



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES-IZTACALA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y
FARMACOLÓGICA DE LOS ALCALOIDES
DE *Heimia salicifolia* (HBK) LINK POR
SUS PROPIEDADES ANTIHIPERTENSORAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ELIZABETH ALEJANDRINA GUZMÁN
HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme asignado la beca, sin la cual no hubiese sido posible la realización de este trabajo de Tesis de Maestría.

El autor agradece el financiamiento otorgado al proyecto de investigación de Tesis por el programa PAPCA (2006-2007) de la FES- IZTACALA, UNAM.

El autor agradece el financiamiento otorgado al proyecto de investigación de Tesis por el CONACYT 52565.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora:

Dra. Beatriz Vázquez Cruz, por su tiempo, comprensión, apoyo y por guiarme en el camino del conocimiento que siempre será lo más importante que me ha dado.

Y A MI COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Dr. David Kershenovich Stalnikowitz

A MIS SINODALES:

Dr. Marte Lorenzana Jiménez

Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

Dra. María Guadalupe Campos Lara

30

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

MARGARITA Y SEVERINO

POR ENSEÑARME EL CAMINO CORRECTO, GRACIAS POR SU APOYO, DEDICACIÓN Y COMPRENSIÓN.

EL CRÉDITO ES DE USTEDES YA QUE SIN SU AYUDA NO HUBIERA PODIDO TERMINAR ESTE CAMINO.

A MIS SOBRINOS: FER, GRECIA, CARLITOS Y GABRIEL .

ÉLIA Y FER: GRACIAS POR AYUDARME A RECORRER ESTE CAMINO, CREO QUE SIN SU AYUDA TAMPOCO HUBIERA PODIDO LOGRAR TERMINAR ESTE CAMINO.

ÍNDICE

FIGURAS.....	V
TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fisiología del endotelio vascular	3
2.2. Participación del endotelio vascular en la regulación de la presión arterial.....	6
2.3. Sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio.....	9
2.4. Sistema renina angiotensina aldosterona.....	11
2.4.1. Componentes del sistema renina angiotensina.....	13
2.4.1.1. Renina.....	13
2.4.1.2. Angiotensinógeno.....	14
2.4.1.3. Enzima convertidora de angiotensina.....	14
2.4.1.4. Angiotensina I.....	14
2.4.1.5. Angiotensina II.....	15
2.5 Aspectos generales de la hipertensión arterial	16
2.6. Disfunción endotelial e hipertensión.....	20
2.7. Papel del sistema renina angiotensina aldosterona en la hipertensión.....	21
2.8. Farmacoterapia.....	22
2.9. Importancia de las plantas medicinales en México.....	23
2.10. Estudios botánicos de <i>Heimia salicifolia</i>	24
2.11. Estudios etnobotánicos.....	25
2.12. Estudios farmacológicos sobre el efecto hipotensor de <i>Heimia salicifolia</i>	26
2.13. Estudios químicos.....	26
3.0 Justificación.....	29
4.0 HIPÓTESIS.....	29
5.0. OBJETIVOS.....	30
5.1 General.....	30
5.2 Particulares.....	30

6.0	MATERIAL y MÉTODOS.....	31
6.1	Material biológico.....	31
6.1.1	Ratas.....	31
6.1.2	Recolección y comprobación taxonómica de <i>Heimia salicifolia</i>	31
6.2	Reactivos.....	31
6.2.1.	Uso general.....	31
6.2.2.	Específicos.....	32
6.3.	Estudio químico de los alcaloides.....	33
6.3.1.	Aislamiento de los alcaloides.....	33
6.3.2.	Elucidación de la estructura química.....	34
6.4.	Estudios farmacológicos de los alcaloides.....	34
6.4.1.	Curva dosis respuesta a angiotensina II en ausencia y presencia del extracto clorofórmico.....	34
6.4.2.	Valoración del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas anestesiadas normotensas.....	35
6.4.3.	Valoración farmacológica del extracto clorofórmico en ratas hipertensas por administración de L-NAME.....	35
6.4.4.	Valoración del extracto clorofórmico sobre la reactividad del lecho lecho vascular mesentérico.....	36
6.4.5.	Curva dosis respuesta a cada uno de los alcaloides aislados del extracto clorofórmico.....	37
6.4.6.	Curva dosis respuesta a ang II en ausencia y presencia de cada uno de los alcaloides.....	37
6.4.7.	Valoración farmacológica del alcaloide 3 sobre anillos de aorta torácica.....	38
6.4.8.	Reactividad vascular del lecho mesentérico en presencia del alcaloide 3.....	38
6.5.	Análisis estadístico.....	39
7.0.	RESULTADOS.....	40
7.1.	Identificación de la planta.....	40
7.2.	Alcaloides aislados.....	40

7.2.1. Identificación cualitativa del alcaloide 3.....	41
7.2.2. Elucidación química del alcaloide 3.....	42
7.3. Efecto del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas anestesiadas normotensas.....	47
7.4. Efecto de angiotensina II en ausencia y presencia del extracto clorofórmico.....	48
7.5. Efecto del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas.....	49
7.6. Efecto del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas hipertensas.....	50
7.7. Efecto del extracto clorofórmico sobre la reactividad vascular del lecho mesentérico de rata.....	51
7.8. Efecto de los alcaloides aislados del extracto clorofórmico de <i>Heimia salicifolia</i> sobre la presión arterial sistólica de ratas anestesiadas normotensas.....	54
7.9. Efecto de angiotensina II en ausencia y presencia de cada uno de los alcaloides.....	56
7.10. Efecto del alcaloide 3 sobre anillos de aorta torácica	59
7.11. Efecto del alcaloide 3 sobre la reactividad vascular del lecho mesentérico	61
7.11.1. Efecto del alcaloide 3 en presencia del azul de metileno en el lecho vascular mesentérico.....	62
7.11.2. Efecto del alcaloide 3 en presencia de la wortmanina en el lecho vascular mesentérico.....	63
7.11.3. Efecto del alcaloide 3 en presencia de atropina en el lecho vascular mesentérico.....	64
7.11.4. Efecto del alcaloide 3 en presencia del L-NAME en el lecho vascular mesentérico.....	65
7.11.5. Efecto del alcaloide 3 en presencia de difenhidramina en el lecho vascular mesentérico.....	66
8.0. DISCUSIÓN.....	67

9.0 CONCLUSIÓN.....74
10.0 BIBLIOGRAFÍA.....75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes morfológicos de la célula endotelial.....	4
Figura 2.	Generación de vasoconstrictores y vasodiladores a través del endotelio.....	8
Figura 3.	Componentes del sistema renina angiotensina aldosterona.....	12
Figura 4.	<i>Heimia salicifolia</i>	25
Figura 5.	Estructura de los alcaloides de <i>H. salicifolia</i> en posición cis-quinolizidina.	27
Figura 6.	Estructura de los alcaloides de <i>H. salicifolia</i> en posición Trans-quinolizidina.	28
Figura 7.	Separación cromatográfica del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i>	40
Figura 8.	Espectro de RMN C ¹³ de <i>H. salicifolia</i>	42
Figura 9.	Espectro de RMN H ¹ de <i>H. salicifolia</i>	43
Figura 10.	Efecto del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i>	47
Figura 11.	Curvas dosis-respuestas a angiotensina II en ausencia y presencia del extracto clorofórmico.....	48
Figura 12.	Efecto del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i> sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas	49
Figura 13.	Efecto del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i> sobre la presión arterial sistólica de ratas hipertensas.....	50
Figura 14.	Efecto del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i> sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con y sin endotelio.....	51
Figura 15.	Efecto de la acetilcolina sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas con y sin endotelio.....	52
Figura 16.	Efecto del nitroprusiato sódico sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con y sin endotelio.....	53
Figura 17.	Efecto de los alcaloides aislados del extracto clorofórmico de <i>H. salicifolia</i> sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas.....	55
Figura 18.	Curva dosis-respuesta a angiotensina II en ausencia y en presencia de cada uno de los alcaloides sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas.....	57
Figura 19.	Efecto del alcaloide 3 sobre los anillos arteriales de rata con y sin endotelio precontraídos con fenilefrina.....	58

Figura 20. Curva dosis respuesta a fenilefrina.....	59
Figura 21. Efecto de la fenilefrina sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas.....	60
Figura 22. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de fenilefrina.....	61
Figura 23. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de fenilefrina + Azul de metileno.....	62
Figura 24. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de fenilefrina + Wortmanina	63
Figura 25. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de fenilefrina + Atropina.....	64
Figura 26. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de L-NAME.....	65
Figura 27. Efecto del alcaloide-3 sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas en presencia de fenilefrina+ Difenhidramina	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales alcaloides de tipo Cis-quinolizidina.....	26
Tabla 2. Principales alcaloides de tipo Trans-quinolizidina.....	27
Tabla 3. Relaciones de frente de los alcaloides aislados de <i>H. salicifolia</i> separados por cromatografía en capa fina mezcla eluyentes (cloroformo-metanol 3:2).....	40
Tabla 4. Señales observadas en el espectro de resonancia magnética nuclear de RMN C ¹³ y RMN H ¹	43

RESUMEN

Heimia salicifolia (HBK) Link comúnmente llamada hierba de San Francisco, es un arbusto de la familia *Lythraceae* nativa de América, crece en zonas semicálidas y templadas. Las hojas se han utilizado en la medicina tradicional mexicana como antiinflamatorio, sedante, antiespasmódico y antibacteriano. Contiene principalmente alcaloides que pertenecen a la familia de las bifenilquinolizidinas. El objetivo de este estudio fue caracterizar química y farmacológicamente los alcaloides de *Heimia salicifolia* por sus propiedades antihipertensoras.

Estudios previos con los extractos acuoso y metanólico de las hojas de *Heimia salicifolia* disminuyeron la presión arterial sistólica de la rata normotensa. Mediante métodos de extracción química, se aislaron los alcaloides extracto clorofórmico. Se registró la presión arterial sistólica en la arteria carótida de ratas Wistar macho anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg). Se realizó una curva dosis respuesta al extracto clorofórmico observándose disminución de la PAS de 20 ± 7 mmHg. Al realizar una curva dosis respuesta a angiotensina II (25 -125 ng/kg) en presencia del extracto clorofórmico se observó que la curva se desplazaba hacia la derecha concluyéndose que el extracto clorofórmico tiene efecto antihipertensor.

Posteriormente, la administración del extracto clorofórmico durante 10 días por vía oral a ratas normotensas en dosis de 10, 20 y 40 mg/kg, disminuyó la presión arterial sistólica en 28%, 21% y 4%, respectivamente; mientras que en ratas hipertensas mediante la administración de L-NAME más extracto clorofórmico en dosis de 10 y 20 mg/kg disminuyó la presión arterial sistólica en 11 y 12% con respecto al grupo de L-NAME indicando que el extracto clorofórmico tiene efecto hipotensor en la rata normotensa y antihipertensor en ratas hipertensas.

Al realizar estudios *in vitro* en el lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con y sin endotelio en presencia del extracto clorofórmico se observó disminución de la presión de perfusión a través de la integridad del endotelio y de la liberación de óxido nítrico de las células musculares lisas.

La separación del extracto clorofórmico mediante cromatografía en columna y capa fina permitió la separación de 4 alcaloides cuyo R_f fue: alcaloide-1 0.92, alcaloide-2 0.87, alcaloide-3 0.55, y alcaloide-4 0.35. Se estudió su efecto en el modelo de la rata normotensa

y se observó disminución de la presión arterial sistólica con el alcaloide-1 de 4.3 ± 1.3 mmHg, alcaloide-2 de 26 ± 2 mmHg y alcaloide-3 de 27 ± 4 mmHg dependiente de la dosis. Al realizar la curva dosis respuesta angiotensina II (25 -125 ng/kg) en presencia de cada uno de los alcaloides (dosis 2 mg/kg), se observó que los alcaloides 2 y 3 disminuyeron la respuesta presora máxima a angiotensina II en 32 y 59.6%. Por lo que se decidió continuar el estudio con el alcaloide-3 utilizando el modelo del lecho vascular mesentérico perfundido con solución Krebs más fenilefrina 10^{-5} M. La presión de perfusión aumentó en un 69%, en estas condiciones se realizó una curva concentración respuesta a acetilcolina y al alcaloide-3 observándose disminución de la presión de perfusión de 26%. En otra serie experimental se perfundió fenilefrina + L-NAME (2×10^{-4} M) y fenilefrina + azul de metileno (10^{-5} M) y al realizar la curva concentración respuesta a acetilcolina y al alcaloide-3 se observó disminución de la presión de perfusión de 11 y 8%, respectivamente. Al perfundir fenilefrina+ wortmanina (10^{-5} M) se observó disminución de la presión de perfusión de 1.8% con el alcaloide-3. En otra serie experimental se perfundió fenilefrina + atropina (10^{-5} M) se observó disminución de la presión de perfusión de 8% con el alcaloide-3. En otra serie experimental se perfundió fenilefrina + difenihidramina (10^{-5} M) se observó disminución de la presión de perfusión de 30% con el alcaloide-3.

Posteriormente, al alcaloide-3 se le realizaron pruebas colorimétricas utilizando la reacción de la 4-nitroanilina y espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de C^{13} y H^1 e indicaron que el alcaloide-3 pertenece a la familia de las bifenil-quinolizidinas. Se trata del alcaloide litrina.

El análisis de los resultados de los ensayos biológicos mostraron que el alcaloide-3 para ejercer su efecto vasodilatador requiere de la liberación de óxido nítrico de las células endoteliales, a través de la activación de la vía PI3K Akt y de su unión a receptores muscarínicos. En base a estos resultados se concluyó que *Heimia salicifolia* contiene por lo menos, un alcaloide bifenilquinolizidínico cuyo efecto es vasorrelajante y puede ser utilizado como agente hipotensor.

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es uno de los problemas de salud pública más importantes en los países desarrollados, y una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México (SSA, 2000). Representa un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular ya que lesiona vasos sanguíneos, renales, cardíacos y cerebrales produciendo complicaciones cardiovasculares, accidentes cerebrales, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, daño renal y aterosclerosis (Gharavi y col., 2001). Desafortunadamente en el 90% de los hipertensos la etiología es desconocida, razón por la cual su tratamiento es fundamentalmente paliativo y en gran parte se basa en el uso de sustancias con las que se busca mantener la presión arterial sistólica dentro de un rango de valores normales.

No obstante la existencia de numerosos medicamentos antihipertensivos, gran parte de la población mexicana tanto de zonas rurales como urbanas, utilizan plantas para mitigar uno o varios síntomas que en ocasiones acompañan a la hipertensión arterial. La terapéutica con plantas, ha sido practicada desde tiempos inmemoriales y en México a principios de este siglo constituía la base de la prevención y curación de la mayoría de las enfermedades más frecuentes (Magos, 1999). La información científica sobre este campo se ha incrementado; sin embargo, para una gran cantidad de extractos y sustancias de origen vegetal, no se cuenta con los estudios preclínicos y / o clínicos que permitan reconocer científicamente sus propiedades medicinales y tóxicas. De las 250, 000 a 750, 000 especies de plantas (SAGARPA, 2001), se estima que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. En México existen 124 especies de plantas encontradas para el tratamiento de la presión arterial sistólica. De estas el 74% se utiliza de manera empírica, como ejemplo de éstas se encuentra la anona, el chayote, el perejil (De feo y col., 1993), y sólo el 26% han sido estudiadas científicamente entre éstas se encuentran la *Boerhavia diffusa* (mata de pavo), *Cardiospermum halicacabum* (Farolitos), *Sida acuta* (malva), (Hansen y col., 1995), *Bidens pilosa* (Acetilla) (Dimo y col., 2002). De otras plantas como la rauwolfia (*Rauwolfia vomitoria* o *Rauwolfia serpina*, se han aislado de la corteza y la raíz compuestos como los siguientes

alcaloides: 1) Reserpina: que disminuye la presión arterial y la frecuencia cardiaca 2) Rescinamina, con acciones similares a la reserpina pero menos efectos depresores del SNC 3) Ajmalicina, un bloqueador adrenérgico β , que produce vasodilatación y es simpaticolítico. 4) Raupina. Acción hipotensora y 5) Ajmalina: arrítmico en el uso de taquicardias (Kuklinski, 2000). Sólo algunas plantas se han estudiado a nivel clínico dentro de éstas se encuentra la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y el ajo (*Allium sativum*) (Montoya, 2005).

En la actualidad, el estudio de las plantas medicinales como recurso de la terapéutica moderna ha entrado en una etapa de interés médico científico a nivel nacional y mundial, lo que obedece a la necesidad de contar con fármacos más eficaces con menos efectos colaterales y de costo accesible para los pacientes con enfermedades crónicas.

La presente investigación pretende acercarse al conocimiento químico y farmacológico de *Heimia salicifolia*, la cual a pesar de que no cuenta con antecedentes etnobotánicos contiene metabolitos de naturaleza alcaloidal que en investigaciones científicas han mostrado actividad hipotensora. Por esta razón, la posibilidad de encontrar propiedades antihipertensoras en *Heimia salicifolia*, es altamente probable.

El objetivo de la presente investigación fue aislar los alcaloides de las hojas de *Heimia salicifolia*, estudiar su efecto hipotensor y antihipertensor de cada uno de estos alcaloides en diferentes modelos de hipertensión y proponer el mecanismo de acción del efecto vasodilatador.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fisiología del endotelio vascular

El endotelio vascular actualmente es considerado como un “órgano” de regulación vascular con acciones endócrina, parácrina y autócrina que está implicado en procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes (Cachofeiro y col., 2000). Antes de describir las funciones del endotelio, mencionaremos algunos aspectos de la microestructura de la célula endotelial.

Las células endoteliales poseen componentes del aparato contráctil del tejido muscular: actina, miosina, tropomiosina y alfa-actinina (Fig.1). Que se encuentran organizadas en tres estructuras llamadas: membrana cortical, sistema de filamentos de actina y las fibras de tensión estriadas tipo miofibrillas (Cachofeiro y col., 2000).

Mediante su acción conjunta, estos componentes mantienen la:

- Estructura y remodelación de la membrana plasmática
- Inmovilización de las proteínas en la membrana endotelial
- Permeabilidad selectiva del endotelio a sustancias y células.

La membrana cortical es responsable de la forma y de la elasticidad de las células endoteliales, sirve de anclaje para diversas proteínas de membrana y de moléculas de adhesión. Entre las proteínas de membrana se encuentra la anexina, que es un complejo de ión calcio (Ca^{++}), lípidos y proteínas, que controla la exocitosis y la endocitosis.

Dentro de las moléculas de adhesión están la E-selectina y la cadherina. Por todo ello tanto, la adherencia de células y el paso de moléculas a través de las células endoteliales dependen de la integridad de la membrana cortical (Consentido y col., 2000).

Las fibras de tensión son totalmente distintas de la membrana cortical, son abundantes en las células endoteliales pues se encuentran expuestas a mayor fuerza de fricción o estiramiento de la pared ejercida por la sangre circulante. Ayudan a la célula endotelial a adaptarse a las fuerzas mecánicas del flujo de sangre (Jiménez y col., 2003). Las caveolas son estructuras vesiculares típicas del endotelio, se encuentran distribuidas

entre un 5 y 10% de la membrana celular endotelial. Son ricas en lípidos, receptores y proteínas como la actina. Algunas tienen forma de depresión, mientras que otros son estructuras planas o globulares. Las caveolas están formadas por transportadores o canales de numerosas moléculas como colesterol, ácidos grasos, Ca^{++} tanto a través de las células como dentro y fuera de ellas.

Pueden actuar como reservorios de receptores interiorizados, de los que se podrá disponer cuando le sean necesarios a la célula. Participan en procesos de transducción de señales, incluidos los que favorecen la vasoconstricción, vasodilatación y crecimiento de la pared del vaso (Shaul y col., 2000).

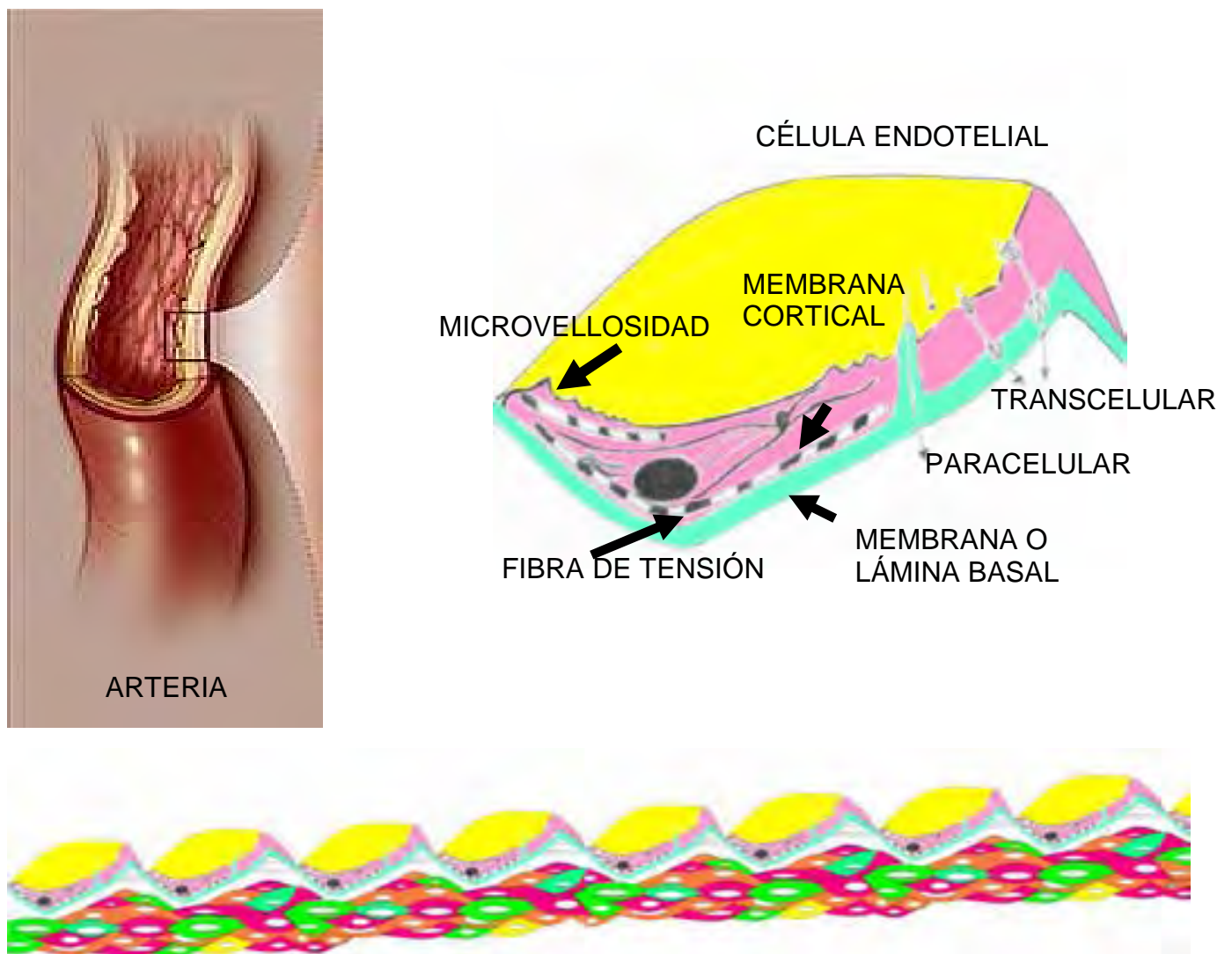


Figura. 1. Componentes morfológicos de la célula endotelial.

Las funciones del endotelio son múltiples, por lo que se puede inferir que funciona como barrera selectiva entre los compartimentos extra e intravascular, mediante la permeabilidad selectiva del tamaño y carga eléctrica de la molécula. La permeabilidad, consiste en el transporte de solutos y agua a través de las capas endotelial y epitelial, puede seguir dos vías. La vía transcelular cruza las membranas celulares basal y apical y es principalmente mediada por canales, acarreadores, bombas y vesículas. En contraste, la vía paracelular pasa a través de los espacios intercelular y lateral entre las células en contacto y es mediado por las uniones estrechas (Bazzoni y col., 2006).

Regulación de los procesos de agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis: Esta función la realiza mediante la expresión de la trombo-modulina, que se une a la trombina, disminuyendo de esta forma su afinidad por el fibrinógeno y aumentando la actividad de la proteína C.

A su vez el endotelio puede ser trombogénico, al activar el factor Von Willebrand, que estabiliza al factor VIII y actúa como cofactor en la adherencia de las plaquetas. Segrega el factor activador de plaquetas, que es un mediador importante en la producción plaqueta/fibrina. Estos factores normalmente promueven la coagulación local y la reparación en el sitio de daño (Pacheco y col., 2003).

Regulación de la proliferación y crecimiento de las células de la pared vascular:

El endotelio regula la capacidad de proliferación del músculo liso vascular mediante la liberación de numerosos factores como el factor de crecimiento angiogénico, el factor de crecimiento endotelial vascular que actúan localmente, aisladamente o en combinación sobre las células del músculo liso modulando su capacidad proliferativa y migratoria (Scout y col., 1993).

Regulación de la adhesión de leucocitos a las células endoteliales a través de la expresión de la P-selectina, E-selectina, moléculas de adhesión intracelular tipo 1 y moléculas de adhesión vascular tipo 1. La P-selectina es la primera en expresarse y ocurre en los primeros 15 minutos de la activación endotelial, estas moléculas permiten la adhesión, rotación y migración leucocitaria hacia los tejidos, este mecanismo tiene la finalidad de protección, sin embargo los leucocitos y macrófagos liberan enzimas proteolíticas y radicales libres de oxígeno que amplifican el daño tisular y la lesión endotelial (Contreras, 2004).

Regulación del tono vascular; entendiéndose por tono vascular, la contracción sostenida del músculo liso que le permite al vaso mantener un diámetro continuo mediante la liberación de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras por el endotelio (Badimón, 2001).

2.2. Participación del endotelio vascular en la regulación de la presión arterial

La presión sanguínea o arterial es la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared vascular, y corresponde al producto del gasto cardiaco por la resistencia vascular periférica total (Tresguerres, 1999). Su expresión matemática es: $PA = GC \times RTP$, esta relación indica que cualquier factor que modifique el gasto cardiaco o la resistencia periférica total modificará la presión arterial. El gasto cardiaco está determinado por varios factores, entre ellos están: las propiedades contráctiles del corazón, la frecuencia y el ritmo cardiaco, la precarga, la actividad del sistema nervioso autónomo y la integridad funcional de las válvulas cardiacas. La precarga está determinada por el volumen intravascular, el tono y la capacidad venosa. La resistencia periférica total es la fuerza que se opone al flujo sanguíneo y depende del volumen sanguíneo y del diámetro de la arteria, tiene una relación inversa con la cuarta potencia del radio de la luz del vaso (Crawford, 2002).

El registro de la presión arterial se conforma de las presiones sistólica y diastólica. La presión sistólica corresponde a la fuerza ejercida por la sangre contra la pared vascular cuando es impulsada por el corazón durante la sístole, y la presión diastólica corresponde a la fuerza ejercida por la sangre contra la pared de los vasos durante la diástole ventricular o estado de relajación del corazón (Guillén, 2002).

La presión sistólica promedio de un adulto joven y sano es de 120 mmHg y la presión diastólica es de 80 mmHg (120/80). La presión arterial sistólica no se mantiene continua a lo largo del día, ya que se van produciendo aumentos y descensos, dependiendo de la actividad que se realice (Costanzo, 2000), sin embargo existen mecanismos de control que mantienen los valores de la presión arterial sistólica en intervalos que se consideran normales.

La presión arterial sistólica normal se conserva así porque existen varios mecanismos que interaccionan y actúan sobre el gasto cardiaco y la resistencia periférica total

(Tresguerres, 1999); en el presente estudio solo se mencionará, su regulación a través del endotelio vascular.

El endotelio vascular interviene activamente en la producción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras (Cachofeiro, 2001) que le permiten participar importantemente en la modulación del tono vascular (Fig. 2). El endotelio vascular participa en la activación de algunas sustancias del plasma como bradicinina, noradrenalina, serotonina y ADP, y en la síntesis y liberación de vasodilatadores como prostaciclina, metabolito del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa (Moncada y col., 1976) y el factor relajante derivado de endotelio actualmente conocido como óxido nítrico (Furchgott y Zawadzki, 1980). El endotelio vascular también participa en la síntesis de agentes vasoconstrictores como la endotelina y metabolitos del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa como el tromboxano A_2 . El endotelio vascular está expuesto a cambios del flujo sanguíneo y a cambios de presión por lo cual, al sufrir de estrés relativo al flujo y deformaciones en las paredes de los vasos, participa en la respuesta, generando rápidamente óxido nítrico y prostaciclina y modulando la respuesta estructural a largo plazo del músculo liso de la pared vascular, produciendo factores de crecimiento que estimulan la proliferación del músculo liso vascular. La prostaciclina y el óxido nítrico tienen efectos antiproliferativos, por lo cual se establece un mecanismo de control entre los factores de crecimiento y la prostaciclina y el óxido nítrico. Las endotelinas son péptidos de 21 aminoácidos que contiene dos puentes de disulfuro (ET-1, ET-2, ET-3), difiriendo las dos últimas en dos y seis aminoácidos. Las endotelinas son producidas por el endotelio vascular en forma de preproendotelina que requiere un proceso proteolítico de ruptura por una endopeptidasa dando lugar a un péptido intermediario de 38 aminoácidos, la pro-endotelina que es inactiva requiere de la enzima convertidora de endotelina para formar a la endotelina. Las endotelinas difieren en su actividad biológica, así la ET-1 tiene una acción parácrina que ejerce a través de su unión a receptores específicos llamados ET_A que se encuentran en las células del músculo liso; a corto plazo, regula el tono vascular y modula los reflejos cardiovasculares mediante su acción vasoconstrictora, mientras que los receptores ET_B se localizan en las células endoteliales, liberan óxido nítrico y prostaciclina que modulan su acción vasoconstrictora (Tollins y col., 1999).

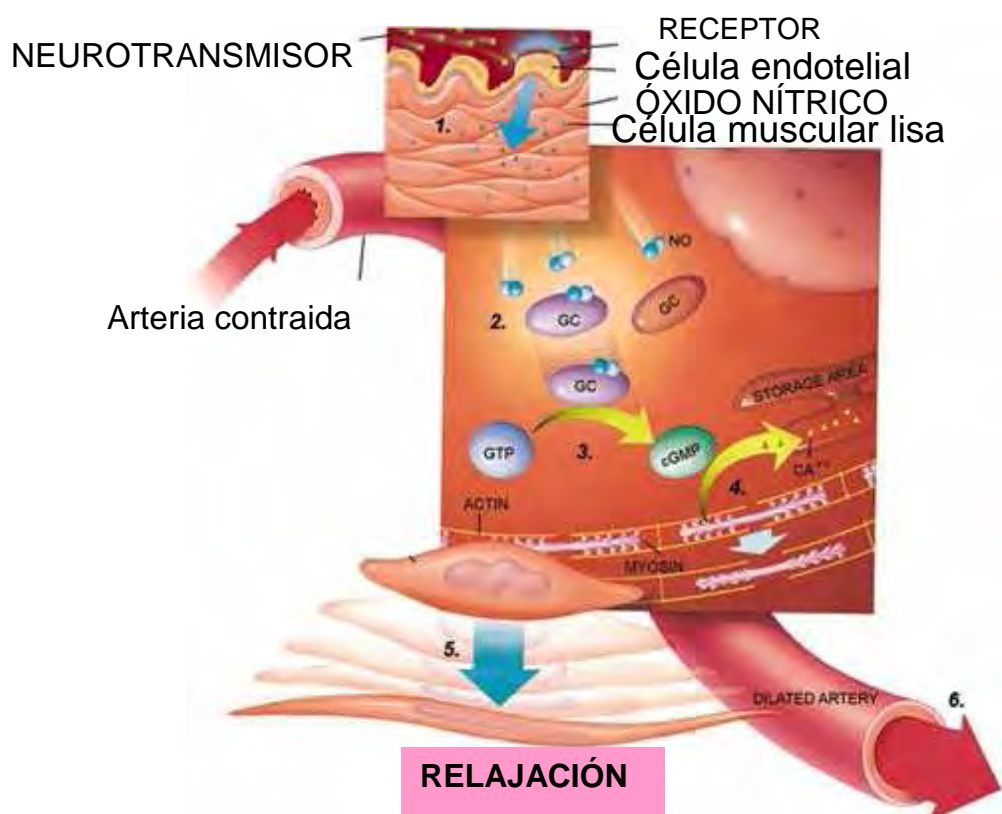
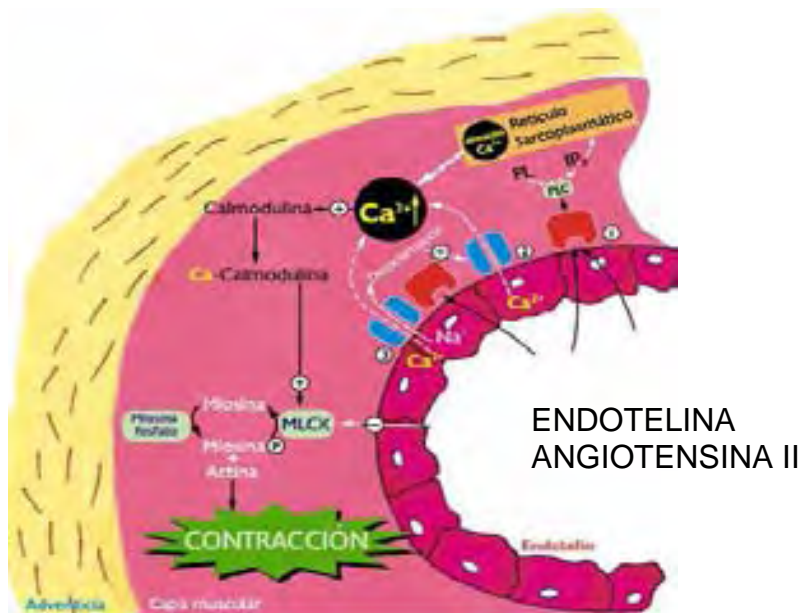


Figura. 2. Generación de vasoconstrictores endotelina y vasodiladores prostaciclina y óxido nítrico a través de las células endoteliales

2.3. Sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio

Dentro de las sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio se encuentran la prostaciclina, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y óxido nítrico siendo este compuesto uno de los más importantes ya que es liberado continuamente de las células endoteliales por lo tanto mantiene de manera continua la vasodilatación del músculo liso.

El óxido nítrico es un radical libre compuesto por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno. Es una molécula de vida media corta (3 a 5 segundos), después se transforma a nitritos y nitratos sin actividad sobre el endotelio (Hecker y col., 2000).

El óxido nítrico en el endotelio se sintetiza por la actividad de la sintasa de óxido nítrico sobre la L-arginina, una vez sintetizado el NO difunde hacia el músculo liso donde se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (Cosentino, 1999), causando un cambio conformacional en la enzima que la hace activa, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular del 3',5'-guanosina monofosfato cíclico. A su vez, este segundo mensajero (GMPc), produce la apertura de canales de K⁺ hiperpolarizando la fibra muscular lisa y disminuyendo el contenido intracelular de Ca⁺² (Li, 2001) esto conlleva a que el músculo liso vascular se relaje.

La actividad de la eNOS requiere de sus dos sitios catalíticos. 1) el dominio de actividad reductasa está ubicado en el C-terminal de la enzima y con los sitios de unión para los cofactores NADPH, FAD Y FMN. Las flavinas FADH y FMNH trasladan electrones desde el NADPH al grupo hemo. 2) el sitio de actividad oxidasa está compuesto por un grupo hemo ubicado en N-terminal de la proteína, y determina la oxidación de la L-arginina. Ambos dominios se hallan separados por un sitio de unión para calmodulina. De esta manera el grupo terminal guanidino de la arginina incorpora 5 electrones oxidándose, reacción que es sustentada por el NADPH, las flavinas FMNH, FADH y la tetrahidrobiopterina constituyen cofactores adicionales de la eNOS (Campbell, 2002). La transferencia de los electrones requiere la fijación de calmodulina a la sintasa de óxido nítrico.

Se han identificado 3 isoformas de la NOS, la endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) y la inducida (iNOS); la eNOS y la nNOS son constitutivas dependientes de calcio-calmodulina, su actividad depende de la activación de Akt que se encuentra a su vez regulada por la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa la cual fosforila fosfatidilinositoles (PI) específicos, dando como producto fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, estos lípidos son reconocidos por Akt que es una serina treonina cinasa citosólica que consta de una sola cadena polipeptídica, con dominios catalíticos (cinasa) y a su vez se encuentra regulado (por 3 fosfatidilinositoles), dominio rico en glicina (G) y de homología con pleckstrina (PH) que le permiten su interacción con PI3P (Vivanco y col., 2002). Este cambio de localización celular permite que la enzima Akt cuando se encuentra activa fosforile los aminoácidos serina o treonina de multitud de proteínas que poseen la secuencia aminoacídica consenso RxRxxS/T en su estructura primaria (Ruiz, 2002); Estudios recientes han demostrado que Akt fosforila a la eNOS en su residuo serina 1179 y en la secuencia del humano en la serina 1177.

El gene de la enzima inducible se encuentra en el cromosoma 17, su peso molecular es 130 kDa y su producción es estimulada por agentes inflamatorios en macrófagos y fagocitos. Los cuales liberan grandes cantidades de NO de forma sostenida, para así eliminar bacterias, parásitos y otros agentes patógenos (Lowenstein, 1994).

Algunas sustancias endógenas como la acetilcolina, bradicinina e histamina producen su acción vasodilatadora a través de la liberación de óxido nítrico, ya que al interactuar con sus receptores específicos (Buga y col., 1991), por ejemplo muscarínicos para acetilcolina, estimulan la actividad de la fosfolipasa C, lo que desencadena la formación del 1, 4, 5-inositol trifosfato y diacilglicerol. Estos segundos mensajeros abren los canales de calcio del retículo endoplásmico liso con la consecuente liberación de calcio que se une a la calmodulina y activa la sintasa de óxido nítrico generando óxido nítrico (Quesada, 2000).

La síntesis de óxido nítrico puede ser inhibida por análogos estructurales de la L-arginina como la nitro-monometil-L-arginina (L-NMMA), N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) y nitro-L-arginina (L-NA). Palmer y col. (1988) demostraron el papel de la L-arginina como precursor del óxido nítrico endógeno con el hallazgo de la L-NMMA. Este compuesto que previamente se describió como inhibidor de la generación de nitritos y nitratos en macrófagos activados impidió tanto la relajación dependiente del endotelio como la liberación del óxido nítrico, cuyo efecto se revierte al añadir concentraciones crecientes de L-arginina, concluyéndose que la sustancia L-NMMA actúa como un inhibidor competitivo sobre la sintasa de óxido nítrico (Cowley, 1995). Estos inhibidores se han utilizado en modelos experimentales para desarrollar hipertensión ya que se pierde el equilibrio entre la liberación de óxido nítrico y las sustancias vasoconstrictoras principalmente de angiotensina II y catecolaminas lo que produce aumento de la presión arterial sistólica e hipertensión arterial (Santos y col., 2003).

2.4. Sistema renina angiotensina aldosterona

El Sistema Renina-Angiotensina aldosterona juega un papel fisiológico muy importante en el mantenimiento de la presión arterial y volumen sanguíneo, así como en condiciones patológicas de presión alta y complicaciones renales (Guyton, 2001).

El sistema renina- angiotensina aldosterona comprende una serie de reacciones enzimáticas sobre compuestos de naturaleza proteica que conducen a la formación de Ang II.

La renina es una enzima que actúa sobre el angiotensinógeno (sustrato de la renina) para catalizar la formación del decapeptido Ang I, este decapeptido se desdobra mediante la ECA dando como producto el octapeptido Ang II, como se observa en la figura (Fig. 3).

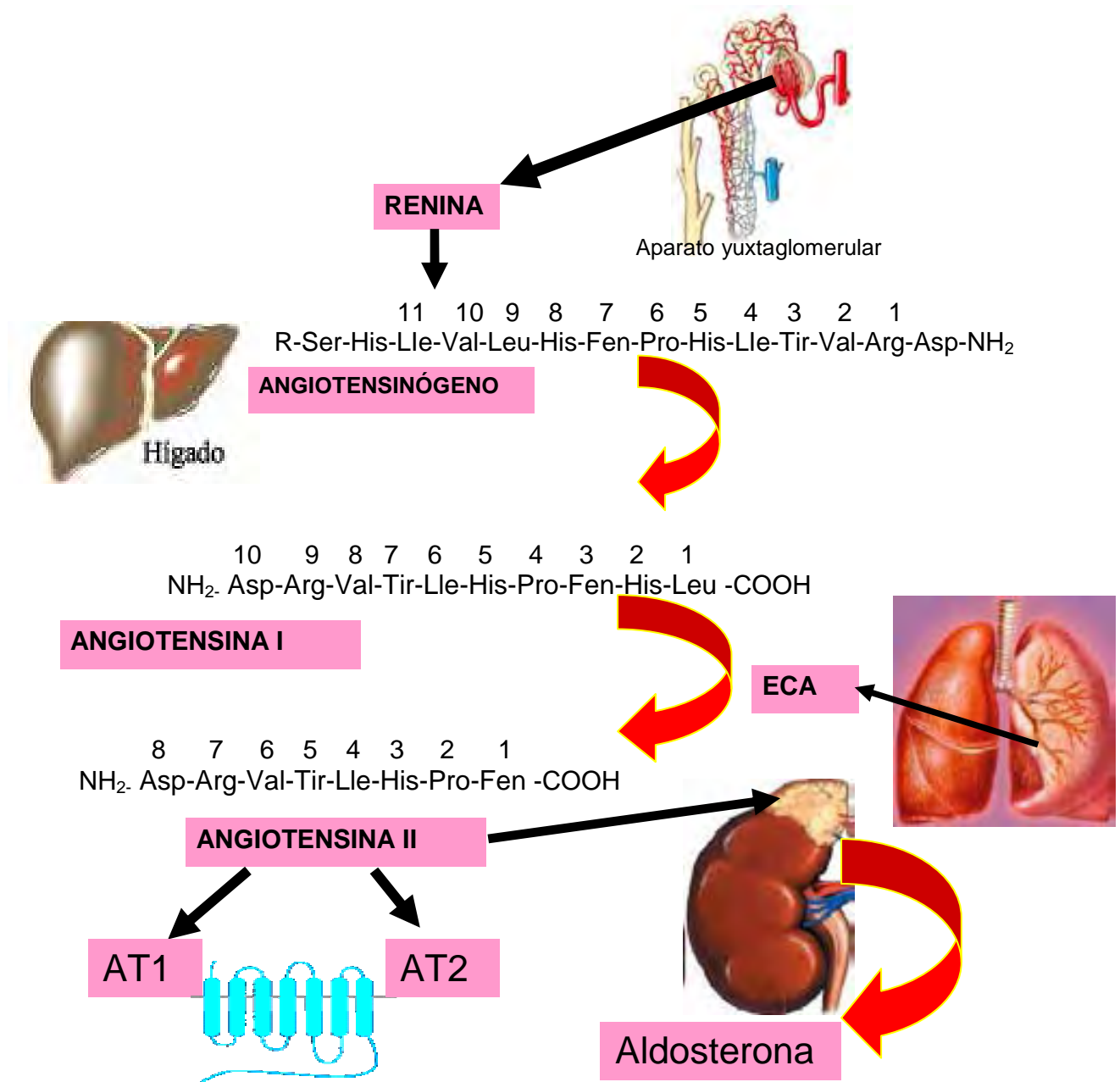


Figura. 3. Componentes del sistema renina angiotensina aldosterona y secuencia de formación de Angiotensina II. Angiotensinógeno, ECA (enzima convertidora de angiotensina), angiotensina I, angiotensina II.

2.4.1 Componentes del SRA-A

2.4.1.1. Renina

Es una proteasa de aspartilo su principal sustrato natural es una α_2 - globulina, el angiotensinógeno. La renina rompe el enlace entre los residuos 10 y 11 en el amino terminal de esta proteína para formar Ang I. La forma activa de la renina es una glucoproteína que contiene 340 aminoácidos. Se sintetiza como preprorenina de 406 aminoácidos que se procesa a prorenina que se obtiene de retirar los últimos 23 aa de la región amino terminal, y contiene 383 aminoácidos y es una forma madura pero inactiva de la proteína (Imai, 1998). La renina contiene 340 aminoácidos es almacenada en las células yuxttaglomerulares y al ser liberada se encuentra circulando en la sangre. La vida media de la prorenina es de 15 min (Jackson, 2003). La renina activa tiene una vida media en la circulación de 80 min. Su única función conocida es liberar el decapeptido angiotensina I de la región amino terminal de la molécula de angiotensinógeno (Ganong, 2002).

El incremento en la actividad del sistema nervioso simpático de los nervios renales aumenta las catecolaminas circulantes y las prostaglandinas que estimulan la secreción de renina actuando directamente sobre el aparato yuxttaglomerular.

Existen trastornos que incrementan la secreción de renina como: reducción de sodio, uso de diuréticos y de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, hipotensión, hemorragia, deshidratación, insuficiencia cardíaca, cirrosis, estímulos psicológicos o a través del incremento de Na^+ y Cl^- en la mácula densa (Ganong, 2002).

La secreción de renina a partir de las células yuxttaglomerulares es controlada por la vía de la mácula densa, vía del barorreceptor intrarrrenal y por los receptores β -adrenérgicos (Jackson, 2003).

2.4.1.2. Angiotensinógeno

El angiotensinógeno, es una [α₂ globulina](#) formada por 453 aminoácidos, es sintetizado y liberado principalmente por los hepatocitos (también lo pueden hacer adipocitos y astrocitos) en forma constitutiva, siendo el plasma el principal reservorio del angiotensinógeno. Esta proteína constituye el sustrato de la renina. La porción importante de la proteína es el amino terminal, a partir del cual se libera la angiotensina I, es reconocido por un péptido señal y una secuencia carboxílica terminal que contiene 3 sitios de glucosilación en los aminoácidos 47-49, 295-297 y 319-321, que son reconocidas por la renina (Ibarra y col., 1993).

2.4.1.3. Enzima convertidora de angiotensina

Es una dipeptidil carboxipeptidasa que está formada por 1278 aminoácidos y presenta dos dominios homólogos, cada uno con un sitio catalítico y una región para unión con Zn⁺², es producida por diferentes tejidos (sistema nervioso central, epitelio de los túbulos proximales, endotelio vascular, pulmón, epitelio pulmonar). Esta enzima es inespecífica y desdobla unidades dipéptido de sustratos con diversas secuencias de aminoácidos. Una característica importante es que sólo reconoce sustratos que poseen un grupo carboxilo libre en el aminoácido carboxilo terminal, y la prolina no debe ser el penúltimo aminoácido; así la enzima desdobla al decapeptido angiotensina I en el ocatapéptido angiotensina II, quien contribuye de manera importante en la regulación de la presión arterial sistólica (Gómez y col., 2000).

2.4.1.4. Angiotensina I

Se forma a partir del extremo amino terminal del angiotensinógeno, que es reconocido por un péptido señal y una secuencia carboxilo terminal Asp-Arg-Val-Tir-Lle-His-Pro-Fen-His-Leu. La angiotensina I es el sustrato para la enzima convertidora de angiotensina que da lugar a la angiotensina II, al separar dos aminoácidos (His y Leu) de la Ang I (Ibarra y col., 1993).

2.4.1.5. Angiotensina II

Es un octapéptido considerado el componente principal activo del sistema renina angiotensina aldosterona. Su vida media *in vivo* es menor de 30 segundos, por la rapidez de degradación enzimática por parte de las peptidasas a angiotensina III, IV, y 1-7. Los efectos fisiológicos de angiotensina II se ejercen a través de su unión a receptores de siete dominios transmembranales llamados AT1 y AT2, localizados sobre la superficie de la membrana plasmática de las células blanco. Las acciones principales de angiotensina II, las realiza a través de su unión al receptor AT1 y de la activación de la vía de la Rho cinasa, la cual pertenece a la superfamilia de las GTPasas pequeñas que comprende más de 100 proteínas estructuralmente relacionadas.

Las GTPasa/s pequeñas son activas cuando tienen unido GTP e inactivas cuando contienen GDP. En su estado activado, las GTPasas pequeñas se unen a sus efectores que, a su vez, regulan un gran número de funciones biológicas. Las GTPasas pequeñas son controladas por distintas clases de proteínas reguladoras (Boguski y col., 2000) su activación está mediada por la acción de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina conocidos como GEF (*guanine nucleotide exchange factors*). Estos factores desplazan al inhibidor de la disociación de GDP (GDI) y liberan el residuo isoprénico unido a la GTPasa pequeña que sirve para su anclaje a la membrana plasmática, y también catalizan el intercambio de GDP a GTP. La unión del GTP induce un cambio conformacional en la GTPasa pequeña, activándola y permitiendo el acoplamiento a sus efectores. Al activarse Rho-cinasa por RhoA fosforila la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, con lo cual esta fosfatasa es inhibida, y se favorece de esta manera la contracción de las células musculares lisas vasculares, la formación de fibras de estrés y la migración celular. La importancia de esta vía radica en que la angiotensina II a través de su receptor AT1 y por estimulación de la neurotransmisión noradrenérgica periférica, activa a Rho cinasa, para producir vasoconstricción y con ello producir aumento en la presión arterial, además de realizar otras funciones como: reducción de la excreción urinaria de sodio y agua, e incremento de la excreción renal de potasio.

La angiotensina II estimula la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal para incrementar la síntesis y secreción de aldosterona.

Aldosterona: es un mineralocorticoide que participa en el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico mediante la regulación de la reabsorción y secreción de Na⁺ y K⁺ en los túbulos distal y colector. La aldosterona se produce localmente en el tejido vascular tanto en las células endoteliales, como en las células musculares lisas. Esta síntesis parece ser regulada por los mismos estímulos que regulan la síntesis adrenal. A nivel vascular, este mineralocorticoide participa en la regulación del tono vascular a través de la modulación del transporte de sodio y calcio en las células musculares lisas de la media así como la modulación de los sistemas adrenérgico, nitrérgico y sensorial (Cachofeiro y col., 2004).

2.5. Aspectos generales de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial es el aumento sostenido e innecesario de las presiones sistólica y diastólica. De la expresión $PA = GC \times RTP$; se puede inferir que la hipertensión arterial puede ser consecuencia de la elevación de alguno de los dos factores o de ambos. El aumento fisiológico del gasto cardiaco, puede ser adaptado por disminución de la resistencia periférica total y por los mecanismos que controlan la presión arterial normal, lo cual no ocurre en la hipertensión arterial; al parecer los mecanismos barorreceptores, humorales y renales están colocados en un valor superior de control de presión arterial (Guyton, 1996).

La hipertensión arterial es uno de los problemas de salud pública más importantes en los países desarrollados, y una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México (SSA, 2000). Representa un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular ya que lesiona vasos sanguíneos renales, cardiacos y cerebrales produciendo complicaciones cardiovasculares, accidentes cerebrales, insuficiencia cardiaca, enfermedad isquémica, daño renal y aterosclerosis (Gharavi y col., 2001).

Desde el punto de vista clínico la Organización Mundial de la Salud define que un paciente es hipertenso, cuando muestra cifras de presión arterial diastólica mayor o igual a 90 mm Hg y/o la presión arterial sistólica mayor o igual a 140 mm Hg, dentro de esta misma clasificación de acuerdo con los valores de presión arterial sistólica y

presión arterial diastólica se puede agrupar en hipertensión: Leve cuando los valores oscilan entre 140-159 mmHg y 90-99 mmHg, moderada 160-179 mmHg y 100-109 mmHg y severa cuando los valores son mayores a 180 mmHg y 110 mmHg (Mosterd y col., 1999).

Se calcula que cerca de 600 millones de personas padecen esta patología a nivel mundial. En nuestro país, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 se estima que el 30.8% de la población mayor de 20 años (alrededor de 13 millones de personas) es portadora de este padecimiento, Esta encuesta ubica a la hipertensión arterial como uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Olaiz, 2006).

En México, la mortalidad atribuida a enfermedades cardiovasculares ha mostrado un incremento sostenido durante los últimos años. En 1992, el 2.7% de las defunciones se relacionó con enfermedades cardiovasculares, mientras que para el año 2005, esta cifra se incremento hasta 3.6%, ubicándose como la quinta causa de muerte nacional (SSA, 2005).

La prevalencia de esta enfermedad en las mujeres se relaciona estrechamente con la edad y aumenta considerablemente a partir de los 50 años, debido a la disminución de estrógenos en la menopausia. Así pues, la relación de la hipertensión entre el sexo femenino y el masculino pasa de 0.6-0.7 a los 30 años a 1.1-1.2 a los 65 años (Olaiz y col., 2006).

La hipertensión arterial según su etiología se clasifica en: Primaria y Secundaria

La hipertensión arterial esencial es de causa desconocida, constituye del 90-95% de todos los casos, y la secundaria a otras patologías subyacentes, 5 a 10% restante (Braunwald y col., 2002).

La hipertensión arterial se produce por combinación de varios factores, como son: edad, sexo, actividad física, dieta, sobrepeso, factores genéticos, sociales y psicológicos (Mazzali y col., 2001), que conllevan al desarrollo de cambios que alteran la relación entre el volumen sanguíneo y la resistencia periférica. El gasto cardiaco puede estar elevado en pacientes con exceso de peso o en ancianos, sin embargo el factor más importante en la hipertensión arterial es el aumento del tono arteriolar, por lo cual la resistencia periférica total está aumentada, obligando al corazón a realizar mayor

esfuerzo para impulsar la sangre a través de las arterias grandes y medianas, las cuales deben soportar el impacto del ventrículo con su impulso sistólico y se ven sometidas a una gran presión (Cotran y col., 2002). Estos vasos pierden su elasticidad progresivamente y los territorios que irrigan ven reducida su perfusión gradualmente. Las mismas arteriolas sufren el efecto de la presión excesiva y sostenida, desarrollándose hiperplasia arteriolar con reducción del calibre de su luz, esto a su vez perpetúa la hipertensión arterial estableciéndose así un círculo vicioso (Espino y col., 1997).

Entre los mecanismos fisiológicos que contribuyen al desarrollo de la hipertensión arterial esencial están:

Sistema nervioso simpático. El aumento en la actividad del SNS tiene un papel muy importante en el desarrollo de la hipertensión arterial esencial, existe cierta correlación entre la presión arterial diastólica y la concentración plasmática de noradrenalina la cual es constante en personas normotensas, en tanto que en pacientes hipertensos los niveles están aumentados; los cambios en la concentración de catecolaminas son más notorios en los pacientes que están en los límites normales de presión arterial sistólica (Esler y col., 1990). Se ha observado que en los pacientes con hipertensión arterial esencial la actividad del sistema nervioso parasimpático está disminuida, prevaleciendo el tono del sistema nervioso simpático; efecto que puede atribuirse al aumento del umbral del reflejo barorreceptor; se ha discutido, que el aumento del tono simpático puede deberse a la falta de sistemas que modulen su actividad, como falta de modulación en la liberación de su neurotransmisor, daño en los sistemas que participan en su recaptura por la neurona adrenérgica o aumento de sus efectos a través del sistema renina angiotensina aldosterona (Jackson y col., 1985. Zimmerman y col., 1987. Debra y col., 1983. Chayziantoniou y col., 1991). Otro mecanismo puede ser por alteración de mecanismos que modulan la actividad de sustancias vasodilatadoras como las prostaglandinas vasodilatadoras (MaGiff y col., 1973. Messina y col., 1975. Mistry y col., 1988).

Sistema nervioso central. Incrementa el gasto cardiaco por medio de sus descargas simpáticas eferentes lo cual produce vasoconstricción arteriolar para evitar la sobrecarga de flujo en los capilares, lo cual eleva la presión arterial sistólica, los

cambios de presión influyen en el riñón por sus efectos sobre el volumen y en el sistema renina aldosterona (Henry y col., 1990).

Los barorreceptores son sensibles a la presión media y a la magnitud del cambio de presión e inician una reacción barorreceptora refleja de tipo adrenérgico que afecta la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca. Se ha observado que la denervación de los barorreceptores a menudo no produce hipertensión neurógena y cuando sucede así el incremento de presión es ligero; varios autores coinciden con Guyton (1990) en que los barorreceptores no controlan la presión arterial sistólica a largo plazo.

Factores genéticos. El proceso se inicia con una lesión endotelial por una susceptibilidad genética sobre la que actúan factores del medio, como la ingesta inadecuada de sodio y las tensiones emocionales. Las células endoteliales modifican su función, con un desbalance entre las sustancias vasodilatadoras-antiproliferativas-antitrombóticas, a favor de un predominio en la secreción de sustancias vasoconstrictoras-proliferativas-protrombóticas, lo que origina un aumento en los niveles del calcio a nivel del citosol, lo que provoca vasoconstricción, estimulación celular con proliferación de células duplicables e hipertrofia en células no duplicables, además de secreción de sustancias paracrinas y endocrinas por células en las que el calcio constituye el segundo mensajero (catecolaminas, angiotensina, insulina), que acopla el estímulo con la función.

Dentro de los genes que han sido más estudiados en el desarrollo de la hipertensión arterial se encuentran aquellos que tienen relación con el sistema noradrenérgico, con el eje sistema renina aldosterona, con las proteínas G de transducción transmembranal; la alfa-aducina, componente de citoesqueleto, que está involucrada en el contacto intercelular, en el transporte iónico transmembrana, la transducción de señales y el balance de sodio; y las proteínas que forman los canales iónicos, las bombas de cationes, los intercambiadores y los cotransportadores; es importante ya que estos factores genéticos al ser combinados con factores ambientales pueden dar origen a la hipertensión arterial en diferentes individuos aun cuando sean de la misma familia (Zenteno y col., 2003).

2.6. Disfunción endotelial e hipertensión

La disfunción endotelial es la pérdida de la capacidad del endotelio para inhibir la agregación plaquetaria, adherencia de neutrófilos, proliferación celular y modular el tono vascular ya que existe disminución de las sustancias vasodilatadoras principalmente de óxido nítrico por consecuencia aumenta la actividad de las sustancias vasoconstrictoras (Fasce y col., 2002).

La disfunción endotelial en la hipertensión se acompaña de un aumento del estrés hemodinámico que puede llegar a producir cambios en la estructura y en la función del endotelio. Se han descrito dos tipos de fuerzas que actúan sobre las células endoteliales vasculares y que aumentan su magnitud en la hipertensión arterial (Mombouli, 1999). La fuerza circunferencial, que depende de la presión de la sangre en el interior del vaso, del radio de éste y grosor de la pared, puede llegar a producir una deformación por estiramiento de las células endoteliales; la fuerza tangencial, que depende de factores como la viscosidad de la sangre y velocidad de flujo sanguíneo. Desde el punto de vista clínico estos factores pueden agruparse en dos modalidades: 1) desequilibrio de la regulación del tono vasomotor que consiste en el mantenimiento de la resistencia periférica elevada. 2) estructural, consecuencia del crecimiento de la pared vascular que se genera a partir del desequilibrio entre factores promotores del crecimiento e inhibidores de éste. Ambas alteraciones se perpetúan y mantienen la hipertensión (Safar y col., 2000). Las consecuencias clínicas del remodelado vascular asociado a la hipertensión son diferentes dependiendo del tipo de vaso que se considere. En arterias pequeñas y arteriolas una disminución del diámetro de la luz y una reducción en su número produce un aumento de las resistencias periféricas, en arterias grandes, la pérdida de elasticidad implica una disminución de su capacidad amortiguadora y propicia el incremento de la presión de pulso. La relación entre daño renal e hipertensión implica vasodilatación de la arteriola aferente para compensar la reducción del número de nefronas funcionales, lo que producirá un incremento tanto en la filtración como en la presión glomérulo-capilar, favoreciendo el desarrollo de la glomeruloesclerosis (Hernández y col., 2000)

2.7. Papel del sistema renina angiotensina aldosterona en la hipertensión

La angiotensina II tiene diferentes mecanismos de daño endotelial ya que estimula la producción de superóxido por medio de la activación del sistema oxidativo de membrana NADH/NADPH en las células musculares lisas, lo que produce la inactivación de la eNOS, causa oxidación de la tetrahydrobiopterina, que actúa como cofactor (Thomas y col., 2003) también puede oxidar al ácido araquidónico y por este mecanismo, liberar al vasoconstrictor 8-iso prostaglandina F₂α (isoprostano), las consecuencias del estrés oxidativo incluyen: pérdida de la vasodilatación dependiente del endotelio, expresión génica, respuestas inflamatorias y perpetuación de la hipertensión. Las mutaciones en los genes que codifican la síntesis de aldosterona, la eNOS y el angiotensinógeno se encuentran relacionados con la génesis de la hipertensión arterial. El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de angiotensina que consiste en la ausencia (supresión D) o la presencia (inserción-1) de un fragmento en los genotipos DD y DI, ha demostrado su asociación con la prevalencia de hipertensión arterial. También el alelo D se ha vinculado con el incremento de las concentraciones circulantes y la actividad de la enzima convertidora de angiotensina con efectos secundarios sobre la generación de angiotensina II (Hauser y col., 1998).

Sin embargo, la angiotensina II también participa en la expresión de eNOS, a través de la proteína cinasa C, de esta manera, un aumento de la angiotensina II contribuye al incremento del catabolismo y reducción de la producción de NO, produciendo vasoconstricción a través de los receptores AT1 (Munzemaier y col., 1999). Otro mecanismo de daño por estrés oxidativo es por una rápida translocación de la GTPasa pequeña y la GTPasa de la familia Rho rac1 a la membrana celular, prerequisite indispensable para la activación de NADPH oxidasa.

A largo plazo, la angiotensina II también puede producir cambios en las células endoteliales por aumento en la expresión en los genes rac1, p22phox y NOX-1.

Una tercera forma de daño endotelial por angiotensina II es que facilita el reclutamiento de monocitos y macrófagos dentro de la pared vascular, por la estimulación de las células musculares lisas y la producción de molécula 1 de adhesión vascular (Amaral y col., 2001).

2.8. Farmacoterapia

Los diversos fármacos antihipertensivos producen su efecto de disminuir la tensión arterial: disminución del volumen circulante, disminución del tono simpaticoadrenérgico. Vasodilatadores. En la tabla 1 se muestran los principales grupos de fármacos antihipertensivos y sus efectos colaterales de cada uno de estos fármacos.

TIPO DE FÁRMACO	EJEMPLO	EFFECTOS COLATERALES
<i>Diuréticos</i>	Tiazidas (hidroclorotiazida, clortalidona)	Acción de corta duración, ↑ de los niveles de colesterol y glucosa.
	Diuréticos de asa (furosemida, bumetanida, ác. etacrínico)	Hiponatremia, colapso circulatorio, tromboembolia.
	Diuréticos ahorradores de K (amilorida, triamtereno, espironolactona)	Hipercalcemia, ginecomastia.
<i>Simpaticolíticos</i>	Fármacos de acción central (metildopa, clonidina, guanfacina)	Sedación, boca seca, bradicardia, rebote de hipertensión por supresión.
	Bloqueadores ganglionares (trimetafán)	Trastornos visuales, boca seca, escalofríos, estreñimiento, anorexia.
	Bloqueadores de neuronas adrenérgicas (reserpina, guanetidina)	Sedación, congestión nasal e hipotensión,
	Antagonistas β-adrenérgicos (propranolol, metoprolol)	Bradicardia.
	Antagonistas α-adrenérgicos (prazosín, terazosín, fentolamina)	Hipotensión, cefalalgia, mareos, somnolencia o náuseas.
	Antagonistas adrenérgicos mixtos (labetalol)	Insuficiencia cardíaca.
<i>Vasodilatadores</i>	arteriales (hidralazina, minoxidil, diazóxido)	Dolor de cabeza, retención de líquidos, taquicardia, Sx. de lupus.
	Arteriales y venosos (nitroprusiato)	Incremento moderado de la frecuencia cardíaca.
<i>Bloqueadores de los canales de Ca</i>	(verapamil, diltiazem, nifedipina, nimodipina, felodipina, nicardipina, isradipina, amlodipina)	Alteraciones de la conducción, disfunción sistólica, hiperplasia e hipertrofia gingival, constipación, edema de la rodilla, cefalea.
<i>Inhibidores de la ECA</i>	(captopril, enalapril, lisinopril, quinapril, remipril, benazepril, fosinopril)	Tos común, rara vez angioedema, hipercalcemia, pérdida del sabor.
<i>Antagonistas de los receptores de angiotensina II (AT1)</i>	(losartán)	Angioedema infrecuente, hipercalcemia.

Tabla 1. Clasificación de los antihipertensores según su sitio primario o mecanismo de acción (Hardman y col., 1996)

2.9. Importancia de las plantas medicinales en México

México es un país de gran diversidad florística debido a sus condiciones geográficas, orográficas, climáticas y edafológicas.

La extraordinaria riqueza florística de México, lo ubica en cuarto lugar mundial ya que posee 26 500 especies, de las cuales aproximadamente 9 500 son endémicas, y de estas 3000 especies son medicinales (SAGARPA, 2001).

Se estima que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa, de las cuales 124 especies se utilizan para el tratamiento de la hipertensión el 74% se utiliza de manera empírica como ejemplo de estas se encuentra anona, chayote (De feo y col., 1993), y solo el 26% han sido estudiadas como ejemplo se encuentra: *Boerhavia difusa* (mata de pavo), *Cardiospermum halicacabum* (Farolitos), *Sida acuta* (malva), (Hansen y col., 1995), *Bidens pilosa* (Aceitilla) (Dimo y col., 2002). De otras plantas como la rauwolfia (*Rauwolfia vomitoria* o *Rauwolfia serpina*) se han aislado compuestos como los alcaloides principalmente de la corteza y raíz, 1) Reserpina: disminuye la presión arterial y frecuencia cardiaca, aumenta la liberación de noradrenalina. 2) Rescinamina: acciones similares a la reserpina pero menos efectos depresores del SNC 3) Ajmalicina: bloqueador adrenérgico β , produce vasodilatación y es simpaticolítico. 4) Raupina. Acción hipotensora y 5) Ajmalina: arrítmico en el uso de taquicardias (Kuklinski, 2000). Hasta el nivel clínico se encuentra la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y el ajo (*Allium sativum*) (Montoya, 2005).

De ahí que es importante seguir estudiando las plantas medicinales para establecer una adecuada estandarización de los componentes que permita su validación fitoquímica, farmacológica y clínica para ser utilizadas por el humano. Ya que en la actualidad existe una tendencia a sustituir el uso de los compuestos sintéticos (medicamentos y alimentos) con productos naturales (Delfín, 1998). Muchos de los metabolitos secundarios son principios activos útiles para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al hombre (Ramírez, 1997). Estos metabolitos han llegado a ser aislados y muchos de ellos, utilizados por sus propiedades terapéuticas como los alcaloides.

2.10. Estudios botánicos de *Heimia salicifolia*

Heimia salicifolia (HBK) Link comúnmente llamada hierba de San Francisco, escoba colorada, escoba de arroyo, escoba de río, garañona, granadilla, granadina, hierba huachinol, hachinal, hauchinal, hanchinol, huanoli, hierba jonequil, jarilla, jara amarilla, jara mansa, retama, sinicuilchi, sinicuiche, sinicuil, trenchinole, trinchinole, flores de San Francisco, escobilla (Graham, 1991, 1994; Martínez, 1979); en Argentina: quiebra arado, es un arbusto de la familia Lythraceae nativa de México, crece en zonas semicálidas y templadas desde el norte de México hasta Argentina (Aguilar, 1994). Su posición taxonómica es la siguiente: orden: Myrtiflorae, género: *Heimia*, especie: *salicifolia*. Las flores son de color amarillo, solitarias, axiales, con un pedúnculo corto y un par de brácteas en la base del receptáculo, que es acampanado; sépalos triangulares como apéndices más cortos y estrechos intercalados; 5 a 7 pétalos caedizos; 10 a 18 estambres (Fig.4).



Figura 4. *Heimia salicifolia*

El fruto es una cápsula globosa que se abre en 4 valvas, envuelta en un receptáculo ensanchado, sus hojas son opuestas o subopuestas, sésiles, enteras, lanceoladas, acuminadas, de 2 a 9 cm de largo, con borde liso más pálidas por el envés (Argueta y col., 1994; Graham, 1994).

En la información existente, no se puede precisar el número de especies que se reconocen para el género, sin embargo *Heimia salicifolia*, *H. myrtifolia*, y *H. montana* son las más conocidas.

2.11. Estudios etnobotánicos

Las hojas se han usado durante siglos en la medicina tradicional mexicana en forma de infusión o cataplasma para inflamación en los estados de México (Argueta, 1994), Nayarit (Aguilar, 1994); (Tamaulipas) Standley, 1924, (Argentina) Carrizo, 2002. Otros usos medicinales señalan que la infusión puede servir como sedante (Wiebelhaus, 1974; Maximino, 1992; Carrizo, 2002), antiespasmódico (Maximino, 1992; Malone/Rother, 1994) y antibacteriano (Carrizo, 2002).

2.12. Estudios farmacológicos sobre el efecto hipotensor de *Heimia salicifolia*

Kaplan (1966) encontró que la administración continua de los alcaloides aislados vertina y litrina en dosis de 100 mg/kg/día disminuye la presión arterial sistólica en ratas normotensas.

El grupo de Malone y Rother (1994) realizaron una revisión bibliográfica fitoquímica y fitofarmacológica encontrando que vertina administrado a ratas normotensas en dosis de 100 mg/kg/día durante 21 días les produjo hipotensión (Robichaud, 1964 y Malone, 1972), mientras que litrina al ser administrado a la misma dosis, tiene actividad diurética en ratas normotensas (Kaplan, 1966 y Malone, 1972).

2.12. Estudios químicos

El estudio químico de *H. salicifolia* fue iniciado por Blossmer (1964) quien aisló y caracterizó las sustancias activas presentes en las hojas de esta planta y resaltó la presencia de alcaloides del tipo de las bifenílquinolizidinas siendo vertina, lifolina, nesodina y litrina como los de mayor interés para el área de investigación farmacológica, mientras que en las partes aéreas encontró los alcaloides criogenina, dehidro-decodina, de los retoños se han aislado el dimetoxi-10-epi-abresolina, la 2 hidroxí-4(3-hidroxí-4-metoxí-fenil)-quinolizidina.

Posteriormente Duke en el año de 1992 clasificó a estos alcaloides de acuerdo a su geometría y posición del anillo de quinolizidina en dos grupos posición cis-quinolizidina y trans-quinolizidina (tabla 2 y 3):

TABLA 2. PRINCIPALES ALCALOIDES DE TIPO CIS-QUINOLIZIDINA

Alcaloide	No. de Carbonos	Sustitución
Vertina	23	Dimetoxilo
Sinicuichina	22	Dimetoxilo
Heimidina	23	Dimetoxilo
Epidemetoxiabresolina	22	Alcaloide éster

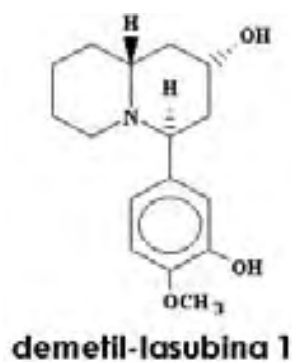
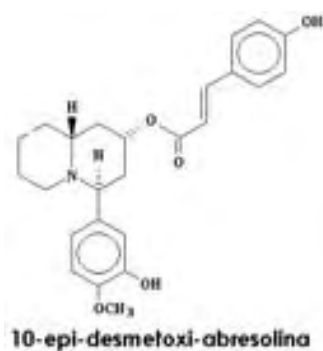
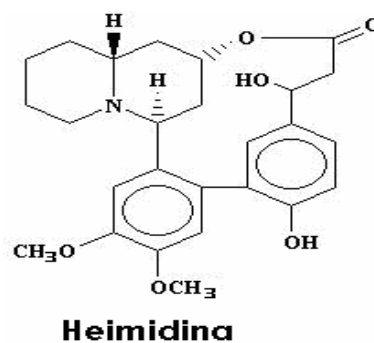
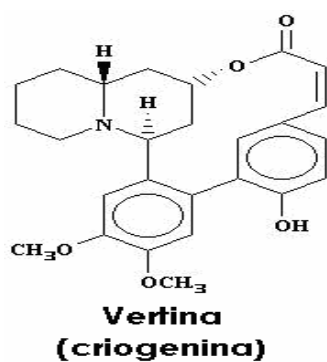


Figura 5. Estructura de los alcaloides de *H. salicifolia* en posición cis-quinolizidina

TABLA 3. PRINCIPALES ALCALOIDES DE TIPO TRANS-QUINOLIZIDINA

Alcaloide	No. de Carbonos	Sustitución
Lithrina	23	Dimetoxilo
Nesodina	22	Dimetoxilo
Abresolina	23	Alcaloide ester
Lifolina	23	Hidroxilo
Dehidrodecodina	22	Metoxilo
Demethi-lasubina II	23	Phenyquinolizidinol

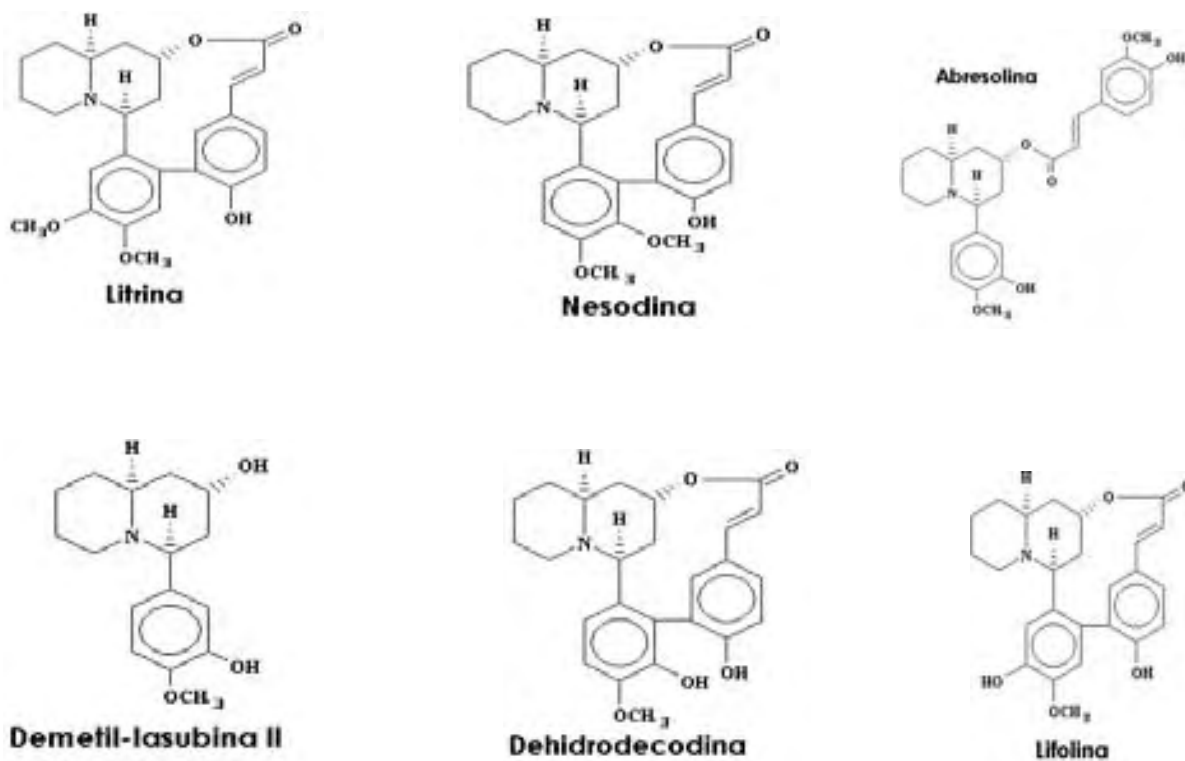


Figura 6. Estructura de los alcaloides de *H. salicifolia* en posición trans-quinolizidina

3. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica degenerativa frecuente en nuestro país y representa un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares en pacientes en etapas productivas de su vida, con repercusión sobre la esperanza y calidad de vida.

En la actualidad se dispone de una gran variedad de fármacos antihipertensores eficaces, pero con numerosos efectos colaterales (Tabla .1) además su costo es elevado por lo que es necesario continuar la búsqueda de nuevos fármacos antihipertensores, siendo las plantas una fuente de obtención de muchos fármacos. Una de estas plantas es *H. salicifolia* de la cual se conoce que tiene sustancias activas que pueden llegar a ser útiles para el tratamiento de la hipertensión arterial.

4.- HIPÓTESIS

La planta *Heimia salicifolia* contiene alcaloides que disminuyen la presión arterial en ratas normotensas y en modelos experimentales de hipertensión.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Caracterizar química y farmacológicamente los alcaloides de *H. salicifolia*, por sus propiedades antihipertensoras.

5.2. PARTICULARES

- a) Aislar los alcaloides de *H. salicifolia*
- b) Realizar curvas dosis-respuesta a los alcaloides parcialmente purificados de *H. salicifolia* en la rata normotensa.
- c) Realizar curvas dosis-respuesta a Ang II en la rata normotensa en ausencia y presencia de los alcaloides parcialmente purificados.
- d) Estudiar el efecto del extracto clorofórmico de *H. salicifolia* en ratas normotensas.
- e) Estudiar el efecto del extracto clorofórmico de *H. salicifolia* en ratas hipertensas por la administración de L-NAME.
- f) Estudiar el efecto del extracto clorofórmico sobre la reactividad vascular del lecho mesentérico con y sin endotelio.
- g) Realizar curvas dosis-respuesta a cada uno de los alcaloides aislados de *H. salicifolia* en la rata normotensa.
- h) Realizar curvas dosis-respuesta a Ang II en la rata normotensa en ausencia y presencia de cada uno de los alcaloides.
- i) Estudiar el efecto del alcaloide con actividad hipotensora y antihipertensora, sobre los anillos arteriales con y sin endotelio.
- j) Estudiar el efecto del alcaloide con actividad hipotensora y antihipertensora sobre la reactividad vascular del lecho mesentérico.
- k) Caracterizar la estructura química del o los alcaloides con mejor efecto hipotensor, utilizando técnicas espectrofotométricas

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1. RATAS

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar macho con pesos entre 300-350 suministrados por el Bioterio de la FES Iztacala, UNAM. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones de alimentación, temperatura e higiene controladas y ciclos de luz-oscuridad de 12 por 12 h.

6.1.2. Recolección y comprobación taxonómica de *H. salicifolia*

Las hojas de *H. salicifolia* se recolectaron durante el mes de junio de 2006, en el Municipio de Acámbaro, Guanajuato teniendo como coordenadas geográficas 100°30'06" y 101°00'00" de longitud oeste y a los 19°55'42" y 20°12'16" de latitud norte. Su clima es semitemplado, teniendo temporada de secas en primavera y de lluvias en verano. El tipo de suelo que se encuentra en esta zona es Vertisol con Feozaem y el tipo de vegetación que se encuentra es bosque de encino, matorral xerófilo. Se seleccionó material biológico para su posterior identificación en el Herbario "IZTA" de la FES Iztacala, UNAM.

6.2. Reactivos

6.2.1. Uso general

Las sales para la preparación de la solución fisiológica de Krebs fueron de los laboratorios J.T. Baker y Merck: NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, NaHCO₃ y glucosa.

Todos los disolventes para la extracción de los alcaloides fueron calidad reactivo adquiridos de los laboratorios Merck o J. T. Baker.

6.2.2. Uso específico

Angiotensina II, fenilefrina, N ω -nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L- NAME), clorhidrato de histamina y wortmanina fueron adquiridos del laboratorio Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.); el cloruro de acetilcolina y el sulfato de atropina de la marca Merck. Las soluciones de todos los fármacos se prepararon el día del experimento. Cada fármaco se disolvió en solución Krebs a excepción de la ANG II que fue disuelta en solución salina estéril. La fenilefrina fue preparada a partir de una concentración de 1mg/ml; de esta solución se tomó para cada experimento una alícuota y posteriormente se realizaron diluciones. Las soluciones se mantuvieron en refrigeración durante el transcurso del experimento hasta el momento de su utilización.

Para la acetilcolina se preparó una solución de 1 mg/ml de la cual se tomó una alícuota para realizar diluciones hasta tener una solución stock de 10^{-4} M.

Angiotensina II (1 mg/ml). Para la preparación de angiotensina II se realizaron diluciones 1:10 (solución isotónica 0.9%) para llegar a una concentración de 1 μ g/ml, a partir de esta solución se calcularon los volúmenes adecuados que correspondan a la dosis ajustada al peso de cada rata, para la realización de las curvas dosis respuestas de 25-250 ng/kg.

El L-NAME fue preparado a una concentración de 2×10^{-4} M.

La atropina (Merck) fue preparada en el momento de realizar el experimento a una concentración de 10^{-7} M.

Extracto clorofórmico. Se preparó una solución de 20 mg/ml utilizando como diluyente carboximetilcelulosa 1% (Merck).

6.3. Estudio químico de los alcaloides

6.3.1. Aislamiento de los alcaloides

Para el aislamiento de los alcaloides se utilizó la metodología descrita por Blomster y col. (1964). Se utilizaron 5 kg de hojas secas pulverizadas, las cuales se desengrasaron con éter de petróleo. Después se extrajeron exhaustivamente con metanol por cada kilogramo procesado, maceración por 24 h. Posteriormente se realizó la prueba de Dragendorff para verificar la presencia de alcaloides. El extracto metabólico se concentró al vacío en un rotavapor hasta obtener un volumen de 50 ml. Se dejó secar a 50°C 24 h. Después se resuspendió en 100 ml de agua destilada. El extracto acuoso obtenido se acidificó con ácido clorhídrico al 10%, a pH 2 que se midió con un potenciómetro. Se filtró con celita. El filtrado acuoso se lavó con 500 ml de éter dietílico, se modificó el pH a 9 con hidróxido de amonio al 28%. La solución se extrajo con 200 ml de cloroformo. El EC se concentró en un rotavapor y se dejó secar a 50°C 24 h. Parte de este extracto se utilizó para realizar los ensayos biológicos, mientras que la fracción restante de este extracto se adsorbió en 50 g de óxido de aluminio básico (Sigma) y se colocó en una columna de 60 X 2 cm la cual contenía óxido de aluminio básico. El eluyente utilizado fue metanol-cloroformo (1:1) y finalmente metanol.

Con las fracciones obtenidas se realizó una cromatografía en capa fina de sílica gel G 60 de 20 X 20 cm, espesor 0.3 mm, previamente activadas a 100 °C durante 1 h, empleando como eluyentes metanol-cloroformo 3:2. Las cromatoplacas se dejaron a temperatura ambiente y después de 24 h se visualizaron con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (UVGL-25) a una longitud de onda de 254 nm observando cuatro fracciones, al extraerlas de la sílica gel se identificaron como alcaloides mediante el reactivo 4-nitroanilina diazotizada (3 ml de una solución al 3% de 4-nitroanilina en ácido clorhídrico 0.8 N más 0.5 ml de nitrito de sodio al 5% seguida por álcali). Los alcaloides así separados fueron utilizados para los ensayos biológicos.

6.3.2. Elucidación de la estructura química

Los estudios espectroscópicos que permitieron identificar la estructura química del AL-3, se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la UNAM como se indica a continuación: La RMN H¹ Y RMN C¹³ se realizaron con un espectrómetro Varian Unity (300Mhz) y también se realizaron comparaciones con espectros conocidos de estos alcaloides mediante el programa Chemistry Organic Data Base. Se usó tetrametil silano como patrón de referencia interno, y cloroformo deuterado como solvente.

6.4. Estudio Farmacológico de los alcaloides

6.4.1. Curva dosis respuesta al extracto clorofórmico en ausencia y presencia angiotensina II sobre la presión arterial sistólica de ratas anestesiadas normotensas

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg, vía i.p.), se colocaron en una tabla de disección; con ayuda del material de disección se realizó una incisión en la región inguinal se localizó el paquete vascular se disecó la vena femoral, enseguida se colocó un catéter con solución salina al 0.9%, a favor del torrente sanguíneo. En seguida se hizo una incisión en el cuello y se disecó la arteria carótida externa derecha y se colocó un catéter, también con solución salina, a favor del torrente sanguíneo, para registrar la presión arterial sistólica y el otro extremo de la cánula se conectó a un transductor de presión (Narco Bio-Systems, Mod. P-1000B) previamente calibrado que a su vez estaba conectado al fisiógrafo (NBS, Mod. DMP-4B). Se registró la presión arterial sistólica por 20 min o hasta que el registro fuera estable y en seguida se realizó una curva dosis-respuesta al extracto clorofórmico en dosis crecientes (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/kg, i.v.). Cuando el registro de la presión arterial sistólica fue estable, se realizó una curva dosis-respuesta a angiotensina II utilizando dosis crecientes de 25, 50, 75, 100 y 125 ng/kg, posteriormente se esperó a que la presión arterial sistólica regresara a su nivel inicial, y en seguida se administró una sola dosis (2 mg/kg, i.v.) del

extracto clorofórmico. Después de 10 min se realizó la curva dosis-respuesta a angiotensina II utilizando las mismas dosis que en la curva control.

6.4.2. Valoración farmacológica del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas

Se formaron 4 grupos de 5 ratas cada uno a las que se les administró por vía oral durante 10 días los siguientes tratamientos: G1 (Control): vehículo (carboximetilcelulosa al 1%) 2 ml/kg, extracto clorofórmico de *H. salicifolia* en dosis de G2 (10), G3 (20) y G4 (40 mg/ kg). Al inicio y al final del tratamiento se registró la presión arterial sistólica a través de un método no invasivo (pletismográfico). Los animales fueron pesados diariamente para ajustar las dosis.

6.4.3. Valoración farmacológica del extracto clorofórmico en ratas hipertensas por administración de L-NAME

Se formaron 5 grupos de 5 ratas cada uno a las que se les administró en el agua de beber los siguientes tratamientos durante 10 días: G1 (control) fue tratado con agua, el G 2 con L-NAME (70 mg/kg/día), G3 L-NAME (70 mg/kg/día) más enalapril (5 mg/kg) y los G 4 y 5 L-NAME más EC de *H salicifolia* a las dosis de 10 y 20 mg/kg/día. Al inicio y al final del tratamiento se registró la presión arterial sistólica a través de un método no invasivo que consistió en colocar a la rata en una caja inmovilizadora, dejando al descubierto la extremidad caudal. Posteriormente fue colocada en una cámara de acondicionamiento Heater and Scanner LE5650/6) LSI LETICA a una temperatura de 40-45 °C. Se esperó un periodo de 10 min para que el registro del pulso fuera homogéneo y se procedió a realizar el registro de la PAS a través de un transductor de presión (LE 5007) LSI LETICA. Colocado en la arteria caudal y conectada a una computadora de presión arterial sistólica automática y graficado en el programa Chart 4.0 en una computadora de escritorio.

6.4.4. Reactividad vascular del lecho mesentérico en presencia del extracto clorofórmico

La rata fue previamente anestesiada con pentobarbital sódico a la dosis de 35 mg/kg, vía i.p., y se colocó en una tabla de disección; y se le realizó una incisión media en la cavidad abdominal, se expuso el lecho mesentérico, se disecaron las arterias mesentérica y aorta, las cuales se refirieron con hilo seda, se ocluyó la aorta por arriba de la arteria mesentérica, a la cual se colocó una aguja del No. 19 unida a una cánula que contenía solución Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 2.4, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 11.8, NaHCO₃ 25 y glucosa 10; el LVM se separó de las asas intestinales y se suspendió en una cámara para órgano aislado, mediante una bomba 1C-2 se hizo circular agua a 37 °C. El lecho vascular mesentérico se perfundió con solución Krebs, previamente burbujeado con carbógeno (O₂/CO₂ 95:5%) a un pH de 7.4, y a 37 °C. La presión de perfusión se registró con un transductor de presión unido a un amplificador y a un fisiógrafo (Narco Bio-System, Mod. P-1000A) y se dejó estabilizar por 30 min a una presión de perfusión de 50 mmHg, una vez que se estabilizó el registro se siguió el siguiente protocolo:

Se realizaron curvas concentración respuesta a fenilefrina 1µg/ml, de 1, 5, 10, 20,40 y 80 µg, Se dejó estabilizar la preparación, posteriormente se perfundió con sol. Krebs + fenilefrina 10⁻⁵ M; observándose un aumento de la presión de perfusión a 85-90 mmHg, una vez que se mantuvo estable se procedió a realizar curvas concentración respuesta a:

- a) Extracto clorofórmico (10, 30, 50, 70 y 90 µg)
- b) Acetilcolina (10, 30, 50, 70 y 90 µg).
- c) Nitroprusiato Sódico (10⁻¹⁰ a 10⁻⁸ M).
- d) Acetilcolina (20, 40, 60 y 80 µg).

Una vez obtenidas las curvas concentración respuesta a los agonistas mencionados, el endotelio fue dañado por perfusión de agua desionizada durante 5 minutos. Posteriormente se perfundió Sol. Krebs + fenilefrina 10^{-5} M, una vez que la presión de perfusión fue de 60 mmHg y el registro fue estable se procedió a realizar las curvas concentración respuesta a los mismos agonistas como se explicó anteriormente.

6.4.5. Curva dosis respuesta a cada uno los alcaloides aislados del extracto clorofórmico sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas

La preparación experimental se realizó como se menciona en la sección 6.2.1. Solo que las curvas dosis-respuesta se hicieron a cada uno de los alcaloides las dosis administradas fueron 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/kg.

6.4.6. Curva dosis respuesta a cada uno de los alcaloides en ausencia y presencia de angiotensina II

Las curvas dosis respuesta a angiotensina II se obtuvieron de la misma forma como se menciona en la sección 6.4.1. Una vez obtenida la curva dosis respuesta a angiotensina II se esperó a que la presión regresara a su nivel inicial, y enseguida se administró una sola dosis (2 mg/kg, i.v.) de cada uno de los alcaloides aislados. Los alcaloides fueron cuatro y se mencionaron de acuerdo a su migración en la placa de sílica gel G. Después de 10 min se realizó nuevamente la curva dosis-respuesta a angiotensina II utilizando las mismas dosis que en la curva control. Los resultados obtenidos mostraron que el alcaloide-3, produjo mayor efecto hipotensor y antihipertensor por lo que las demás series experimentales se hicieron con este alcaloide.

6.4.7. Valoración farmacológica del alcaloide 3 sobre anillos de aorta torácica

Los animales fueron sacrificados por sobre-exposición a éter etílico e inmediatamente se abrió la cavidad torácica y se retiró la aorta, y se colocó en una caja de petri con solución Krebs a temperatura ambiente. Después de eliminar el tejido conectivo, las arterias fueron seccionadas en anillos de 3-4 mm de longitud; de cada arteria se obtuvieron cuatro anillos adyacentes. El endotelio se removió mecánicamente por fricción suave de la superficie luminal con pinzas de disección.

Los anillos fueron suspendidos horizontalmente entre dos ganchos de níquel-cromo en forma de L (0.5 y 0.2 mm de diámetro) en cámaras de tejido aislado. El gancho inferior fue fijado al fondo de la cámara mediante un sujetador de vidrio, el gancho superior se conecto directamente al transductor de tensión isométrica para registrar los cambios de tensión en analizadores de tensión (Grass Ft03c), los cuales estaban conectados a su vez a una computadora Pentium II. Los datos fueron colectados a través de un programa de Digi-Med y procesados posteriormente con MS Excel 7.0. Los anillos arteriales se dejaron estabilizar por 2 h, durante este periodo se realizaron cambios de solución Krebs cada 15 min, y al mismo tiempo se realizaron estimulaciones cada 30 min con fenilefrina 10^{-5} M, al término de estas 2 h se le administró a cada anillo carbacol 10^{-5} M con la finalidad de corroborar la presencia o ausencia de endotelio. Posteriormente se realizó una curva concentración respuesta a fenilefrina 10^{-9} M a 10^{-7} M y se incubaron los anillos aórticos con fenilefrina 10^{-7} M, en presencia de ésta se administró el alcaloide- 3 en dosis de 20 hasta 80 ug.

6.4.8. Reactividad vascular del lecho mesentérico en presencia del alcaloide 3

El efecto vasodilatador del alcaloide 3 se estudió en el lecho vascular mesentérico como se describió previamente en la sección 6.4.4.

Se realizaron una serie de curvas concentración respuesta a fenilefrina de (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80µg), una vez que se obtuvo la respuesta máxima se dejó estabilizar hasta regresar a nivel de su presión de perfusión inicial y enseguida se perfundió con sol. Krebs + fenilefrina 10^{-5} M; observándose aumentó de la presión de perfusión de 85-90 mmHg una vez que se mantuvo estable se realizaron curvas concentración respuesta a:

- a) Acetilcolina (20, 40, 60 y 80 µg).
- b) Alcaloide 3 (20, 40,60 y 80 µg).

En otras series experimentales el lecho vascular mesentérico se perfundió con sol. Krebs + fenilefrina 10^{-5} M más uno de los siguientes inhibidores durante 10 minutos: L-NAME 10^{-5} M; wortmanina 10^{-5} M, azul de metileno 10^{-5} M, atropina 10^{-5} M, histamina 10^{-5} M y difenhidramina 10^{-5} M; durante 10 minutos y enseguida se realizaron curvas concentración respuesta a:

- c) Acetilcolina (20, 40, 60 y 80 µg).
- d) Alcaloide 3 (20, 40,60 y 80 µg).

6.5. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de todas las series experimentales se calcularon la media y el error estándar de la media; posteriormente para determinar la significancia entre los tratamientos se utilizó la prueba de t-Student para datos pareados y no pareados utilizando el programa SPSS versión 12, las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

7.0. RESULTADOS

7.1. IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA

La planta fue identificada por la Biól. Edith López Villafranco en el Herbario "IZTA" de la FES Iztacala, UNAM como *H. salicifolia* (HBK.) Link; el ejemplar de respaldo se integró a la colección científica con el número de registro 41653.

7.2. ALCALOIDES AISLADOS

Con las técnicas químicas de extracción y separación utilizados y partiendo de 5 kg de hojas secas de *H. salicifolia* se obtuvo un rendimiento de 15 g de EC y al separar el EC mediante cromatografía en columna y capa fina se obtuvo un rendimiento de 0.310 g de AL lo que corresponde al 0.034%.

Por medio de la cromatografía en capa fina con la mezcla de disolventes cloroformo-metanol 3:2 del EC se logró separar 4 compuestos que por reacciones químicas fueron identificadas como alcaloides (Fig. 7).

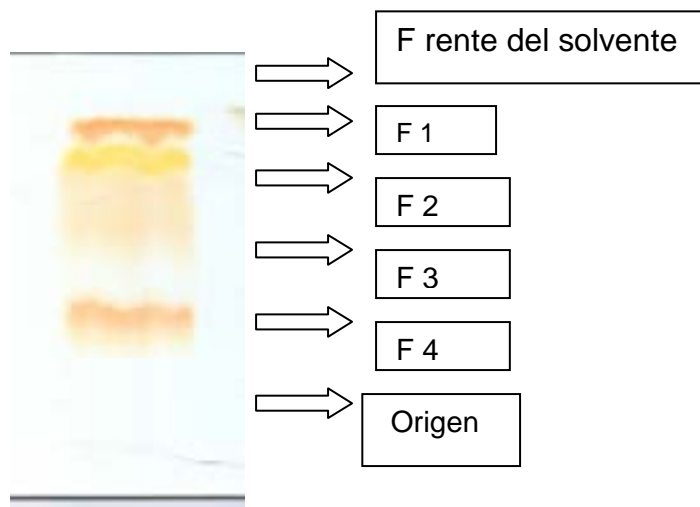


Figura. 7. Separación cromatográfica del extracto cloroformico de *Heimia salicifolia* con la mezcla cloroformo-metanol (3:2). (*F Fracción).

7.2.1. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DEL ALCALOIDE 3

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con la reacción de la 4-nitroanilina de los AL separados cromatográficamente en capa fina.

ALCALOIDES	Rf	Reacción 4-nitroanilina diazotizada
(A1)	0.92	Naranja
(A2)	0.87	Púrpura
(A3)	0.55	Gris
(A4)	0.35	Verde

Tabla 4. Factor de retención (Rf) de los alcaloides aislados del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* separados por cromatografía en capa fina con la mezcla de eluyentes (cloroformo-metanol 3:2).

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de la rata anestesiada normotensa e hipertensa, se decidió realizar el estudio espectroscópico del AL-3 debido a que mostró el mayor efecto hipotensor y de mayor duración.

7.2.2. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALCALOIDE 3

La interpretación de los espectros se hizo por comparación con espectros realizados por Blomster (1964), por medio del programa ACD / RMNC¹³ y H¹, predictor Versión 5.0 y con el apoyo del Dr. Guillermo Ávila Acevedo (Lab. Fitoquímica, UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM).

El espectro de RMN C¹³ (Fig. 8) permitió asignar las posiciones de los carbonos, mientras que el espectro de RMN H¹ (Fig. 9) permitió asignar las posiciones de los hidrógenos, del compuesto aislado de *H. salicifolia*, las señales químicas que se observaron se enlistan en la tabla 4 y las señales observadas con el programa ACD, predictor Versión 5.0 se enlistan en la tabla 5.

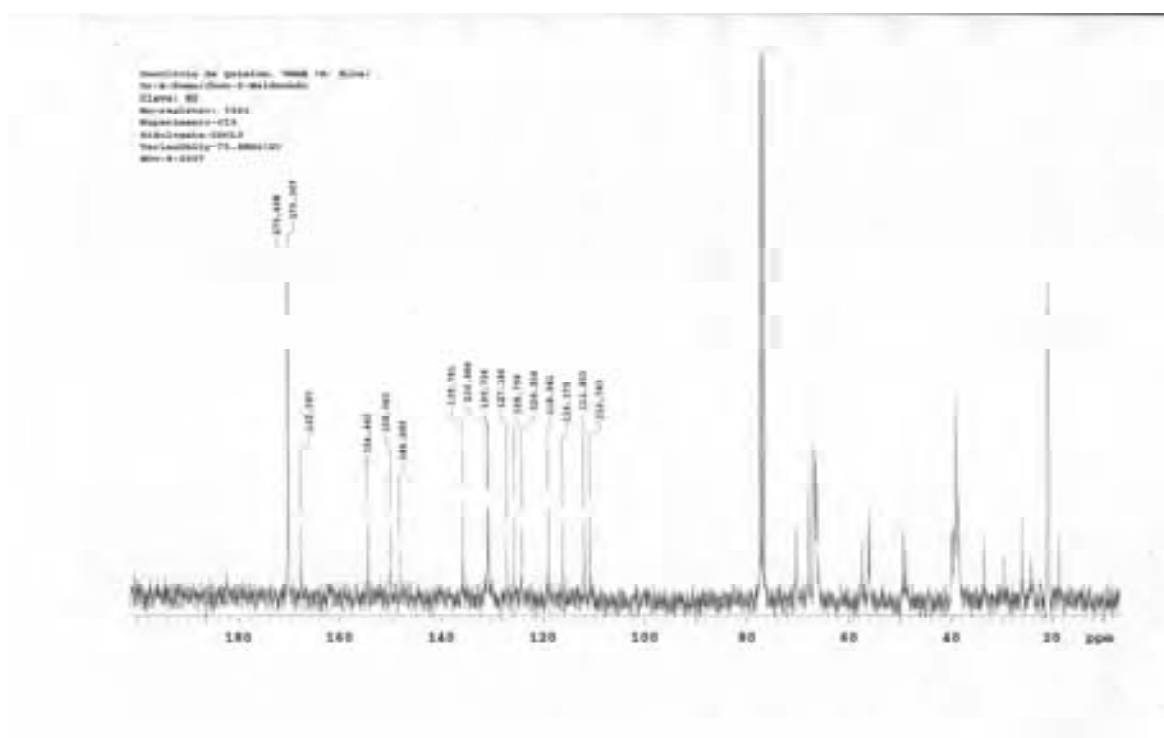


Figura.8. Espectro de RMN C¹³ del alcaloide-3 aislado del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia*

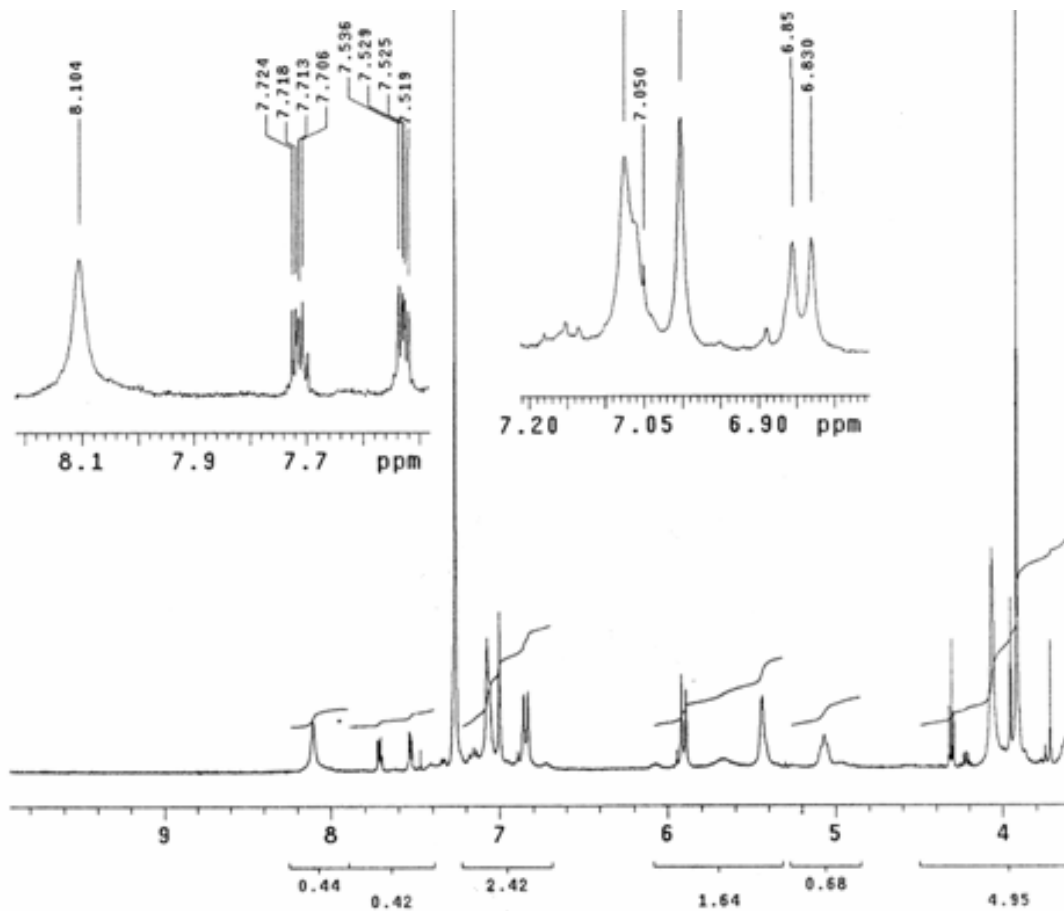


Figura.9. Espectro de RMN H¹ del alcaloide-3 aislado del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia*

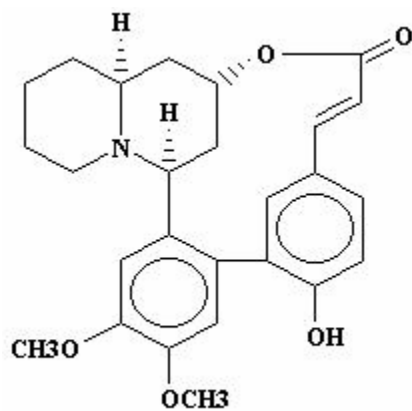
Carbono No.	CHn	Desplazamiento químico	Carbono No.	CHn	desplazamiento químico	Carbono No.	H	&	Carbono No.	H	&
2	CH	70.32	16	C	170.30	2	1	4.95	20	1	3.59
3	CH2	39.108	17	C	136.6	3	1	2.15	21	1	2.54
4	CH	55.64	18	C	130.726	4	1	2.08	21	1	2.08
6	CH2	53.15	19	C	138.08	6	1	2.77	22	1	7.724
7	CH2	26.15	20	C	57.406	7	1	2.54	26	1	6.39
8	CH2	24.148	21	CH2	38.716	8	1	1.53	28	1	5.03
9	CH	33.501	22	CH	135.781	9	1	1.50	30	3	3.85
10	C	167.757	23	CH	118.941	10	1	1.36	23	3	3.75
11	CH	118.941	24	C	146.29	11	1	1.33			
12	CH	148.265	25	C	154.442	12	1	7.20			
13	C	150.043	26	CH	111.933	13	1	7.50			
14	CH	127.186	30	CH3	56.226	14	1	7.18			
15	CH	125.758	32	CH3	56.008	15	1	6.90			

Tabla. 5. Señales observadas en el espectro de resonancia magnética nuclear de RMN C^{13} y RMN H^1 del alcaloide-3.

Carbono No.	CHn	Desplazamiento químico	Carbono No.	CHn	desplazamiento químico
2	CH	70.55	16	C	165.68
3	CH2	37.27	17	C	136.6
4	CH	55.64	18	C	129.91
6	CH2	53.15	19	C	138.023
7	CH2	26.15	20	C	58.11
8	CH2	24.65	21	CH2	38.08
9	CH	33.56	22	CH	136.11
10	C	166.33	23	CH	118.73
11	CH	118.84	24	C	146.29
12	CH	146.13	25	C	154.71
13	C	149.93	26	CH	111.933
14	CH	127.72	30	CH3	56.99
15	CH	125.96	32	CH3	56.71

Carbono No.	H	&	Carbono No.	H	&
2	1	5.05	20	1	3.59
3	1	2.15	21	1	2.54
4	1	2.08	21	1	2.08
6	1	2.77	22	1	7.73
7	1	2.54	26	1	6.39
8	1	1.53	28	1	5.03
9	1	1.50	30	3	3.85
10	1	1.36	23	3	3.75
11	1	1.33			
12	1	7.32			
13	1	7.50			
14	1	7.41			
15	1	6.94			

Tabla. 6. Señales observadas en el espectro de resonancia magnética nuclear de RMN C^{13} y RMN H^1 del alcaloide-3 de acuerdo al programa ACD, predictor Versión 5.0.& desplazamiento químico.



Litrina

Las señales obtenidas en los espectros de RMN C^{13} y RMN H^1 muestran que se trata del alcaloide litrina, el cual al ser comparado con los estudios de Blossmer (1964) y Dobberstein (1974) se determinó que pertenece al grupo de las bifentilquinolizidinas .

7.3. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS ANESTESIADAS NORMOTENSAS.

La presión arterial sistólica de las ratas normotensas disminuyó por la administración del extracto clorofórmico de *H. salicifolia*; a partir de la dosis de 1 mg/kg. El valor de la presión arterial sistólica control fue de 128 ± 8 mmHg y con la dosis de 1 mg/kg disminuyó a 108 ± 4 mm Hg, por lo tanto el extracto clorofórmico produjo un decremento de 20 ± 7 mm Hg (Fig.10).

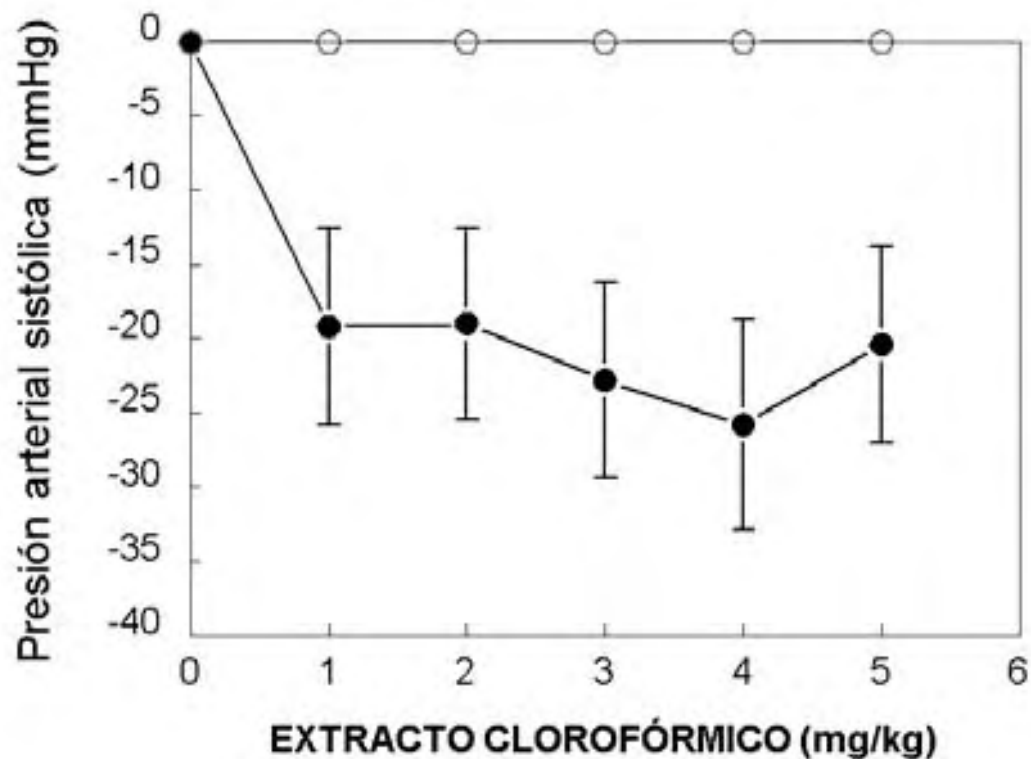


Figura. 10. Efecto del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* sobre la presión arterial sistólica de ratas anestesiadas normotensas; Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

7.4. EFECTO DE ANGIOTENSINA II EN AUSENCIA Y PRESENCIA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO

En las ratas anestesiadas normotensas la Angiotensina II aumentó la presión arterial sistólica basal de manera proporcional a la dosis administrada. Las ratas mostraron una presión arterial sistólica de 128 ± 8 mm Hg y un efecto máximo de 165 ± 3 mmHg, lo que indica un incremento máximo de 37 ± 1 mmHg. El incremento máximo ($E_{m\acute{a}x}$) se obtuvo con la dosis de 100 ng/kg de Angiotensina II y la dosis efectiva media (DE_{50}) fue de 50 ng/kg (Figura 11). Al realizar la curva dosis-respuesta a Angiotensina II en presencia del extracto clorofórmico (2 mg/kg) se observó una inhibición del 60% de la respuesta máxima con la dosis de 100 ng/kg (Fig. 11).

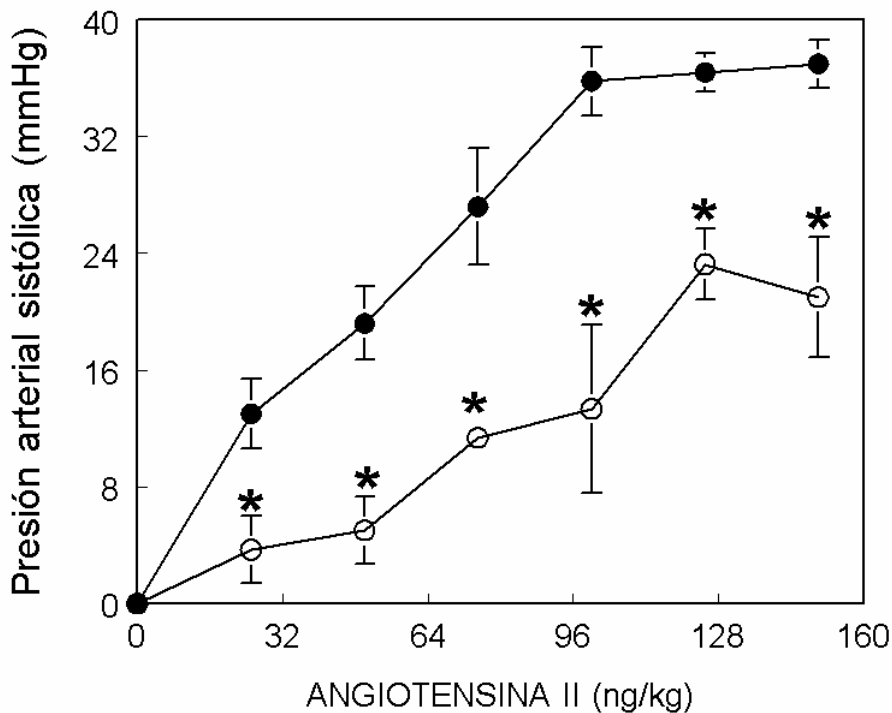


Figura. 11. Curvas dosis-respuestas a angiotensina II en ausencia (●) y presencia (○) del extracto clorofórmico sobre ratas anestesiadas normotensas; cada punto de la curva corresponde a la media de \pm error estándar de la media; n=5. * $P < 0.05$.

7.5. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS NORMOTENSAS DESPIERTAS

La administración oral del extracto clorofórmico por 10 días disminuyó la presión arterial sistólica de las ratas normotensas, el efecto fue mayor con las dosis de 10 y 20 mg/kg. Antes de administrar los tratamientos no se observaron diferencias significativas en la presión arterial sistólica que fue de 120 ± 2 mmHg. La dosis de extracto clorofórmico 40 mg/kg no disminuyó significativamente la presión arterial sistólica en relación con el grupo control que recibió carboximetilcelulosa (Fig. 12). Las dosis de 10 y 20 mg/kg de extracto clorofórmico disminuyeron la presión arterial sistólica en 25%.

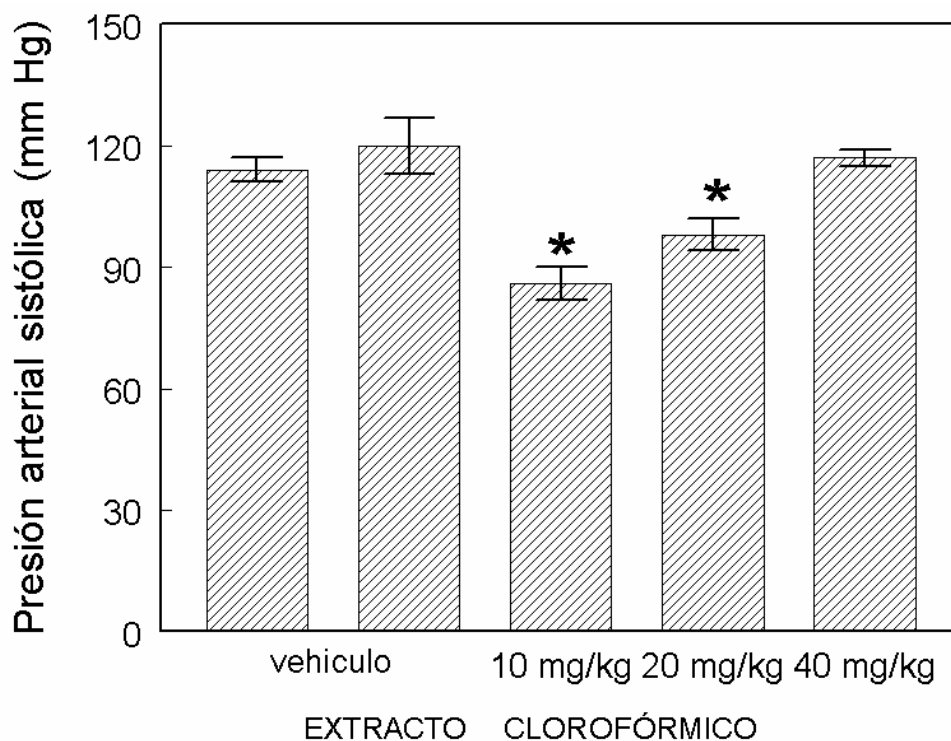


Figura. 12. Efecto del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* administrado por 10 días (10, 20 y 40 mg/kg, v.o) sobre la presión arterial de ratas normotensas. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media; los grupos tratados con extracto clorofórmico fueron comparados estadísticamente con el grupo del vehículo a los 10 días de tratamiento* $p \leq 0.05$ $n=5$

7.6. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS HIPERTENSAS

La presión arterial sistólica se incrementó, por efecto del tratamiento con el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico L-NAME, desde 118 ± 3 mmHg hasta 164 ± 2 mmHg.

El grupo control mantuvo la presión arterial sistólica de 111 ± 2 mmHg; las ratas que recibieron L-NAME + enalapril (5 mg/kg) mostraron una disminución significativa de la presión arterial sistólica de 138 ± 3 mmHg, con respecto al grupo de ratas que solo recibió L-NAME (Fig. 13).

El grupo de ratas que recibió L-NAME + extracto clorofórmico de *H. salicifolia* (10 y 20 mg/kg) mostraron disminución de la presión arterial sistólica de 148 ± 2 mmHg (16 mmHg) y 149 ± 1.7 mmHg (15 mmHg), con respecto al grupo de L-NAME.

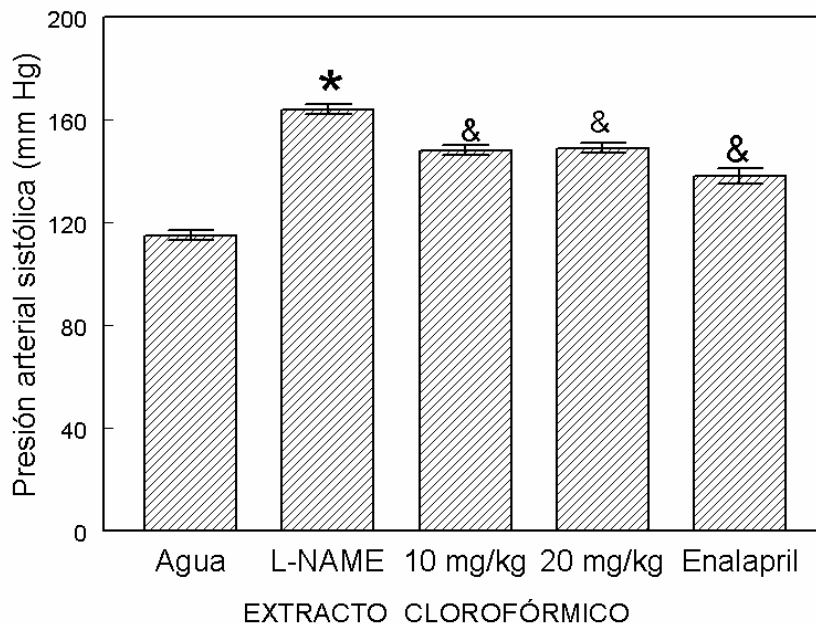


Figura. 13. Efecto del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* (10, 20 y 40 mg/kg, v.o) sobre la presión arterial de ratas hipertensas por administración de L-NAME por 10 días. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media; & los grupos tratados con extracto clorofórmico fueron comparados estadísticamente con el grupo de L-NAME y a los 10 días de tratamiento* $p \leq 0.05$ $n=5$ y * el grupo control fue comparado con el de L-NAME $p \leq 0.05$

7.7. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DEL LECHO MESENTÉRICO DE RATA

El lecho vascular mesentérico se tomó como un modelo *in vitro* de lecho vascular de resistencia. La perfusión de solución Krebs produjo una presión de perfusión de 50 ± 2.2 mmHg; al realizar la curva concentración respuesta a FEN se observó un aumento de la presión de perfusión máximo de 38 ± 3 mmHg con $90 \mu\text{g}$ de fenilefrina, mostrando de esta manera la funcionalidad de la preparación. Posteriormente la perfusión continua de fenilefrina aumentó la presión de perfusión a 84 ± 1.2 mmHg; en estas condiciones se realizaron curvas concentración respuesta al extracto clorofórmico observándose disminución de la presión de perfusión de 27 ± 3 mmHg con $90 \mu\text{g}$ de extracto clorofórmico (Fig. 14). De manera similar a lo observado con la curva dosis respuesta acetilcolina cuyo efecto vasorrelajante se observó con $10 \mu\text{g}$ de acetilcolina y el efecto máximo se alcanzó con $90 \mu\text{g}$ (Fig. 15). Cuando estas curvas se repitieron con el endotelio dañado por perfusión de agua desionizada (5 min) no se observaron cambios en la presión de perfusión. En el caso de las curvas dosis respuestas a nitroprusiato sódico se observó que este agonista fue capaz de relajar al endotelio en presencia y ausencia de endotelio (Fig. 16).

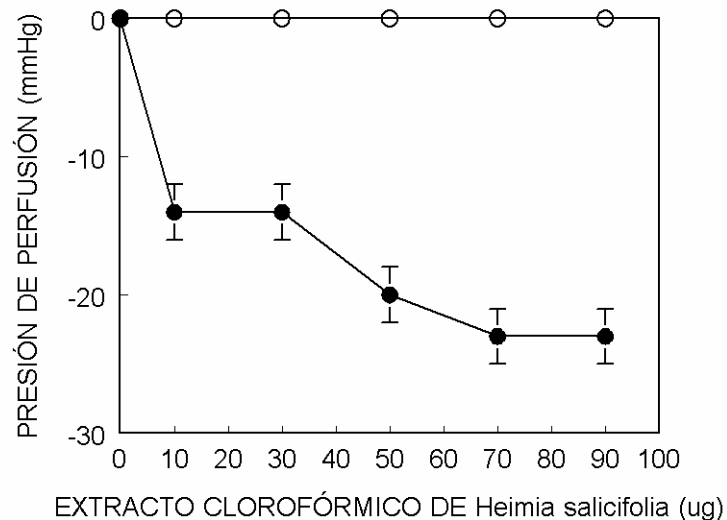


Figura. 14. Efecto del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con (●) y sin (○) endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M). Cada punto de la curva corresponde a la media de \pm error estándar de la media; n=5. * $P < 0.05$

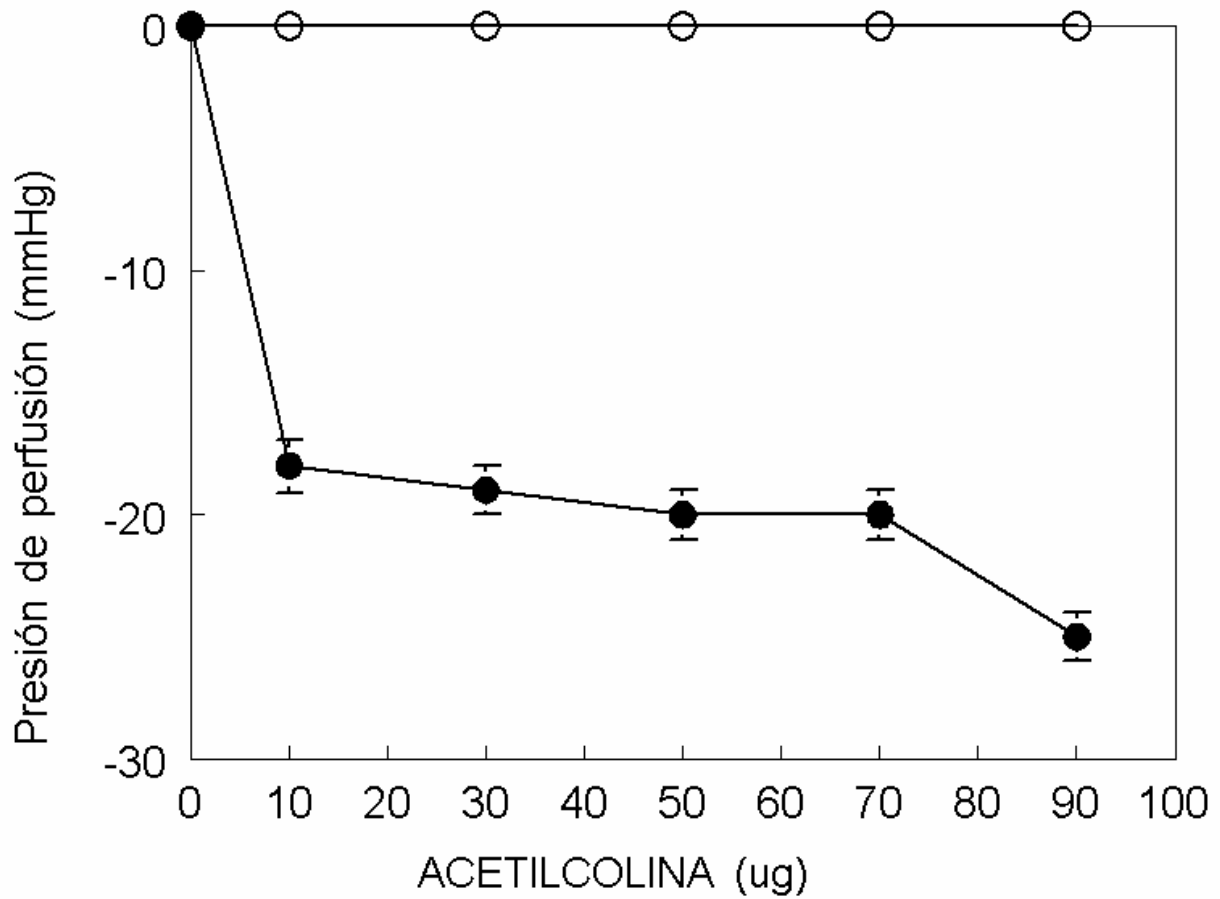


Figura. 15. Efecto de la acetilcolina sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con (●) y sin (○) endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M). Cada punto de la curva corresponde a la media de \pm error estándar de la media; n=5.
* P<0.05

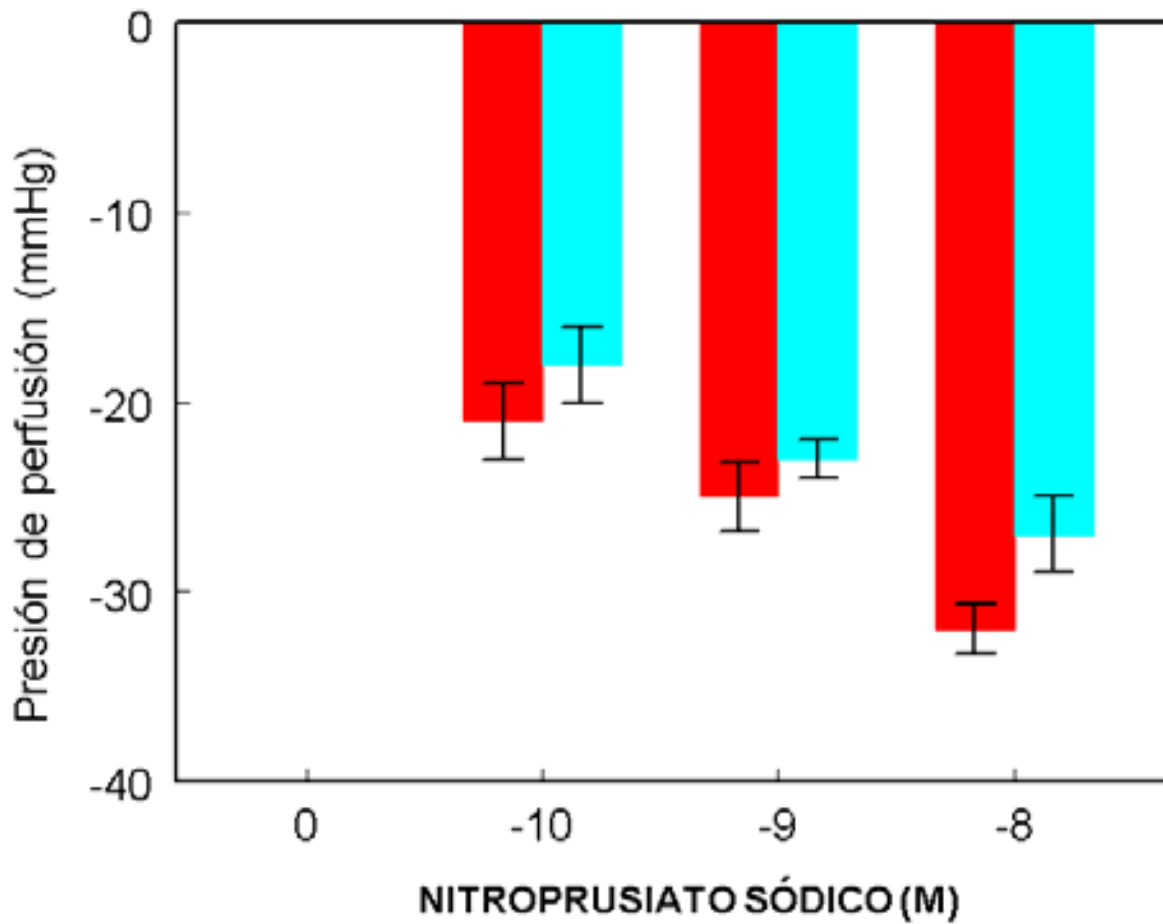


Figura 16. Efecto del nitroprusiato sódico sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con ■ y sin ■ endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M). Cada punto de la curva corresponde a la media de \pm error estándar de la media; n=5.
* P<0.05

7. 8. EFECTO DE LOS ALCALOIDES AISLADOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Heimia salicifolia* SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS ANESTESIADAS NORMOTENSAS

Una vez que los alcaloides fueron separados por cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico, se evaluó cada uno de ellos en la presión arterial sistólica de las ratas normotensas.

- a) Alcaloide 1 ($R_f = 0.92$) a las dosis administradas (1-2 mg/kg) no se observaron cambios significativos en la presión arterial sistólica (Fig. 17A).
- b) Alcaloide 2 ($R_f = 0.87$) a las dosis administradas (1-2 mg/kg) se observó disminución en la presión arterial sistólica, siendo máximo con la dosis de 2 mg/kg (26 ± 3 mmHg) (Fig. 17 B).
- c) Alcaloide 3 ($R_f = 0.55$) a las dosis administradas (1-2 mg/kg) se observó disminución en la presión arterial sistólica, siendo máximo con la dosis de 2 mg/kg (27 ± 4 mmHg) (Fig. 17 C).
- d) Alcaloide 4 ($R_f = 0.35$) a las dosis administradas (1-2 mg/kg) se observó aumento en la presión arterial sistólica de 15 ± 3 mmHg (Fig.17 D)

7. 8. EFECTO DE LOS ALCALOIDES AISLADOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Heimia salicifolia* SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA DE RATAS ANESTESIADAS NORMOTENSAS

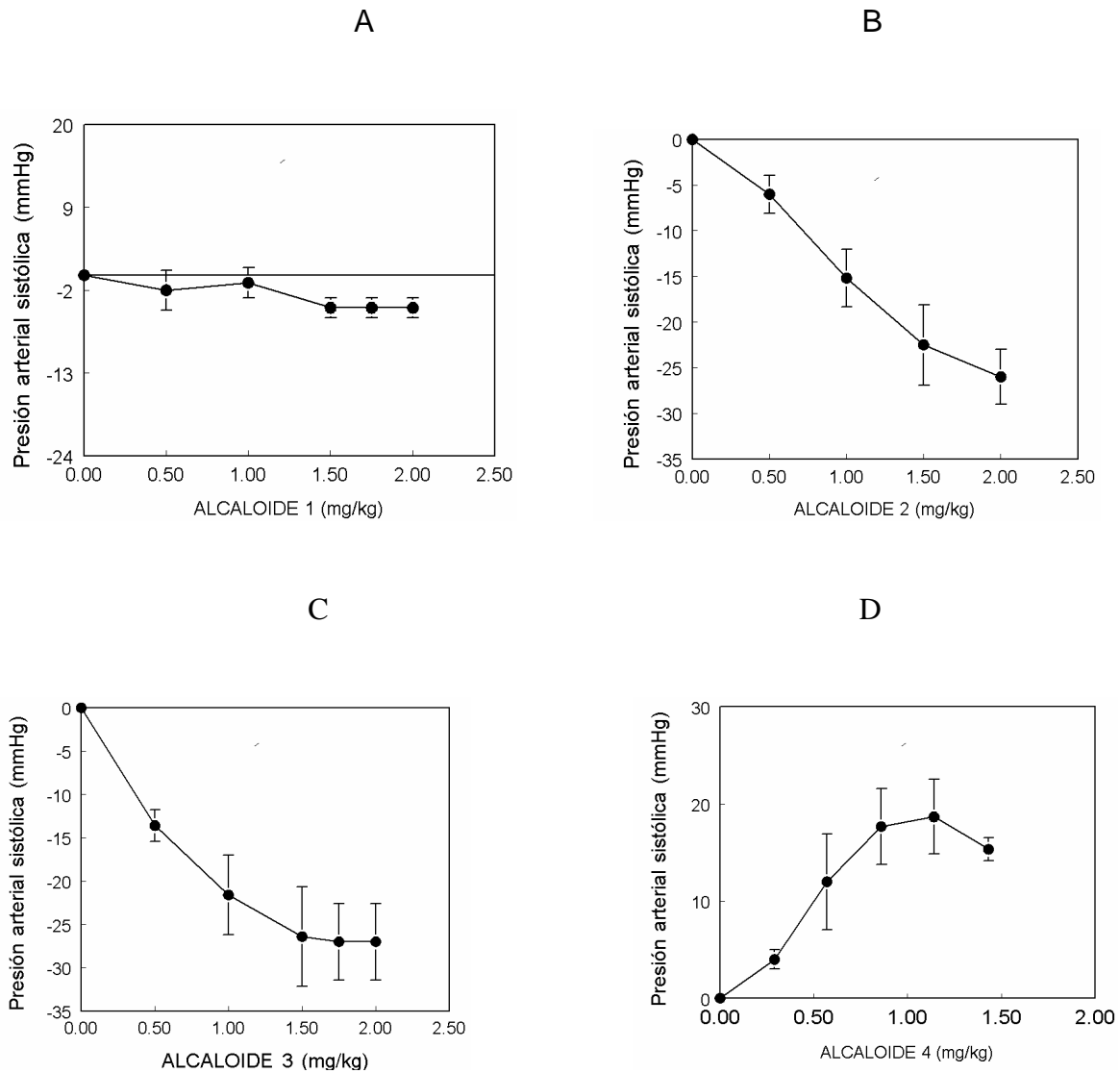


Figura. 17. Efecto de los alcaloides aislados del extracto clorofórmico de *Heimia salicifolia* sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas; cada punto de la curva corresponde a la media de \pm error estándar de la media; n=5.

7.9. EFECTO DE LOS ALCALOIDES EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ANGIOTENSINA II

Al realizar la curva dosis-respuesta a angiotensina II en presencia de cada uno de los alcaloides a la dosis de 2 mg/kg, se observó lo siguiente:

- a) Alcaloide 1 no modificó la respuesta hipertensora a angiotensina II (Fig. 18 A).
- b) Alcaloide 2 disminuyó la respuesta máxima de angiotensina II de 165 ± 3 mmHg a 136 ± 2 mmHg (Fig.18 B).
- c) Alcaloide 3 disminuyó la respuesta máxima de angiotensina II a partir de la dosis de 75 ng/kg siendo máxima esta disminución con la dosis de 125 ng/kg fue de 165 ± 3 mm Hg a 66 ± 2 mm Hg (Fig. 18 C).
- d) Alcaloide 4 no mostró diferencias significativas con respecto a la curva control de angiotensina II (Fig.18 D).

7.9. EFECTO DE Ang II EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS ALCALOIDES

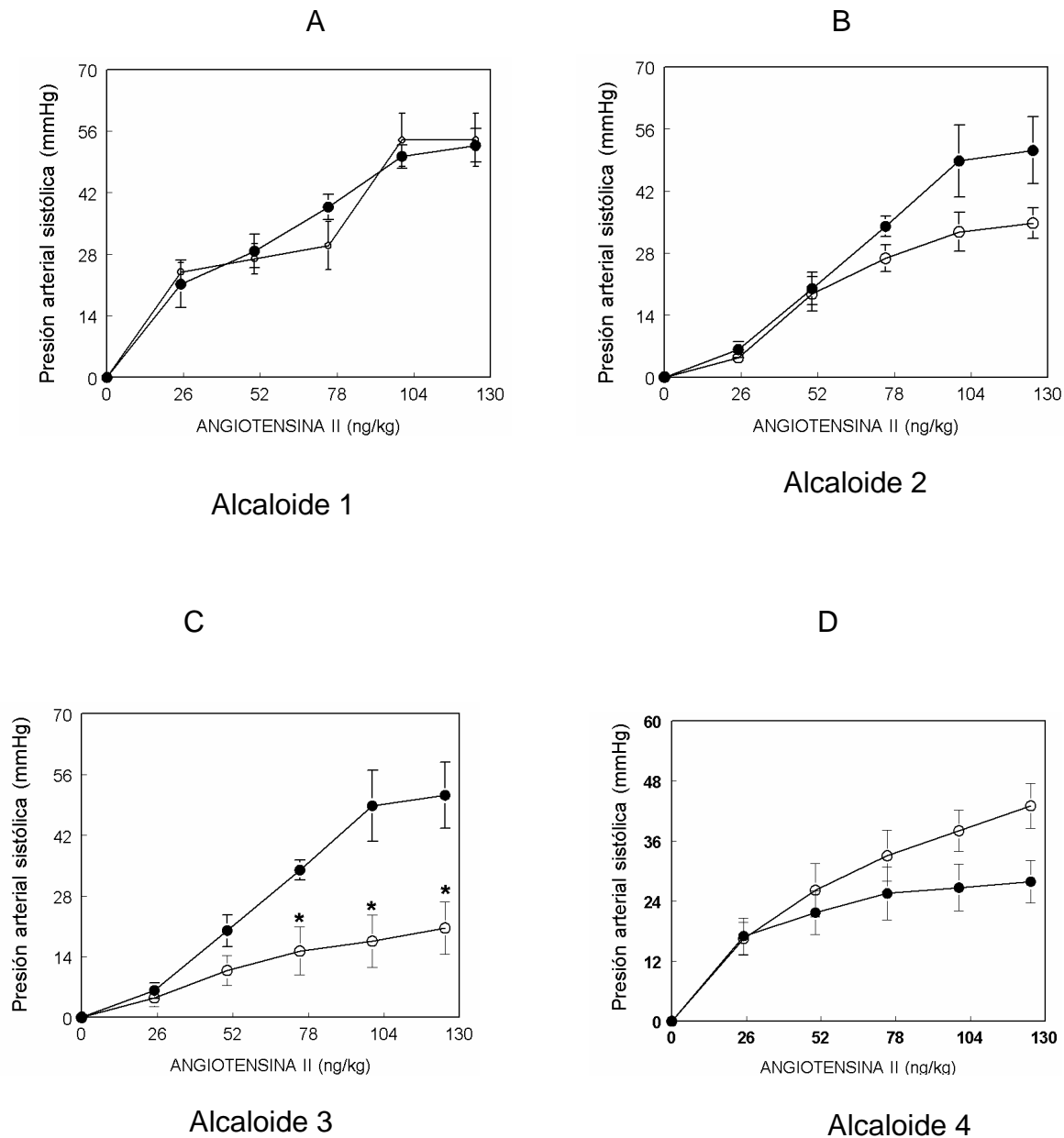


Figura. 18. Curva dosis-respuesta angiotensina II en ausencia (●) y en presencia (○) de los alcaloides sobre la presión arterial sistólica de ratas normotensas. Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5. El grupo tratado con el alcaloide fue comparado estadísticamente con el grupo que recibió angiotensina II * $p < 0.05$.

7.10. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 SOBRE LOS ANILLOS DE AORTA TORÁCICA CON Y SIN ENDOTELIO

En anillos arteriales con endotelio precontraídos con fenilefrina 10^{-5} M, se estudió el efecto del alcaloide-3 y se observó disminución significativa del efecto máximo de fenilefrina del 10% con la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$, al seguir aumentando las dosis del alcaloide-3, no se modificó el efecto (Fig. 19). Los experimentos realizados en anillos arteriales sin endotelio, el alcaloide-3 no mostró efecto vasorrelajante, a pesar de haber aumentado las dosis 10 veces (Fig. 19).

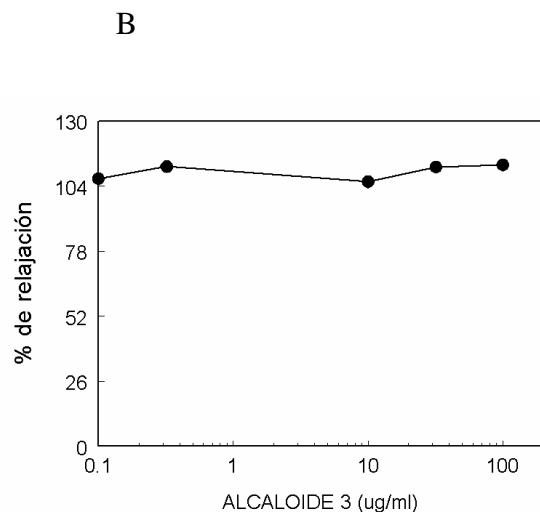
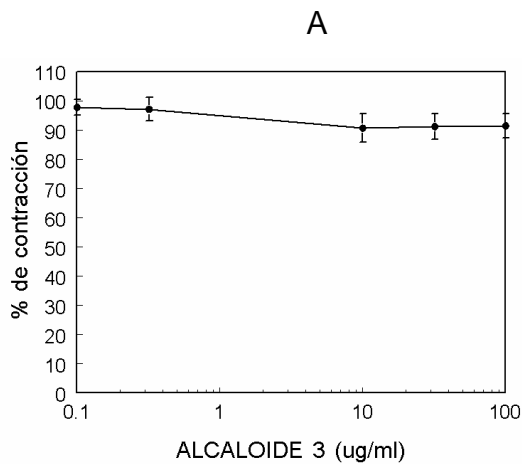


Figura. 19. Efecto del alcaloide- 3 sobre los anillos arteriales de rata con (Fig 19 A) y sin endotelio (Fig. 19 B) precontraídos con fenilefrina 10^{-5} M. Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

Para comprobar la integridad funcional de los anillos arteriales ante agentes vasoconstrictores como la fenilefrina se hicieron curvas dosis respuesta a fenilefrina. Mostrando que la fenilefrina produjo vasoconstricción dependiente de la dosis administrada, obteniendo la respuesta máxima con 10^{-7} M (Fig. 20).

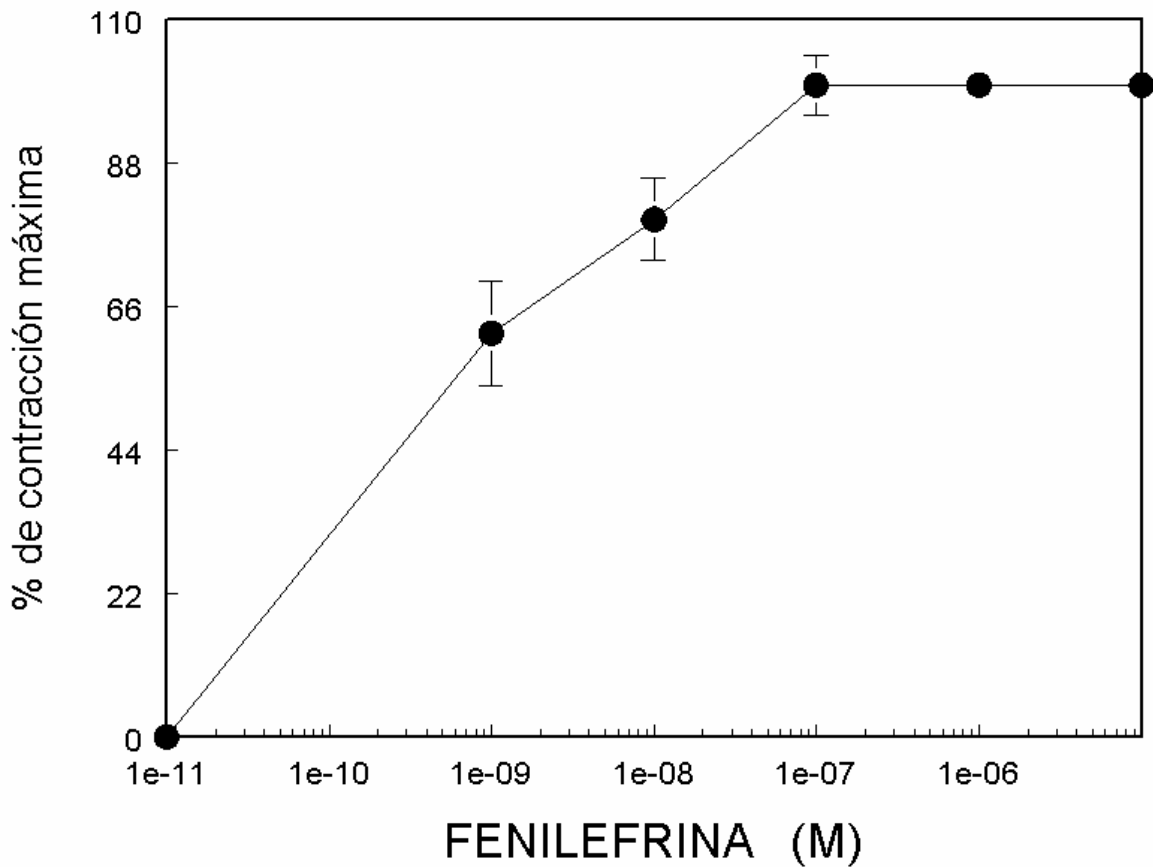


Figura. 20. Curva dosis respuesta a fenilefrina en anillos aórticos de rata con endotelio. Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

Debido a que el alcaloide-3 mostró poco efecto vasorrelajante en los anillos arteriales (apenas del 10 %), se decidió continuar con la preparación del lecho mesentérico. La perfusión de solución Krebs en el lecho vascular mesentérico produjo una presión de perfusión de 50 ± 2.2 mmHg; en estas condiciones se realizó una curva concentración respuesta a fenilefrina (10^{-6} M) observándose un aumento de la presión de perfusión dependiente de la concentración de fenilefrina (Fig. 21). Esta curva permitió establecer la integridad de la preparación, del mismo modo para conocer la integridad del endotelio se realizó una curva concentración respuesta a acetilcolina, para lo cual fue necesario mantener precontraída la preparación por perfusión continua de fenilefrina (10^{-5} M), lo que aumentó la presión de perfusión a 80 ± 1.2 mmHg (Fig. 22).

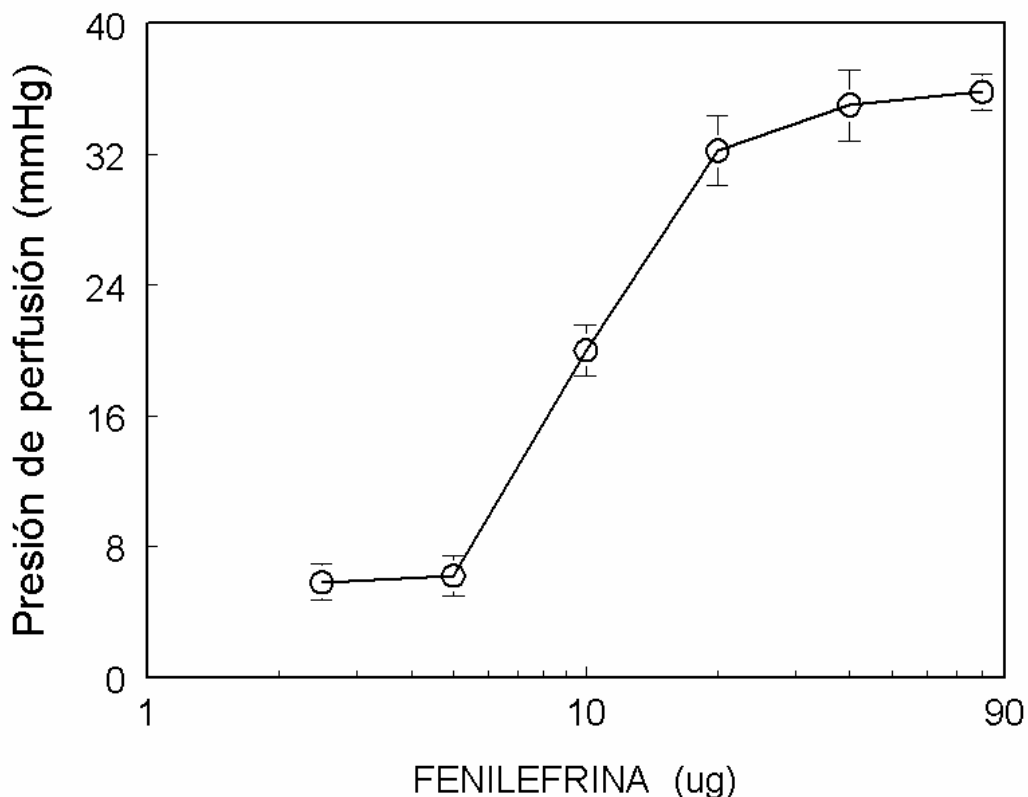


Figura.21. Efecto de la fenilefrina sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas. Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; * $P < 0.05$

7.11. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DEL LECHO MESENTÉRICO DE RATA

En todas las series experimentales la presión de perfusión de la preparación se mantuvo en 80 ± 1.2 mmHg, bajo estas condiciones se realizaron curvas concentración respuesta al alcaloide-3 observándose disminución de la presión de perfusión, dependiente de la dosis; la disminución máxima fue de 23 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 de manera similar a acetilcolina (Fig. 22 B). Ésta es la primera evidencia del efecto vasorrelajante del alcaloide-3. En estas mismas condiciones se realizaron las siguientes series experimentales.

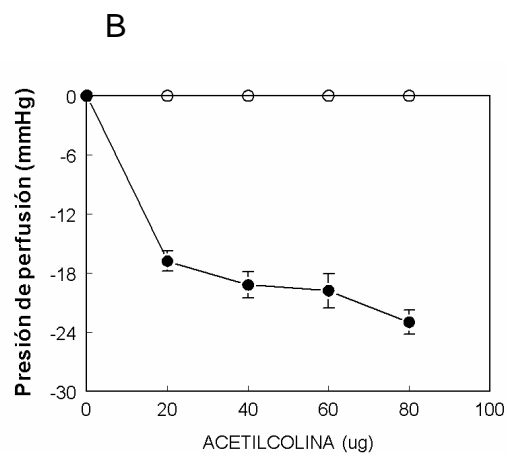
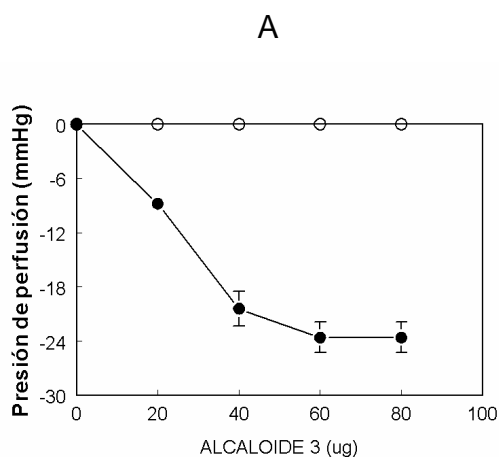


Figura. 22. Efecto del alcaloide- 3 (Fig. 22 A) y acetilcolina (Fig. 22 B) sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

7.11.1. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL AZUL METILENO SOBRE EL LECHO VASCULAR MESENTÉRICO

Al realizar la curva concentración respuesta al alcaloide-3 en presencia de azul de metileno, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, se observó disminución de la presión de perfusión dependiente de la dosis, la disminución máxima fue de 7 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 de manera similar a acetilcolina (Fig. 23 B). Este resultado nos indica que el alcaloide-3 para ejercer su efecto vasodilatador requiere de la activación de la guanilato ciclasa soluble.

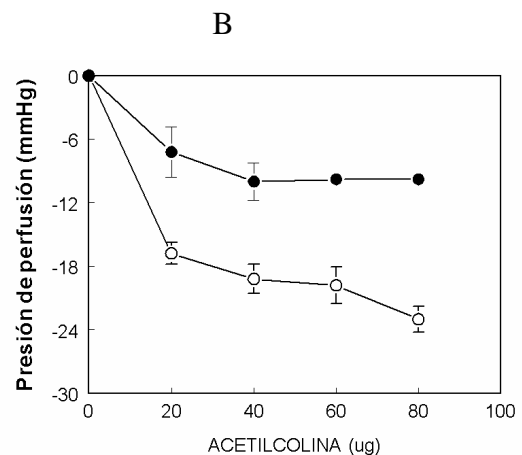
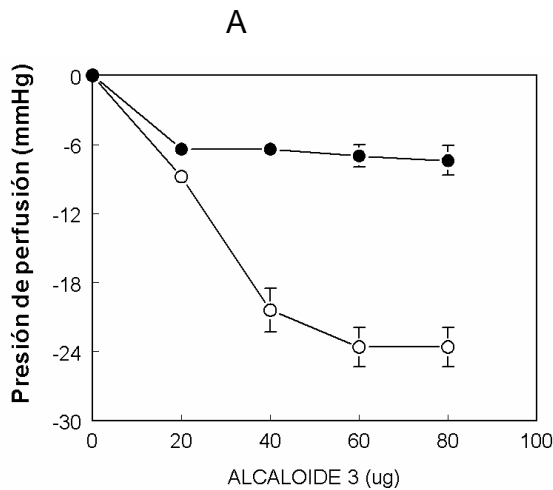


Figura. 23. Efecto del alcaloide-3 (Fig. 23 A) y acetilcolina (Fig. 23 B) sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con fenilefrina ($-\ominus$) y fenilferina + Azul de metileno (10^{-5} M) ($-\bullet-$). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5

7.11.2. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE WORTMANINA SOBRE EL LECHO VASCULAR MESENTÉRICO

Al realizar la curva concentración respuesta al alcaloide-3 en presencia de wortmanina, inhibidor de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), se observó disminución de la presión de perfusión dependiente de la dosis, la disminución máxima fue de 1.6 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 de manera similar a acetilcolina (Fig. 24 B). Este resultado indica que el alcaloide-3 para ejercer su efecto vasorrelajante requiere de la vía PI3K /Akt activadora de la sintasa de óxido nítrico.

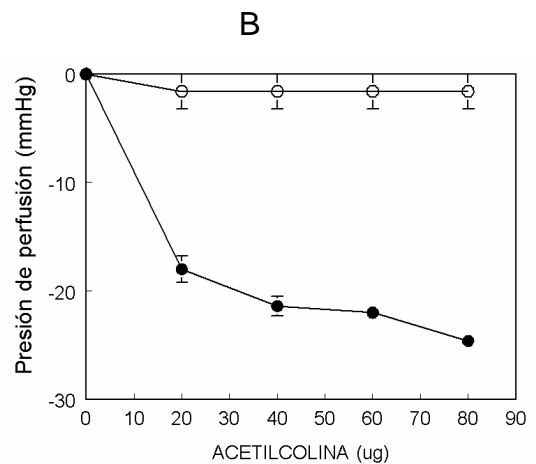
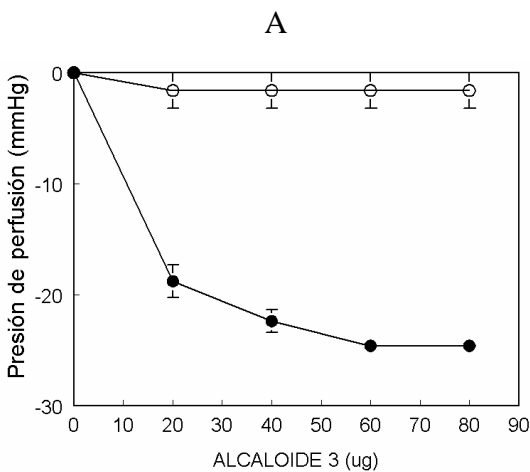


Figura. 24. Efecto del alcaloide-3 (Fig. 24 A) y acetilcolina (Fig. 24 B) sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con fenilefrina (\circ) y fenilefrina + wortmanina (10^{-5} M) (\bullet). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

7.11.3. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ATROPINA SOBRE EL LECHO VASCULAR MESENTÉRICO

Al realizar la curva concentración respuesta al alcaloide-3 en presencia de atropina, antagonista de los receptores muscarínicos, se observó disminución de la presión de perfusión dependiente de la dosis, la disminución máxima fue de 5 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 de manera similar a acetilcolina (Fig. 25 A). El alcaloide-3 para ejercer su efecto vasodilatador requiere de la unión al receptor muscarínico.

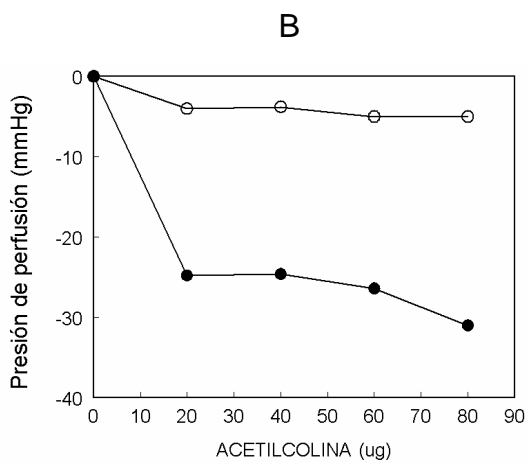
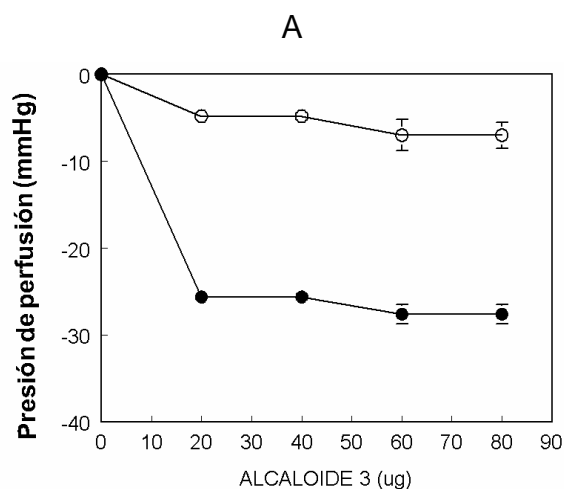


Figura.25. Efecto del alcaloide-3 (Fig. 25 A) y de acetilcolina (Fig. 25 B) sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con FEN (—●—) + Atropina (10^{-5} M) (—○—). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

7.11.4. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE L-NAME SOBRE EL LECHO VASCULAR MESENTÉRICO

Al realizar la curva concentración respuesta al alcaloide-3 en presencia de L-NAME, inhibidor competitivo de sintasa de óxido nítrico endotelial, se observó disminución de la presión de perfusión dependiente de la dosis, la disminución máxima fue de 7 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 de manera similar a acetilcolina (Fig. 26 B). El alcaloide-3 para ejercer su efecto vasodilatador requiere de la síntesis de óxido nítrico.

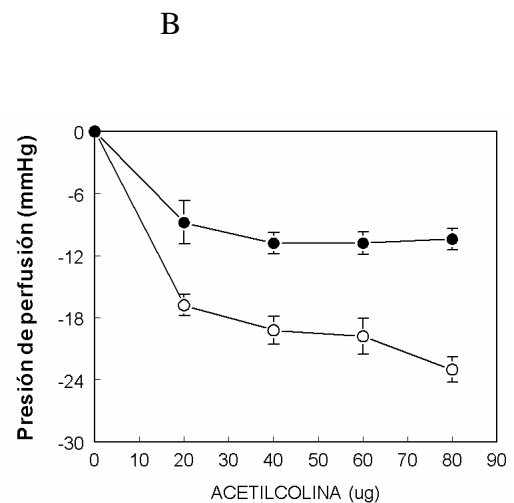
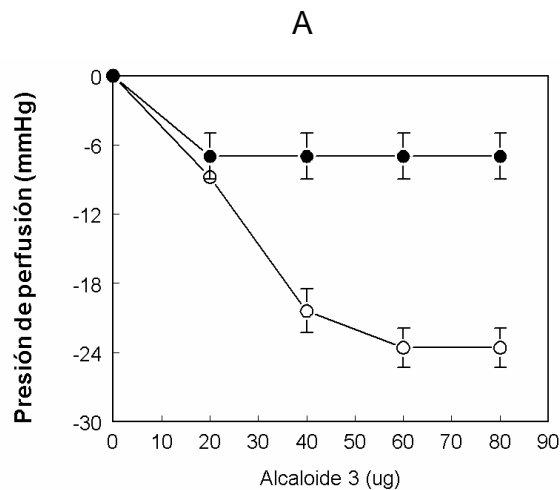


Figura. 26. Efecto del alcaloide-3 (Fig. 26 A) y de acetilcolina (Fig. 26 B) sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con L-NAME (●) (10^{-5} M). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

7.11.5. EFECTO DEL ALCALOIDE 3 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LA DIFENHIDRAMINA SOBRE EL LECHO VASCULAR MESENTERICO

Al realizar la curva concentración respuesta al alcaloide-3 en presencia de difenhidramina, antagonista de los receptores H1 para histamina, se observó disminución de la presión de perfusión dependiente de la dosis, la disminución máxima fue de 30 ± 2 mmHg con 80 μ g de alcaloide-3 en presencia y en ausencia de difenhidramina (Fig. 27A). Con respecto a lo observado con histamina el efecto vasorrelajante fue inhibido. El alcaloide-3 no depende de su unión a receptores histaminérgicos H1 para ejercer su efecto vasodilatador.

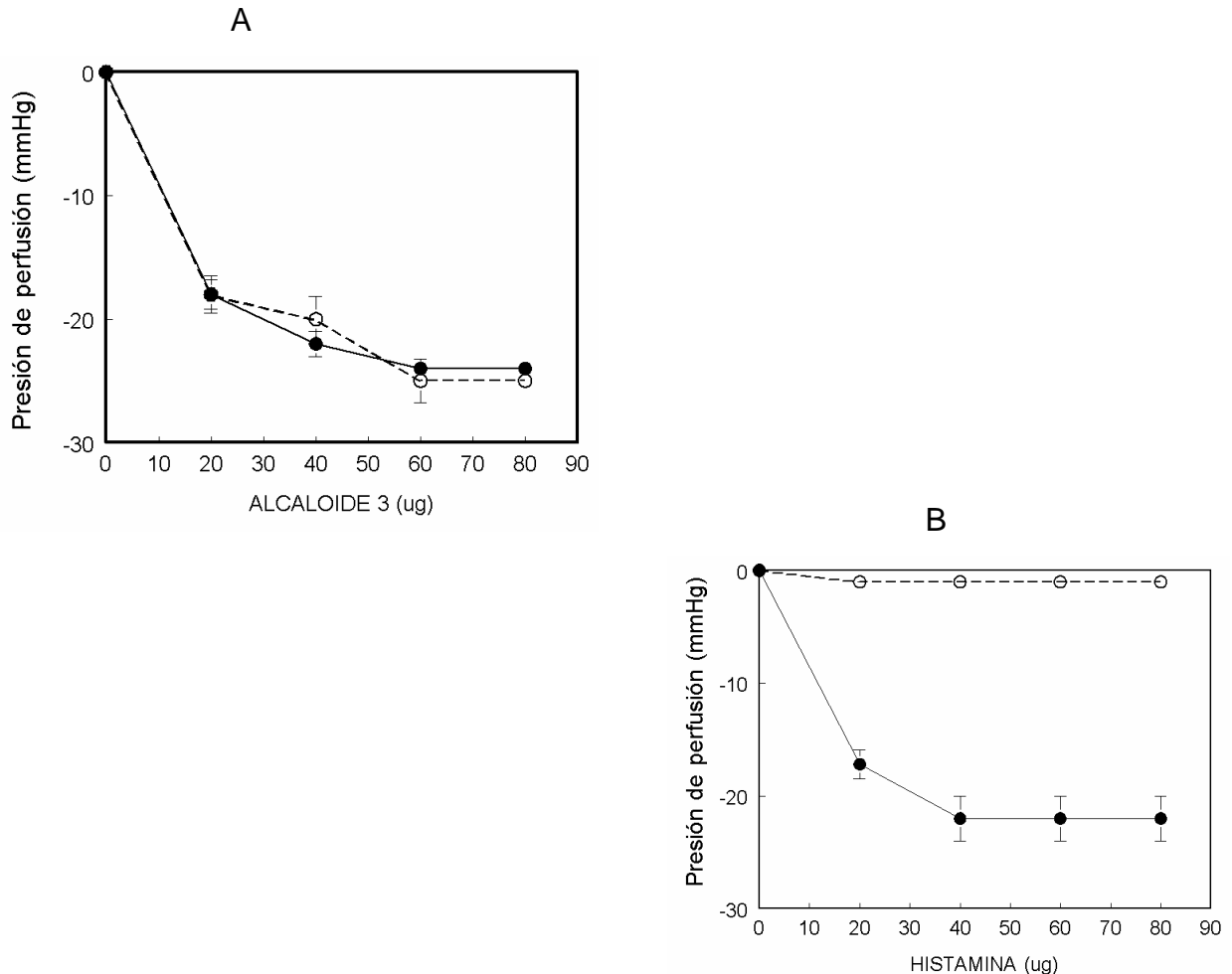


Figura.27. Efecto del alcaloide-3 (Fig. 27 A) y de histamina (Fig. 27 B) sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con endotelio precontraído con fenilefrina (\bullet) y fenilefrina + difenhidramina (10^{-5} M) (\ominus). Cada punto de la curva corresponde a la media \pm error estándar de la media; n=5.

DISCUSIÓN

El aislamiento de los alcaloides se realizó siguiendo parte de la metodología propuesta por Blomster (1964) y Dobberstein (1974). Los alcaloides de acuerdo a Mann (1992), son compuestos de origen químico natural caracterizados por la presencia de uno o más átomos de nitrógeno de naturaleza básica. Hasta finales del siglo XIX, este grupo químico representaba en la Medicina el recurso farmacológico primario para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, respiratorios, cardiovasculares y del sistema nervioso central.

Varias de las técnicas de separación de los alcaloides se basan en modificar el pH, ocasionando que precipiten, y de esta manera se pueden disolver en disolventes no polares como el cloroformo. La técnica de separación de Blomster (1964) y Dobberstein (1974) se basa en estos principios y fue utilizada para separar los alcaloides de las hojas de *H. salicifolia*. Una vez que se obtuvo el extracto clorofórmico se continuaron los estudios. Para su administración en las ratas, fue necesario liofilizarlo y disolverlo en carboximetilcelulosa, se observó que la presión arterial sistólica de la rata normotensa disminuyó de manera dependiente de la dosis como se observa en la Fig. 10, lo que sugiere que existe interacción entre el o los compuestos activos y moléculas receptoras, pues la respuesta a un ligando es proporcional al número de receptores ocupados por el ligando (Hasrat y col., 2004). Se ha reportado que entre los alcaloides presentes en *H. salicifolia* se encuentra vertina (Malone y Rother, 1994) el cual según estudios reportados por Robichaud (1964), disminuye la presión arterial sistólica, lo que sugiere que el efecto hipotensor observado se debe a la presencia de este alcaloide en el extracto clorofórmico o a un compuesto muy similar a la vertina.

Para estudiar el efecto antihipertensor de los alcaloides se desarrolló un modelo de hipertensión aguda por administración de angiotensina II, observándose aumento de la presión arterial sistólica dependiente de la dosis. La angiotensina II al unirse a su receptor AT1 induce un rápido incremento de la presión arterial sistólica por activación de la guanosina trifosfatasa pequeña Rho, que se transloca hacia la membrana plasmática donde activa a Rho-cinasa, esta enzima fosforila a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina inhibiéndola, lo que favorece la contracción del músculo liso (Jalil y

col., 2005), aumento de la resistencia periférica total y del gasto cardiaco (Trinity, 2005) lo que conlleva a un aumento de la presión arterial.

Cuando se hizo la curva dosis-respuesta a angiotensina II en organismos pretratados con el extracto clorofórmico, el efecto hipertensor de angiotensina II fue reducido (Fig.11), lo que sugiere que alguno de los alcaloides del extracto clorofórmico bloquea el receptor AT1 (Katzung, 1991) o que el efecto antihipertensor es a través de la activación de otro tipo de receptores diferentes a los de angiotensina II (p. ej., H₁ y colinérgicos de tipo muscarínico) cuyo efecto vasodilatador es por liberación de NO (Stankevicius, 2003; Thors, 2004).

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto clorofórmico disminuyó la presión arterial sistólica de las ratas normotensas e hipertensas por la administración de angiotensina II. Por lo que se consideró la administración del extracto clorofórmico a ratas normotensas, observándose disminución de la presión arterial sistólica el efecto máximo se alcanzó con la dosis de 10 mg/kg (Fig. 12), lo que sugiere que los mecanismos reguladores de la presión arterial sistólica a través del sistema nervioso central evitan los cambios bruscos de esta variable. Estudios realizados por Kaplan (1966) demostraron que la administración de vertina y litrina en dosis de 100 mg/kg/día disminuyeron la presión arterial sistólica en ratas normotensas. Robichaud (1964) y Malone (1972) demostraron que vertina cuando es administrada en dosis de 100 mg/kg/día durante 21 días a ratas normotensas les produce hipotensión. Por lo que es probable que en el extracto clorofórmico de las hojas de *H. salicifolia* se encuentren vertina y litrina como compuestos vasodilatadores.

Los resultados obtenidos en la medición de la presión arterial sistólica en las ratas normotensas despiertas mostraron que la administración oral de L-NAME en dosis de 70 mg/kg/día durante un periodo de 10 días, incrementó la presión arterial sistólica de manera sostenida indicando la aparición de hipertensión (Fig.13) de manera similar a lo reportado por Dae, (2004) y Navarrete, (2005).

En los animales pretratados con el L-NAME, antagonista competitivo del precursor natural L-arginina en el sitio catalítico de la sintasa de óxido nítrico (Solari, 1999), inhibiendo así la síntesis de óxido nítrico, lo que permitió que los compuestos vasoconstrictores incrementen su efecto y aumente la presión arterial vía sistema

nervioso simpático y sistema renina angiotensina- aldosterona (Rodrigo et al., 2000; Rees et al., 1990; Navarro, 1994 y Ferrer et al., 1998. El modelo L-NAME ha sido utilizado tanto para producir hipertensión aguda como crónica. Los resultados obtenidos mostraron que la administración por 10 días de L-NAME, aumentó la presión arterial sistólica de manera significativa, sin embargo, la administración conjunta con el extracto clorofórmico disminuyó dicho aumento de manera significativa en comparación con el grupo tratado con L-NAME, de manera similar a lo reportado en *Arbutus unedo* (Afkir y col., 2007) *Caesalpine sappá* (Xie, 2000), *Uncaria rhynchophylla* (Goto, 2000), *Cordyceps sinensis* (Chiou, 2000), cuyo efecto hipotensor es a través de la liberación de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto clorofórmico produce efecto hipotensor y disminuye la hipertensión producida por L-NAME, en modelos *in vivo* (Fig.13).

Por otro lado, el grupo tratado con L-NAME + enalapril, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, disminuyó la presión arterial sistólica en ratas hipertensas ya que al inhibir esta enzima se inhibe la degradación de bradicinina, la cual al unirse a sus receptores B2 que se expresan en el endotelio vascular produce vasodilatación a través de la liberación de óxido nítrico, prostaciclina y /o ácido epxoieicosatetraenoico (Bener y col., 2006). Otra vía importante que es activada es la relacionada con la síntesis de angiotensina 1-7, a partir de angiotensina I, por la enzima convertidora de angiotensina 2, la cual ha sido informado que produce vasodilatación.

Al comparar el efecto del enalapril con el efecto del extracto clorofórmico se puede observar que el enalapril mostró mejor efecto sobre la presión arterial sistólica; esto se debe a que el enalapril es un fármaco puro que es bien absorbido por el tracto digestivo y que puede ejercer su efecto hipotensor a través de la generación de prostaciclina y / o por activación de angiotensina 1-7, mientras que el extracto clorofórmico requiere de la vía íntegra de óxido nítrico para producir vasorrelajación.

Debido a que en preparaciones íntegras es difícil proponer un mecanismo de acción para el extracto clorofórmico por lo complejo de los mecanismos que regulan la presión arterial sistólica. Las siguientes series experimentales fueron diseñadas en una preparación *in vitro*, que permite mejor control de las variables como la temperatura, pH

y que además no se presentan variables como absorción y metabolismo como en el lecho vascular mesentérico; esta preparación permite estudiar los cambios de reactividad vascular en vasos de resistencia.

Los estudios de reactividad vascular realizados con el lecho vascular mesentérico de ratas normotensas con endotelio íntegro, mostraron que el extracto clorofórmico tiene efecto vasorrelajante dependiente de la dosis, con un comportamiento similar al efecto de la acetilcolina, cuyo efecto vasorrelajante es a través de la liberación de óxido nítrico (Mucillo et al., 1998). Ya que cuando el lecho vascular mesentérico fue lesionado por la técnica de Criscione y col. (1984), el efecto del extracto clorofórmico y de acetilcolina desapareció (Fig. 14 y Fig.15). Estos resultados también fueron observados por Muccillo, (2004) con *Casimiroa edulis* y por Dae (2004) en *Bulbus fritillaria*.

Los resultados obtenidos con el nitroprusiato sódico mostraron que la vasorrelajación se produce de manera independiente de la integridad del endotelio vascular ya que es un donador de óxido nítrico, es decir su actividad farmacológica se correlaciona con la cantidad de óxido nítrico, que es capaz de liberar (Kaibuchi, 2000) (Fig. 16).

Los resultados químicos obtenidos con el extracto clorofórmico mostraron que se trataba de una mezcla de alcaloides tipo quinolizidina y desde el punto de vista biológico con efecto hipotensor, antihipertensor y vasorrelajante. Por lo que, las siguientes series experimentales se diseñaron para separar los alcaloides y estudiar la actividad farmacológica de cada uno de los ellos.

La separación cromatográfica del extracto clorofórmico se realizó utilizando como fase estacionaria óxido de aluminio básico, el inconveniente de dicho soporte es que sustancias altamente polares, podrían formar enlaces covalentes o adsorberse irreversiblemente al óxido de aluminio básico, dificultando su remoción con los eluyentes convencionales y por lo tanto su valoración farmacológica (Tabla. 3). No obstante, de acuerdo al análisis por cromatografía en capa fina, el empleo de la mezcla metanol - cloroformo como eluyentes, permitió remover del óxido de aluminio la mayoría de las sustancias presentes en el extracto clorofórmico.

Se obtuvieron 4 fracciones cuyos valores de R_f (Tabla 3) fueron similares a los obtenidos por Dobberstein (1974). Los alcaloides mencionados en la Tabla 3 fueron obtenidos de cuatro agrupamientos realizados con las fracciones separadas por

recromatografía en capa fina que resultaron ser activos. En la separación de los alcaloides por cromatografía en capa fina se encontraron dos (alcaloide-2 y 3) cuyo efecto fue hipotensor; sin embargo, el alcaloide- 3 mostró mayor efecto y de mayor duración (Fig. 17), probablemente este efecto tan marcado sobre la presión arterial sistólica se debe a que en su estructura química tiene grupos metoxilos que interaccionan con los receptores de las sustancias vasodilatadoras como los muscarínicos de acetilcolina, los H₁ de histamina, o los B₂ de bradicinina, los cuales como ya se mencionó producen vasodilatación por liberación de óxido nítrico (Amos y col., 2003; Ganado y col., 2004) y de acuerdo a lo observado con el extracto clorofórmico en los ensayos del lecho vascular mesentérico el alcaloide-3 requiera de la integridad del endotelio y de la liberación de óxido nítrico para ejercer su efecto hipotensor.

Este efecto ha sido reportado en las plantas *Lupinus albus L.*, *L. mutabilis*, *L. luteus* y *L. angustifolius* que contienen AL de quinolizidina (Schemeller et al, 2004).

El alcaloide- 1 no modificó la presión arterial sistólica (Fig. 16 y 20). Aunque los alcaloides separados del extracto clorofórmico pertenecen al grupo de las quinolizidinas y por tanto comparten similitudes químicas es probable que al alcaloide 1 le falten algunos grupos químicos para mostrar efecto hipotensor, probablemente los grupos metoxilos.

El alcaloide- 4 mostró efecto hipertensor (Fig. 11); posteriormente cuando se administró angiotensina II en presencia del alcaloide- 4 (Fig. 19) se observó ligera disminución de la presión arterial sistólica pero no fue significativa. Este efecto opuesto al de los otros alcaloides probablemente se debe a que tiene grupos químicos con afinidad por los receptores adrenérgicos tipo alfa, como los hidroxilos (Hardman y col., 1996).

Con el propósito de proponer el mecanismo por el cual el alcaloide-3 produce vasorrelajación se realizaron estudios *in vitro*, de la aorta torácica de rata observándose que el alcaloide- 3 produjo vasodilatación mínima (Fig. 25 y 26) aún con dosis altas, en comparación con el efecto observado con acetilcolina cuyo efecto vasodilatador fue 10 veces mayor que con el alcaloide- 3. Como se sabe la acetilcolina se une a receptores muscarínicos para causar vasorrelajación dependiente del endotelio a través de la liberación de óxido nítrico y/o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Ay y col.,

2000). Esta relajación difiere en relación al subtipo de receptor muscarínico del vaso sanguíneo, lecho vascular, especie y calibre de las arterias. El factor hiperpolarizante es el principal vasorrelajante en los vasos de resistencia (Paulus y cols., 2001). Mientras que en las arterias de conductancia el óxido nítrico es el principal mediador (Tuncer y Vanhoutte, 1993). Lo que sugiere que el alcaloide- 3 tiene poco efecto vasodilatador en los vasos de conductancia como la aorta, probablemente se debe a que al interaccionar los grupos metoxilos con el receptor cambie su configuración tridimensional y por ello no se esté llevando a cabo esta interacción, mientras que en el lecho vascular mesentérico el alcaloide-3 al interaccionar con su receptor esta interacción se esté llevando a cabo con mayor facilidad y no requiera cambiar su configuración tridimensional. Este efecto se ha encontrado en otros alcaloides como la pilocarpina, agonista muscarínico que no causa vasorrelajación en anillos de aorta de rata pero sí causa vasorrelajación en el lecho vascular mesentérico (Shan y Wang, 2002). En base a estos resultados y a lo reportado por Shan y Wang (2002) se decidió continuar el estudio en la preparación del lecho vascular mesentérico cuyo riego sanguíneo es a través de vasos sanguíneos de resistencia.

Se observó que el alcaloide- 3 causó vasorrelajación en el lecho vascular mesentérico precontraído con fenilefrina (Fig. 22) de manera similar a la acetilcolina sugiriendo que este efecto es dependiente de endotelio.

Al precontraer el lecho vascular mesentérico con el L-NAME, que es un inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico endotelial, se observó que el efecto vasorrelajante tanto del alcaloide-3 como de acetilcolina fue de menor magnitud (Fig. 26) de manera similar a lo observado con otras plantas como *Casimiroa edullis* (Rutaceae) por Muccillo y col. (2004), *Tríbulus terrestris* (Zygophyllaceae) por Phillips (2005). Sugiriendo que el efecto vasorrelajante es a través de la liberación de óxido nítrico, al activarse la guanilato ciclasa incrementa los niveles de GMPc y con ello disminuye el Ca^{++} citosólico y se produce la vasorrelajación (Ghayur y Gilani, 2006). Al inhibir la guanilato ciclasa con azul de metileno se observó que también se redujo el efecto vasodilatador del alcaloide-3 y de la acetilcolina (Fig. 23) de manera similar a lo observado en otras plantas como *Casimiroa*, *Crotalaria sessiliflora* por Koh y col (2007)

y *Balistes capriscus* (Cavalli, 2003), sugiriendo un papel significativo de la GC en la relajación vascular inducida por el alcaloide- 3.

Al inhibir la fosfatidilinositol-3- cinasa con wortmanina, lo que también inhibe la activación de Akt que se requiere para la fosforilación y activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial, se observó disminución del efecto vasodilatador tanto del alcaloide- 3 como de acetilcolina (Fig. 24). Sugiriendo una participación importante de esta enzima en la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial. Este efecto se ha reportado en otras plantas como (*Hancornia speciosa*) (Ferreira, 2007), cuyo mecanismo de acción es a través de la enzima Akt.

Al perfundir el lecho vascular mesentérico con fenilefrina más atropina, antagonista no selectivo de receptores muscarínicos se observó que la respuesta vasodilatadora de acetilcolina y del alcaloide-3 fue menor (Fig. 25) sugiriendo que la acción hipotensora del alcaloide-3 se debe a la estimulación del receptor muscarínico que al estar bloqueado por la atropina impide su unión al alcaloide-3, por lo cual la respuesta vasodilatadora fue menor, de manera similar a los estudios realizados con otras plantas como *Raphanus sativus* (rábano) (Ghayur y Gilani, 2006) y en la familia de las Leguminosae *Lupinus albinus*, *Lupinus mutabilis* (Schmeller y col., 1994). Para verificar que el efecto del alcaloide-3 es mediado por su unión a receptores muscarínicos, con cierto grado de especificidad el lecho vascular mesentérico se perfundió con fenilefrina más difehidramina, antagonista del receptor H₁ para histamina, observándose que con alcaloide-3 (Fig. 27) en presencia o en ausencia de la difenhidramina produjo vasodilatación indicando que este efecto no requiere de la unión a receptores H₁ y que es específico para receptores muscarínicos y que la histamina no participa en este efecto.

Al realizar el análisis de la estructura química de este alcaloide a través de resonancia magnética nuclear de C¹³ y H¹ , Spectrum Chemical Organic Data Base, Blomster (1964) se determinó que se trata de litrina, este alcaloide en su estructura química tiene un anillo bifenílico que probablemente sirve de unión entre el receptor muscarínico y el ácido aspártico que a su vez requiere que se una el grupo carbonilo de litrina para que forme un enlace de hidrógeno con el hidroxilo de tirosina para que pueda unirse este complejo a la proteína G y ésta se disocie del receptor y se divida en las

subunidades α y el complejo $\beta\gamma$. (Bikádi y Simonyi, 2003). A su vez la subunidad α estimule la generación de segundos mensajeros IP3 y DAG y con ello se incrementa el nivel de calcio intracelular (Karlson y col., 2000), se active la enzima Akt, se forme óxido nítrico, se active la guanilato ciclasa, se incrementen los niveles de GMP cíclico y esto conlleve a disminuir la concentración de Ca^{++} citosólico en las células musculares lisas y ocurra la vasorrelajación.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio es posible elaborar el siguiente resumen:

- El extracto clorofórmico mostró efecto hipotensor en ratas anestesiadas normotensas e hipertensas por administración de L-NAME.
- Al separar el extracto clorofórmico mediante cromatografía en columna y capa fina se obtuvieron 4 alcaloides de los cuales los alcaloides 2 y 3 mostraron efectos hipotensor y antihipertensor en la rata anestesiada normotensa.
- Mediante resonancia magnética nuclear de C^{13} y H^1 se determinó que el alcaloide 3 se trata de litrina de la cual no existen antecedentes de su uso en el tratamiento para la hipertensión arterial.
- Litrina para ejercer su efecto vasodilatador requiere de la liberación de óxido nítrico y de su unión a receptores muscarínicos.

9.0. CONCLUSIÓN

Heimia salicifolia contiene por lo menos un alcaloide bifenílquinolizidínico cuyo efecto es vasodilatador y potencialmente puede ser utilizado como agente hipotensor.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, A., Camacho, R., Chino, S., Jácquez, P., López, M.E. 1994. Plantas medicinales del herbario del IMSS. Cuadros básicos para aparatos y sistemas del cuerpo humano. Instituto Mexicano del Seguro Social. México.567.

Aguilar A, Cano L. & Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Tomo I.

Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyyat A. 2008. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. J Ethnopharmacol 116(2): 288-95.

Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, Greene AS. 2001. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. Microcirculation 8: 57-67.

Amos S, Akah P, Enwerem N. 2003. Hypotensive Activity of the Ethanol Extract of *Pavetta crassipes* Leaves. Biol. Pharm. 26 (12); 1674-1680.

Argueta, A., Aguilar, A., Cano, L. 1994. Flora medicinal indígena de México. Tomos I, II, III. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 980.

Badimon L, Vilahur G. 2001. Platelets, arterial thrombosis and cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. Epub. 1: 30-9.

Bagaté K, Grima J, Imbs J, Helwing J. 2001. Signal transduction pathways involved in kinin B(2) receptor vasodilation in the rat isolated perfused kidney. Br. J. Pharmacology. 132 (8): 1735-42.

Bazzoni M. Schattauer Gmb H, Stuttgart. 2006. Endothelial tight junctions permeable barriers of the vessel wall. Thromb Haemost 95: 36–42

Bernatova I, Pechanova O, Pelouch V, Simko F. 2000. Regression of chronic L-NAME-treatment-induced left ventricular hypertrophy: effect of captopril. J Mol Cell Cardiol; 32: 177-185.

Bernátová I, Pechánova O, Kristek F. 1999. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term N_G-nitro-L-arginine metil ester treatment. J Pharmacol. 81: 99-106.

Bikadi Z, Simonyi M. 2003. Muscarinic and nicotinic cholinergic agonists: Structural analogies and discrepancies. Current medicinal chemistry 10: 2611-2620.

Blomster, R.N., Schwarting, A.E., Bobbitt, J.M. 1964. Alkaloids of *Heimia salicifolia* I: A preliminary report. *Lloydia* 27 (2): 15-24.

Boguski MS, McCormick F. 2000. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 366: 643-54.

Braunwald e, Fauci A, Kasper D, Hauser S. 2000. Principios de medicina interna. 15ed. México. McGraw-Hill. 1660-76.

Buga GM, Gold ME, Fukuto, JM, Ignarro L. 1991. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17: 187-193.

Caballero-George C, Vanderheyden PM, Solis PN, Pieters L, Shahat AA, Gupta MP, Vauquelin G, Vlietinck AJ. 2001. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. *Phytomedicine* 8(1): 59-70.

Caballero-George C, Vanderheyden PM, De Bruyne T, Shahat AA, Van den Heuvel H, Solis PN, Gupta MP, Claeys M, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck AJ. 2002. In vitro inhibition of [3H]-angiotensin II binding on the human AT1 receptor by proanthocyanidins from Guazuma ulmifolia bark. *Planta Med.* 68(12): 1066-71.

Cachofeiro, V. 2001. Endothelial dysfunction in hipertensión. *Nefrology* 23 (2): 4-12.

Cachofeiro V, Ramos M, Lahera j. 2004. La alteración renal no es el principal mecanismo patogénico en el desarrollo de la hipertensión arterial. Hipertensión: Órgano oficial de la Sociedad Española de Hipertensión - Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial. 21: 251-255.

Cachofeiro V, Ramos M, Martínez J. Lahera J. 2001. Alteraciones del endotelio en la hipertensión. *Nefrología* 23: 3-12.

Campbell L, Safer W. 2002. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 11:177-183.

Carrizo, E. 2002. Plantas medicinales en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero de Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 72: 89-9

Cavalli I. 2003. Fish *Balistes capriscus* skin extract-induced relaxation in mesenteric arterial bed of rat. *J. Ethnopharmacology* 88: 215-220.

Contreras G, Pardo V, Cely C, Borja E, Hurtado A, De La Cuesta C, Iqbal K, Lenz O, Asif A, Nahar N, Leclercq B, Leon C, Schulman I, Ramirez-Seijas F, Paredes A, Cepero A, Khan T, Pachon F, Tozman E, Barreto G, Hoffman D, Almeida Suarez M, Busse JC, Esquenazi M, Esquenazi A, Garcia Mayol L, Garcia Estrada H. 2004. Factors associated with poor outcomes in patients with lupus nephritis. *Lupus.*14(11): 890-5.

Constanzo, L.S. 2000. Fisiología cardiovascular. En *Fisiología*. Ed. Mc.Graw-Hill, Interamericana. España. 108-161.

Cosentino.1999. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc. Res.* 43: 274-78.

Consentido M, Morrow J, Roberts L. 2000. Autacoides derivados de lípidos eicosanoides y factor activador de plaquetas. En *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Goodman & Gilman. 8ª ed. Interamericana Mc Graw Hill.1225-35.

Consentino. 1999. Tetrahydrobiopterin and endothelial function. *Eur heart* 19: 663-89.

Cotran R, Kumar V, Collins T. 2002. *Patología estructural y funcional*. 6ª ed. Colombia. McGraw-Hill-interamericana. 74-80.

Crawford, M. 2002. *Cardiología*. Ed. Harcourt. Madrid, España. 879.

Chiou W, Chang P, Chou C, Chen C. 2000. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Cordyceps sinensis*. *Life Sci.* 66(14) 1369-76.

Dae. G. 2004. Effects of *Bulbs fritillaria* water extract on blood pressure and renal functions in the L-NAME- induced hypertensive rats. *J. Ethnopharmacology* 91: 51-56.

De feo, V.& senatore. 1993. Medicinal plants and phytotherapy in the amalfitan coasti, salerno province. Campania souther Italy. *J. Ethnopharmacology* 39: 39-51.

Delfin, A.I., Chino, V.S. 1998. *Biomoléculas*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 3581.

Dimo T, Rakotonirnas S, Azar J. 2002. Leaf methanol extract of *Bidens pilosa* prevents and attenuates the hipertensión induced by high-fructose diet in wistar rats. *J. Ethnopharmacology* 83: 183-191.

Dobberstein, R.H. 1974. The sequential appearance and metabolism of alkaloids in *Heimia salicifolia*. *Lloydia* 3 (5): 98-105.

Duke, J.A. 1992. *Handbook of biologically active phytochemicals and their activities*. Boca Raton, FL. CRC Press. 791.

Fasce, E. 2002. Endothelial dysfunction and hypertension. *Am. J. Physiol.* 5 (2): 24-34.

Ferrer V, Fonseca J. García R. 1998. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan.* 2(3): 45-53.

Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. 2007. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J Ethnopharmacol.*109(1): 161-4.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (2): 373-376.

García J, Ortiz MC, O'Valle F, Alcaraz A, Navarro EG, Vargas F. 2006. 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)*. 110(2): 227-33.

Ganado P, Sanz M, Padilla E. 2004. An In Vitro Study of Different Extracts and Fractions of *Allium sativum*: Vascular Reactivity. *J. Pharmacology*. 94: 434-442.

Ganong W. 2002. Mecanismos reguladores cardiovasculares. En *Fisiología Médica*. 18ª ed. Ed. Manual Moderno. México. 491-501.

Gómez JM, Sahún M, Vila R, Domènech P, Catalina P, Soler J, Badimón L. 2000. Peripheral fibrinolytic markers, soluble adhesion molecules, inflammatory cytokines and endothelial function in hypopituitary adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 64(6): 632-9.

Goto, H. 2000. Vasodilatador effect of extract prepared from *Uncariae ramulus* on isolated rat aorta. *Amerc. J. Chinese*. 28: 197-203.

Graham, S. A., 1991. Lythraceae. En V. Sosa et al. (eds.). *Flora de Veracruz*. Fascículo 66. Instituto de Ecología. Xalapa, Ver., México.

Graham, S. A., 1994. Lythraceae. En: Rzedowski, J. et al. (eds.). *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. Fascículo 24. Instituto de Ecología. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Guillén del Castillo, M. y Linares, G. 2002. Bases biológicas y fisiológicas del movimiento humano. Ed. Médica Panamericana, Madrid, España: 253-277.

Gutzwiller Gp., Tschopp S., Bock A., Zehnder C. 2004. Glucagon-like peptide I induces natriuresis in healthy and in insulin-resistant obese men. *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 3055-61.

Guyton, A.C. 2001. Aparato cardiovascular. En *Tratado de fisiología médica*. Interamericana. 9ª ed. 257-317 pp.

Hansen K, Wagners S, Gudiksen. 1995. In vitro screening of traditional medicines of hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacology* 48: 43-51.

Hasrat J, Pieters L, Vlietinck. 2004. Medicinal plants in Suriname: hypotensive effect of *Gossypium barbadense*. *J Pharmacol*, 381-387.

Häuser W, Jöhren O, Saavedra JM. 1998. Characterization and distribution of angiotensin II receptor subtypes in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*, 348: 101-114.

Hecker M, Hernández A. 2000. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: factor or fiction. *News. Physiol Sci*. 15: 15.

Hernández P. 2000. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition on pre-proendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 7: 616-622.

Hilgers RH, Todd J Jr, Webb RC. 2006. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(1): H216-22.

Ibarra R, Pedraza C. 1993. Renina: Estructura y regulación de la expresión del gen, biosíntesis y vías celulares de secreción. *Rev. Invest Clin*. 45: 225-66.

Ilknur A, Emre S, Tuncer M. 2000. Factors responsible for acetylcholine-induced dilatation in the isolated perfused rat kidney. *General Pharmacology*. 34: 175-181.

Imai T, Miyazaki H, Hirose S. 1998. Cloning and sequence and lysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 80: 7405-7409

Jalil J, Lavandero S, Chiong M y Paz M. 2005. La vía de señalización Rho/Rho-quinasa en la enfermedad y el remodelado cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 58: 951 - 961

Jackson, 2003. Renina y angiotensina en: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10^a ed. Editor Goodman & Gilman. Ed. Mc Graw Hill. México. pp. 819-841.

Jiménez J, Cheng H, Harris R. 2003. Renal and related cardiovascular effects of conventional and Cox-2 specific analgesics. *Am J. Her*. 7: 63-74.

Karlsson E, Jolkkonen M, Mullageta E, Onali P, Adem A. 2000. Snake toxins high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82: 793-806.

Katzung, G. 1991. *Farmacología Básica y Clínica*. 4^a ed. Edit. El Manual Moderno, México, D.F. 659.

Kaplan, H.R., Malone, M.H. 1966. A pharmacology study of nesodine, cryogenine and other alkaloids of *Heimia salicifolia*. *Lloydia* 29 (2): 348-359.

Kaibuchi, A. 2000. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by Rho family GTPases in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem*. 68 (6): 459-486.

Koh SB, Kang MH, Kim TS, Park HW, Park CG, Seong YH, Seong HJ. 2007. Endothelium-dependent vasodilatory and hypotensive effects of *Crotalaria sessiliflora* L. in rats. *Biol Pharm Bull.* 30(1): 48-53.

Kuklinski, 2000. *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.* Ed. Omega. 230-33.

Li S, Wang Y, Matsumura K. 2001. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase 2 mice. *Brain. Res.* 825: 86-94.

Lowenstein E., Vouthier M. 1994. Sympathetic nervous system activation and hyperdynamic circulation associated with desflurane: not all isomers are created equal. *Anesthesiology* 79(3): 419-21.

Magos G A. 1999. Estudio farmacológico y químico de los metabolitos secundarios de la semilla de *Casimiroa edulis* responsables de la actividad cardiovascular en roedores. Tesis de Doctorado. Inst. Inv. Biomédicas. UNAM.

Malone, M.H. 1972. Antiinflammatory evaluation of cryogenine. *Internacional Congress of Pharmacology* 4 (3): 161-172.

Malone, M.H., Rother, A. 1994. A new review: Phytochemistry and pharmacology of *Heimia salicifolia* J. *Ethnopharmacol.* 42 (8): 135-159.

Mann, J. 1992. *Secondary Metabolism.* 2ª ed. Oxford Science Publications, Great Britain: 374.

Martínez M. 1992. *Las Plantas Medicinales de México.* 6ª ed. Ed. Botas. México. 656.

Martínez, M., 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.* Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Mombouli J.V. 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol Cell Cardiol* 31: 61-74.

Moncada, S., Gryglewski, R., Burtings, S., and Vane, J.R. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665.

Montoya-Piña J. V. 2005. Investigación bibliográfica de plantas utilizadas como antihipertensoras en la región neotropical de la República Mexicana. Tesis de licenciatura. Biología, FES Iztacala, UNAM. Pág. 68.

Muccillo A. 2004. Endothelium-dependet vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of *Casimiroa edulis* on rat mesenteric arterial bed. *J. Ethnopharmacol.* 95: 163-167.

Munzemaier D. 1996. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 27: 760-765.

Navarro C. 1994. Óxido nítrico, función renal y presión arterial. *American Journal. Hypertension* 1(3): 141-44.

Navarrete-Bastida, R.G. 2004. Efecto del extracto acuoso de las hojas de *Casimiroa edulis* la Llave et Lex en un modelo de hipertensión aguda y crónica. Tesis de Licenciatura. Biología, FES Iztacala, UNAM.

Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Villalpando S. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. México: Instituto Nacional de Salud Pública. pp. 80-81.

Pacheco R. 2003. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *An. Fac. Med.* 64: 43-54.

Palmer, R.M.J, Ferrige, A.G., Moncada, S. 1988. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(3): 524-526.

Paulus WJ, Frantz S, Kelly RA. 2001. Nitric oxide and cardiac contractility in human heart failure: time for reappraisal. *Circulation* 104(19): 2318-23.

Pechanova O, Dobesova Z, Cejka J, Kunes J, Zicha J. 2004. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *J Hypertens.* 22: 167-173.

Pereira L, Bezerra D, Mandarim-de-Lacerda C. 2004. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathology Research and Practice* 200: 211-7.

Phillips A. 2006. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *J. Ethnopharmacology* 104: 351-55.

Qi W., Twigg S., Chen X. et al. 2004. The integrated actions of transforming growth factor-beta 1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 9: 113-125.

Quesada. 2002. Nitric oxide synthase activity in hypertension and hypothyroid rats. *Eur J. Endocrinol.* 147: 177-122,

Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O. 2006. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica* 37 (1): 65-70.

Rees D, Palmer R, Schulz R, Hodson H. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthases in vitro and in vivo. *British Journal Pharmacology* 1 (34): 95-99.

Rodrigo J, Fernández A, Serrano J, López J, Castro. 2000. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 23 (2): 195-236.

Rojas J, Ronceros S, Palomino R. 2006. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá) en ratas. *An. Fac. Med.* 67 (3): 206-213.

Robichaud R. 1964. Pharmacodynamics of cryogenine, an alkaloid from *Heimia salicifolia* Link and Otto. *Arch. Internationals de Pharmacodynamie et Therapie* 157: 220- 232.

Morales-Ruiz M. 2002. Participación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa/ sintasa endotelial del óxido nítrico en procesos de angiogénesis y remodelado vascular. *Nefrología XXII, Suplemento 5*: 13-16.

Safar M.E. 2000. Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* 32: 156-161.

Saul, y Anderson R. 1998. Role of plasmalemmal caveola in signal transduction. *Am. J Physiology* 275(5 Pt 1): L843-51.

Scout, Vanhoutte P. 1993. The endothelium as regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 87: 51-55.

Schmeller T, Sauerwein M, Sporer F, Wink M. 1994. Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Natural Products* 57: 1316-1319.

Shan YM, Hao CY, Wang L. 2002. An immunohistochemical study on the distribution in organs in cases with morphine poisoning. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 18(1): 9-11.

Sparatore A, Basilico N, Parapini S, Romeo S, Novelli F, Sparatore F, Taramelli D. 2005. 4-Aminoquinoline quinolizidinyl- and quinolizidinylalkyl-derivatives with antimalarial activity. *Bioorg Med Chem.* 13(18): 5338-45.

Stankevicius E. 2003. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina* 39: 333-341.

Standley. 1924. Trees and shrubs of México. Contributions from the United States National Herbarium. Washington.1025.

Secretaría de Salud. Causas de mortalidad en México 2000. Estadísticas de mortalidad, [http:// www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx).

SSA. Norma oficial mexicana NOM-030-SSA-2-1999. Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Diario Oficial de la Federación, 2000.

Thomas AL, Morgan B, Drevs J, Unger C, Wiedenmann B, Vanhoefer U, Laurent D, Dugan M, Steward WP. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: ptk787/zk 222584. *Semin Oncol.* 30 (6): 32-38.

Thorin, Shreeves M. 1998. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacology* 78: 155-66.

Tollins, P.J, Shultz, J., Raij, L. 1999. Role of endothelium-derived relaxing factor regulation of vascular tone and remodeling. *Am. J. Hypertens.* 17 (3): 909-916.

Tresguerres, F.J.A. 1999. Integración neuroendócrina. En *Fisiología Humana*. Mc Graw Hill Interamericana. España. 887-902.

Trinity J., Bivalacqua, Ajay Dalal, Hunter C. Champion, and Philip J. Kadowitz. 2005. Role of AT1 receptors and autonomic nervous system in mediating pressor responses to Ang II in anesthetized mice. *Am. J. Physiol.* 277: E838-E848.

Thors B, Hildórrsson H, Thorgeirsson G. 2004. Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at ser 1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3k-Akt. *Science* 573: 175-180.

van den Meiracker AH, van der Linde NA, Broere A, Derkx FH, Boomsma F. 2001. Effects of L-arginine and L-NAME on the renal function in hypertensive and normotensive subjects. *Nephron* 91(3): 444-51

Vázquez-Pérez, S., Navarro-Cid, J., de las Heras, N., Cediél, E., Sanz-Rosa, D., Ruilope, L.M., Cachofeiro, V., Lahera, V. 2001. Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *Am. J. Hypertens.* 19 (3): 539-45.

Vaziri N, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs D. 2000. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 36: 957-64.

Vivanco I. and Sawyers C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Reviews* 2: 489-501.

Weiprecht H, Lorenz, Schnerman J. 1990. Effect of adenosine receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular. *J. Clin. Invest.* 85: 1622-28.

Wiebelhaus, V.D. 1974. A Water diuretic. How and Why. In: L.G. Wesson and G.M. Fanelli. Recent Advances in Renal Physiology and Pharmacology, University Park Press, Baltimore, Md. pp. 331-347.

Xie Y.W., Mang Ds, Xu H, Dong H, But P. 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. Life Sci. 67(15): 1913-8.