peso seco, respectivamente. Se informa del aislamiento de cuatro nuevos derivados de 2-arilbenzofurano (moracinas V-Y) y dos compuestos conocidos (moracinas N y P) a partir del extracto de hoja en etanol (Yang 2010). El extracto de hoja en butanol produce dos nuevos prenilflavanos y un glucósido, junto con seis compuestos conocidos (Doi 2001). Además, el extracto de hoja en metanol da como resultado el aislamiento de diez flavonoides nuevos y conocidos (Dat 2010). A partir del extracto de hoja en etanol de *Morus alba* se ha aislado el aislamiento de morachalconas B y C, chalconas inusuales con un anillo de furano de cinco miembros que contiene una molécula de oxígeno. El fraccionamiento del extracto guiado por bioensayos conduce al aislamiento de 15 flavonoides, incluidos cinco nuevos compuestos (Yang 2012).

Las estructuras de los compuestos que ejercen un efecto antihipertensivo, cuyo modo de acción ha sido investigado, pueden agruparse estructuralmente en flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos polifenólicos. El esteviósido es el único. El modo de acción más frecuentemente invocado para los flavonoides, a saber, la quercetina,

sus glucósidos más biodisponibles, la isquercitrina y la rutina, y para el kaempferol, es la mejora de la producción endotelial de NO. Para el kaempferol, la prevención de los efectos de la angiotensina II se ha documentado recientemente (Chen 2016), mientras que para la quercetina no se ha excluido la inhibición de la ECA y la relajación directa e independiente del endotelio del músculo liso vascular a través del bloqueo de los canales de calcio (Larson 2010). La reducción del estrés oxidativo debido a las propiedades antioxidantes y el consiguiente aumento de la biodisponibilidad del óxido nítrico está ampliamente documentada para los ácidos fenol y polifenol presentes en las hojas de *Morus alba*, a saber, el ácido vanílico (Kumar 2014; Kumar 2012b), ácido siríngico (Kumar 2012a, 2012b), ácido ferúlico (Kumar 2012), ácido protocatequico (Juurlink 2014; Safaeian 2018) y ácido 5-O-cafeoilquínico (Suzuki 2006). Para el ácido gálico, estudios recientes han demostrado su efecto antihipertensivo a través de la regulación de la histona desacetilasa 1 o 2 (Jin 2017a,b) Entre los isómeros del ácido hidroxibenzoico que ejercen actividad en el sistema cardiovascular, se ha propuesto el ácido 3-hidroxibenzoico para la reducción de la lipólisis de los adipocitos mediante la activación de los receptores del ácido hidroxicarboxílico con posibles mejoras en los perfiles de lípidos en sangre (Juurlink 2014). Por último, el efecto antihipertensivo del esteviósido se ha atribuido a su acción inhibidora del flujo de calcio hacia las células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Lee 2001).

### **Efectos de *Morus alba* en el sistema cardiovascular.**

*Morus alba* demostró efectos protectores contra el daño miocárdico inducido por isoproterenol, lo que condujo a una reducción de la miocarditis y de las regiones de necrosis miocárdica en las ratas tratadas, junto con niveles más bajos de

marcadores cardíacos. En un modelo de miocarditis inducida por miosina, preservó el tejido cardíaco, previniendo una infiltración sustancial de citoquinas inflamatorias y tejido fibroso, corrigiendo la disfunción sistólica y diastólica del miocardio (Naowaboot 2009a; Yang 2014b). Además, *Morus alba* inhibió significativamente la expresión de periactina y fractalquina, así como los niveles intracelulares de ROS, la activación de NADPH y una mayor unión de monocitos a las células endoteliales humanas (Yang 2012). Redujo la presión arterial media anormal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial sistólica y diastólica alta en ratones experimentales. La reactividad deteriorada de los vasos sanguíneos, incluida la disminución de la dilatación y el aumento de la constricción, se restableció a niveles normales después del tratamiento a largo plazo con hojas de morera. La reactividad vascular alterada, que implica una disminución de la dilatación y un aumento de la contracción, volvió a niveles normales después de una terapia prolongada con hojas de *Morus alba*. En las células del músculo liso vascular, la relajación estuvo mediada por el bloqueo del canal de  $Ca^{2+}$  dependiente de receptor y dependiente de voltaje, mientras que la contracción estuvo mediada por la activación del receptor de rianodina del retículo sarcoplásmico (Naowaboot 2009b).

El extracto de la planta indujo una breve disminución de la presión arterial y del pulso que duró menos de 3 minutos (Lee 2011). En un modelo de ratón con hipertensión arterial, el extracto de *Morus alba* mostró un efecto antihipertensivo, induciendo la relajación vascular endotelial a través de una ruta dependiente del óxido nítrico. La investigación molecular reveló una mayor fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El extracto también tuvo un impacto positivo en el sistema vascular al activar dos proteínas clave que actúan como receptores de estrés

(Hong 2011). El extracto de *Morus alba* o 4 U/kg de insulina mejoraron eficazmente la capacidad de respuesta vascular en ratas diabéticas. Después del tratamiento con extracto de *Morus alba*, los niveles de malondialdehído en el hígado, riñones, corazón y aorta disminuyeron significativamente (Sharma 2010). En ratas alimentadas con aterosclerosis, el tratamiento crónico con extractos en dosis bajas (100 mg/kg/día) o dosis altas (200 mg/kg/kg) redujo la hipertensión y suprimió la relajación del anillo vascular inducida por la acetilcolina. El tratamiento con hojas de *Morus alba* restauró los marcadores circulantes de disfunción endotelial (molécula 1 de adhesión de células vasculares solubles, fibrinógeno y óxido nítrico) a niveles normales (Yang 2011b). Las hojas de *Morus alba* también fueron efectivas contra las placas ateroscleróticas ya formadas, reduciendo significativamente la cantidad de placa en ensayos con animales después de una terapia a largo plazo con *Morus alba* (Alvin 2011). La investigación del efecto vasoprotector del extracto de corteza de raíz de *Morus alba* utilizando aorta torácica de rata aislada reveló una vasorelajación dependiente de la concentración a través de un mecanismo dependiente del endotelio. La eliminación del endotelio redujo significativamente la relajación vascular en respuesta al extracto y también redujo la respuesta contráctil a la fenilefrina (Woo 2017).

Los modos de acción mejor documentados de las hojas y extractos de hojas de *Morus alba* que producen un efecto hipotensor incluyen el bloqueo de los canales de calcio, el antagonismo  $\alpha_1$  y el aumento de la producción de NO en el endotelio. El extracto de acetato de etilo de las hojas de *Morus alba* provocó una relajación dependiente de la concentración de las aortas intactas y sin endotelio precontraídas por KCl, lo que sugiere un efecto antagonista del calcio hacia los canales de calcio

operados por voltaje. Además, este extracto inhibió la contracción del músculo liso de la aorta provocada por la fenilefrina, lo que indica su capacidad para suprimir la liberación de calcio intracelular dependiente del receptor de inositol trifosfato y/o rianodina (Xia 2008). Carrizzo (2016) demostró que el extracto de hojas de *Morus alba* evoca vasodilatación en los vasos de ratones, que fue revertida por L-NAME, lo que sugiere la participación del óxido nítrico en su actividad. Además, este efecto parecía estar mediado por la activación de los sensores de estrés y chaperonas Proteína Quinasa ARN como la retículo quinasa endoplásmica y la proteína de choque térmico 90, que inducen la fosforilación de la isoforma endotelial de la NO sintasa (eNOS). Estos hallazgos se confirmaron *in vivo*, ya que la administración oral del extracto fue ineficaz en ratones con deficiencia de eNOS, mientras que provocó una disminución de la PA en la cepa de tipo salvaje. Además, se demostró que la administración oral de un extracto de hoja de *Morus alba* a ratas diabéticas reduce el aumento de la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica y la presión arterial media y restablece las respuestas vasculares a los vasodilatadores como la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio (Naowaboot 2009 ). Estos resultados se alinean con los obtenidos por Lee (Lee 2011), quien observó que la administración oral de un extracto acuoso de hojas de *Morus alba* disminuye la PA y restaura parcialmente la relajación a acetilcolina de los anillos aórticos de ratas alimentadas con un aterogénico. dieta. Otros efectos que pueden contribuir a inhibir la hipertensión pueden deberse, al menos en parte, a las actividades antioxidantes y antiateroscleróticas del extracto de hoja de *Morus alba* (Enkhmaa 2005) y a las propiedades antidiabéticas, antibacterianas, anticancerígenas, hipolipidémicas y antidiabéticas de las hojas de morera y propiedades antiinflamatorias, probablemente debido a las moracinas (Naik 2015). En particular,

existe evidencia sólida y documentada de la eficacia del extracto de hoja de *Morus alba* para controlar las condiciones hiperlipidémicas y controlar la obesidad (El-Beshbishy 2006; Noh 2022). Hay evidencia de que también puede mejorar la presión arterial elevada al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), interfiriendo con el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y normalizando la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) anormalmente elevadas (Thaipitakwong 2018). El mecanismo de hipertensión causado por el SRAA suele atribuirse al efecto vasoconstrictor directo de la angiotensina II (Ang-II) y al efecto mineralocorticoide de la aldosterona. En un experimento *in vitro*, se ligó la arteria renal izquierda de la rata para crear un modelo de hipertensión renal, que desencadenó una secreción excesiva de renina y activó el SRAA. Después del tratamiento con la fracción soluble en acetato de etilo de extractos metanólicos de *Morus alba* durante seis semanas, la hipertensión desapareció (Nade 2013). Los resultados demostraron que podría interferir con el SRAA, mejorando así la función del endotelio vascular y reduciendo la presión arterial (Nade 2013). Además, la actividad de ECA afecta directamente a la producción de angiotensina II. Se observó que, después del tratamiento con *Morus alba*, la actividad de la ECA en las células se redujo, lo que provocó una disminución en la producción de la angiotensina II y un debilitamiento de la vasoconstricción, lo que provocó una disminución en la presión arterial (Micucci 2020). Es más, se trataron ratas diabéticas con *Morus alba* en diversas dosis durante 8 semanas. Curiosamente, se encontró que el tratamiento con 0,5 y 1,0 g·kg<sup>-1</sup> de *Morus alba* redujo la PAS, la PAD, la PAM y la FC a niveles casi normales (Naowaboot 2009). La hipertensión es una de las complicaciones de los pacientes diabéticos crónicos. Los estudios han encontrado que *Morus alba* podría aliviar la

hipertensión en ratas diabéticas. En resumen, ML es una planta medicinal beneficiosa para pacientes con hipertensión, pero el posible mecanismo de MLA en la hipertensión aún necesita más investigación para aclararse.

### **Efectos de *Morus alba* en la hipertensión arterial.**

La hipertensión es un importante desafío de salud pública a nivel mundial y es una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares, retinianas y renales (DellaCroce 2008; Savica 2010). La primera línea de tratamiento para la hipertensión son los cambios en el estilo de vida, como cambios en la dieta, ejercicio físico y pérdida de peso (Smith 2010). La reducción de la presión arterial (en 5 mm Hg) puede disminuir los riesgos de accidente cerebrovascular en un 34% y de cardiopatía isquémica en un 21%, así como reducir la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Law 2003).

Recientemente, se están invirtiendo muchos esfuerzos en la detección de componentes bioactivos en alimentos o dietas para el tratamiento y prevención de la hipertensión (Yoshikawa 2000). *Morus alba* L. se cultiva en países orientales y sus hojas se utilizan desde hace mucho tiempo para alimentar a los gusanos de seda. En la medicina popular, las hojas de morera, la corteza de las raíces y las ramitas se han utilizado durante mucho tiempo para reducir la fiebre, proteger el hígado, mejorar la vista, fortalecer las articulaciones, facilitar la descarga de orina y reducir la presión arterial (Chang 2011). Hasta la fecha, diferentes partes de la morera, desde la corteza de la raíz hasta las hojas, han sido ampliamente investigadas por sus beneficios para la salud, incluidos los efectos antioxidantes, hipolipidémicos, antihiper glucémicos, antiaterogénicos, antivirales, antimicrobianos y neuroprotectores (Chang 2011; El-Beshbishy 2006; Harauma 2007; Liu 2009; Naowaboot 2009; Yang 2010; Zhang 2009)

El ácido c-aminobutírico (GABA) es un aminoácido de cuatro carbonos que actúa como uno de los principales neurotransmisores inhibidores del sistema nervioso central (Kimura 2002). Se ha demostrado que el GABA desempeña un papel importante en el control de la presión arterial tanto del sistema nervioso central como del periférico (Hayakawa 2005; Kimura 2002). El GABA también se encuentra en diversas plantas y alimentos fermentados, como hojas de té (Abe 1995), productos lácteos fermentados (Hayakawa 2004), soja fermentada (Aoki 2003), salsa de soja (Yamakoshi 2007), granos de arroz (Akama 2009) y tomate (Yoshimura 2010). Se ha descubierto que la alimentación con GABA o alimentos ricos en GABA, como té verde, productos lácteos fermentados y salsa de soja, durante 4 a 6 semanas deprime la elevación de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Abe 1995; Hayakawa 2004; Yamakoshi 2007). Además, también se ha informado en humanos del efecto antihipertensivo de la leche fermentada rica en GABA (Inoue 2003), así como de que *Morus alba* contiene una cantidad considerable de GABA (Kang 2006). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que *Morus alba* tendrá la capacidad de ejercer efectos antihipertensivos in vivo a través de GABA.

En estudios con animales, la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca anormalmente elevadas se normalizaron mediante la ingestión de hojas de morera (Yang 2012; Nade 2013). Una investigación de la reactividad vascular reveló que las hojas de morera mejoraban la respuesta de los vasos sanguíneos a los estimuladores exógenos. La reactividad deteriorada de los vasos sanguíneos, incluida la disminución de la dilatación y el aumento de la constricción, se restableció significativamente a los niveles normales después del tratamiento a largo plazo de las hojas de morera

(Naowaboot 2009). Las hojas de morera reducen la presión arterial y la frecuencia cardíaca al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Los estudios in vitro observaron una menor actividad de la ACE después de que las células fueron tratadas con extracto de hojas de morera (Yang 2012). Además, las hojas de morera actuaron como bloqueadores de los canales de calcio. Una disminución en la contracción vascular en respuesta a la fenilefrina indicó que las hojas de morera bloquearon la vía de entrada del calcio a las células (Nade 2013). El otro posible mecanismo de acción antihipertensiva podría ser el contenido de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el extracto de hojas de morera porque la presión arterial media del grupo de tratamiento se redujo con una tendencia similar a la del grupo que recibió GABA puro (Yang 2012).

## Objetivos

En este estudio nos planteamos poner de manifiesto las propiedades cardiovasculares, renales y antiagregantes de extractos de morera en un modelo de hipertensión arterial experimental por déficit de óxido nítrico, lo que permita dilucidar un posible papel protector de las hojas de morera frente a las enfermedades cardiovasculares, como posible ingrediente funcional en la prevención y tratamiento de estas enfermedades.

Objetivo general: evaluar los efectos cardiovasculares, vasculares, plaquetarios y renales de un extracto etanólico de hojas de morera *Morus alba* L. en la hipertensión arterial (HTA) experimental por déficit de óxido nítrico.

### Objetivos específicos:

- Estudio *in vitro* de la biocompatibilidad, citotoxicidad y efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hojas de morera *Morus alba*.
- Analizar *in vivo* los efectos de un tratamiento crónico del extracto sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca.
- Estudiar los efectos del tratamiento crónico del extracto en la función renal.
- Estudiar los efectos del tratamiento crónico del extracto sobre la reactividad vascular aórtica y papel del óxido nítrico.
- Estudiar los efectos del tratamiento crónico del extracto sobre la agregación plaquetaria.

- Estudiar los efectos estructurales del tratamiento crónico del extracto: anatomía patológica de aorta, riñón y corazón.
- Estudiar los efectos de un tratamiento agudo del extracto sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca, agregación y función renal en los animales hipertensos.

# Métodos

## Protocolos experimentales.

1. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera.
2. Evaluación *in vitro* de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera.
3. Estudio en un modelo animal (ratas SD) del efecto agudo y crónico del extracto etanólico al 70% de hoja de morera (MAE).
  1. Efecto del tratamiento crónico (6 semanas) con MAE en animales con hipertensión arterial inducida por déficit de óxido nítrico con L-NAME.
    1. Grupos experimentales: control normotenso, hipertenso L-NAME, hipertenso tratado crónicamente con MAE, hipertenso L-NAME tratado crónicamente con captopril.
  2. Efecto del tratamiento agudo (3 días) con MAE en animales hipertensos (6 semanas).
    1. Grupos experimentales: hipertenso L-NAME tratado durante 3 días con placebo o con MAE.

## Animales.

En este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (SD), todas con aproximadamente ocho semanas de edad, proporcionadas por el Servicio de Experimentación Animal del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la

Universidad de Murcia (licencia nº REGAES 300305440012). En total, se emplearon 80 ratas en el desarrollo de este trabajo experimental. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ( $55\pm 10\%$ ) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, así como la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, sobre el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, en conformidad con la normativa europea (2010/63/UE) sobre protección de animales utilizados con fines científicos.

Así mismo, se cumplió la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA 677/2020 y del Comité de Bioseguridad (CBE 373/2020 de la Universidad de Murcia y el Organismo Competente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM) (código N° A13210203, Anexo I).

### **Extractos de hoja de morera**

Se utilizaron 3 tipos de extractos de hoja de morera *Morus alba*. Dos de ellos fueron extractos etanólicos, utilizando como agente extractante etanol al 50% y al 70% respectivamente y el tercero fue un extracto acuoso, con agua ultrapura como agente extractante. A modo de comparativa de estos extractos con un compuesto

comercial, se utilizaron las cápsulas de hoja de morera de Bioganix (autorizadas para su venta en EE. UU. por la FDA).

Se seleccionó una variedad de *Morus alba* del Banco de Germoplasma del IMIDA (BAGERIM) por sus efectos antioxidantes en estudios previos con *Caenorhabditis elegans* y sus efectos antiinflamatorios en ratones obesos (Leyva-Jiménez 2020). Tras la recolección de las hojas, éstas se lavaron, se secaron y se liofilizaron. Los 3 tipos de extractos fueron producidos por el Equipo de Biotecnología del IMIDA, así como la preparación de las muestras de Bioganix. La metodología se adaptó a cada tipo de extracción acorde a la bibliografía existente. Partiendo de la hoja de morera liofilizada, se procedió a la preparación de los extractos incubando en agitación y alternando con sonicación, con cada tipo de agente extractante según correspondiese. Posteriormente se procedió a la centrifugación y filtración de las muestras y su posterior concentración y eliminación del etanol mediante el uso de un rotavapor. Como último paso de la extracción, todos los extractos elaborados fueron sometidos a liofilización y conservados a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Cultivos celulares**

Se utilizaron 2 líneas celulares para llevar a cabo los distintos estudios *in vitro* con los extractos de hoja de morera. En el caso de la evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de estudio, se seleccionó la línea celular L929 de fibroblastos de ratón por ser la más ampliamente utilizada para estos estudios y ser la referencia de la ISO 10993-5:2009 para pruebas de citotoxicidad *in vitro* (ISO 10993-5:2009). En el caso de los ensayos de evaluación

de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los extractos de hoja de morera, se realizaron con la línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón, generalmente empleada en la bibliografía para llevar a cabo este tipo de experimentos.

La línea celular L929, adquirida de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS), L-glutamina 2 mM y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Se incubó a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, realizándose el cambio de medio cada 2-3 días y procediendo al subcultivo con tripsina/EDTA una vez alcanzado el 80% de confluencia celular.

La línea celular RAW 264.7, fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivó en DMEM con alto contenido de glucosa suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 4 mM y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Se incubó a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio cuidadosamente dos veces por semana con medio fresco y permitiendo que las células crecieran hasta alcanzar el 80% de confluencia para proceder al subcultivo mediante la técnica de raspado.

En ambos casos, la viabilidad y el número de células se determinaron mediante tinción con azul tripán, utilizando una cámara de Neubauer y se comprobó la ausencia de contaminación por micoplasmas en el cultivo celular antes de realizar los experimentos.

## **Protocolos experimentales para el estudio *in vitro* en cultivos celulares.**

1. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera. Se utilizó la línea celular L929.
2. Evaluación *in vitro* de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera. Se utilizó la línea celular RAW 264.7. Se realizaron las siguientes medidas en el sobrenadante del cultivo celular, como marcadores de inflamación:
  1. Análisis de óxido nítrico.
  2. Análisis de citoquinas inflamatorias.
  3. Análisis de los niveles de radicales libres (ROS), como medida de la actividad antioxidante de los extractos.

## **Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera.**

Se estudiaron los efectos de distintas concentraciones de los extractos preparados, así como de las cápsulas comerciales sobre el crecimiento y la proliferación celular mediante el ensayo de reducción metabólica intracelular con el reactivo PrestoBlue (PB). Este reactivo consiste en una solución permeable a la membrana a base de resazurina, de manera que el ensayo con PB analiza cuantitativamente la proliferación de las células metabólicamente activas mediante la reducción mitocondrial de la resazurina a un compuesto altamente fluorescente, la resorufina, cuantificable mediante la medida de su emisión de fluorescencia.

## Procedimiento:

1. *Siembra de la placa de 96 pocillos:* Se sembró una placa de 96 pocillos, con la línea celular L929 a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> (3.200 células/pocillo) y 200 µl de DMEN completo sin rojo fenol. Se dejaron sin sembrar los últimos 4 pocillos de la placa como blanco del ensayo. Se procedió a la incubación de la placa 24 h a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, para que tengan lugar la adhesión y el crecimiento celular del cultivo.

2. *Adición de las distintas muestras a ensayar:* Tras 24 h de incubación, las células se trataron con diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y 500 µg/mL) de las distintas muestras de estudio:

- **MAE 70%:** extracto etanólico con 70% EtOH como agente extractante
- **MAE 50%:** extracto etanólico con 50% EtOH como agente extractante
- **MAE Acuoso:** extracto con agua como agente extractante
- **Cápsulas** comerciales: Bioganix (EE.UU.)

Las muestras de los distintos extractos liofilizados fueron resuspendidas obteniendo una suspensión *stock* a 100 mg/ml. Se procedió a su dilución 1/10 en DMEM para tener una suspensión de trabajo a 10 mg/ml. Se procedió a añadir a cada pocillo el volumen de muestra correspondiente a cada concentración de estudio:

- Pocillos de 25 µg/ml de concentración de estudio: **0.5 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 50 µg/ml de concentración de estudio: **1 µl** de suspensión de trabajo

- Pocillos de 100 µg/ml de concentración de estudio: **2 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 200 µg/ml de concentración de estudio: **4 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 500 µg/ml de concentración de estudio: **10 µl** de suspensión de trabajo

Se establecieron 3 controles del ensayo, un control de crecimiento y proliferación celular con células creciendo sin haber sido sometidas a ningún tratamiento y otros 2 controles con células expuestas a los agentes extractantes de etanol al 70% y al 50%, a concentración similar a la más alta de los tratamientos de estudio (500 µg/ml de MAE), para descartar un efecto del agente extractante. Cada caso de estudio se evaluó por cuadruplicado (4 réplicas por muestra y concentración). A continuación se procedió a la incubación de la placa con el cultivo celular expuesto a los distintos casos de estudio durante 24h en el incubador. La siguiente figura muestra el diseño de la placa que se usó:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	SPL1 MAE 70% 25 µg/ml	SPL3 MAE 70% 50 µg/ml	SPL5 MAE 70% 100 µg/ml	SPL7 MAE 70% 200 µg/ml	SPL9 MAE 70% 500 µg/ml	SPL11 MAE 50% 25 µg/ml	SPL13 MAE 50% 50 µg/ml	SPL15 MAE 50% 100 µg/ml	SPL17 MAE 50% 200 µg/ml	SPL19 MAE 50% 500 µg/ml	CTL1 Etanol 70%	CTL3 Control Células
<b>B</b>	SPL1 MAE 70% 25 µg/ml	SPL3 MAE 70% 50 µg/ml	SPL5 MAE 70% 100 µg/ml	SPL7 MAE 70% 200 µg/ml	SPL9 MAE 70% 500 µg/ml	SPL11 MAE 50% 25 µg/ml	SPL13 MAE 50% 50 µg/ml	SPL15 MAE 50% 100 µg/ml	SPL17 MAE 50% 200 µg/ml	SPL19 MAE 50% 500 µg/ml	CTL1 Etanol 70%	CTL3 Control Células
<b>C</b>	SPL1 MAE 70% 25 µg/ml	SPL3 MAE 70% 50 µg/ml	SPL5 MAE 70% 100 µg/ml	SPL7 MAE 70% 200 µg/ml	SPL9 MAE 70% 500 µg/ml	SPL11 MAE 50% 25 µg/ml	SPL13 MAE 50% 50 µg/ml	SPL15 MAE 50% 100 µg/ml	SPL17 MAE 50% 200 µg/ml	SPL19 MAE 50% 500 µg/ml	CTL1 Etanol 70%	CTL3 Control Células
<b>D</b>	SPL1 MAE 70% 25 µg/ml	SPL3 MAE 70% 50 µg/ml	SPL5 MAE 70% 100 µg/ml	SPL7 MAE 70% 200 µg/ml	SPL9 MAE 70% 500 µg/ml	SPL11 MAE 50% 25 µg/ml	SPL13 MAE 50% 50 µg/ml	SPL15 MAE 50% 100 µg/ml	SPL17 MAE 50% 200 µg/ml	SPL19 MAE 50% 500 µg/ml	CTL1 Etanol 70%	CTL3 Control Células
<b>E</b>	SPL2 MAE 25 µg/ml	SPL4 MAE 50 µg/ml	SPL6 MAE 100 µg/ml	SPL8 MAE 200 µg/ml	SPL10 MAE 500 µg/ml	SPL12 Cápsulas 25 µg/ml	SPL14 Cápsulas 50 µg/ml	SPL16 Cápsulas 100 µg/ml	SPL18 Cápsulas 200 µg/ml	SPL20 Cápsulas 500 µg/ml	CTL2 Etanol 50%	Blanco
<b>F</b>	SPL2 MAE Acuoso 25 µg/ml	SPL4 MAE Acuoso 50 µg/ml	SPL6 MAE Acuoso 100 µg/ml	SPL8 MAE Acuoso 200 µg/ml	SPL10 MAE Acuoso 500 µg/ml	SPL12 Cápsulas 25 µg/ml	SPL14 Cápsulas 50 µg/ml	SPL16 Cápsulas 100 µg/ml	SPL18 Cápsulas 200 µg/ml	SPL20 Cápsulas 500 µg/ml	CTL2 Etanol 50%	Blanco
<b>G</b>	SPL2 MAE Acuoso 25 µg/ml	SPL4 MAE Acuoso 50 µg/ml	SPL6 MAE Acuoso 100 µg/ml	SPL8 MAE Acuoso 200 µg/ml	SPL10 MAE Acuoso 500 µg/ml	SPL12 Cápsulas 25 µg/ml	SPL14 Cápsulas 50 µg/ml	SPL16 Cápsulas 100 µg/ml	SPL18 Cápsulas 200 µg/ml	SPL20 Cápsulas 500 µg/ml	CTL2 Etanol 50%	Blanco
<b>H</b>	SPL2 MAE Acuoso 25 µg/ml	SPL4 MAE Acuoso 50 µg/ml	SPL6 MAE Acuoso 100 µg/ml	SPL8 MAE Acuoso 200 µg/ml	SPL10 MAE Acuoso 500 µg/ml	SPL12 Cápsulas 25 µg/ml	SPL14 Cápsulas 50 µg/ml	SPL16 Cápsulas 100 µg/ml	SPL18 Cápsulas 200 µg/ml	SPL20 Cápsulas 500 µg/ml	CTL2 Etanol 50%	Blanco

3. *Ensayo con el reactivo PB*: Pasadas 24 h de exposición a los extractos, las células se incubaron con una solución de PrestoBlue al 10% durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 7,5 %. Durante este tiempo, el PB será reducido por las células metabólicamente activas virando del color azul, hacia el morado o el fucsia y emitiendo fluorescencia cuando sea excitado con la longitud de onda adecuada. Transcurridas las 4h se traspasaron 100 µl de cada pocillo a una placa negra para proceder a la lectura de la fluorescencia relativa (RF) de cada pocillo usando el lector de microplacas Synergy MX de Biotek, a una longitud de onda de 570 nm de excitación y 610 nm de emisión.

## **Evaluación *in vitro* de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera.**

### **1. Análisis de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivo celular.**

Una de las técnicas para evaluar los niveles de inflamación en cultivos celulares consiste en medir los niveles de óxido nítrico (NO) liberados al medio de cultivo, ya que el NO puede ser considerado como un marcador de inflamación (Sharma 2007). Al ser un radical libre, el NO es una molécula inestable que logra estabilizarse al unirse a otras especies como el oxígeno, formando nitritos y nitratos (Moncada 1991; Moncada 1998). En consecuencia, los nitritos son los productos oxidados inertes del óxido nítrico, y constituyen el depósito de almacenamiento fisiológico del óxido nítrico. Así, los niveles de NO en cultivo se pueden cuantificar de manera indirecta mediante la determinación de nitritos, como indicador de la producción de NO, usando el reactivo Griess (Dirch 1998).

## **2. Análisis de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante de cultivo celular.**

Otra vía para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos de morera desarrollados es el estudio de la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Estas citoquinas de actividad pro-inflamatoria son moléculas producidas, principalmente, por monocitos y macrófagos, activados tras el contacto con un agente patógeno. Se seleccionaron 3 citoquinas pro-inflamatorias para su cuantificación en el medio de cultivo, tras la exposición de una línea celular de macrófagos a un agente inflamatorio. De esta manera se procedió a la cuantificación de la producción de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  mediante la técnica de ELISA.

### **Procedimiento:**

1. *Siembra de la placa de 96 pocillos:* Se sembró una placa de 96 pocillos, con la línea celular RAW 264.7 a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> (16.000 células/pocillo) y 200  $\mu$ l de DMEN completo sin rojo fenol. Se procedió a la incubación de la placa 24 h a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, para que tengan lugar la adhesión y el crecimiento celular del cultivo.

2. *Adición de las distintas muestras a ensayar:* Tras 24 h de incubación, las células se trataron con diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y 500  $\mu$ g/mL) de las distintas muestras de estudio:

- **MAE 70%:** extracto etanólico con 70% EtOH como agente extractante
- **MAE 50%:** extracto etanólico con 50% EtOH como agente extractante
- **MAE Acuoso:** extracto con agua como agente extractante
- **Cápsulas** comerciales: Bioganix (EE.UU.)

Las muestras de los distintos extractos liofilizados fueron resuspendidas obteniendo una suspensión *stock* a 100 mg/ml. Se procedió a su dilución 1/10 en DMEM para tener una suspensión de trabajo a 10 mg/ml. Se procedió a añadir a cada pocillo el volumen de muestra a 10mg/ml correspondiente a cada concentración de estudio:

- Pocillos de 25 µg/ml de concentración de estudio: **0.5 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 50 µg/ml de concentración de estudio: **1 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 100 µg/ml de concentración de estudio: **2 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 200 µg/ml de concentración de estudio: **4 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 500 µg/ml de concentración de estudio: **10 µl** de suspensión de trabajo

3. *Inducción de la inflamación:* para inducir la inflamación, se adicionó el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* a 1 µg/ml, a cada pocillo del cultivo (Page 2022) simultáneamente a la adición de las muestras de extracto de morera. En todos los casos de estudio se establecieron 3 controles del ensayo, un control de crecimiento y proliferación celular con células creciendo sin haber sido sometidas a ningún tratamiento y otros 2 controles más, uno de control positivo de inflamación con células expuestas a 1 µg/ml de LPS y otro como control positivo de anti inflamación con células expuestas a 6 µg/ml de quercetina, seleccionada por ser un compuesto fenólico similar a los presentes

en los extractos de morera y por sus ampliamente descritos efectos antiinflamatorios (Aghababaei 2023). Cada caso de estudio se evaluó por cuadruplicado (4 réplicas por muestra y concentración). A continuación se procedió a la incubación de la placa con el cultivo celular expuesto a los distintos casos de estudio durante 24h en el incubador.

4. *Ensayo con el reactivo Griess*: El ensayo con el reactivo de Griess es un ensayo colorimétrico adecuado para cuantificar los niveles del ión nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en soluciones acuosas. Para proceder con este ensayo se recogieron 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo de cada pocillo que se hicieron reaccionar con la misma cantidad de reactivo de Griess a 40 mg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de microplacas Synergy MX (Biotek). La cuantificación de la concentración de nitrito se calculó mediante análisis de regresión a partir de la curva estándar de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) de la siguiente tabla.

<b>Estándar <math>\text{NaNO}_2</math></b>	<b>Concentración <math>\text{NaNO}_2</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>1</b>	100
<b>2</b>	50
<b>3</b>	25
<b>4</b>	12.5
<b>5</b>	6.25
<b>6</b>	3.125
<b>7</b>	1.563
<b>Blanco</b>	0

El diseño de la placa para los experimentos de antiinflamación: se muestra en la siguiente figura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	STD8
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	100
<b>B</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	STD7
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	50
<b>C</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	STD6
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	25
<b>D</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	STD5
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	12.5
<b>E</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	STD4
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	6.25
<b>F</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	STD3
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	3.125
<b>G</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	STD2
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	1.563
<b>H</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	STD1
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	0

5. *Determinación de la producción de citoquinas inflamatorias:* Se recogió el medio de cultivo sobrante de cada pocillo, se procedió a su centrifugación para sedimentar los restos celulares y se almacenaron las muestras a -80°C hasta su posterior análisis. Se procedió al análisis de la producción de citoquinas inflamatorias mediante kits ELISA para cuantificar la producción de IL-6, TNF-α e IL-1β, siguiendo en cada caso las instrucciones y protocolos indicados por el fabricante (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, EE. UU.):

- PicoKine ELISA EK0394, para cuantificar Mouse IL 1β.
- Picokine ELISA EK0527, para cuantificar Mouse TNF.
- Picokine ELISA EK0411, para cuantificar Mouse IL6.

### 3. Estudio *in vitro* de la actividad antioxidante de los extractos de morera desarrollados

Para evaluar la capacidad antioxidante de los distintos extractos de morera desarrollados, se procedió al análisis de las ROS intracelulares tras la inducción del cultivo a un estrés oxidativo. La producción intracelular de ROS se estudió mediante tinción del cultivo con DCF-DA (diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína), una de las técnicas más utilizadas para medir directamente el estado redox de una célula (Eruslanov 2010) cuantificable mediante la medida de su emisión de fluorescencia.

#### Procedimiento:

1. *Siembra de la placa de 96 pocillos:* Se sembró una placa de 96 pocillos, con la línea celular RAW 264.7 a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> (16.000 células/pocillo) y 200 µl de DMEN completo sin rojo fenol. Se procedió a la incubación de la placa 24 h a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, para que tengan lugar la adhesión y el crecimiento celular del cultivo.

2. *Adición de las distintas muestras a ensayar:* Tras 24 h de incubación, las células se trataron con diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y 500 µg/mL) de las distintas muestras de estudio:

- **MAE 70%:** extracto etanólico con 70% EtOH como agente extractante
- **MAE 50%:** extracto etanólico con 50% EtOH como agente extractante
- **MAE Acuoso:** extracto con agua como agente extractante
- **Cápsulas** comerciales: Bioganix (EE.UU.)

Las muestras de los distintos extractos liofilizados fueron resuspendidas obteniendo una suspensión *stock* a 100 mg/ml. Se procedió a su dilución 1/10 en

DMEM para tener una suspensión de trabajo a 10 mg/ml. Se procedió a añadir a cada pocillo el volumen de muestra a 10mg/ml correspondiente a cada concentración de estudio:

- Pocillos de 25 µg/ml de concentración de estudio: **0.5 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 50 µg/ml de concentración de estudio: **1 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 100 µg/ml de concentración de estudio: **2 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 200 µg/ml de concentración de estudio: **4 µl** de suspensión de trabajo
- Pocillos de 500 µg/ml de concentración de estudio: **10 µl** de suspensión de trabajo

*3. Inducción del estrés oxidativo:* Se adicionó a cada pocillo el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* a 1 µg/ml, el cual tiene la capacidad de inducir un estrés oxidativo (a la concentración indicada) en esta línea celular (Page 2022), simultáneamente a la adición de las muestras de extracto de morera. En todos los casos de estudio se establecieron 3 controles del ensayo, un control de crecimiento y proliferación celular con células creciendo sin haber sido sometidas a ningún tratamiento y otros 2 controles más, uno de control positivo de oxidación con células expuestas a 1 µg/ml de LPS y otro como control positivo de anti oxidación con células expuestas a 6 µg/ml de quercetina, seleccionada por ser un compuesto fenólico similar a los presentes en los extractos de morera y por sus ampliamente descritos efectos antioxidantes (Aghababaei 2023). Cada caso de estudio se evaluó por

cuadruplicado (4 réplicas por muestra y concentración). A continuación se procedió a la incubación de la placa con el cultivo celular expuesto a los distintos casos de estudio durante 24h en el incubador. El diseño de la placa para los experimentos de antioxidación se muestra en la siguiente figura:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	CTL3
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	Control Células
<b>B</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	CTL3
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	Control Células
<b>C</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	CTL3
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	Control Células
<b>D</b>	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	SPL13	SPL15	SPL17	SPL19	CTL1	CTL3
	MAE 70% 25 µg/ml	MAE 70% 50 µg/ml	MAE 70% 100 µg/ml	MAE 70% 200 µg/ml	MAE 70% 500 µg/ml	MAE 50% 25 µg/ml	MAE 50% 50 µg/ml	MAE 50% 100 µg/ml	MAE 50% 200 µg/ml	MAE 50% 500 µg/ml	Quercetina 20 µM	Control Células
<b>E</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	Blanco
	MAE 25 µg/ml	MAE 50 µg/ml	MAE 100 µg/ml	MAE 200 µg/ml	MAE 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	
<b>F</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	Blanco
	MAE 25 µg/ml	MAE 50 µg/ml	MAE 100 µg/ml	MAE 200 µg/ml	MAE 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	
<b>G</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	Blanco
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	
<b>H</b>	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	SPL14	SPL16	SPL18	SPL20	CTL2	Blanco
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml	LPS 1 µg/ml	

4. *Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)*: Después de 24 h de exposición del cultivo al LPS, las células se lavaron con PBS, se cargaron con 10 µM de DCF-DA y se incubaron a 37 °C durante 30 min y en oscuridad. En este periodo de incubación, las esterasas celulares escinden el DCF-DA produciendo un producto no fluorescente (H<sub>2</sub>DCF), el cual es oxidado por los ROS intracelulares a moléculas fluorescentes (DCF). La intensidad de la fluorescencia producida se cuantificó utilizando un lector de microplacas Synergy MX (Biotek) con una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm de longitud de onda.

## Grupos experimentales para el estudio *in vivo*

Para el estudio del efecto del tratamiento crónico del extracto etanólico (MAE), los animales se distribuyeron en cuatro grandes grupos:

- **Grupo Control:** animales que no recibieron ningún tratamiento.
- **Grupo hipertenso L-NAME:** ratas tratadas crónicamente con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME. Esta sustancia se administró en el agua de bebida, ajustando la cantidad de bebida diaria para suministrar una dosis de 10 mg/kg/día.
- **Grupo hipertenso L-NAME + MAE:** Ratas tratadas con L-NAME y MAE 70% (100 mg/kg/día) durante 6 semanas. El MAE se administró diariamente por gavaje, mediante una sonda. El extracto etanólico al 70% fue preparado como se indica en el apartado anterior.
- **Grupo hipertenso L-NAME + Captopril:** El captopril es un inhibidor del enzima de conversión de Angiotensina II (IECA) y se ha demostrado ser un buen tratamiento para este tipo de hipertensión experimental (Paredes 2018a). El captopril se administró juntamente con el L-NAME en el agua de bebida durante 6 semanas, a una dosis de 100 mg/kg/día.

## Protocolos experimentales en los estudios crónicos.

- Estudios metabólicos: balance de agua y sodio en la sexta semana del estudio.
- Medida de la presión arterial y frecuencia cardíaca.
- Estudio de la reactividad vascular en anillos de aorta torácica.
- Hemograma.

- Estudio de la agregación plaquetaria: respuesta a ADP y colágeno.
- Estudio histopatológico.

### **Protocolos experimentales en el estudio agudo.**

Para el estudio del efecto del tratamiento agudo del extracto etanólico, los animales, se distribuyeron en cuatro grandes grupos:

- Grupo Control: animales que no recibieron ningún tratamiento.
- Grupo Control + MAE agudo: ratas que reciben tratamiento agudo con MAE 70% (100 mg/kg/día) durante 3 días en la sexta semana del estudio.
- Grupo hipertenso L-NAME: Ratas tratadas con L-NAME (10 mg/kg/día) durante 6 semanas.
- Grupo hipertenso L-NAME: ratas tratadas con L-NAME durante 6 semanas y tratadas con MAE (100 mg/kg/día) durante 3 días en la sexta semana del estudio.

Los protocolos experimentales en los estudios del efecto agudo del MAE (3 días) fueron:

- Estudios metabólicos: balance de agua y sodio en la sexta semana del estudio, realizándose una medida basal antes del inicio del tratamiento agudo y otra media el último día del tratamiento.
- Medida de la presión arterial y frecuencia cardíaca.
- Hemograma.
- Estudio de la agregación plaquetaria: respuesta a ADP y colágeno.

## **Estudios metabólicos in vivo y obtención de muestras.**

Este método se ha realizado según nuestros estudios previos (Tesis Doctoral Paredes 2015; Paredes 2018a; Paredes 2018b). “Durante la sexta semana de estudio, las ratas fueron introducidas en jaulas metabólicas individuales para su acostumbramiento durante dos días y al tercer día se inició la recogida de datos, registrándose la ingesta de agua y comida y el volumen urinario durante 24 h. Se les suministró comida estándar triturada (Panlab, Barcelona, España) y agua libremente disponible. El L-NAME y el captopril se disolvieron en el agua de bebida, ajustando la concentración de manera que los animales recibieran la dosis diaria adecuada del tratamiento. La dieta estándar contenía 104 mEq/Kg de sodio. Las muestras de orina fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4i, Jouan, Saint-Herblain, Francia) para eliminar residuos. Luego, se dividieron en dos fracciones, que se congelaron a -80°C, para análisis de diversas sustancias, y la otra se mantuvo a 4°C para medir la concentración de sodio. Los parámetros analizados fueron:

- Ingesta de comida y agua: Se calculó mediante la diferencia entre el peso de la comida (g/24h) o agua (ml/24h) colocada en el comedero o bebedero, respectivamente, y el residuo después de 24 horas.

- Volumen urinario (Vu): Se determinó restando el peso del recipiente vacío del peso del recipiente con la orina recolectada durante 24 horas.

- Concentración urinaria de sodio (Nau): Se midió utilizando un electrodo iónico selectivo que determina el potencial (mV) de sodio en la solución. El electrodo, combinado con un electrodo de referencia, tiene una membrana específica para Na<sup>+</sup> (Glass Micro-Sodium Combination Electrode 9811BN; Thermo Scientific Orion, USA).

Se calibró el electrodo con soluciones de Na<sup>+</sup> de concentraciones conocidas antes de realizar las mediciones.

- Ingesta de sodio (Nai): Se calculó usando la fórmula  $Nai \text{ (mEq/24h)} = Pc \text{ (g/24h)} \times Nac \text{ (mEq/g)}$ , donde Pc es el peso de la comida y Nac es la concentración de Na en la comida.

- Excreción urinaria de sodio (ExUNa): Se obtuvo mediante la fórmula  $ExUNa \text{ (mEq/24h)} = Vu \text{ (L/24h)} \times Nau \text{ (mEq/L)}$ .

- Balance de sodio (BNa): Se calculó como la diferencia entre la ingesta diaria de Na y su excreción urinaria en 24 horas, sin considerar la excreción fecal de Na, que es mínima. La fórmula es  $BNa \text{ (mEq/24h/100 g peso)} = Nai - ExUNa$  (ambos, mEq/24h/100 g peso).”

### **Medida de la presión arterial en rata anestesiada. Extracción de muestras de sangre, tejidos y eutanasia.**

El día del experimento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg) intraperitoneal y se les colocó sobre una manta termostataada para mantener la temperatura corporal a 37°C. El pentobarbital se preparó a partir de una solución comercial de 200 mg/ml (Dolethal, CIMAVet) y diluyéndola en tampón fosfato estéril. Se canuló la arteria femoral con una cánula de polietileno (PE-50) para la determinación directa de presión arterial media (PAM), sistólica, diastólica y frecuencia cardíaca (sistema de registro PowerLab, ADInstruments). Tras el registro de la presión durante unos 5 minutos, se procedió a realizar una laparotomía, para la obtención de muestras de sangre y tejidos (aorta, corazón y riñón). Tras la extracción de sangre y previo a la extracción de tejidos, se realizó la eutanasia.

## **Estudio de la reactividad vascular en anillos aórticos de rata.**

“Este protocolo se ha realizado siguiendo la metodología empleada en multitud de estudios de nuestro laboratorio (Tesis Doctoral Paredes MD 2015; Paredes 2018a; Paredes 2018b). En los animales en los que se realizó el estudio de la reactividad vascular, la aorta torácica se extrajo rápidamente tras la eutanasia y se colocó en una solución de Krebs oxigenada con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; Sociedad Española del Oxígeno, Murcia) a 37°C y pH 7,4, donde se limpió cuidadosamente de grasa y tejidos circundantes. La composición de la solución Krebs fue: NaCl 128 mM, KCl 4.7 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5 mM, EDTA 0.01 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12.5 mM y glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 11 mM. Una vez limpia, la aorta se cortó en 4 anillos de aproximadamente 4 mm de longitud. Cada anillo se montó en un dispositivo que consistía en dos alambres finos de acero inoxidable: uno fijo a la pared de la cámara y otro, paralelo al primero, conectado a un transductor isométrico de señales (TRI202P, Panlab, Barcelona). Este transductor medía los cambios en la tensión (en gramos) causados por las contracciones isométricas de los anillos. Las señales se amplificaron utilizando un amplificador FE228 y se registraron mediante un sistema de adquisición de datos (PowerLab 8/30) conectado a un ordenador, con análisis realizado por el software LabChart 8.0 (FE228, PowerLab 8/30 y LabChart 8.0 ADInstruments, Oxford, UK). Cada anillo se colocó en un baño de 10 ml de solución Krebs burbujeada con carbógeno, en un aparato (LE 01004, Panlab, Barcelona) con doble pared de vidrio que formaba un circuito cerrado para el paso de agua a 37°C, gracias a un termostato. El burbujeo continuo de carbógeno aseguraba una adecuada oxigenación y mantenimiento del pH fisiológico (7,3-7,4). Los baños también contaban con un sistema de aspiración para el lavado de

las preparaciones. Los anillos se tensionaron inicialmente a 2 gramos con un tornillo micrométrico y se mantuvieron en estabilización durante 60 minutos antes de los experimentos, con renovación del líquido cada 15 minutos y reajuste continuo de la tensión basal a 2 g, considerada óptima para la contracción. Tras la estabilización, se realizaron dos curvas dosis-respuesta consecutivas: una para vasoconstricción y otra para vasodilatación.”

“En el primer experimento, se administran dosis progresivas y acumulativas de L-fenilefrina, desde  $10^{-9}$  M hasta  $10^{-4}$  M. Tras cada dosis, se realizan lavados con solución Krebs para eliminar el fármaco, seguido de un período de estabilización de 30 a 40 minutos hasta restablecer la tensión basal óptima de 2 gramos. En los grupos tratados con el inhibidor de la NOS, L-NAME, se añade a los baños a una concentración de  $10^{-4}$  M de manera aguda, 30 minutos antes de realizar la curva correspondiente.”

“Para la curva de vasodilatación, se aplican concentraciones crecientes y acumulativas de acetilcolina, de  $10^{-9}$  M a  $10^{-4}$  M, después de una fase de vasoconstricción inducida por una dosis de fenilefrina que genera aproximadamente el 70% de la contracción máxima. Las diferentes concentraciones de acetilcolina se administran una vez que se ha alcanzado la respuesta máxima a la dosis anterior. Esto permite evaluar la vasodilatación dependiente del endotelio. Al concluir la curva de acetilcolina, se agrega nitroprusiato sódico a  $10^{-4}$  M para medir la vasodilatación independiente del endotelio. La respuesta de contracción a la fenilefrina se mide en gramos en relación con el valor basal de 2 g, mientras que la relajación inducida por acetilcolina y nitroprusiato sódico se expresa como un porcentaje de la contracción máxima provocada por fenilefrina. Además, se calculan las dosis efectivas al 50%

(DE50) para fenilefrina y acetilcolina mediante un análisis de regresión individual para cada anillo.”

### **Muestras de sangre, plasma y tejido.**

“Este protocolo se ha realizado siguiendo la metodología empleada en multitud de estudios de nuestro laboratorio (Tesis Doctoral Paredes MD 2015; Paredes 2018a; Paredes 2018b). Se obtuvo una muestra de sangre de 80-100  $\mu$ L anticoagulada (EDTA) y se realizó un hemograma utilizando un analizador hematológico adaptado a medidas en pequeños animales (NK6550 Analizador Hematológico, Nihon Kohden Corporation). Los parámetros medidos fueron recuento de glóbulos rojos, blancos y plaquetas, volumen plaquetario medio y hemoglobina. “

“En cuanto a los tejidos, además de la aorta torácica para el estudio de la reactividad vascular, se extrajeron también la aorta abdominal, el corazón y riñones para el análisis histopatológico posterior. Además se tomaron muestras adicionales de aorta abdominal, riñón, plasma y orina, que se almacenaron en un congelador a -80°C para su uso futuro”.

### **Estudio de la agregación plaquetaria.**

“Este protocolo se ha realizado siguiendo la metodología empleada en multitud de estudios de nuestro laboratorio (Tesis Doctoral Paredes MD 2015; Paredes 2018a; Paredes 2018b). El estudio de la agregación plaquetaria en respuesta

a agonistas se realizó en plaquetas lavadas. Para ello se obtuvo, de la aorta abdominal, una muestra de sangre directamente en una solución anticoagulante de ACG (ácido cítrico 52 mM, citrato sódico 80 mM y glucosa 180 mM), a una dosis de 850  $\mu$ L en 5mL de sangre). A esta sangre con ACG se le añadió apirasa (5 $\mu$ /mL de una solución de 40  $\mu$ g/m) y prostaglandina E1 (10  $\mu$ L/mL de una solución 50  $\mu$ M, para prevenir la activación de las plaquetas durante la centrifugación. La muestra de sangre ACG se deja reposar 15 minutos y seguidamente es centrifugada a 180g durante 10 min (Digicen 21R, OrtoAlresa, Madrid, España), obteniéndose el plasma rico en plaquetas o PRP. El PRP se vuelve a centrifugar a 800g durante 15 min para precipitar las plaquetas y posteriormente son lavadas 2 con tampón hepes (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glucosa, 35 mM HEPES, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42 mM), al que se le añadió 0,5 mM de EGTA, albúmina (3,5 mg/mL) y se ajustó el pH a 6,5. Las plaquetas lavadas fueron resuspendidas en tampón hepes sin Ca<sup>2+</sup>, al que se le añadió albúmina (1 mg/mL) y se ajustó el pH a 7,4. La concentración de plaquetas en los estudios fue de 2x10<sup>8</sup> plaquetas/mL, ajustadas mediante la medida de su concentración con el analizador hematológico. Las plaquetas se mantenían en todo momento a 19°C en un baño termostataado. El Ca<sup>2+</sup> se añadió justo antes de iniciarse los experimentos. Se estudió la respuesta de agregación a dos agonistas plaquetarios: adenosín difosfato o ADP (0,75; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20  $\mu$ M) y colágeno (0,75; 1,25; 2,5 y 5  $\mu$ M) en un agregómetro óptico de 2 canales (Chronolog, modelo 700, Chronolog Corporation, Havertown, PA 19083, Inglaterra).”

### **Compuestos químicos**

Todos los compuestos químicos empleados en el estudio fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España), a excepción de aquellos casos específicos

que se mencionan. Para el estudio de reactividad vascular, la acetilcolina, fenilefrina, nitroprusiato sódico y L-NAME se disolvieron en agua destilada y se almacenaron congelados a -80°C. Estos compuestos se diluyeron en solución Krebs para obtener las concentraciones requeridas el día de su uso, y la concentración final se expresa como la concentración en el baño de órganos.

### **Estudio histopatológico**

Las muestras de tejido cardíaco, aorta abdominal y riñón fueron fijadas en formalina tamponada al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación y posteriormente mantenidas a 4°C en alcohol etílico al 70% hasta su procesamiento. Se seleccionó una sección transversal de 0,5 cm de riñón que incluía cortical y medular, tres secciones transversales de tejido cardíaco a diferentes alturas de cavidades ventriculares y una sección transversal de la aorta abdominal.

El procesamiento de las muestras se realizó por la Plataforma de Patología del Instituto de Investigación Biosanitaria Pascual Parrilla (IMIB). Tras confeccionar un bloque de parafina, las muestras fueron cortadas mediante un microtomo rotatorio Shandon Finesse 325 a 4 micras de espesor. Brevemente, las secciones tisulares fueron recogidas en baño de flotación, depositadas sobre portaobjetos y secadas en estufa a 37°C durante 24 h. Las secciones tisulares fueron teñidas con tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Además, se cuantificó el grado de fibrosis renal mediante la tinción de Sirius Red.

Para cuantificar los diversos parámetros como el área de fibrosis, grosor de la capa media arterial, etc., se utilizó software de análisis de imágenes. Concretamente, SliveViewer 2.7 v01 (3DHISTECH Ltd, Hungary) y Fiji (ImageJ). SliveViewer es un

software gratuito de captura y procesamiento de imágenes, que se usa para visualizar y gestionar imágenes histológicas digitalizadas, permitiendo medir distancias y áreas en una sección de tejido con alta resolución. Fiji (ImageJ) es un software gratuito y de código abierto ampliamente utilizado en investigación biomédica para analizar imágenes microscópicas, en este caso obtenidas con SliveViewer. Fiji se utilizó para cuantificar la fibrosis renal.

Se valoraron los siguientes parámetros histológicos, que pueden reflejar el daño causado por la hipertensión y la posible reversión con el tratamiento (figuras 2 y 3):

- **Corazón.** Se midió el “Espesor (grosor) del tabique interventricular” medido en la zona media de las cavidades cardíacas y el “Índice de remodelado” del ventrículo izquierdo, expresado como ratio espesor de la pared interventricular/área total ventricular.
- **Aorta torácica.** Se midió el “Espesor de la pared aórtica” (de la capa media) y el “Índice de remodelado” vascular”, expresado como ratio espesor de la pared/área total aórtica y como Índice de grosor relativo ( $2 \times \text{grosor pared} / \text{diámetro luminal}$ ).
- **Riñón.** Como marcador de daño renal crónico se midió el grado de fibrosis renal cortical, mediante la tinción de Red Sirius. Concretamente el porcentaje de “glomerulosclerosis y de fibrosis túbulointersticial y vascular/perivascular”.

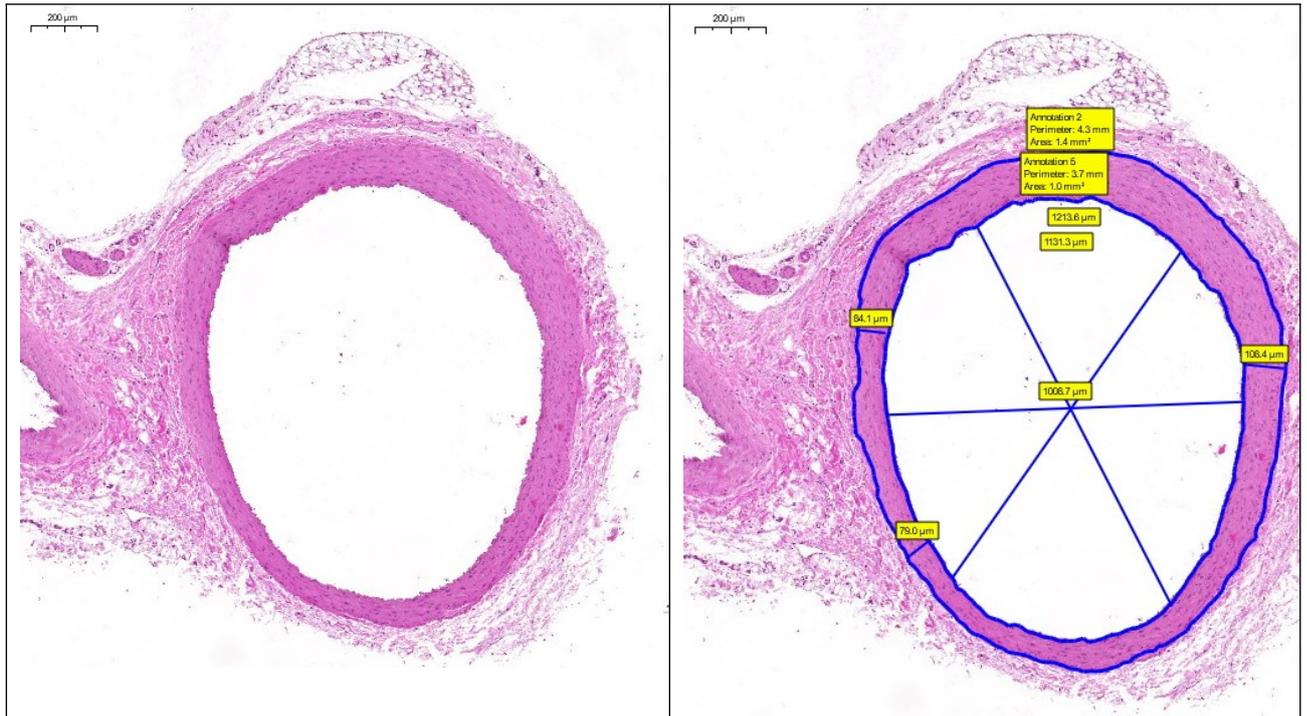
#### **Cálculo del Índice de Remodelado en corazón y aorta:**

- Grosor de la pared: Mide el espesor de la pared del ventrículo o la aorta. Para el ventrículo, mide desde el endocardio hasta el epicardio; para la aorta, mide el

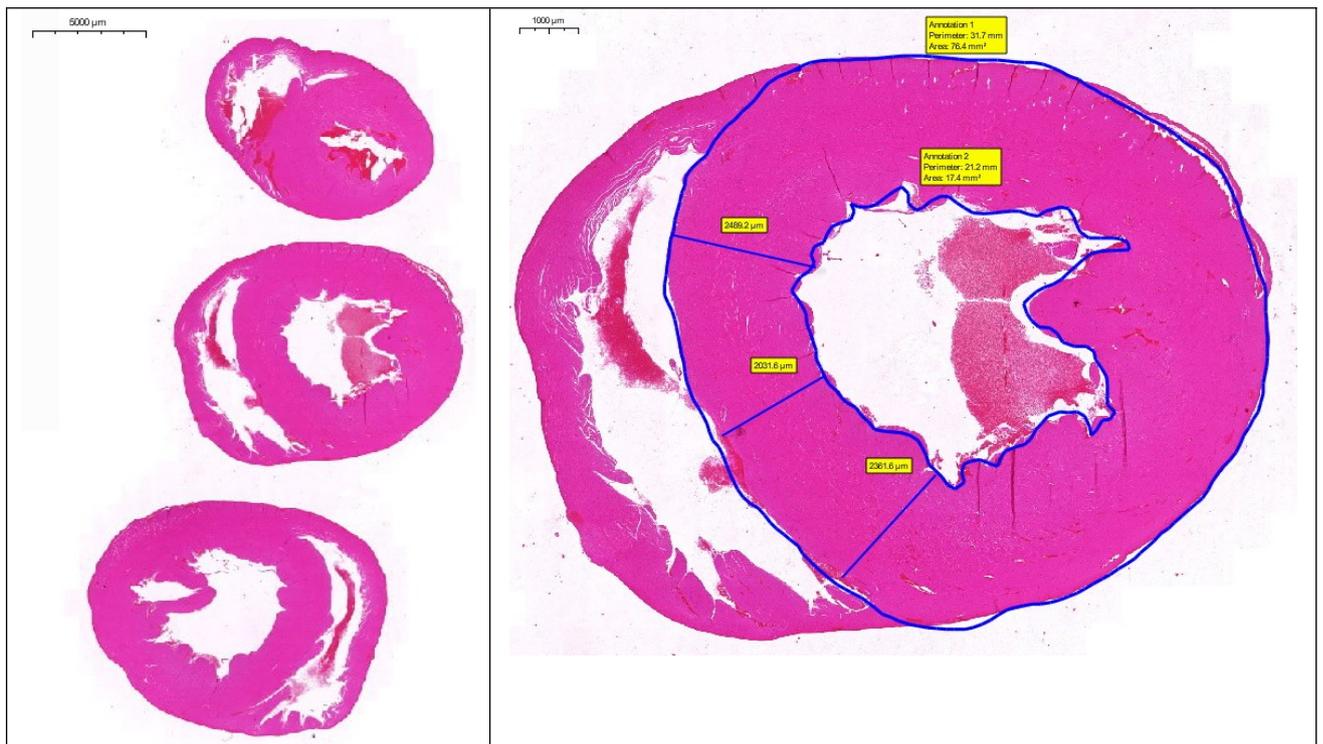
espesor de la túnica media. Se tomaron 3 medidas en cada caso y se calculó la media.

- Área del lumen: Mide el área del lumen (espacio interno) del ventrículo o la aorta.
- Área de la pared: Calcula el área de la pared muscular del ventrículo o de la aorta, excluyendo el lumen. Resulta de restar el área externa menos el área luminal.
- Diámetro luminal de la aorta: Es el diámetro del lumen del vaso, medido de un borde interno a otro borde interno. Se tomaron 3 medidas de cada y se calculó la media.
- El “Índice de remodelado” del ventrículo izquierdo, se calculó usando la relación entre el área de la pared y el área total (suma de la pared más el área del lumen):  
$$\text{Ratio espesor de la pared/luz} = \frac{\text{Área de la pared}}{\text{Área de la pared} + \text{Área del lumen}}$$
- El “Índice de remodelado” en la aorta, se calculó de dos formas, con la ratio espesor de la pared/luz =  $\frac{\text{Área de la pared}}{\text{Área de la pared} + \text{Área del lumen}}$  y con el índice de grosor relativo =  $2 \times \text{grosor pared aórtica} / \text{diámetro luminal}$ .

Un aumento en el índice de remodelado sugiere remodelado concéntrico donde se produce hipertrofia o engrosamiento de la pared en relación con el diámetro del vaso, común en hipertensión arterial. Una disminución del índice de remodelado, mientras que una disminución puede indicar atrofia o adelgazamiento del tejido (remodelado excéntrico), lo que puede ocurrir en ciertas enfermedades vasculares crónicas, donde hay dilatación del lumen sin aumento proporcional del grosor de la pared.



**Figura 2.** Medición del espesor de la pared, diámetro luz y áreas externa y luminal en la aorta ABDOMINAL de una rata control (Hematoxilina 5x, respectivamente).

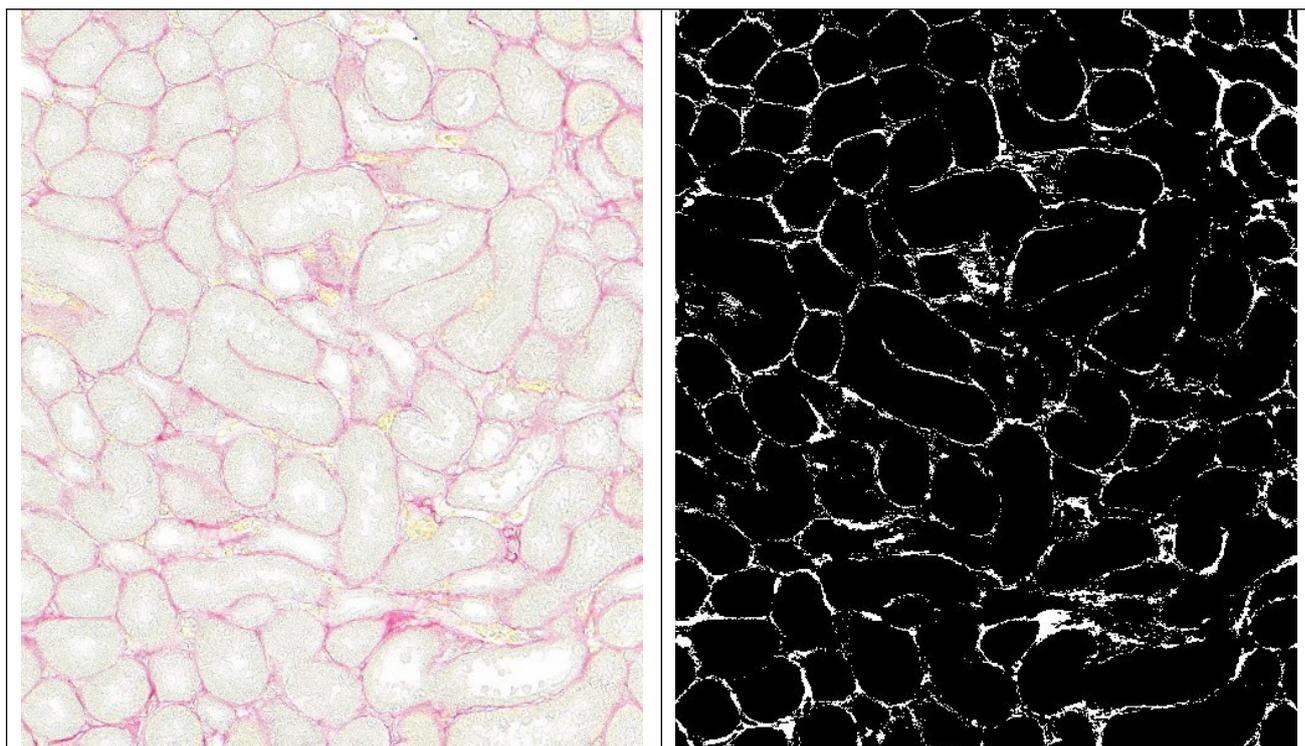


**Figura 3.** Medición del espesor del tabique interventricular y áreas externa y luminal en el ventrículo izquierdo, corte medio de una rata control (Hematoxilina 0,3x y 1,0x, respectivamente).

## Medida de la fibrosis renal

La tinción de rojo Sirio (Sirius Red) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar y cuantificar la fibrosis en tejidos, como el riñón, debido a su alta especificidad para el colágeno, especialmente los tipos I y III, los cuales son componentes clave de la fibrosis. Se obtuvieron imágenes de túbulos (20x), glomérulos (63x) y vasos (100x) con el software SlideViewer 2.7 v01, realizando 6 medidas de cada zona/riñón. Con el software de análisis de imágenes (Fiji) se cuantificó la proporción de área teñida de rojo (% de fibrosis) en cada imagen. Para ello, se realizó la deconvolución de las imágenes mediante el plugin "Colour Deconvolution". La imagen del canal rojo resaltará el colágeno teñido con Rojo Sirio, mientras que los canales verde y azul mostrarán otros componentes tisulares y colores residuales. Posteriormente se ajustaron los umbrales ("Set threshold") para segmentar el colágeno teñido de rojo eliminando ruido de fondo (componentes no deseados). Se midió el área teñida y se expresó como un porcentaje del área total del campo de visión, lo que proporciona una medida cuantitativa del grado de fibrosis (figura 4). Para el cálculo del porcentaje de fibrosis se usó esta fórmula:

$$\text{Porcentaje de Fibrosis} = \frac{\text{Área del colágeno}}{\text{Área total}} \times 100$$



**Figura 4.** Ejemplo de medición del % de fibrosis tubular en una imagen de la corteza renal (Rojo Sirio, 20x).

### **Métodos estadísticos**

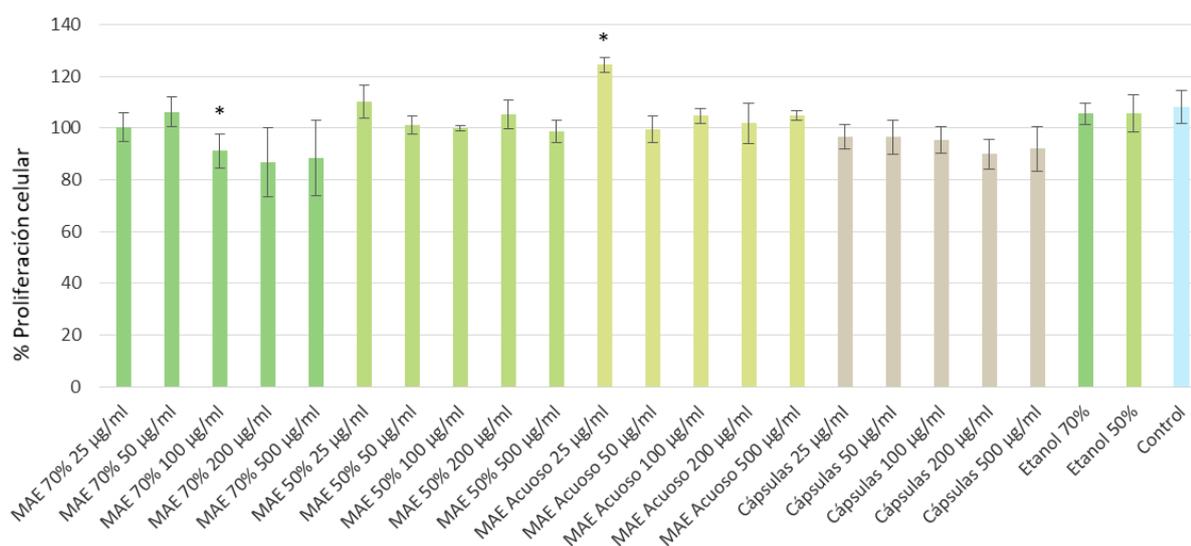
Los resultados se presentan como la media aritmética y la desviación estándar de la media. Para evaluar las diferencias dentro de un mismo grupo en los estudios de reactividad vascular, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples. Cuando se obtuvieron resultados significativos, se aplicó el test de Duncan para identificar las diferencias estadísticas entre pares. La respuesta contráctil a la fenilefrina se muestra en gramos, mientras que las respuestas de relajación a la acetilcolina se expresan como un porcentaje de la contracción inducida por fenilefrina. Los valores de la dosis efectiva del 50% (ED50) se calcularon mediante análisis de regresión para cada anillo por separado, y las diferencias entre grupos se evaluaron utilizando la prueba t de Student. Las diferencias entre grupos se

analizaron mediante ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples, y si era necesario, se realizó un test de Duncan posterior. Para otras comparaciones entre grupos, se utilizó el análisis de varianza de una sola vía. En los experimentos de cultivo celular, se compararon las medias utilizando ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo en todos los análisis.

## Resultados

### Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad y/o citotoxicidad de los diferentes extractos de hoja de morera.

Se estudió el efecto de los distintos extractos de hoja de morera desarrollados sobre el crecimiento y proliferación celular, utilizando para ello la línea de fibroblastos de ratón L929. Mediante el ensayo del PB, se comparó la proliferación de las células expuestas a las distintas muestras de estudio, con las células control, sin ningún tipo de exposición a ningún agente externo al cultivo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos de este ensayo.



**Figura 5.** Porcentajes de proliferación de la línea celular L929 tras la exposición a los diferentes extractos de morera de estudio (MAE), con distintos agentes extractantes (etanol al 50% y 70%, y en acucoso), comparados con cápsulas comerciales de extracto de morera, y a distintas concentraciones. Los asteriscos (\*) muestran resultados estadísticamente distintos al control de las células creciendo sin exposición a ningún agente.

Todas las muestras ensayadas resultaron en un crecimiento celular similar al

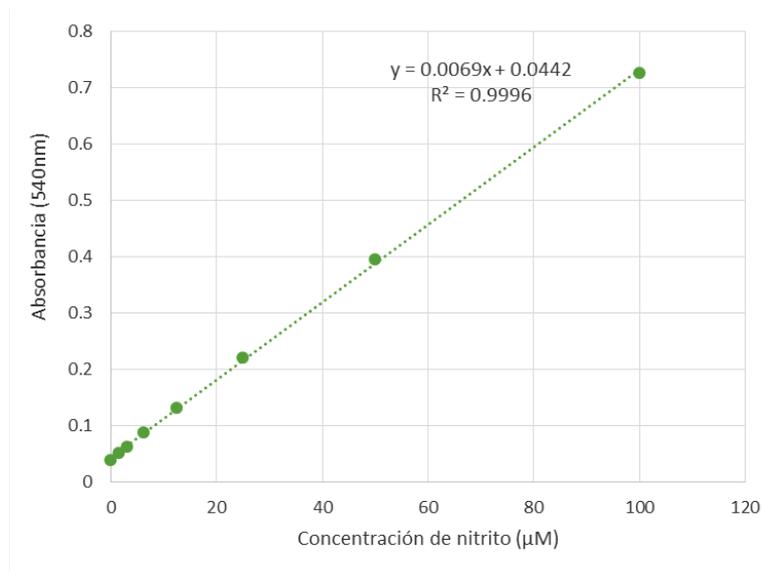
control, a excepción de las células creciendo en exposición al extracto de morera en acuoso a la concentración de 25 µg/ml que tuvieron una mayor proliferación con respecto a las células control y el caso de las células creciendo expuestas a 100 µg/ml del extracto etanólico de morera, con etanol al 70% como agente extractante, las cuales presentaron un porcentaje de proliferación estadísticamente menor a las células control. No obstante, este menor porcentaje de crecimiento celular en esta muestra de MAE 70% 100 µg/ml fue de un 91%, muy por encima del 70% de proliferación celular que se considera el umbral para hablar de citotoxicidad (ISO 10993-5:2009). En definitiva, ninguno de los extractos desarrollados presentó citotoxicidad celular, así como ninguno de los agentes extractantes, etanol al 70% y al 50%, a concentración similar a la más alta de los tratamientos de estudio (500 µg/ml de MAE).

### **Evaluación *in vitro* de la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de hoja de morera.**

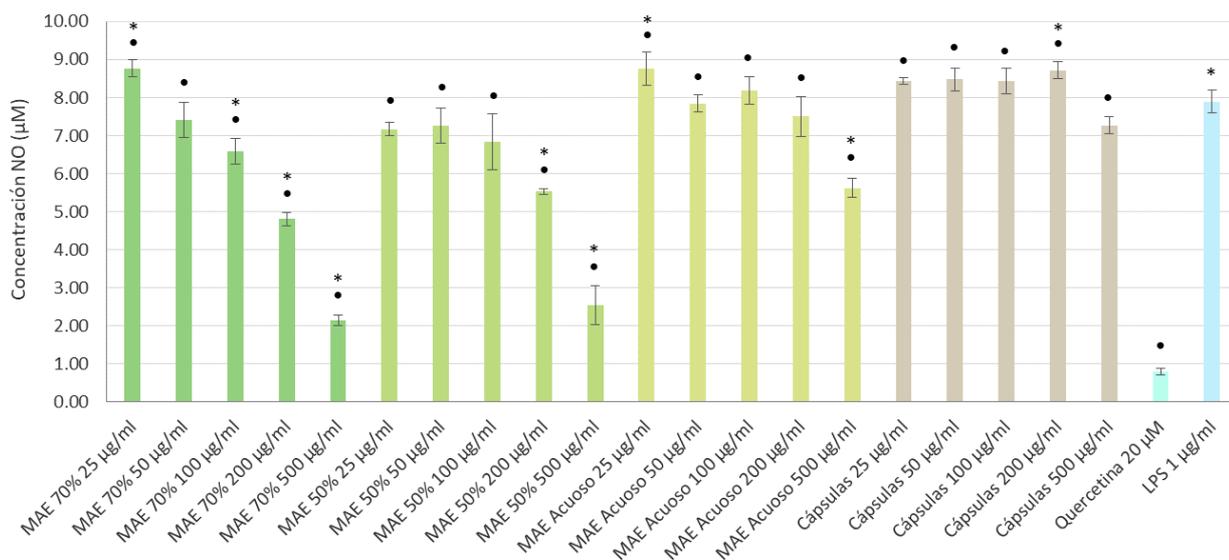
#### **Análisis de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivo celular.**

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los diferentes extractos de morera desarrollados, se analizó la producción celular de NO como respuesta a una inducción de inflamación con LPS en la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7. Debido a su alta inestabilidad en el medio, la producción de NO se cuantificó de manera indirecta midiendo la concentración de nitritos mediante el ensayo con el reactivo de Griess, a partir de una recta estándar de concentración de nitrito de sodio (figura 6). A las 24h de la inducción de la inflamación con LPS y la adición de las

muestras de extractos al cultivo, se analizaron los datos obtenidos.



**Figura 6.** Recta estándar de concentración de nitrito de sodio para ensayo con del reactivo de Griess.



**Figura 7.** Producción de NO en células RAW 264.7 tras la inducción de inflamación con LPS y efecto de la exposición a distintas concentraciones de extractos de morera durante 24h. Se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar. Los asteriscos (\*) muestran resultados estadísticamente distintos entre las distintas muestras y el control positivo de inflamación (LPS) y los puntos (•) muestran resultados estadísticamente distintos entre las distintas muestras y el control positivo de antiinflamación (quercetina)  $p < 0,05$ . Ambos controles (LPS y quercetina) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

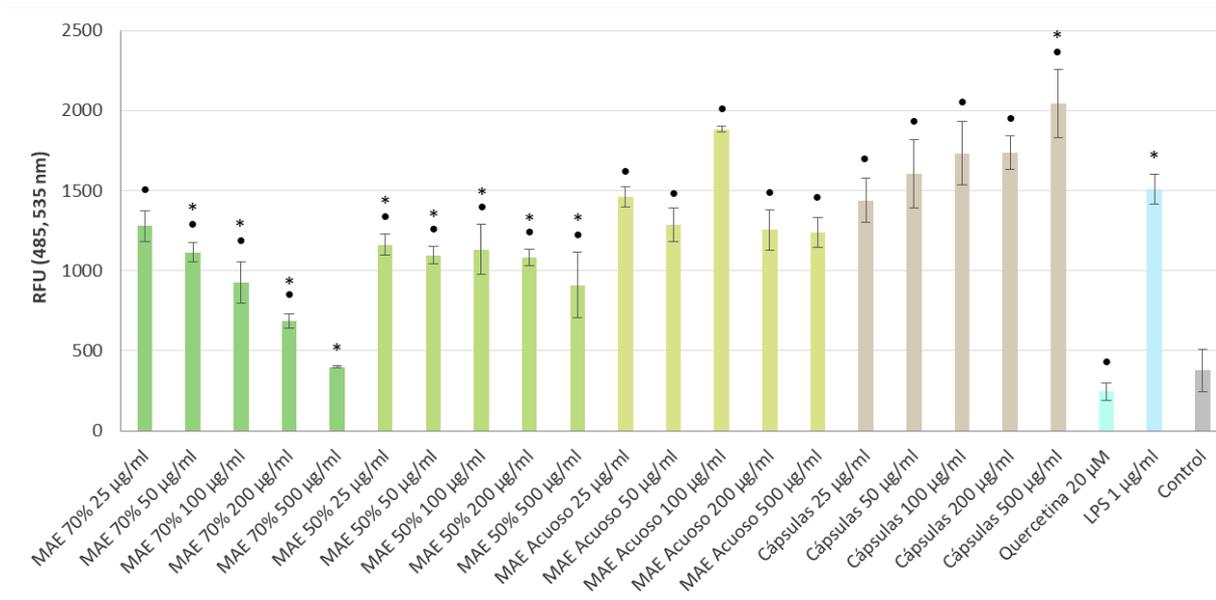
Todos los extractos desarrollados presentaron capacidad antiinflamatoria, reduciendo los niveles de NO de manera dosis-dependiente (figura 7). Esta reducción fue más evidente en el caso de los extractos etanólicos, donde las dosis de 200 y 500 µg/ml disminuyen significativamente la producción de NO con respecto al control positivo de inflamación con LPS y obteniendo el mismo resultado a concentraciones de 100 µg/ml en el caso del MAE 70%. Cabe decir que esta dosis intermedia de 100 µg/ml coincide con la concentración de estudio más ampliamente consensuada en la bibliografía existente.

El extracto en acuoso también mostró cierta capacidad antiinflamatoria a la concentración de estudio de 500 µg/ml, reduciendo los niveles de NO en el medio de cultivo, aunque de manera menos intensa que en el caso de los extractos de morera etanólicos.

Por el contrario, no se advirtió efecto antiinflamatorio alguno, en cuanto a la reducción de la concentración de NO en el cultivo, en los casos de estudio usando las cápsulas comerciales de EE.UU.

### **Ensayo *in vitro* de la actividad antioxidante de los extractos de morera.**

En base a la estrecha relación existente entre la inflamación y el estrés oxidativo, se estudió la capacidad antioxidante de los distintos extractos de morera desarrollados mediante la cuantificación de los niveles de ROS intracelulares, utilizando la línea celular RAW 264.7, estimuladas con LPS y tiñendo las células con DCF-DA a las 24h para obtener las medidas de fluorescencia correspondientes a la producción de ROS. Estos resultados se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** Producción de ROS en células RAW 264.7 tras la inducción de estrés oxidativo con LPS y efecto de la exposición a distintas concentraciones de extractos de morera durante 24h. Se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar de las unidades de fluorescencia relativa (RFU). Los asteriscos (\*) muestran resultados estadísticamente distintos entre las distintas muestras y el control positivo de oxidación (LPS) y los puntos (•) muestran resultados estadísticamente distintos entre las distintas muestras y el control positivo de antioxidación (quercetina)  $p < 0,05$ . Ambos controles (LPS y quercetina) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Ciertamente, las células estimuladas con LPS mostraron niveles aumentados de ROS intracelulares con respecto a las células control sin estímulo, las cuales, mostraron valores estadísticamente similares a las estimuladas con LPS pero expuestas a quercetina 20µM (control positivo de antioxidación). En cuanto a los extractos de hoja de morera estudiados, los resultados obtenidos mostraron la capacidad ambos extractos etanólicos para reducir el estrés oxidativo inducido por un estímulo inflamatorio como es el LPS. Esta reducción en los niveles intracelulares de ROS fue más pronunciada en el caso de las muestras de MAE 70%, siguiendo un patrón dosis-dependiente y alcanzando valores estadísticamente similares al control

sin estímulo y al control con quercetina en el caso de estudio de 500µg/ml. En cambio, tratamiento del cultivo con el extracto acuoso de morera, así como con las cápsulas de extracto comerciales, no mostró disminuciones significativas en la producción de ROS, sino valores similares al control positivo de oxidación con LPS, alcanzando incluso valores más altos en el caso de estudio de las cápsulas a 500µg/ml.

Estos resultados confirman la buena actividad antioxidante exhibida por los extractos etanólicos, destacando la capacidad de la hoja de morera para reducir el estrés oxidativo inducido por un proceso inflamatorio.

### **Análisis de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante de cultivo celular.**

En las tablas 1 a 5 se muestran los resultados obtenidos en los distintos ELISAs utilizados para la medición de IL-1, IL-6 y TNF en respuesta a distintas concentraciones y cantidades de los tipos de MAE usados, así como la respuesta a quercetina y lipopolisacárido (LPS). Las figuras 9 a 11 muestran los mismos datos de manera gráfica.

**Tabla 1.** Niveles de citoquinas en relación a la concentración de MAE 70%.

	<b>MAE 70% 25 µg/ml</b>	<b>MAE 70% 50 µg/ml</b>	<b>MAE 70% 100 µg/ml</b>	<b>MAE 70% 200 µg/ml</b>	<b>MAE 70% 500 µg/ml</b>
<b>IL-1</b>	64,4	56,4	46,8	24,8	1,0
<b>IL-6</b>	301,4	150,1	81,8	9,7	3,5
<b>TNF</b>	5019,3	4437,4	4319,5	4086,4	3009,1

**Tabla 2.** Niveles de citoquinas en relación a la concentración de MAE 50%.

	<b>MAE 50% 25 µg/ml</b>	<b>MAE 50% 50 µg/ml</b>	<b>MAE 50% 100 µg/ml</b>	<b>MAE 50% 200 µg/ml</b>	<b>MAE 50% 500 µg/ml</b>
<b>IL-1</b>	60,9	63,7	56,6	51,9	13,7
<b>IL-6</b>	288,8	252,7	212,7	142,1	23,4
<b>TNF</b>	4442,6	4028,8	3907,1	3719,5	3559,3

**Tabla 3.** Niveles de citoquinas en relación a la concentración de MAE Acuoso.

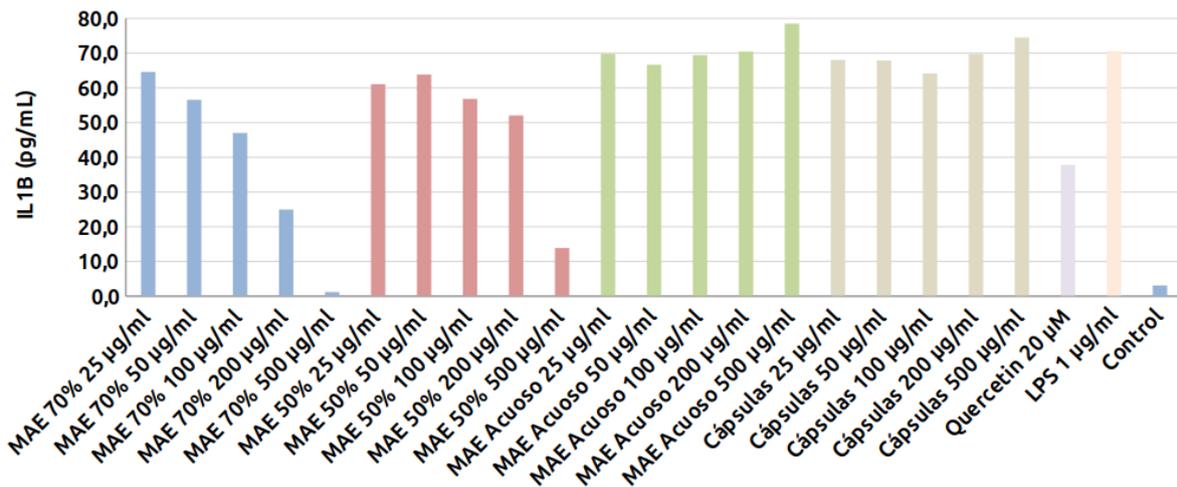
	MAE Acuoso 25 µg/ml	MAE Acuoso 50 µg/ml	MAE Acuoso 100 µg/ml	MAE Acuoso 200 µg/ml	MAE Acuoso 500 µg/ml
<b>IL-1</b>	69,6	66,5	69,2	70,3	78,3
<b>IL-6</b>	426,5	367,3	354,9	320,1	292,3
<b>TNF</b>	4254,4	3906,4	3790,0	3843,1	3795,5

**Tabla 4.** Niveles de citoquinas en relación a la concentración de cápsulas.

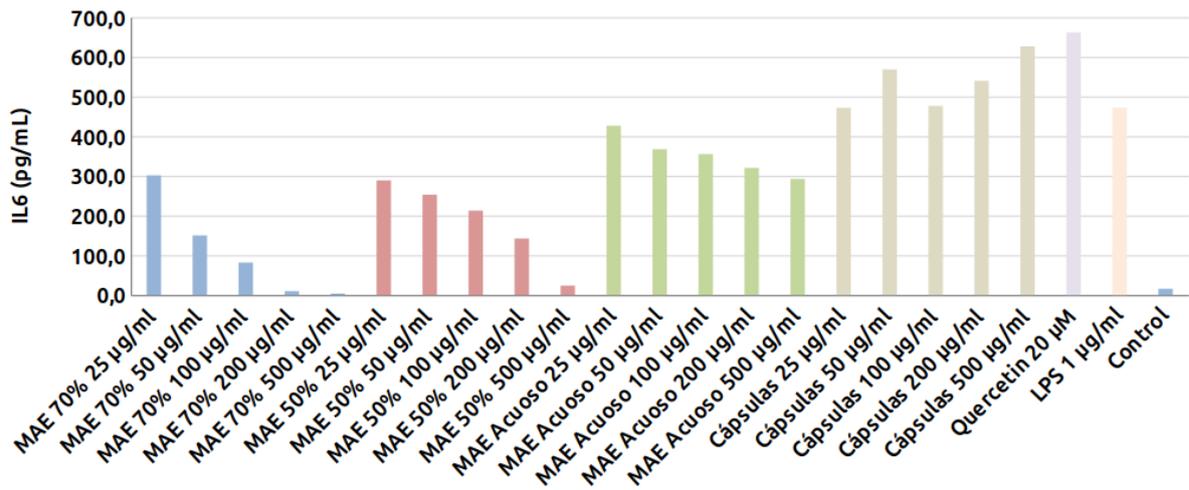
	Cápsulas 25 µg/ml	Cápsulas 50 µg/ml	Cápsulas 100 µg/ml	Cápsulas 200 µg/ml	Cápsulas 500 µg/ml
<b>IL-1</b>	67,9	67,7	64,0	69,6	74,3
<b>IL-6</b>	471,5	568,4	476,5	539,7	626,7
<b>TNF</b>	3693,1	3765,8	3710,9	3661,8	3661,8

**Tabla 5.** Niveles de citoquinas en tres situaciones experimentales.

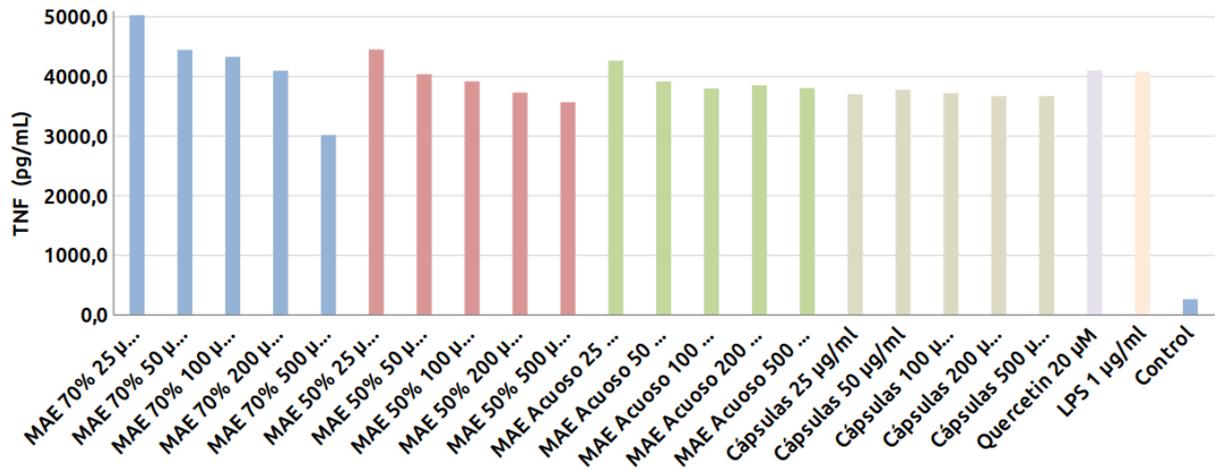
	Quercetin 20 µM	LPS 1 µg/ml	Control
<b>IL-1</b>	37,6	70,4	2,9
<b>IL-6</b>	661,4	471,9	15,7
<b>TNF</b>	4089,3	4073,5	255,0



**Figura 9.** Producción de IL-1 en las distintas situaciones experimentales.



**Figura 10.** Producción de IL-6 en las distintas situaciones experimentales.

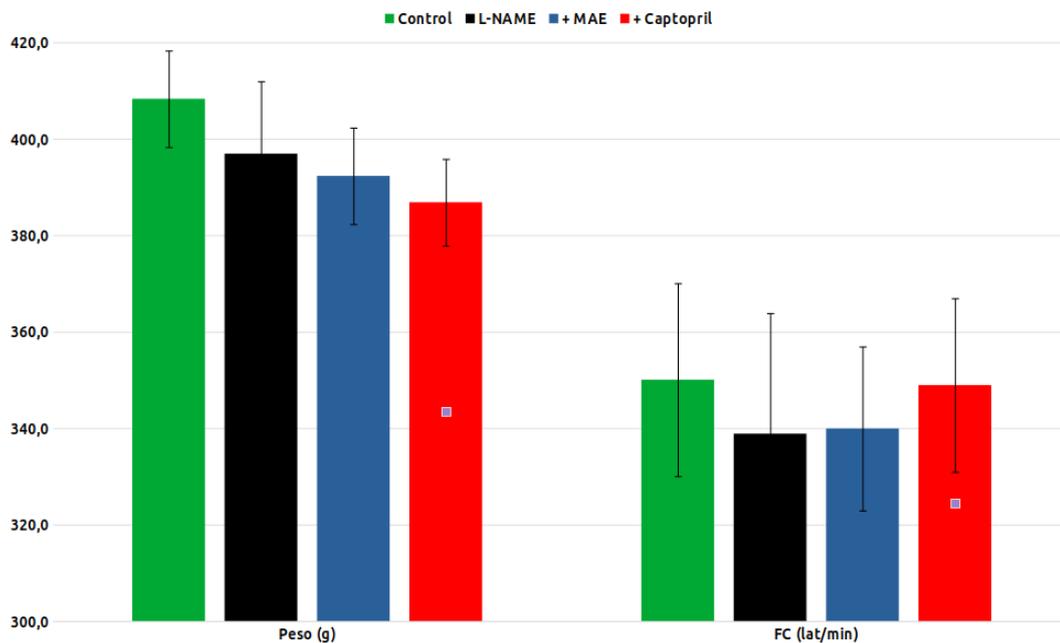


**Figura 11.** Producción de TNF en las distintas situaciones experimentales.

### Presión arterial.

A continuación se presentan los datos de las ratas que durante 6 semanas reciben NAME (100ug/Kg/día) o placebo en el agua de bebida (Control) o NAME + el extracto de *Morus alba* (MAE) (100 mg/kg/día por gavaje) y Name+Captopril. En la

figura 12, se muestra el peso de los animales en el momento del experimento, así como la frecuencia cardíaca. No hubo diferencias significativas entre grupos.



**Figura 12.** Peso corporal y frecuencia cardíaca en los grupos experimentales.

En la figura 13, se observa la PA media (PAM), así como la PA sistólica (PAS) y PA diastólica (PAD) en los grupos experimentales. Como se ve, el tratamiento crónico con L-NAME indujo un fuerte aumento de la PAM, PAS y PAD, mientras que el tratamiento simultáneo con MAE o Captopril lo redujeron en gran medida, de forma significativa, aunque sin alcanzar los valores del grupo control, en el caso del grupo tratado con el extracto MAE.

El tratamiento agudo (tres días) con MAE redujo ligera y significativamente la presión arterial en los animales crónicamente tratados con L-NAME ( $156,9 \pm 19,9$  vs  $143,7 \pm 10,7$  mmHg), sin que tuviera efecto en los animales controles ( $113,4 \pm 9,9$  vs  $115,5 \pm 10,2$ ).

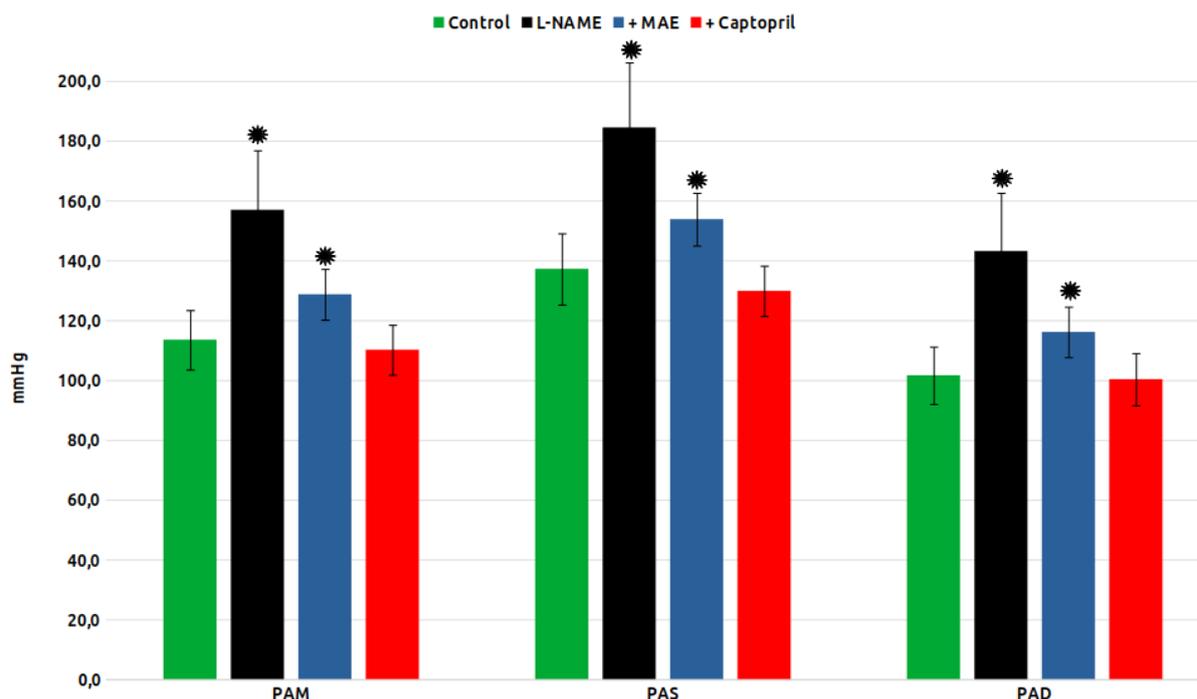


Figura 13. Presión arterial media (PAM), sistólica y diastólica en los grupos experimentales (\*,  $p < 0.05$  vs control).

### Hemograma.

La tabla 6 muestra los hemogramas de los grupos experimentales. No hubo diferencias significativas.

**Tabla 6.** Hemograma en los grupos experimentales.

	$10^3/\mu\text{L}$ Leucocitos	$10^6/\mu\text{L}$ Eritrocitos	g/dL Hb	% Hto	fL VCM	pg HCM	$10^3/\mu\text{L}$ Plaquetas	fL VPM
<b>Control</b>	2,59	8,02	14,96	43,21	53,96	18,65	638,88	5,58
	0,89	0,52	0,91	2,18	1,46	0,44	109,02	0,17
<b>L-NAME</b>	2,18	8,24	15,26	43,49	52,81	18,54	647,38	5,58
	0,81	0,34	0,68	1,56	0,81	0,74	70,46	0,21
<b>+ MAE</b>	2,45	7,94	14,72	42,17	53,17	18,57	612,33	5,50
	1,29	0,55	0,68	2,43	1,23	0,53	76,33	0,11
<b>+ Captopril</b>	2,65	8,00	14,85	42,74	53,46	18,57	634,45	5,50
	1,32	0,62	1,14	3,30	2,64	0,85	135,33	0,22
<b>+ MAE agudo</b>	2,63	8,34	15,45	44,85	53,87	18,53	620,67	5,62
	0,67	0,59	1,02	3,02	1,93	0,74	48,21	0,17

## **Reactividad vascular.**

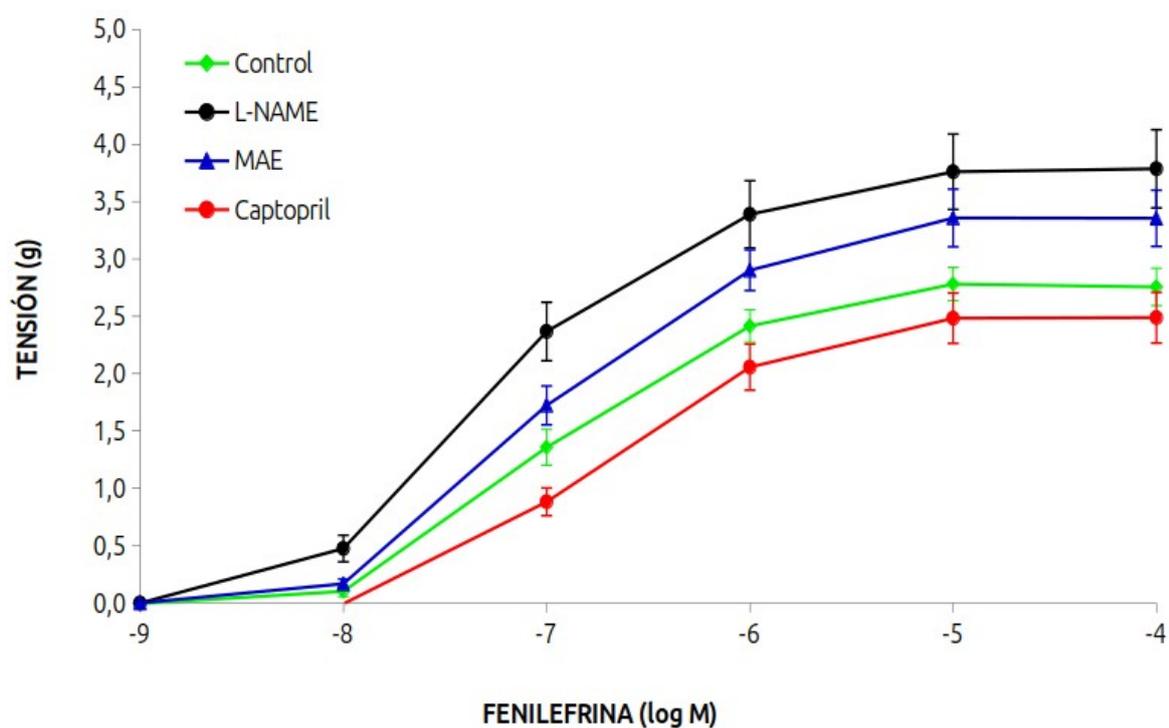
La respuesta vasoconstrictora de los anillos aórticos a la fenilefrina se muestra en la figura 14. Como se observa, la respuesta del grupo tratado crónicamente con L-NAME fue superior a la del control y el tratamiento simultáneo con MAE la redujo, pero todavía fue mayor que la de los animales controles. El tratamiento con captopril redujo la respuesta vasoconstrictora. Los datos de la dosis efectiva 50 (en mM), pD<sub>2</sub> (-M) y respuesta máxima (g) se muestran en la tabla 7.

En la figura 15 y tabla 8 se pueden ver los datos de reactividad vascular a fenilefrina en los grupos experimentales, en los que se añadió de forma aguda L-NAME, para inhibir toda la síntesis de NO. La respuesta fue mucho mayor que en los animales sin tratar (figura 14), aunque las diferencias persistieron de la misma manera.

La figura 16 y la tabla 9 muestran los resultados de la respuesta vasodilatadora a acetilcolina. El grupo control y el de captopril mostraron la máxima respuesta vasodilatadora (cerca al 90%), mientras que la del grupo L-NAME fue de un 10%. El tratamiento con MAE en estos animales mejoró claramente la respuesta vasodilatadora hasta llegar casi al 60%. En el caso de los grupos tratados de forma crónica con L-NAME, la respuesta vasodilatadora estaba prácticamente abolida.

La respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico realizada al final de los experimentos fue prácticamente del 100% sin diferencias entre grupos (figura 17 y tabla 10).

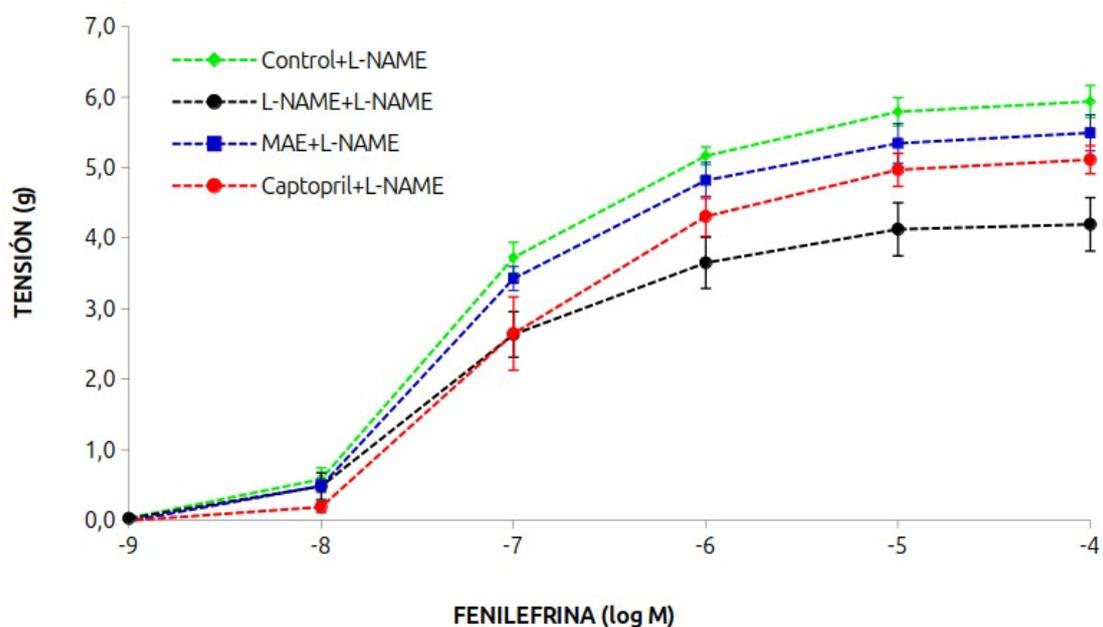
### Figuras de reactividad vascular.



**Figura 14.** Respuesta contráctil a fenilefrina en los grupos experimentales.

**Tabla 7.** Datos de reactividad en respuesta a fenilefrina de los experimentos de la figura 1. Se muestran media y desviación estándar (\*,  $p < 0.05$  vs Control).

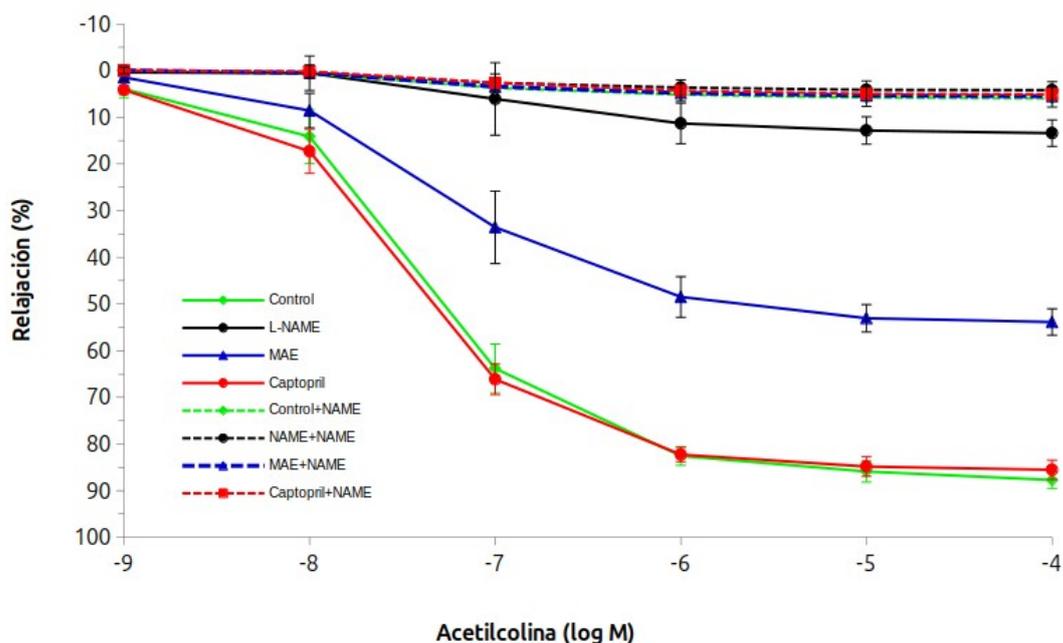
	ED50	pD2	Max
<b>Control</b>	0,499	6,302	2,791
	0,002	0,002	0,145
<b>L-NAME</b>	0,517*	6,288*	3,793*
	0,006	0,005	0,550
<b>MAE</b>	0,508*	6,294*	3,372*
	0,003	0,003	0,316
<b>Captopril</b>	0,496	6,304	2,495
	0,003	0,003	0,176



**Figura 15.** Respuesta contráctil a fenilefrina en los anillos aórticos de los grupos experimentales tratados de forma aguda con L-NAME.

**Tabla 8.** Datos de reactividad en respuesta a fenilefrina de los experimentos de la figura 14. Se muestran media y desviación estándar (\*,  $p < 0.05$  vs Control; +,  $p < 0.05$  MAE vs L-NAME).

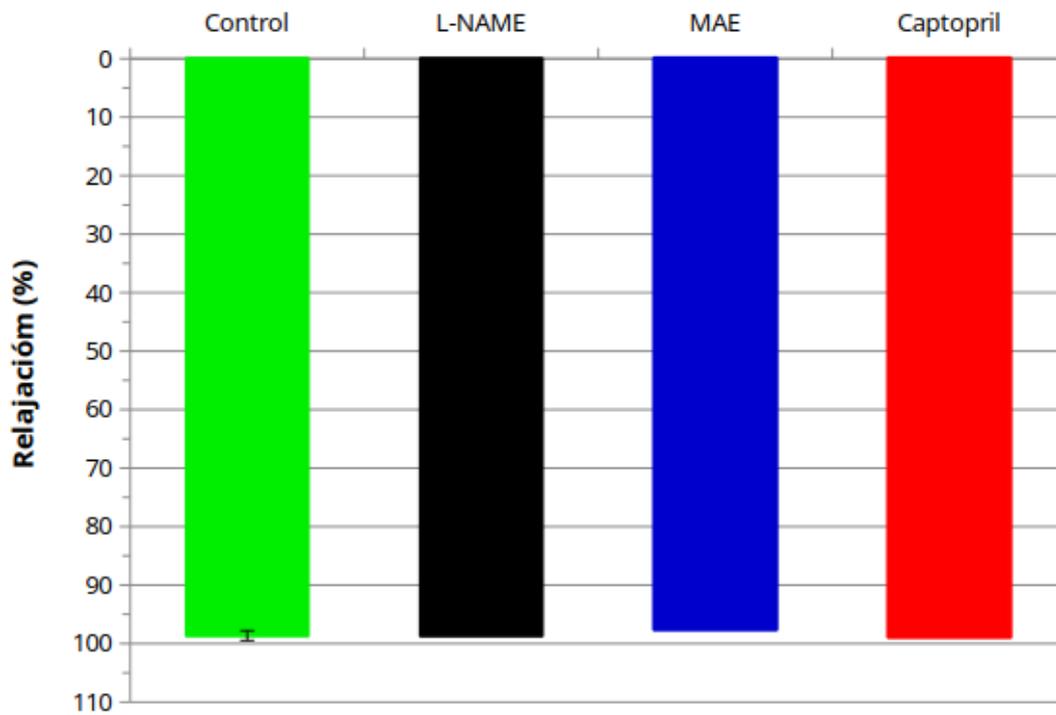
L-NAME agudo	ED50	pD2	Max
Control	0,556	6,257	5,937
	0,006	0,004	0,228
L-NAME	0,523*	6,282*	4,195*
	0,007	0,005	0,618
MAE	0,546+	6,263+	5,494+
	0,004	0,003	0,329
Captopril	0,539*	6,269*	5,112*
	0,003	0,002	0,158



**Figura 16.** Respuesta relajante en respuesta a acetilcolina en anillos de los grupos experimentales y en los tratados de forma aguda con L-NAME.

**Tabla 9.** Datos de relajación en respuesta a acetilcolina de los experimentos de la figura 5. Se muestran media y desviación estándar (\*,  $p < 0.05$  vs Control; +,  $p < 0.05$  MAE vs L-NAME).

	ED50	pD2	Max
<b>Control</b>	8,379	5,079	87,723
	0,518	0,026	1,767
<b>L-NAME</b>	0,743*	6,143*	13,786*
	0,067	0,042	4,771
<b>MAE</b>	2,794*+	5,562*+	54,154*+
	0,224	0,032	3,623
<b>Captopril</b>	7,834	5,110	85,539
	0,416	0,024	1,642
<b>L-NAME agudo</b>			
<b>Control</b>	0,487	6,313	1,591
	0,005	0,005	0,571
<b>L-NAME</b>	0,469*	6,329*	0,842*
	0,005	0,005	0,533
<b>MAE</b>	0,507	6,299	2,618
	0,029	0,023	2,646
<b>Captopril</b>	0,539	6,275	4,598
	0,037	0,028	1,953



**Figura 17.** Respuesta relajante a nitroprusiato sódico en los grupos experimentales.

**Tabla 10.** Media y desviación estándar de la respuesta vasodilatadora a nitroprusiato sódico (%).

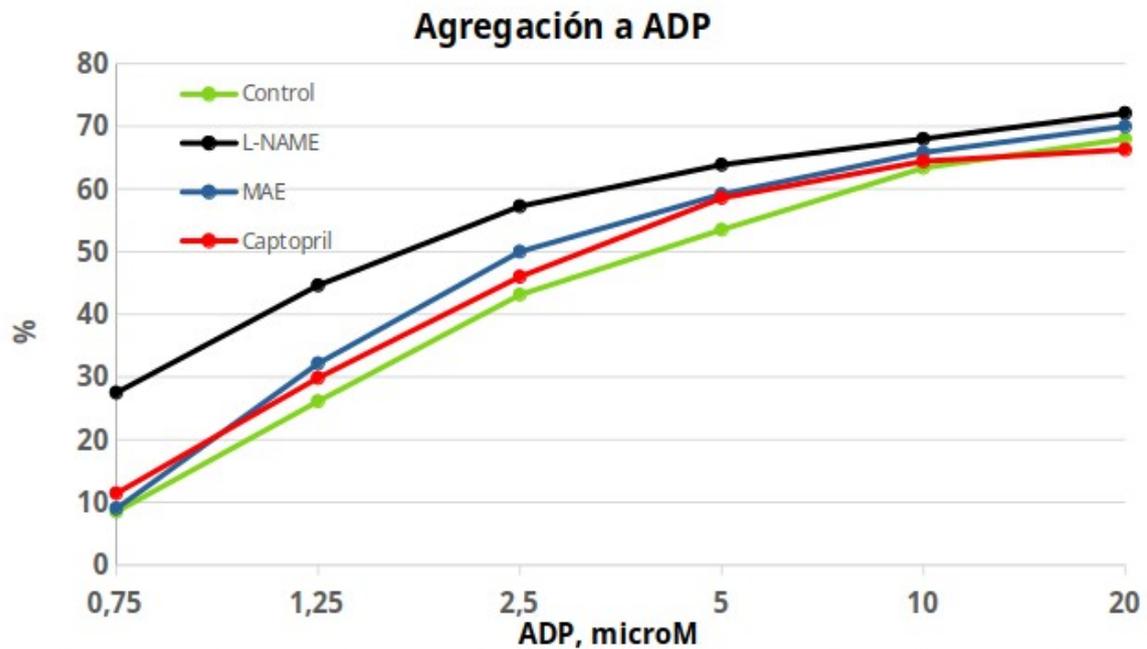
	<b>Control</b>	<b>L-NAME</b>	<b>MAE</b>	<b>Captopril</b>
<b>Media</b>	98,63	98,65	97,53	98,81
<b>DE</b>	0,57	1,19	1,34	0,83

### **Agregación plaquetaria.**

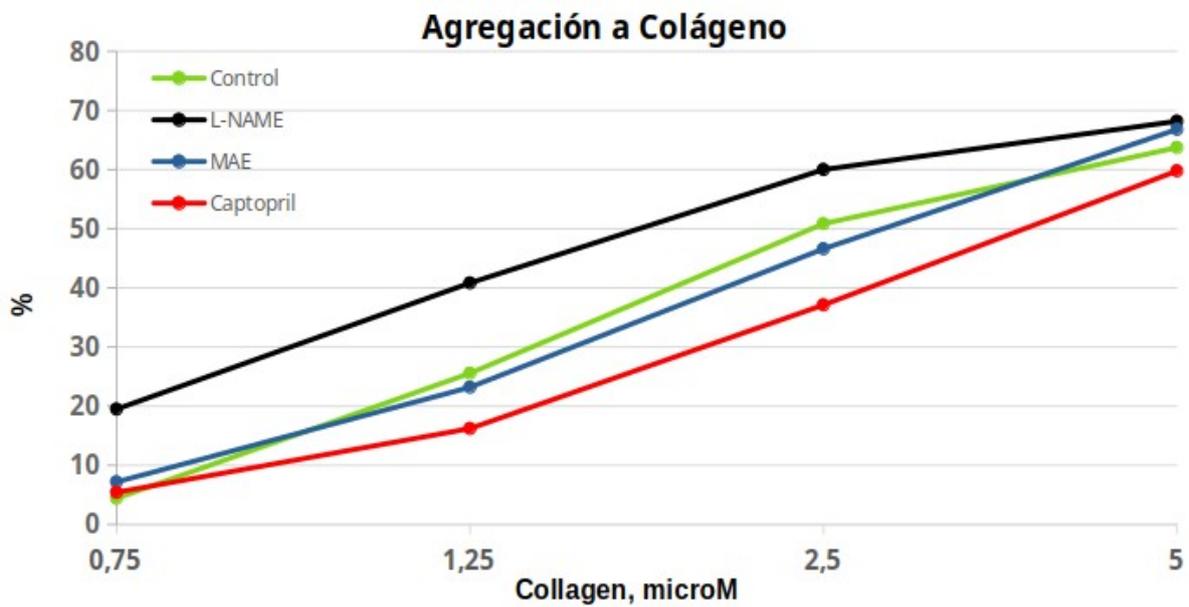
Las figuras 18 y 19 muestran los porcentajes de agregación plaquetaria en los grupos de animales tratados crónicamente con L-NAME, con L-NAME+MAE y con L-NAME+Captopril. Aunque los valores máximos alcanzados son bastante similares, hay diferencias en las respuestas completas, como se evidencia con los respectivos ANOVAs, que dan un resultado significativo entre grupos. Igual ocurre si analizamos las respuestas del área bajo la curva (tablas 11 y 12) y de la pendiente de la curva (tablas 13 y 14). Se decidió no hacer estadística punto por punto lo que daría probablemente muchos resultados, pero de difícil interpretación clínica.

En vez de eso, hemos calculado los datos de ED50 de los distintos grupos para obtener una respuesta más clara, indicativa o no de un cambio de la respuesta global (tabla 15). Sólo el grupo tratado crónicamente con MAE mostró una menor ED50 en relación al grupo control ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas en ninguna otra de las comparaciones.

Finalmente, las figuras 20 y 21 y la tabla 18 muestran la respuesta obtenida al tratar a un grupo de ratas L-NAME con MAE durante 3 días. Se observaron diferencias entre las curvas, aunque ninguno de los parámetros analizados (tablas 18 y 19) mostró diferencias significativas.



**Figura 18.** Curvas de agregación plaquetaria en respuesta a ADP.



**Figura 19.** Curvas de agregación plaquetaria en respuesta a Colágeno.

**Tabla 11.** Área bajo la curva (AUC) de las respuestas de agregación a ADP.

	<b>AUC</b>					
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>Control</b>	24,63	98,76	208,39	276,31	342,75	365,81
	17,46	54,71	42,74	34,89	12,19	21,84
<b>L-NAME</b>	132,93	203,55	296,70	330,30	371,24	389,54
	89,72	87,34	75,36	53,60	41,70	38,12
<b>MAE</b>	37,43	143,15	261,07	320,20	373,37	384,30
	24,16	46,73	29,74	17,94	30,13	12,06
<b>Captopril</b>	23,73	108,23	225,14	306,24	337,91	355,73
	17,54	48,58	43,42	40,65	27,32	25,82

**Tabla 12.** Área bajo la curva (AUC) de las respuestas de agregación a Colágeno.

	<b>AUC</b>			
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>
<b>Control</b>	23,21	113,77	251,87	337,91
	19,05	31,13	22,71	53,63
<b>L-NAME</b>	102,90	214,72	328,52	384,02
	51,91	64,17	57,21	51,92
<b>MAE</b>	53,90	132,68	243,58	370,14
	18,65	54,35	63,82	30,10
<b>Captopril</b>	22,51	79,26	175,30	304,77
	12,44	28,94	59,95	47,29

**Tabla 13.** Pendiente de las respuestas de agregación a ADP.

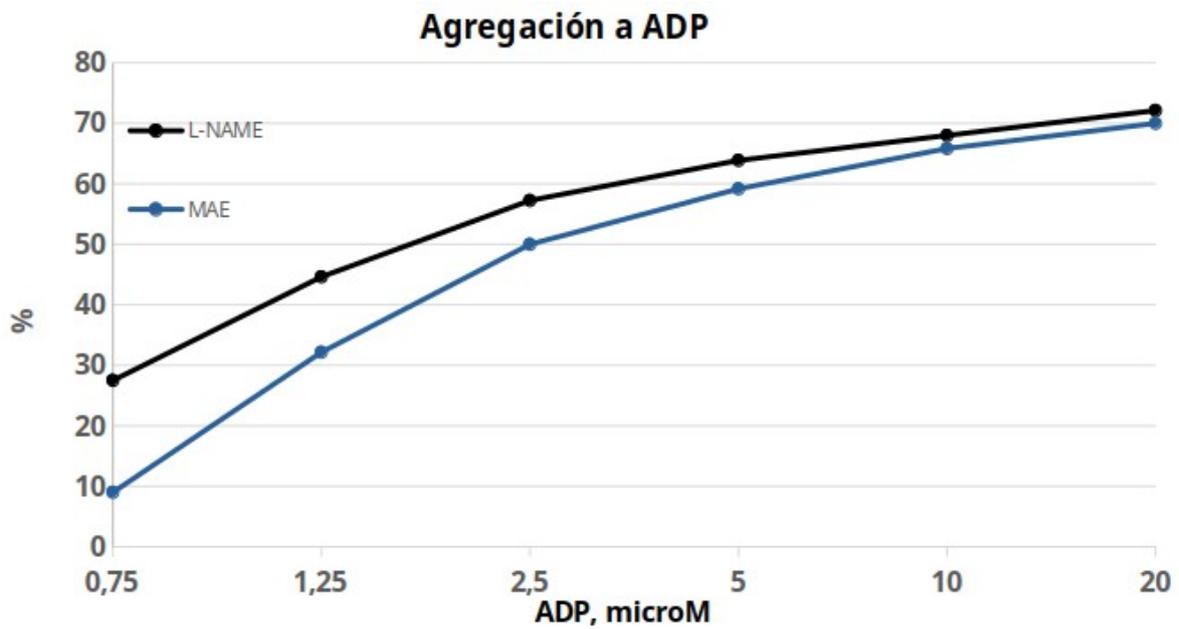
	<b>Pendiente</b>					
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>Control</b>	20,63	43,00	57,00	65,13	67,00	69,25
	10,00	9,37	10,74	6,38	9,44	9,65
<b>L-NAME</b>	35,38	51,75	63,00	67,63	71,25	73,75
	16,41	15,36	13,73	12,06	11,23	12,02
<b>MAE</b>	20,00	50,17	62,83	69,17	74,17	72,00
	3,79	4,17	3,87	4,75	3,13	7,46
<b>Captopril</b>	25,14	48,86	58,43	65,43	63,00	65,29
	13,52	9,56	7,46	7,41	8,66	5,56

**Tabla 14.** Pendiente de las respuestas de agregación a Colágeno.

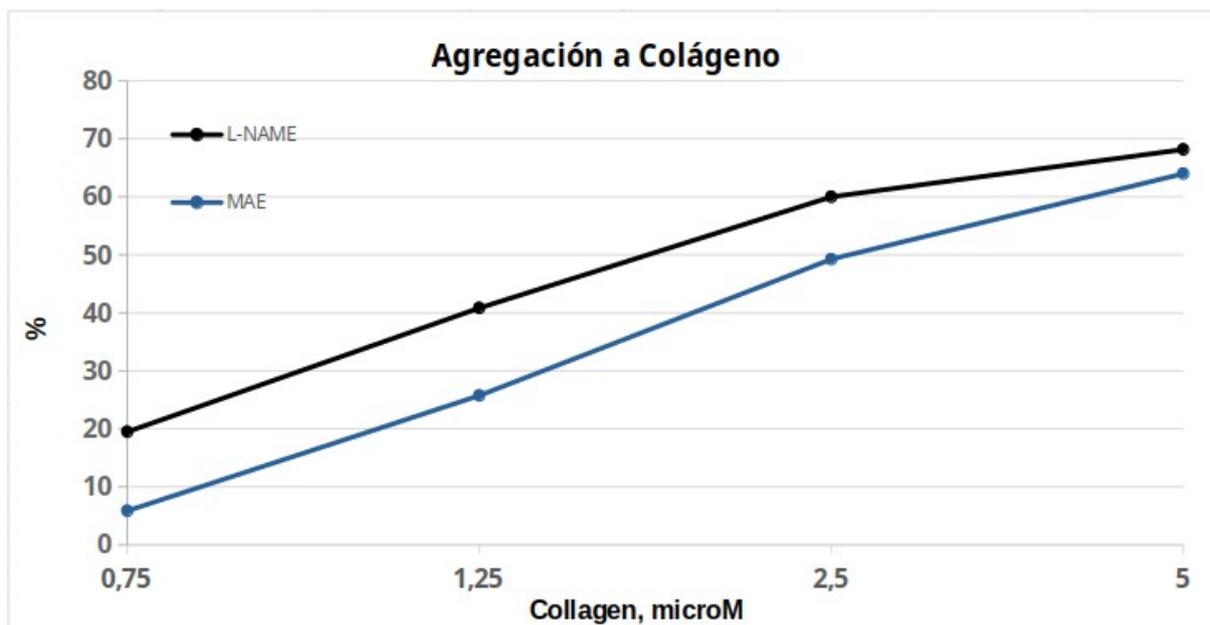
	<b>Pendiente</b>			
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>
<b>Control</b>	4,86	20,14	37,00	50,14
	2,79	6,69	5,77	12,93
<b>L-NAME</b>	14,17	32,33	50,50	57,17
	7,73	10,41	12,19	10,98
<b>MAE</b>	7,00	16,80	35,60	57,80
	1,87	6,94	13,41	10,71
<b>Captopril</b>	4,78	12,67	29,11	50,22
	1,99	4,58	11,47	9,69

**Tabla 15.** Valores de ED50 y pD2 de los grupos experimentales de las figuras 18 y 19. \*, p<0.05 vs Control.

<b>ADP</b>	<b>ED50</b>	<b>pD2</b>		<b>Colágeno</b>	<b>ED50</b>	<b>pD2</b>
<b>Control</b>	4,40	5,36		<b>Control</b>	4,17	5,38
	0,78	0,08			0,61	0,07
<b>L-NAME</b>	4,97	5,30		<b>L-NAME</b>	4,46	5,36
	1,07	0,08			1,07	0,10
<b>MAE</b>	4,66*	5,33		<b>MAE</b>	3,40	5,38
	0,50	0,05			1,83	0,07
<b>Captopril</b>	4,25	5,38		<b>Captopril</b>	3,41	5,48
	0,86	0,09			0,84	0,12



**Figura 20.** Curvas de agregación plaquetaria a ADP en animales L-NAME basal y tras ser tratados 3 días con MAE.



**Figura 21.** Curvas de agregación plaquetaria a Colágeno en animales L-NAME basal y tras ser tratados 3 días con MAE.

**Tabla 16.** Área bajo la curva (AUC) y Pendiente de las respuestas de agregación plaquetaria a ADP en animales L-NAME basal y tras ser tratados 3 días con MAE.

	<b>AUC</b>					
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>L-NAME</b>	132,93	203,55	296,70	330,30	371,24	389,54
	89,72	87,34	75,36	53,60	41,70	38,12
<b>MAE</b>	15,07	55,13	193,18	281,87	333,62	356,88
	8,90	20,13	45,34	38,81	42,00	31,74
	<b>Pendiente</b>					
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>L-NAME</b>	35,38	51,75	63,00	67,63	71,25	73,75
	16,41	15,36	13,73	12,06	11,23	12,02
<b>MAE</b>	15,50	42,50	58,33	68,83	69,50	71,33
	7,87	3,73	6,98	7,73	9,91	9,79

**Tabla 17.** Área bajo la curva (AUC) y Pendiente de las respuestas de agregación plaquetaria a Colágeno en animales L-NAME basal y tras ser tratados 3 días con MAE.

	<b>AUC</b>			
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>
<b>L-NAME</b>	102,90	214,72	328,52	384,02
	51,91	64,17	57,21	51,92
<b>MAE</b>	30,04	118,30	249,73	321,06
	16,42	32,84	40,93	46,19
	<b>Pendiente</b>			
	<b>0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>
<b>L-NAME</b>	14,17	32,33	50,50	57,17
	7,73	10,41	12,19	10,98
<b>MAE</b>	5,75	19,00	38,00	49,50
	2,05	5,55	8,91	8,55

**Tabla 18.** Valores de ED50 y pD2 de los grupos experimentales de las figuras 20 y 21.

<b>ADP</b>			<b>Colágeno</b>		
<b>MAE 3 días</b>	<b>ED50</b>	<b>pD2</b>	<b>MAE 3 días</b>	<b>ED50</b>	<b>pD2</b>
<b>L-NAME</b>	4,97	5,30	<b>L-NAME</b>	4,46	5,36
	1,07	0,08		1,07	0,10
<b>MAE</b>	4,59	5,34	<b>MAE</b>	3,91	5,42
	0,73	0,08		1,00	0,11

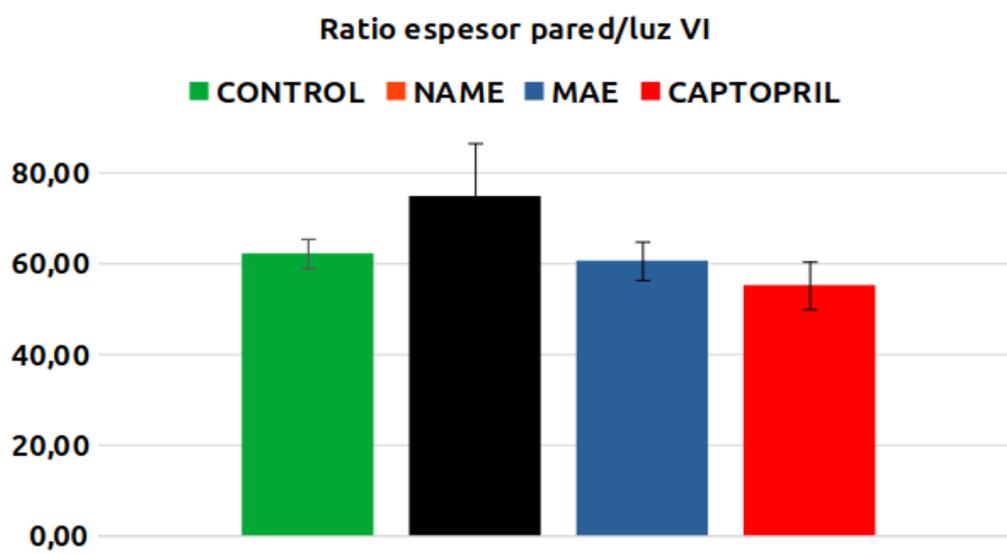
## Estudio anatomopatológico.

### Corazón.

En la tabla 19 se observan los valores cardíacos. La figura 22 muestra la ratio entre el espesor de la pared y la luz del ventrículo izquierdo (VI). No hubo diferencias significativas entre grupos en estos parámetros ( $p=0.85$ ).

**Tabla 19.** Datos anatomopatológicos del ventrículo izquierdo en los grupos experimentales.

	Espesor tabique interventricular (mm)	Area pared ventricular (mm <sup>2</sup> )	Ratio espesor pared/luz VI
<b>Control</b>	2,16	59,04	62,12
	0,12	3,44	3,25
<b>NAME</b>	2,77	69,34	74,76
	0,43	10,23	11,70
<b>+MAE</b>	2,13	57,10	60,54
	0,31	3,76	4,25
<b>+CAPTOPRIL</b>	2,03	51,07	55,10
	0,24	4,72	5,26



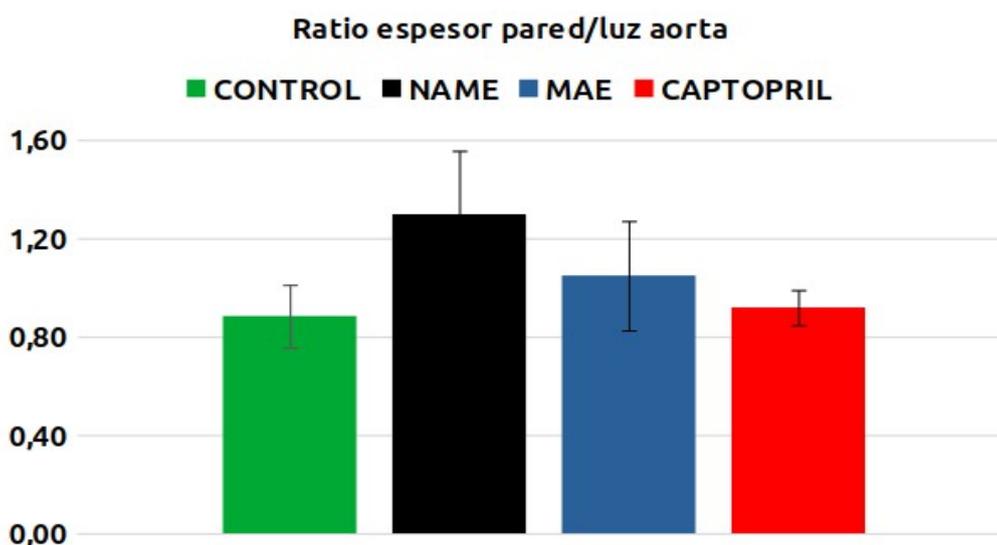
**Figura 22.** Ratio entre el espesor de la pared y la luz del ventrículo izquierdo (VI) en los grupos experimentales.

## Aorta.

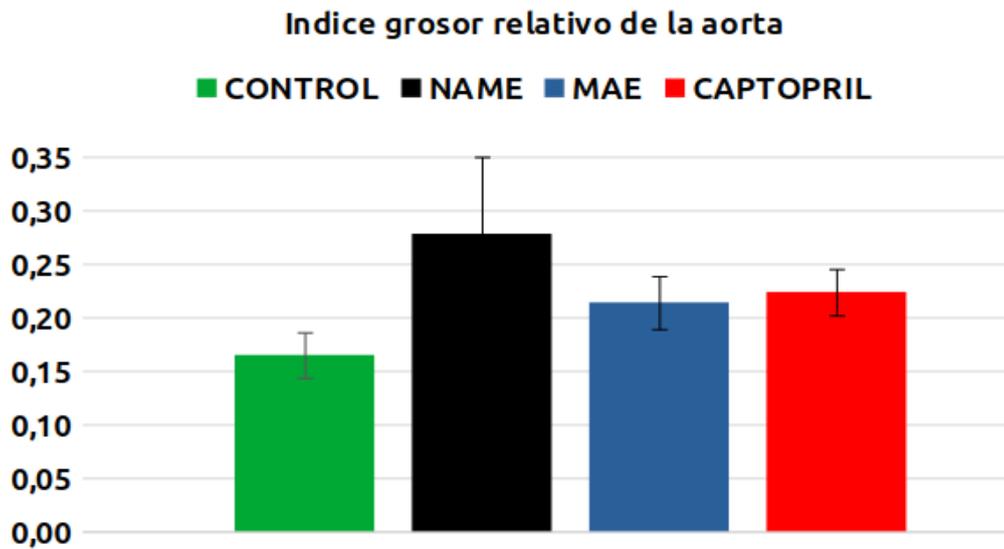
En la tabla 20 se observan los valores medidos en la aorta torácica. La figura 23 muestra la ratio del espesor pared/luz aórtica y la figura 24 el índice grosor relativo. No hubo diferencias significativas entre grupos en estos parámetros ( $p=0.95$  en la ratio espesor pared/luz Ao y  $p=0.66$  en el índice grosor relativo).

**Tabla 20.** Datos anatomopatológicos de aorta torácica en los grupos experimentales (Ao, aorta).

	Espesor pared Ao (capa media)( $\mu\text{m}$ )	Area pared aórtica ( $\text{mm}^2$ )	Ratio espesor pared/luz Ao	Indice grosor relativo
<b>Control</b>	98,52	0,47	0,88	0,16
	8,74	0,11	0,13	0,02
<b>NAME</b>	143,81	0,60	1,30	0,28
	14,80	0,15	0,26	0,07
<b>+MAE</b>	109,36	0,49	1,05	0,21
	15,33	0,18	0,22	0,02
<b>+CAPTOPRIL</b>	89,92	0,31	0,92	0,22
	4,88	0,03	0,07	0,02



**Figura 23.** Ratio entre el espesor de la pared y la luz aórtica en los grupos experimentales.



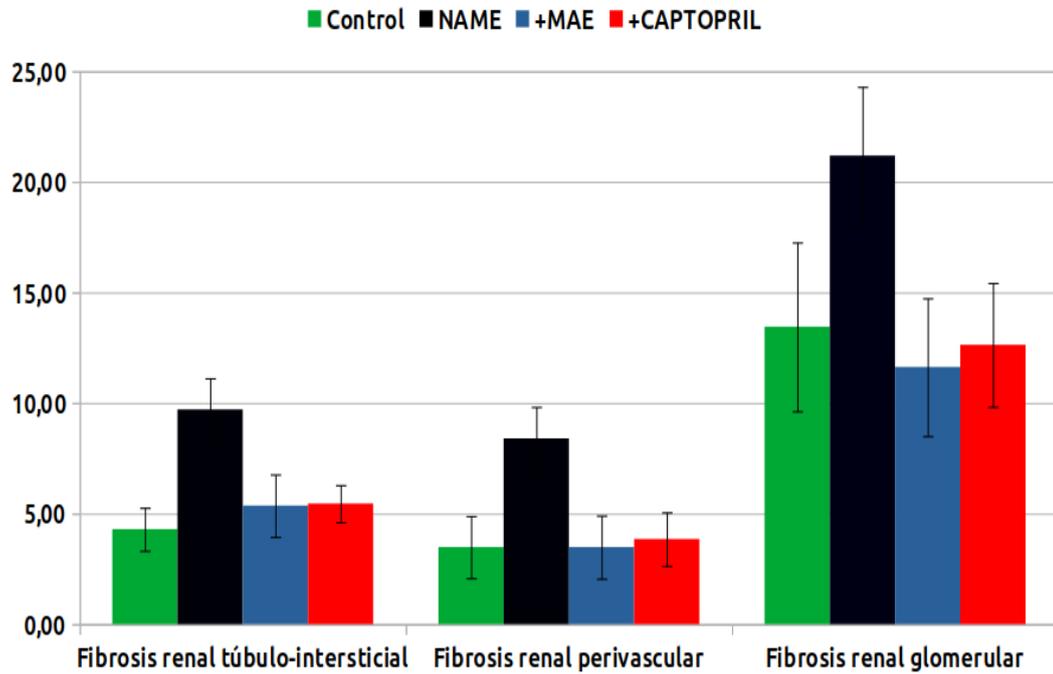
**Figura 24.** Índice del grosor relativo aórtico en los grupos experimentales.

### Riñón

En la tabla 21 se observan los valores de fibrosis renal túbulo-intersticial, perivascular y glomerular en los grupos experimentales. Los datos fueron significativamente mayores en el grupo NAME respecto al control y tanto el tratamiento con MAE como con Captopril los normalizaron sin que existieran diferencias significativas con el grupo control. La figura 25 muestra cada uno de estos datos de manera gráfica.

**Tabla 21.** Datos anatomopatológicos de riñón en los grupos experimentales (\*,  $p < 0.05$  vs Control; +,  $p < 0.05$  vs NAME).

	Fibrosis renal túbulo-intersticial	Fibrosis renal perivascular	Fibrosis renal glomerular
<b>Control</b>	4,30	3,49	13,45
	0,97	1,40	3,81
<b>NAME</b>	9,71 *	8,40 *	21,18 *
	1,55	2,77	3,68
<b>+MAE</b>	5,36	3,49	11,62
	1,41	1,43	3,12
<b>+CAPTOPRIL</b>	5,45	3,85	12,63
	0,84	1,21	2,80



**Figura 25.** Porcentaje de fibrosis renal túbulo-intersticial, perivascular y glomerular en los grupos experimentales (\*,  $p < 0.05$  vs Control; +,  $p < 0.05$  vs NAME).

### Datos de función renal en jaulas metabólicas.

Los resultados de las medidas obtenidas en las jaulas metabólicas del estudio crónico se muestran en la tabla 22. No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados.

En el estudio agudo tampoco se ha encontrado ninguna diferencia significativa.

**Tabla 22.** Datos de función renal obtenidos en las jaulas metabólicas en los grupos experimentales.

	<b>Ingesta agua (ml)</b>	<b>Ingesta comida (g)</b>	<b>Ingesta sodio (mEq)</b>	<b>Orina 24h (ml)</b>	<b>Natriuresis (mEq/24h)</b>	<b>Balance de Na (meq)</b>	<b>Balance Na (meq/100g)</b>
<b>Control</b>	26,43	16,47	1,71	12,69	1,39	0,32	0,09
	8,45	2,08	0,22	6,90	0,76	0,77	0,20
<b>NAME</b>	26,57	17,38	1,81	14,58	1,16	0,65	0,17
	5,56	3,05	0,32	4,96	0,41	0,67	0,18
<b>+MAE</b>	30,93	16,19	1,68	7,97	1,42	0,26	0,07
	7,62	2,62	0,27	1,45	0,26	0,40	0,11
<b>+Captopril</b>	29,87	17,86	1,86	18,50	1,47	0,39	0,11
	8,21	1,10	0,11	6,96	0,56	0,52	0,14

## Discusión

Los estudios en animales utilizando alimentos ricos en flavonoides son una alternativa válida para avanzar en la comprensión de los mecanismos subyacentes a sus efectos hipotensores en modelos experimentales de hipertensión arterial. La ingesta de polifenoles se ha relacionado con un efecto beneficioso que reduce el riesgo de hipertensión. De hecho, estudios epidemiológicos encontraron que un mayor consumo de alimentos y bebidas ricos en flavonoides se relaciona con un menor riesgo de muerte cardiovascular. Además, el uso de productos de origen natural que puedan causar pocos efectos secundarios es una posibilidad atractiva a considerar para el tratamiento de varias patologías. Varios estudios han descrito que el consumo de alimentos ricos en flavonoides o compuestos aislados mejora varios parámetros cardiovasculares como la dilatación mediada por flujo y los biomarcadores de riesgo cardiovascular. Además, muchos flavonoides inducen la liberación de factores vasodilatadores derivados del endotelio, como el óxido nítrico (NO) o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y disminuyen la liberación de sustancias proinflamatorias, induciendo así una mejora de la función endotelial.

La hipertensión por L-NAME es un modelo muy frecuentemente utilizado de disfunción endotelial. Además, dado que la administración de L-NAME induce hipertensión arterial, se ha utilizado ampliamente para analizar el papel del NO en el control de la presión arterial. El riñón parece ser uno de los primeros órganos que reaccionan a la pérdida de NO, mostrando una menor respuesta de natriuresis de presión y un papel aumentado del sistema renina-angiotensina en su fisiopatología.

La hipertensión arterial inducida por la administración crónica de L-NAME se acompaña de remodelación cardiovascular, muy evidente en el corazón y también en los vasos de conducción y de resistencia. Se han descrito casos de hipertrofia ventricular izquierda y fibrosis miocárdica, engrosamiento de la pared aórtica y remodelación de las arterias de resistencia mesentéricas. Recientemente, se ha descrito una expresión de proteína eNOS regulada a la baja en los vasos sanguíneos y una disminución de los niveles plasmáticos de NO en ratas tratadas con L-NAME, lo que probablemente contribuya, mediante una vasorrelajación reducida, a un aumento de la resistencia vascular y de la presión arterial alta. También se observaron niveles aumentados de marcadores de estrés oxidativo en ratas hipertensas con L-NAME, incluido el peroxinitrito, un intermediario muy reactivo y uno de los oxidantes más potentes conocidos en los sistemas biológicos, que causa un deterioro duradero de la respuesta vasoactiva a los vasodilatadores. Los productos derivados del estrés oxidativo no solo disminuyen la biodisponibilidad de NO, lo que causa un deterioro de la vasorrelajación, sino que también causan el desacoplamiento de NOS para producir superóxido vasoconstrictor en lugar de NO vasodilatador.

En nuestro laboratorio hemos estado trabajando los últimos años en el papel de determinados flavonoides en dos modelos experimentales de hipertensión arterial, uno es la hipertensión arterial espontánea (SHR) y otro el de déficit de óxido nítrico, por administración del inhibidor de su síntesis L-NAME. Mientras que los flavonoides usados, el extracto de limón, el extracto de pomelo, el extracto de cacao, la apigenina y la diosmina, prácticamente no tuvieron efecto antihipertensor en los animales con hipertensión espontánea, sí fueron eficaces, aunque en grado moderado, en los animales con hipertensión L-NAME (Paredes 2018 a; Paredes

2018b). Y es que mientras que las causas de la hipertensión espontánea son multifactoriales (genéticas, sistema nervioso simpático, sistema renina-angiotensina, entre otros), las causas de la hipertensión L-NAME son directamente debidas a la disminución de la producción de NO e indirectamente a la sobreactivación de mecanismos vasoconstrictores como el sistema renina-angiotensina y al aumento del estrés oxidativo. Precisamente estos efectos son los más citados como responsables de las acciones de los flavonoides. Y donde más efectos hemos encontrado nosotros ha sido en el nivel de presión arterial y en la función renal y vascular. Por ello, cuando tuvimos la oportunidad de analizar los efectos de otro flavonoide como el extracto de Morus Alba no dudamos en elegir el modelo experimental más adecuado, el de hipertensión L-NAME. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos vasculares y renales de un extracto de Morus Alba (MAE) en un modelo de hipertensión arterial experimental bien conocido como es el de inhibición de la síntesis de óxido nítrico por L-NAME (Hipertensión L-NAME).

#### *Experimentos in vitro.*

Aunque se ha descrito previamente que los extractos de hoja de morera producen diversos efectos beneficiosos (antiinflamatorios, hipoglucemiantes, hipotensivos, ...), su composición puede variar según la variedad de morera utilizada y el método de manipulación de las hojas (temperatura, tipo de solvente, entre otros) para obtener a partir de ellas los extractos. Estos aspectos determinan la composición del extracto y por tanto la actividad terapéutica. Por ello, es importante comprobar *in vitro* la efectividad de los extractos obtenidos para poder seleccionar el más adecuado, antes de hacer experimentos con animales. Los extractos se obtuvieron de

hojas de *Morus alba* L, genotipo BGMU 050 10009. Las características de los extractos obtenidos han sido descritos previamente (Leyva-Jiménez FJ 2020) por el grupo de investigadores del IMIDA. La extracción alcohólica se ha descrito como la óptima, pero la extracción acuosa debe ser considerada como una opción a estudiar por su más fácil aplicación en humanos, ya que es la más parecida a una infusión.

En primer lugar, se estudió el efecto de los distintos extractos de hoja de morera desarrollados sobre el crecimiento y proliferación celular en una línea celular de fibroblastos. Como se ha descrito en los resultados, ninguno de los extractos desarrollados presentó citotoxicidad celular, lo que sugiere un amplio perfil de seguridad para su uso, tanto en animales como en humanos.

Por otro lado, nos propusimos valorar la efectividad de los extractos estudiando el efecto antiinflamatorio en una línea celular de macrófagos, ampliamente usada por otros autores con este fin (Grancieri 2019). Puesto que existe una estrecha relación entre la inflamación y el estrés oxidativo, se estudió la capacidad antioxidante de los distintos extractos de morera desarrollados en respuesta a un estímulo con LPS, mediante la cuantificación de la producción de ROS intracelulares, óxido nítrico y citoquinas. La medida de estos parámetros ha sido usada ampliamente para el estudio de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de diversos extractos de plantas (Frattaruolo 2019a; Frattaruolo 2019b; Saiki 2018;). Todos los extractos desarrollados presentaron capacidad antiinflamatoria, pero esta fue mayor en los extractos etanólicos al 70%, que en los extractos al 50% y ésta a su vez mayor que en los extractos acuosos.

Estos resultados indican que el extracto etanólico al 70% utilizado es el más indicado para estudiar los efectos en el modelo animal.

Respecto a la dosis a utilizar en los estudios en el modelo animal, la dosis comúnmente utilizada en ratas es de alrededor de 100 a 400 mg/kg de peso corporal. En nuestro estudio decidimos usar la dosis de 100 mg/kg/día para no superar el volumen máximo recomendado en las administraciones por gavaje en ratas.

Llama la atención que las cápsulas comerciales de EE. UU. no han mostrado ningún efecto antiinflamatorio. El color de los extractos etanólicos y acuosos suministrados por el IMIDA era verde, mientras que el color del contenido de las cápsulas era marrón, lo que sugiere que en el procesamiento de la muestra se ha producido oxidación. Esto puede explicar, en parte esa falta de efecto. Por otro lado, también puede tener importancia la clase de morera, de manera que para los extractos de esta Tesis se ha utilizado una variedad local, de gran efectividad en otros estudios previos realizados por investigadores del IMIDA (Leyva-Jiménez 2020; Rodríguez-Sojo 2023).

### Aspectos generales

El tratamiento con el extracto de *Morus Alba* fue bien tolerado por los animales, al igual que los demás tratamientos, no encontrándose nada significativo que reseñar. Aunque todos los animales en los distintos grupos experimentales partieron de valores similares al comienzo del tratamiento, no hubo diferencias en el peso en el momento del experimento. Todos los animales estuvieron en las mismas condiciones y la cantidad de comida ingerida fue también similar en todos los grupos. Aunque en algunos trabajos se ha visto que podría haber un efecto metabólico del extracto de *Morus alba*, no hemos encontrado este efecto, aunque el metabolismo de la glucosa o la distribución de grasa, entre otros parámetros, no ha sido analizado en

esta tesis. Como es sabido, Morus Alba tiene efectos antidiabéticos y sobre la resistencia a la insulina (Zhang 2022).

### Presión arterial

En relación a la presión arterial (PA), uno de los importantes objetivos analizados, hemos visto como la PAM, así como la sistólica (PAS) y diastólica (PAD) aumentó significativamente en los grupos experimentales tratados con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME (figura 6). Estos datos son similares a los mostrados previamente por nuestro grupo (Paredes 2018a). Como vemos, el uso del extracto MAE tuvo un importante efecto reductor de la PAM, o si se quiere, el efecto hipertensor del L-NAME fue prevenido en gran medida por el extracto MAE. Aunque quedó un valor ligeramente superior al del grupo control. Por lo tanto, el extracto MAE previene en gran medida la hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico. Es importante reseñar en este momento que el grupo tratado crónicamente con Captopril sí mostró una prácticamente completa prevención de la hipertensión y esto coincide también con estudios previos de nuestro laboratorio (Paredes 2018a). La principal razón para este efecto del captopril parece ser debida la inhibición de la formación de angiotensina II, que sería el principal mecanismo causante de la hipertensión y de sus consecuencias (García-Estañ 2006).

Es interesante comprobar que el extracto MAE administrado de forma aguda en el momento de los experimentos también tuvo un efecto hipotensor en esos animales tratados crónicamente con L-NAME, con un descenso de casi 15 mmHg, lo que indica de nuevo la importancia de los efectos antihipertensivos de este extracto

de mora. En los animales controles, sin embargo, el extracto MAE no indujo ningún cambios de la PA.

En relación con la frecuencia cardíaca, no hubo cambios significativos en los distintos grupos experimentales, situación que también ha sido comprobada previamente por nosotros y otros investigadores. En general, no suelen encontrarse cambios de frecuencia cardíaca en experimentos en ratas, tal vez debido a los altos niveles que muestran estos animales, siempre por encima de los 300 latidos por minuto.

El efecto beneficioso sobre la PA en los animales hipertensos tratados simultáneamente con MAE puede ser debido a múltiples causas, entre ellas el posible aumento de la producción de NO (como veremos con los experimentos de reactividad vascular) y la posible reducción del estrés oxidativo. Otros posibles efectos, como la interacción con el sistema renina angiotensina no pueden ser descartados porque no los hemos analizado en este trabajo.

### *Hemogramas*

También hemos realizado hemogramas a los animales en los grupos experimentales. Como se visto en la tabla 6, no hubo cambios inducidos por el tratamiento crónico con L-NAME, ni tampoco en los grupos tratados adicionalmente con el extracto MAE ni con captopril. Tampoco se observó ningún cambio del hemograma tras la administración aguda del extracto MAE.

### Reactividad vascular

Otro de los objetivos de nuestro estudio fue analizar la reactividad vascular en anillos aórticos. Como se observó, la respuesta vasoconstrictora del grupo tratado crónicamente con L-NAME fue superior a la del control, lo que coincide con nuestros datos previos y los de la literatura (Paredes 2018a y 2018b) y que es debido a la disminución del NO y por ello de la protección vasodilatadora ante el aumento del tono vascular. De forma interesante, el tratamiento de los animales hipertensos simultáneamente con MAE redujo esa mayor reactividad al vasoconstrictor, pero todavía fue mayor que la de los animales controles, lo que sugiere que el extracto MAE podría haber aumentado los niveles de NO en esos anillos aórticos. El tratamiento con captopril redujo la respuesta vasoconstrictora y prácticamente la normalizó, lo que también ha sido encontrado previamente por nuestro grupo. Estos datos del MAE se comprueban al analizar los valores de la dosis efectiva 50, pD2 y respuesta máxima, que muestran una reducción en relación al grupo L-NAME aunque sin alcanzar los valores de normalidad del grupo control.

Estos efectos antivasoconstrictores del extracto MAE pueden ser debidos a un aumento de la producción de NO en los vasos de los animales tratados con MAE, como indica el hecho de que el tratamiento agudo de los anillos con L-NAME potencie la respuesta respecto al primer estudio. De nuevo, los datos de dosis efectiva 50, pD2 y respuesta máxima muestran una mejoría respecto al grupo L-NAME, aunque sin alcanzar los valores de normalidad del grupo control.

Más evidencias de este posible efecto del MAE aumentando la producción de NO se observa en los experimentos de vasodilatación con acetilcolina. Mientras que la respuesta vasodilatadora a acetilcolina está prácticamente eliminada en el grupo

tratado crónicamente con L-NAME (13% del control), la vasodilatación máxima alcanza al 54% en los animales tratados con el extracto MAE. Todas estas diferencias se eliminaron al añadir L-NAME de forma aguda, lo que nos permite concluir de forma bastante segura que el tratamiento con el extracto MAE mejora la producción vascular de NO.

Como en otros experimentos, la respuesta directa del músculo liso aórtico, tras administración de nitroprusiato sódico, estaba perfectamente conservada lo que descarta un efecto directo sobre el músculo liso y añade además un factor de seguridad en la realización de los experimentos.

#### *Agregación plaquetaria.*

Como hemos visto en los experimentos correspondientes, hemos analizado la respuesta agregante a ADP y colágeno, dos de los agonistas más usados habitualmente. Aunque los valores máximos alcanzados son bastante similares, hay diferencias en las respuestas completas, sobre todo a dosis bajas, que dan un resultado significativo entre grupos. El tratamiento crónico con L-NAME aumentó la respuesta agregante y el tratamiento con el extracto MAE lo mejoró significativamente y fue normalizado con captopril, especialmente a dosis bajas también. Igual ocurre si analizamos las respuestas del área bajo la curva y de las pendientes de las curvas. Aunque decidimos no hacer estadística punto por punto, se han calculado los datos de ED50 de los distintos grupos para obtener una respuesta más clara, indicativa o no de un cambio de la respuesta global. Como se observa, sólo el grupo tratado crónicamente con MAE mostró una menor ED50 en relación al grupo

control, aunque de nuevo, sin alcanzar los datos del grupo control. No hubo diferencias significativas en ninguna otra de las comparaciones.

Finalmente, en los experimentos en los que se usó el extracto MAE de forma aguda, se observaron diferencias entre las curvas con una menor respuesta de agregación en los animales tratados con el extracto MAE, aunque ninguno de los parámetros analizados mostró diferencias significativas.

En conclusión, el extracto MAE reduce la mayor agregación plaquetaria inducida por el tratamiento crónico con L-NAME, lo que indica un efecto muy beneficioso del extracto para mejorar la fisiología plaquetaria en situaciones de excesiva agregación, lo que puede permitir una mejor respuesta vascular. Pero, los resultados no arrojan claridad sobre si este efecto es debido a la mayor producción de NO, como parecería lógico deducir.

#### Función renal.

Como hemos descrito, no hemos encontrado diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en relación a la diuresis, natriuresis y balance de sodio. Por ello, no podemos incluir un posible efecto beneficioso de una mayor excreción de sodio que produjera un balance negativo, como mecanismo subyacente al efecto antihipertensor descrito. Esto ha sido también encontrado en nuestros trabajos previos en los que describimos efectos variados sobre el balance de sodio con unos flavonoides y no con otros (Paredes 2018a y 2018b).

## Sumario de resultados

- Los extractos de *Morus alba* analizados no mostraron efectos indeseables en cuanto a biocompatibilidad o citotoxicidad y mostraron su capacidad para reducir el estrés oxidativo inducido por un estímulo inflamatorio.
- El tratamiento crónico con L-NAME indujo un fuerte aumento de la presión arterial, mientras que el tratamiento simultáneo con el extracto MAE o Captopril lo redujeron en gran medida, de forma significativa. El tratamiento agudo (tres días) con MAE redujo ligera y significativamente la presión arterial en los animales crónicamente tratados con L-NAME, sin que tuviera efecto en los animales controles. De la misma forma, la administración aguda de MAE también tuvo un efecto antihipertensor en los animales hipertensos.
- No hubo efectos significativos del extracto MAE en la función renal
- La reactividad vascular aórtica aumentó en los animales hipertensos y el extracto MAE la redujo de forma significativa, en un efecto mediado parcialmente por el óxido nítrico. Igual ocurrió con la respuesta vasodilatadora, mejorada también por el extracto de morera.
- La mayor agregación plaquetaria de los animales hipertensos fue reducida por el extracto de morera en un efecto también parcialmente dependiente del óxido nítrico.
- El tratamiento crónico del extracto no tuvo efectos significativos en las alteraciones estructurales de aorta y corazón, aunque sí redujeron de forma significativa la fibrosis renal túbulo-intersticial, perivascular y glomerular.

## Conclusiones

- Los extractos de *Morus alba* son de uso seguro en animales.
- El extracto MAE resultó ser un antihipertensor de importancia, al ser capaz de reducir la hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico. Este efecto se ha demostrado tanto en administración aguda como crónica.
- El extracto MAE redujo la mayor reactividad vascular de los animales hipertensos y mejoró la respuesta vasodilatadora, efectos parcialmente debidos a un aumento de la producción de óxido nítrico.
- El extracto MAE redujo la mayor agregación plaquetaria de los animales hipertensos, en un efecto también parcialmente dependiente del óxido nítrico.
- El tratamiento crónico con MAE mejoró algunas de las alteraciones estructurales renales mostradas por los animales hipertensos.

## Bibliografía.

1. Abe, Y., Umemura, S., Sugimoto, K., Hirawa, N., Kato, Y., Yokoyama, N., et al. Effect of green tea rich in gamma-aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Hypertension* 1995, 8, 74–79. [https://doi.org/10.1016/0895-7061\(94\)00141-w](https://doi.org/10.1016/0895-7061(94)00141-w)
2. Aghababaei F, Hadidi M. Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. *Pharmaceuticals* 2023, 16(7), 1020; <https://doi.org/10.3390/ph16071020>
3. Akama, K., Kanetou, J., Shimosaki, S., Kawakami, K., Tsuchikura, S., & Takaiwa, F. Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Research* 2009, 18, 865–876. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9272-1>
4. Alcaraz A, Iyú D, Atucha NM, García-Estañ J, Ortiz MC. Vitamin E supplementation reverses renal altered vascular reactivity in chronic bile duct-ligated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Apr;292(4):R1486-93. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00309.2006>
5. Alonzo DS, de Padua LS, Bunyapraphatsara N, et al. *Plant Resources of South-East Asia No. 12(1): Medicinal and Poisonous Plants 1 [M]*. Netherlands: Backhuys Publisher, Leiden, 1999. <https://edepot.wur.nl/411255>
6. Alvin G, Catambay N, Vergara A, Jamora MJ. A comparative study of the safety and efficacy of 75% mulberry (*Morus alba*) extract oil versus placebo as a topical treatment for melasma: a randomized, single-blind, placebo controlled trial. *J Drugs Dermatol* 2011,10(9):1025–103. PMID: 22052272.
7. Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. Effect of gamma-aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-Tempeh) on the blood pressure of

- spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2003, 67, 1806–1808. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1806>
8. Atucha NM, Romecín P, Vargas F, García-Estañ J. Effects of Flavonoids in Experimental Models of Arterial Hypertension. *Curr Top Med Chem.* 2022 22(9):735-745. <https://doi.org/10.2174/1568026621666211105100800>
  9. Bae SH, Suh HJ. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT Food Sci Technol*, 2007, 40(6): 955-962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.06.007>
  10. Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2007 Mar;40(3):401–8. PMID: 17334538.
  11. Bund SJ, Lee RMKW. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res.* 2003 Dec;40(6):547–57. <https://doi.org/10.1159/000075678>
  12. Butt MS, Nazir A, Sultan MT, et al. *Morus alba* L. nature's functional tonic *Trend Food Sci Technol*, 2008, 19: 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.06.002>
  13. Cachofeiro V, Fortepiani LA, Navarro-Cid J, Lahera V, García-Estañ J. Renal dysfunction after chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Dec;4(6):885-91. <https://doi.org/10.1089/152308602762197425>
  14. Carrizzo A, Ambrosio M, Damato A, et al. *Morus alba* extract modulates blood pressure homeostasis through eNOS signaling. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60 (10): 2304-2311. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201600233>.
  15. Chang, L. W., Juang, L. J., Wang, B. S., Wang, M. Y., Tai, H. M., Hung, W. J., Chen, Y. J., & Huang, M. H. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs

- and root bark. *Food and Chemical Toxicology* 2011, 49, 785–790.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.045>
16. Chen, X., Zhang, L., Wu, G., Li, H., Zhang, F., Xu, X. Kaempferol attenuates angiotensin II-induced vascular fibrosis involving the jnk and ERK1/2 pathways. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2016, 9, 2407–2414. <https://e-century.us/files/ijcem/9/2/ijcem0018550.pdf>
17. Dat NT, Binh PTX, Quynh LTP, et al. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. *Fitoterapia*, 2010, 81:1224-1227. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.08.006>
18. DellaCroce, J. T., & Vitale, A. T. Hypertension and the eye. *Current Opinion in Ophthalmology* 2016, 27 (6), 514. <https://doi.org/10.1097/icu.0000000000000307>
19. Devi B, Sharma N, Kumar D, et al. *Morus alba* Linn: A phytopharmacological review *Int J Pharm Pharm Sci*, 2013, 5(2): 14-18.
20. Dirsch VM, Stuppner H, Vollmar AM. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med.* 1998 Jun;64(5):423-6. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957473>
21. Doi K, Kojima T, Makino M, et al. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(2): 151-153. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.151>
22. Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci.* 2011 Sep;36(4):731–7. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9097-y>
23. Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, et al. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens.* 2002 Sep;20(9):1843–54. <https://doi.org/10.1097/00004872-200209000-00031>
24. El-Beshbishy HA, Singab ANB, Sinkkonen J, Pihlaja K. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in

- cholesterol-fed rats. *Life Sciences* 2006; 78 (23): 2724-2733.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.010>
25. Emura, K., Yokomizo, A., Toyoshi, T., Moriwaki, M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2007, 53, 68–74. <https://doi.org/10.3177/jnsv.53.68>
26. Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M., Yamane, Y. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* 2005, 135, 729–734. <https://doi.org/10.1093/jn/135.4.729>
27. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010;594:57-72. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4)
28. Estruch R, Ros E, Salas J et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New Engl. J. Med.* 2013; 368(14): 1279. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200303>
29. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflüg Arch Eur J Physiol.* 2010 May;459(6):923–39. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2>
30. Fortepiani LA, Janvier JJ, Ortíz MC, Atucha NM, García-Estañ J. Effect of endothelin blockade on pressure natriuresis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *J Hypertens.* 1999b Feb;17(2):287–91. <https://doi.org/10.1097/00004872-199917020-00014>
31. Fortepiani LA, Rodrigo E, Ortíz MC, Cachofeiro V, Atucha NM, Ruilope LM, et al. Pressure natriuresis in nitric oxide-deficient hypertensive rats: effect of antihypertensive treatments. *J Am Soc Nephrol JASN.* 1999a Jan;10(1):21–7. <https://doi.org/10.1681/asn.v10121>

32. Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, Mazzotta S, Bellissimo L, Rago V, Curcio R, Dolce V, Aiello F, Cappello AR. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF-kB/MAPK Pathway. *Antioxidants* (Basel). 2019 Jun 20;8(6):186. <https://doi.org/10.3390/antiox8060186>
33. Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, Mazzotta S, Bellissimo L, Rago V, Curcio R, Dolce V, Aiello F, Cappello AR. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF-kB/MAPK Pathway. *Antioxidants* (Basel). 2019 Jun 20;8(6):186. <https://doi.org/10.3390/antiox8060186>
34. García-Estañ J, Ortiz MC, O'Valle F, Alcaraz A, Navarro EG, Vargas F, Evangelista S, Atucha NM. Effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors in combination with diuretics on blood pressure and renal injury in nitric oxide-deficiency-induced hypertension in rats. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Feb;110(2):227-33. <https://doi.org/10.1042/cs20050165>
35. García-Estañ J. Flavonoids in Health and Disease (editorial). *Current Medicinal Chemistry*, 2019; 26 (39): 6972-6975. <https://doi.org/10.2174/092986732639191213095405>
36. Grancieri M, Martino HSD, Gonzalez de Mejia E. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Total Protein and Protein Fractions Digests Reduce Biomarkers of Inflammation and Atherosclerosis in Macrophages In Vitro. *Mol Nutr Food Res*. 2019 Oct;63(19):e1900021. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900021>
37. Hall JE, Omoto ACM, Wang Z et al. Pathophysiology of Hypertension. Hypertension (Fourth Edition). A Companion to Braunwald's Heart Disease 2024, 71-86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88369-6.00005-0>

38. Harauma, A., Murayama, T., Ikeyama, K., Sano, H., Arai, H., Takano, R., et al. Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 358, 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.170>
39. Hayakawa, K., Kimura, M., & Yamori, Y. Role of the renal nerves in gammaaminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* 2005, 524, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.020>
40. Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition* 2004, 92, 411–417. <https://doi.org/10.1079/bjn20041221>
41. Hong Y, Kim MY, Yoon M. The anti-angiogenic herbal extracts Ob-X from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* suppresses adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Pharm Biol* 2011, 49 (8): 775–783. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.547208>
42. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 88, 1, 38–50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.1.38>
43. Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gammaaminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003, 57, 490–495. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601555>

44. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000 Sep;36(3):312–8. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.3.312>
45. ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland: 2009. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
46. Jiménez R, Duarte J, Pérez-Vizcaíno F. Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J Agric Food Chem*. 2012; 60 (36): 8823-30. <http://doi.org/10.1021/jf205370q>.
47. Jin, L., Lin, M.Q., Piao, Z.H., Cho, J.Y., Kim, G.R., Choi, S.Y., Ryu, Y., Sun, S., Kee, H.J., Jeong, M.H. Gallic acid attenuates hypertension, cardiac remodeling, and fibrosis in mice with NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension via regulation of histone deacetylase 1 or histone deacetylase 2. *J. Hypertens* 2017. 35, 1502–1512. <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000001327>
48. Jover B, Mimran A. Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Nov;38 Suppl 2:S65–70. <https://doi.org/10.1097/00005344-200111002-00016>
49. Juurlink, B.H.J., Azouz, H.J., Aldalati, A.M.Z., AlTinawi, B.M.H., Ganguly, P. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutr. J*. 2014, 13, 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-63>
50. Kang, T. H., Oh, H. R., Jung, S. M., Ryu, J. H., Park, M. W., Park, Y. K., et al. Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006, 29, 270–274. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.270>

51. Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, et al. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity *Food Chem*, 2006, 97: 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.019>
52. Kim D-S et al. Antiplatelet activity of *Morus alba* leaves extract, mediated via inhibiting granule secretion and blocking the phosphorylation of extracellular-signal-regulated kinase and Akt. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014,1-11. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/639548>
53. Kimura, M., Hayakawa, K., & Sansawa, H. Involvement of gammaaminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *The Japanese Journal of Pharmacology* 2002, 89, 388–394. <https://doi.org/10.1254/jjp.89.388>
54. Kumar S, Prahalathan P, Raja B. Syringic acid ameliorates (L)-NAME-induced hypertension by reducing oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012 Dec;385(12):1175-84. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0802-7>
55. Kumar, S., Saravanakumar, M., Raja, B. Antihypertensive, antioxidant and free radical scavenging potential of syringic and vanillic acid in L-NAME induced hypertension. In-vivo and in-vitro study. *J. Pharm. Res.* 2012b, 5 29542-2948. <http://jpronline.info/index.php/jpr/article/view/13387/6809>
56. Kumar, S., Prahalathan, P., Saravanakumar, M., Raja, B. Vanillic acid prevents the deregulation of lipid metabolism, endothelin 1 and up regulation of endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2014, 743,117–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.010>
57. Küng CF, Moreau P, Takase H, Lüscher TF. L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension*. 1995 Nov;26(5):744–51. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.26.5.744>

58. Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García-Estañ J, Ruilope LM. Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am J Hypertens.* 1997 Jan;10(1):129–40. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(96\)00346-9](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(96)00346-9)
59. Larson, A.J., Symons, J.D., Jalili, T. Quercetin: a treatment for hypertension? A review of efficacy and mechanism. *Pharmaceuticals* 2010, 3, 237–250. <https://doi.org/10.3390%2Fph3010237>
60. Law, M., Wald, N., & Morris, J. Lowering blood pressure to prevent myocardial infarction and stroke: A new preventive strategy. *Health Technology Assessment* 2003, 7, 1–94. <https://doi.org/10.3310/hta7310>
61. Lee YJ, Choi DH, Kim EJ, Kim HY, Kwon TO, Kang DG, Lee HS. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. *Am J Chin Med* 2011, 39(1):39–52. <https://doi.org/10.1142/s0192415x11008634>
62. Lee, C.N., Wong, K.L., Liu, J.C., Chen, Y.J., Cheng, J.T., Chan, P. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med.* 2001, 67, 796–799. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18841>
63. Leyva-Jiménez FJ, Ruiz-Malagón AJ, Molina-Tijeras JA y cols. Comparative Study of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Leaf Extracts from Four Different *Morus alba* Genotypes in High Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Antioxidants* 2020, 9(8), 733; <https://doi.org/10.3390/antiox9080733>
64. Liu, L. K., Chou, F. P., Chen, Y. C., Chyau, C. C., Ho, H. H., & Wang, C. J. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) extracts on lipid homeostasis in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 7605–7611. <https://doi.org/10.1021/jf9014697>

65. Lopez JJ, El Haouari M, Jardin I, Alonso N, Regodon S, Diez-Bello R, Redondo PC, Rosado JA. Flavonoids and Platelet-Derived Thrombotic Disorders. *Curr Med Chem*. 2019;26(39):7035-7047. <http://doi.org/10.2174/0929867325666180417170218>.
66. Lüscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19 Suppl 5:S34–42.
67. Machii H, Koyama A, Yamanouchi H. Mulberry for Animal Production. Mulberry breeding, cultivation and utilization in Japan [M]. FAO Anim Prod Health Paper, 2002. <https://www.fao.org/4/X9895E/x9895e05.htm>
68. Micucci M, Bolchi C, Budriesi R et al. Antihypertensive phytocomplexes of proven efficacy and well-established use: Mode of action and individual characterization of the active constituents. *Phytochemistry* 2020; 170: 112222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112222>
69. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. 1988 Oct;12(4):365–72. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.12.4.365>
70. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):2002-12. <https://doi.org/10.1056/nejm199312303292706>
71. Nade VS, Kawale LA, Bhangale SP, Wale YB. Cardioprotective and antihypertensive potential of *Morus alba* L. in isoproterenol-induced myocardial infarction and renal artery ligation-induced hypertension. *J Nat Remedies*. 2013, 13:54–67. <https://www.informaticsjournals.com/index.php/jnr/article/view/118>
72. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V et al. Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Nutr Res*. 2009; 29 (8): 602-8. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.06.002>.

73. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Nakmareong S, Itharat A. Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Nutr Res* 2009b, 29:602–608. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.06.002>
74. Noh DJ, Yoon GA. Mulberry (*Morus alba* L.) ethanol extract attenuates lipid metabolic disturbance and adipokine imbalance in high-fat fed rats. *Nutr Res Pract*. 2022 Dec;16(6):716-728. <https://doi.org/10.4162/nrp.2022.16.6.716>
75. OMS 2023. Hipertensión (visitado 18/7/24). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
76. Ortíz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Marcos FM, Atucha NM, García-Estañ J. Role of AT1 receptors in the renal papillary effects of acute and chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):R760–6. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.3.r760>
77. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress* (Thousand Oaks). 2022 Feb 8;6:24705470221076390. <https://doi.org/10.1177%2F24705470221076390>
78. Paredes MD. Efecto de los flavonoides sobre la función endotelial en ratas con hipertensión arterial (Tesis Doctoral). 17/7/2015, Universidad de Murcia. <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/45845>
79. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, García-Estañ J. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2018a; 10 (4): 484-499. <http://doi.org/10.3390/nu10040484>.

80. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, García-Estañ J. Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2018b; 10 (8): 1107-1119. <http://doi.org/10.3390/nu10081107>.
81. Park SW, Shin KC, Yoou SK, et Al. Effects of an ethanolic extract of mulberry fruit on blood pressure and vascular remodeling in spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2019; 41 (3): 280-286. <http://doi.org/10.1080/10641963.2018.1469645>.
82. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol*. 2000 Aug;55(4):221–32. <https://doi.org/10.2143/ac.55.4.2005744>
83. Ried K et al. Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, 15, 8, CD008893. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD008893.pub2>.
84. Rodrigues EL, Marcelino G, Silva GT, Figueiredo PS, Garcez WS, Corsino J, Guimarães RCA, Freitas KC. Nutraceutical and Medicinal Potential of the Morus Species in Metabolic Dysfunctions. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (2): 301. <http://doi.org/10.3390/ijms20020301>
85. Rodríguez-Sojo MJ, Ruiz-Malagón AJ, Hidalgo-García L, Molina-Tijeras JA, Diez-Echave P, López-Escanez L, Rosati L, González-Lozano E, Cenis-Cifuentes L, García-García J, García F, Robles-Vera I, Romero M, Duarte J, Cenis JL, Lozano-Pérez AA, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Rodríguez-Nogales A. The Prebiotic Effects of an Extract with Antioxidant Properties from *Morus alba* L. Contribute to Ameliorate High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Apr 21;12(4):978. <https://doi.org/10.3390/antiox12040978>
86. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):943–9. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.34.4.943>

87. Safaeian, L., Emami, R., Hajhashemi, V., Haghghatian, Z., 2018. Antihypertensive and antioxidant effects of protocatechuic acid in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biomed. Pharmacother.* 100, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.107>
88. Saiki P, Nakajima Y, Van Griensven LJLD, Miyazaki K. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Nov 2;505(3):885-890. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.173>
89. Sánchez M, Romero M, Gómez-Guzman M, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F, Duarte J. Cardiovascular effects of flavonoids. *Curr Med Chem.* 2018; <http://doi.org/10.2174/0929867326666181220094721>.
90. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of White (*Morus alba*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Leaves: Their Potential for New Products Rich in Phytochemicals. *J Funct. Foods.* 2015;18:1039-1046. <https://doi.org/10.1016/j.jfff.2015.03.053>
91. Savica, V., Bellinghieri, G., & Kopple, J. D. (2010). The effect of nutrition on blood pressure. *Annual Review of Nutrition*, 30, 365–401. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-010510-103954>
92. Sebastian RS, Wilkinson EC, Goldman JD, Moshfegh AJ. Dietary favonoid intake is inversely associated with cardiovascular disease risk as assessed by body mass index and waist circumference among adults in the United States. *Nutrients*, 2017, 9, 8, 827. <http://doi.org/10.3390/nu9080827>.
93. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007 Dec;15(6):252-9. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>

94. Sharma SB, Tanwar RS, Rini AC, Singh UR, Gupta S, Shukla SK. Protective effect of *Morus rubra* L. leaf extract on diet-induced atherosclerosis in diabetic rats. *Indian J Biochem Biophys* 2010, 47:26–31.
95. Suttie JM. *Morus alba* L. Grassland of the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 2005. <https://www.fao.org/4/y8344e/y8344e00.htm#Contents>
96. Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., Saito, I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2006, 24, 1065–1073. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000226196.67052.c0>
97. Thaipitakwong T, Numhom S, Aramwit P. Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharm Biol.* 2018; 56 (1): 109-118. <http://doi.org/10.1080/13880209.2018.1424210>.
98. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012 Jun;90(6):713–38. <https://doi.org/10.1139/y2012-073>
99. Vargas F, Romecín P, García-Guillén AI, Wangesteen R, Vargas-Tendero P, Paredes MD, Atucha NM, García-Estañ J. Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Front Physiol.* 2018 Apr 24;9:394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00394>
100. Wani, S.A. Mechanism of flavonoids action in smooth muscle relaxation. *World Journal Pharmacy Pharm Sci* 2017, 6, 514–550. [https://www.wjpps.com/Wjpps\\_controller/abstract\\_id/7699](https://www.wjpps.com/Wjpps_controller/abstract_id/7699)
101. Woo H, Lee J, Park D, Jung E. Protective effect of mulberry (*Morus alba* L.) extract against benzo[a]pyrene induced skin damage through inhibition of Aryl hydrocarbon

- receptor signaling. *J Agric Food Chem* 2017, 65(50):10925–10932.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04044>
102. Xia, M., Qian, L., Zhou, X., Gao, Q., Bruce, I.C., Xia, Q. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* (L.). *J. Ethnopharmacol* 2008, 120, 442–446.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.020>
103. Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., et al. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gammaaminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2007, 71, 165–173. <https://doi.org/10.1271/bbb.60424>
104. Yang MY, Huang CN, Chan KC, Yang YS, Peng CH, Wang CJ. Mulberry leaf polyphenols possess antiatherogenesis effect via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. *J Agric Food Chem* 2011, 59:1985–1995. <https://doi.org/10.1021/jf103661v>
105. Yang NC, Jhou KY, Tseng CY. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing c-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 2012a, 132:1796–1801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.143>
106. Yang NC, Jhou KY, Tseng CY. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing  $\gamma$ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. 2012b; 132:1796–1801. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.143>
107. Yang SJ, Park NY, Lim Y. Anti-adipogenic effect of mulberry leaf ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract* 2014, 8:613–617.  
<https://doi.org/10.4162%2Fnrp.2014.8.6.613>
108. Yang Y, Gong T, Liu C, et al. Four new 2-arylbenzofuran derivatives from leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(2): 257-260.  
<https://doi.org/10.1248/cpb.58.257>

109. Yang Y, Zhang T, Xiao L, et al. Two new chalcones from leaves of *Morus alba* L. *Fitoterapia*, 2010, 81: 614-616. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.005>
110. Yang ZZ, Wang YC, Wang Y, et al. Bioassay-guided screening and isolation of  $\alpha$  glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*. *Food Chem*, 2012, 131: 617-625. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.foodchem.2011.09.040>
111. Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48, 2374–2379. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.074>
112. Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors* 2000, 12, 143–146. <https://doi.org/10.1002/biof.5520120122>
113. Yoshimura, M., Toyoshi, T., Sano, A., Izumi, T., Fujii, T., Konishi, C., et al. Antihypertensive effect of a gamma-aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58, 615–619. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf903008t>
114. Zhang, M., Chen, M., Zhang, H. Q., Sun, S., Xia, B., & Wu, F. H. In vivo hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*. *Fitoterapia* 2009, 80, 475–477. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.009>
115. Zhang R, Zhang Q, Zhu S, Liu B, Liu F, Xu Y. Mulberry leaf (*Morus alba* L.): A review of its potential influences in mechanisms of action on metabolic diseases. *Pharmacol Res.* 2022 Jan;175:106029. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106029>







plazo de un mes, contado desde la recepción de la presente notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 121 y 122 de la citada Ley, y sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que estime procedente. Transcurrido dicho plazo sin que el recurso se haya interpuesto, la Resolución se hará firme a todos los efectos.

El Jefe de Servicio de Producción Animal  
(Documento firmado electrónicamente al margen)  
Enrique J. Navarrete Jiménez

14/03/2021 11:08:11  
Este es una copia electrónica legítima de un documento electrónico almacenado en el Archivo por la Consellería d'Agricultura, Pesca i Medi Ambient de Murcia, según artículo 21.3 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. El código de verificación es: 1850 MS6 526 80556A6A67  
Su autenticidad puede ser comprobada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.ajuntament.murcia.es/verificadocumentos> o introduciendo el código seguro de verificación (CSV) 1850 MS6 526 80556A6A67



## Anexo II



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Noemi Marín Atucha, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera *Morus alba* L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental", realizada por D. Masoud Akbariaghdam, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 13 de septiembre de 2024

Firmado por MARIN ATUCHA  
NOEMI TERESA - \*\*\*6941\*\*  
el día 13/09/2024 con un  
certificado emitido por  
AC FNMT Usuarios

Mod:T-20

## Anexo III



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D<sup>a</sup>. Ana Pagán Bernabeu, Doctora de Universidad del Área de Fisiología, investigadora colaboradora en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera *Morus alba* L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental", realizada por D. Masoud Akbariaghdam, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2024

**ANA PAGAN** Firmado digitalmente  
por ANA PAGAN  
**BERNABEU** - BERNABEU - 48512868A  
**48512868A** Fecha: 2024.09.18  
09:57:00 +02'00'

# Anexo IV



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Joaquín García-Estañ López, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Evaluación de los efectos de extractos de hojas de morera Morus alba L. sobre la función cardiovascular, renal y plaquetaria en la hipertensión arterial experimental", realizada por D. Masoud Akbariaghdam, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de septiembre de 2024

Procedente: JOAQUIN MARIA GARCIA ESTAN LOPEZ. Fecha auto: 15/08/2024 11:48:27. Emisor del certificado: 01-40 PMRT Universitat de Murcia. C=ES



Mod-T-20

Código seguro de verificación: RUxFmBN-/XlnTfZQ-1Yt+HYGK-i6ROH8ml

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 2

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>