

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIZACIÓN EN FARMACOLOGÍA

**ESTUDIOS DE DIFERENTES EXTRACTOS Y COMPUESTOS
DE *Marila pluricostata* y *Marila laxiflora*: ACTIVIDAD
VASCULAR "IN VITRO" Y ACTIVIDAD HIPOTENSIVA
AGUDA.**

POR:

JUAN ANTONIO MORÁN PINZÓN

PROFESORES ASESORES:

DRA. ESTELA GUERRERO DE LEÓN
UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

DR. JOSÉ LUIS LÓPEZ-PÉREZ
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2007



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 4:00 p.m. del día miércoles 2 de mayo del año 2007, en el Salón de Profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, se dio inicio a la sustentación de la Tesis, para optar el Título de Maestría en Ciencias Biomédicas con especialización en Farmacología, defendida por el estudiante Juan A. Morán, con cédula de identidad 4-229-137 y cuyo título es: “ESTUDIOS DE DIFERENTES EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE *MARILA PLURICOSTATA* Y *MARILA LAXIFLORA*: ACTIVIDAD VASCULAR “IN VITRO” Y ACTIVIDAD HIPOTENSIVA AGUDA.

La calificación asignada por los miembros del Jurado, es la siguiente:

	<u>Calificación</u>	<u>Firma</u>
Dra. Estela Guerrero (Presidente):	<u>99</u>	<u><i>[Signature]</i></u>
Dra. Melita Rodríguez (Miembro):	<u>97</u>	<u><i>[Signature]</i></u>
Dr. Ceferino Sánchez (Miembro):	<u>96</u>	<u><i>[Signature]</i></u>
Promedio y calificación final:	<u>97.3</u>	

Magíster Aida Moreno *Aida Luz Moreno S*
Representante de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Argentina Ying: *Argentina Ying B*
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

DEDICATORIA

Por forjar en mí una persona de bien y enseñarme el valor de la vida y las buenas acciones, dedico este trabajo a mi querida y desaparecida Mamá Eladia (Q.E.P.D.), incansable luchadora de la vida que siempre me dió lo mejor de sí pero sobretodo su amor, demostrándolo a cada momento con hechos y no con palabras...

Gracias a ese carácter fuerte y decidido, que la caracterizaba, me instruyó a valorar a las personas por lo que son, a reconocer el verdadero sentido de la amistad, a respetar a cada persona y hacerme comprender que aunque la vida no resulta ser lo que uno desea, siempre hay que luchar por salir adelante.

A pesar de los múltiples problemas de la vida, nunca se dejó abatir y encontraba fuerzas en su inquebrantable fe en Dios Todopoderoso, condición que siempre me inculcó.

A través de consejos y algunas veces regaños, te preocupaste por transmitirme esas buenas cosas, que hoy día puedo apreciar como tu mayor legado.

Aunque hoy, no estés físicamente a mi lado, sé que siempre estarás a mi lado y serás la razón por la cual nunca me daré por vencido para que estés orgullosa de mí, pues todo lo que soy, te lo debo a Ti...

Juan Antonio

AGRADECIMIENTOS

Al terminar este largo camino que culmina con la adquisición de un gran acumulo de conocimientos, destrezas, actitudes y habilidades, no me queda mas que dar el más sincero de los agradecimientos a todos aquellos que formaron parte de esta etapa de formación profesional.

En primer lugar, a la Santísima Trinidad y a la Virgen María por darme la fuerza y sabiduría necesarias para afrontar las pruebas de la vida y salir siempre adelante, a pesar de mi endeble fe. Gracias por vuestra misericordia y amor incondicional.

A todo el personal docente del Departamento de Farmacología, en especial a Leandra y Gisela por su colaboración, comprensión y apoyo durante todos estos años.

A la Dra. Melita Rodríguez, Maestra de Maestros, por todos los conocimientos brindados en el transcurso de mi experiencia como estudiante y docente, cualidades que hoy y siempre me servirán para desempeñarme como un profesional capaz dentro del área de la Farmacología.

Al Dr. Ceferino Sánchez, mi eterno agradecimiento por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo.

A mi amiga, comadre, compañera de faena, de estudios y de la vida, Ivonne, por darme siempre lo mejor de la vida, un hombro en el que apoyarme tanto en las cosas buenas como en las malas, por estar siempre a mi lado y por considerarme parte de tu familia. Mil gracias y que Dios te guarde y colme de bendiciones a tu familia.

A todo el personal administrativo del Departamento de Farmacología, en especial a René y Joe, por la ayuda desinteresada y oportuna que siempre estuvieron dispuestos a dar cada vez que lo necesite.

Al Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, España, especialmente al Dr. José Luis López-Pérez por su invaluable ayuda y amistad en la consecución de este trabajo de investigación.

Al CIFLORPAN de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Panamá y todo su personal, en particular al Dr. Mahabir P. Gupta, Dr. Dionisio Olmedo y Licdo. Alex Espinosa, por el apoyo y guía brindado durante la realización de esta investigación.

Al personal del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en especial a Lili, Bechy y Magdalena, compañeras y amigas. A las Profesoras Delia de Garrido y Oris de Calvo por la ayuda en cuanto al préstamo de equipo y bibliografía, además de las interesantes tertulias fisiológicas, sin las cuales este trabajo no se hubiese podido realizar.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en especial a la Dra. Cecilia Díaz por la disposición y gentileza que siempre la ha caracterizado y por el apoyo incondicional y palabras de aliento que siempre me brindo.

Al Dr. Azael Saldaña y Licda. Tania Gómez, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por la diligente cooperación brindada hoy y siempre.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, en particular, a la Vicerrectora Dra. Betty Ann de Catzambanis y al Prof. Luis Solís por el apoyo brindado en innumerables ocasiones.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación por el apoyo financiero, sin el cual no hubiésemos podido realizar este trabajo.

A las Dras. Astromelia García y Beatriz Ruíz Nájera, a quienes tuve la dicha de conocer durante los estudios y a quienes me unen grandes lazos de amistad. Gracias por preocuparse siempre y conserven esa calidad humana, que pocas veces solemos encontrar en el resto de las personas.

A mis amistades de toda una vida: Denissa, Ale, Rosángela, Anny, Ariadna, Zamira, Rigo, Yitzel, Nidia y Ronnel, por entender y disculpar mi distanciamiento durante épocas de estudio, por estar a mi lado, pero sobretodo por hacerme saber que siempre podré contar con ustedes y sus familias. Personas como ustedes hacen que la vida tenga sentido.

No quiero terminar, sin antes agradecer a una persona importante tanto en este trabajo como en mi vida cotidiana y profesional, a mi tutora, Dra. Estela Guerrero De León, quien con sus consejos y atinada guía me enseñó el sentido del rigor científico permitiéndome cosechar frutos de esta experiencia. Gracias por tu compañía en las buenas y malas experiencias, en esos atareados días de experimentación, en la larga faena del trabajo diario y en esos buenos cafés que juntos hemos disfrutado. Mi eterno agradecimiento porque me has permitido conocer a toda tu familia, a quienes apreció mucho, en especial a dos personas: a la Sra. Sabina y Paola, quienes desde perspectivas diferentes me recuerdan que en esta vida hay que luchar por salir adelante a pesar de todas las vicisitudes que ella involucra.

A TODOS MIL GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA

INDICE GENERAL

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3
I. Enfermedades cardiovasculares.....	4
II. Hipertensión arterial.....	7
A. Clasificación de la hipertensión arterial.....	7
1. Por etiología.....	7
2. Por valores de presión arterial.....	7
3. Por repercusión sobre órganos.....	8
B. Regulación de la presión arterial.....	8
1. Mecanismos nerviosos.....	10
2. Regulación humoral.....	12
a. Catecolaminas suprarrenal.....	12
b. Vasopresina o hormona antidiurética.....	12
c. Sistema renina angiotensina aldosterona.....	13
d. Sistema calicreina-cininas.....	15
e. Péptidos natriuréticos.....	15
3. Mecanismos locales.....	16
a. Mecanismo miogénico.....	16
b. Regulación metabólica.....	16
c. Función endotelial.....	16
C. Fisiopatología de la hipertensión arterial.....	18
1. Factores genéticos.....	18
2. Gasto cardiaco y resistencia periférica.....	19
3. Sistema nervioso periférico.....	19
4. Reactividad vascular.....	20
5. Rigidez arterial.....	20
6. Sistema renina angiotensina aldosterona.....	20
7. Disfunción endotelial.....	22
a. Óxido Nítrico.....	23
b. Estrés oxidativo.....	24
D. Otros factores de riesgo cardiovascular.....	25
E. Remodelado cardiovascular.....	26
F. Tratamiento de la hipertensión Arterial.....	29
1. Tratamiento No farmacológico.....	29
2. Tratamiento farmacológico.....	30
a. Diuréticos tiazídicos.....	32
b. Antagonistas β -adrenérgicos.....	34
c. Antagonistas de canales de calcio.....	36
d. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.....	37
e. Antagonistas del receptor de angiotensina II.....	39
G. Terapia antihipertensiva y remodelado cardiovascular.....	39

	Página
H. Terapia antihipertensiva e hipertrofia ventricular izquierda.....	40
I. Terapia antihipertensiva y disfunción vascular.....	41
J. Terapia antihipertensiva y daño renal.....	43
K. Selección del antihipertensivo.....	43
Antecedentes.....	48
I. Descripción taxonómica de la planta <i>Marila pluricostata</i>	53
II. Descripción taxonómica de la planta <i>Marila laxiflora</i>	54
III. Química de las plantas del Género <i>Marila</i>	55
Justificaciones.....	57
Objetivos.....	60
Metodología.....	62
I. Obtención de los extractos.....	63
A. Recolección e identificación del material vegetal.....	63
B. Procesamiento del material vegetal.....	63
C. Preparación de extractos.....	64
II. Obtención de fenilcumarinas.....	65
A. Productos naturales.....	65
B. Productos sintéticos.....	66
III. Estudios experimentales.....	67
A. Animales	67
B. Materiales	68
C. Reactivos.....	68
D. Procedimientos generales.....	69
E. Procedimiento experimental.....	70
1. Efecto vasodilatador de los diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> y <i>Marila pluricostata</i> y derivados fenilcumarina en presencia de contracción inducida por la FE.....	70
2. Efecto hipotensor agudo de los extractos con mayor actividad vasodilatadora de <i>Marila laxiflora</i> y <i>Marila pluricostata</i>	71
3. Estudio de los mecanismos vasodilatadores de los derivados sintéticos con mayor actividad.....	72
a. Efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en presencia de contracción inducida por KCl.....	72
b. Efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21 dependientes o independientes de la función endotelial.....	73
c. Evaluación de los posibles mecanismos endoteliales involucrados en el efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21.....	73
d. Evaluación de la participación de canales de potasio en el efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21.....	74

	Página
e. Efecto de atropina sobre la vasodilatación inducida por las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21.....	74
f. Efecto de propranolol sobre la vasodilatación inducida por las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21.....	75
g. Evaluación del efecto de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21 sobre la curva concentración respuesta a noradrenalina.....	75
F. Análisis y expresión estadística de los resultados.....	76
Resultados.....	77
1. Actividad vascular de los extractos de <i>Marila laxiflora</i> y <i>Marila pluricostata</i>	78
a. Actividad vascular del extracto de diclorometano de <i>Marila pluricostata</i> en anillos sin endotelio.....	83
2. Efecto hipotensor agudo de los extractos de las plantas del género <i>Marila</i>	85
3. Screening de la actividad vascular de diferentes productos, naturales y de síntesis, obtenidos del extracto diclorometano de <i>Marila pluricostata</i>	91
4. Descripción de los mecanismos de acción implicados en la actividad vascular de fenilcumarinas sintéticas con mejor perfil.....	105
a. Efecto vascular de FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en contracción inducida por KCl.....	105
b. Efecto vascular de FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta con endotelio desnudo.....	110
c. Dilucidación de los mecanismos implicados en el desarrollo del efecto vascular generado por FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta.....	115
d. Determinación de otros posibles mecanismos implicados en el desarrollo del efecto vascular generado por FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta dependiente de estimulación muscarínicos o beta-adrenérgicos.....	128
e. Evaluación del efecto de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21 sobre la curva concentración respuesta a noradrenalina.....	134
Discusión.....	138
Conclusiones.....	157
Bibliografía.....	160
Anexos.....	173

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro I	Clasificación de la HTA según el séptimo reporte del Joint National Committee.....	7
Cuadro II	Modificaciones en el estilo de vida para el manejo de la HTA	30
Cuadro III	Vida media y dosis antihipertensivas de algunos diuréticos tiazídicos.....	33
Cuadro IV	Dosis antihipertensivas y otras propiedades de algunos antagonistas beta-adrenérgicos.....	34
Cuadro V	Antagonistas de calcio y sus afinidades.....	36
Cuadro VI	Clasificación, vida media y dosis antihipertensivas de algunos IECAs.	37
Cuadro VII	Vida media, dosis antihipertensivas de algunos ARA-II.....	39
Cuadro VIII	Lineamientos para el uso de las diferentes clases farmacológicas en HTA de acuerdo a indicaciones precisas.....	45
Cuadro IX	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidos de las curvas concentración-respuesta de diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> realizadas en aortas de ratas Sprague Dawley.	79
Cuadro X	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidos de las curvas concentración-respuesta de diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> realizadas en aortas de ratas Sprague Dawley.....	81
Cuadro XI	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidos de las curva concentración-respuesta del extracto diclorometado de las hojas de <i>Marila pluricostata</i> realizadas en aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) y sin endotelio (E^-).....	83
Cuadro XII	Efectos sobre la presión arterial media producidos por la administración I.P., de los diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> en ratas SHR.....	86
Cuadro XIII	Efectos sobre la frecuencia cardiaca producidos por la administración I.P. aguda, de los diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> en ratas SHR.....	87
Cuadro XIV	Efectos sobre la presión arterial media de la administración I.P., de los diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> en ratas SHR y WKY.....	89
Cuadro XV	Efectos sobre la frecuencia cardiaca de la administración I.P., de los diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> en ratas SHR y WKY.....	90

	Página
Cuadro XVI	Estructuras y pesos moleculares (PM) de las fenilcumarinas de origen natural (FC)..... 92
Cuadro XVII	Estructuras y pesos moleculares (PM) de las fenilcumarinas de síntesis (FCS)..... 93
Cuadro XVIII	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas de las curvas concentración-respuesta de fenilcumarinas naturales aisladas de <i>Marila pluricostata</i> en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio, precontraídas con FE 1×10^{-6} M..... 95
Cuadro XIX	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas de las curvas concentración-respuesta de fenilcumarinas sintéticas en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio, precontraídas con FE 1×10^{-6} M..... 100
Cuadro XX	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de fenilcumarinas sintéticas en anillos de aorta con endotelio, precontraídas con FE 1×10^{-6} M o con 80 mM KCl. 106
Cuadro XXI	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de fenilcumarinas sintéticas en anillos de aorta con endotelio presente (E^+) y desnudo (E^-) contraídos con FE 1×10^{-6} M. 111
Cuadro XXII	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-15 en anillos de aorta con endotelio e incubados con L-NAME, Indometacina o Azul de metileno precontraídos con FE 1×10^{-6} M..... 116
Cuadro XXIII	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-18 en anillos de aorta con endotelio e incubados con L-NAME Indometacina o Azul de metileno precontraídos con FE 1×10^{-6} M. 118

		Página
Cuadro XXIV	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-21 en anillos de aorta con endotelio e incubados con L-NAME, Indometacina o Azul de metileno precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	120
Cuadro XXV	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-15 en anillos de aorta con endotelio e incubados con glibenclamida o tetraetilamonio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	122
Cuadro XXVI	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-18 en anillos de aorta con endotelio e incubados con glibenclamida o tetraetilamonio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	124
Cuadro XXVII	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-21 en anillos de aorta con endotelio e incubados con glibenclamida o tetraetilamonio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	126
Cuadro XXVIII	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-15 en anillos de aorta con endotelio e incubados con atropina o propranolol precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	128
Cuadro XXIX	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-18 en anillos de aorta con endotelio e incubados con atropina o propranolol precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	130
Cuadro XXX	Valores máximos de relajación (E_{MAX}) y de concentración eficaz 50 (CE_{50}) obtenidas a partir de las curvas concentración-respuesta de la fenilcumarina sintética FCS-21 en anillos de aorta con endotelio e incubados con atropina o propranolol precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	132

	Página
Cuadro XXXI Valores máximos de contracción (E_{MAX}) obtenidas a partir de la curva concentración-respuesta a NA en presencia de 1×10^{-4} M de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta con endotelio.	134

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Defunciones relacionadas con ECV en la República de Panamá para el año 2005.....	6
Figura 2	Factores relacionados con la regulación de la PA.....	10
Figura 3	Interrelación entre el SNS y el SRAA en la fisiopatología de la HTA.....	21
Figura 4	Curvas concentración-respuesta obtenidas con diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	80
Figura 5	Curvas concentración-respuesta obtenidas con diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	82
Figura 6	Curvas concentración-respuesta obtenidas con el extracto diclorometano de <i>Marila pluricostata</i> y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) y sin endotelio (E ⁻), precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	84
Figura 7	Variación de la presión arterial media (PAM) (mm Hg) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> , SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).....	86
Figura 8	Variación de la frecuencia cardiaca (FC) (ppm) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de <i>Marila laxiflora</i> , SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).	87
Figura 9	Variación de la presión arterial media (PAM) (mm Hg) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> , SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).	89
Figura 10	Variación de la frecuencia cardiaca (FC) (ppm) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de <i>Marila pluricostata</i> , SHR tratadas con el vehículo (TWEEN) y ratas normotensas (WKY).	90
Figura 11	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-1a, FC-15 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	96

	Página	
Figura 12	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-4, FC-16.y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	97
Figura 13	Curva concentración-respuesta obtenida con la fenilcumarina natural FC- 12/13 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	98
Figura 14	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-1, FC-3, FC-11 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	99
Figura 15	Curva concentración-respuesta obtenida con la fenilcumarina de síntesis FCS-38 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	101
Figura 16	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-11, FCS-12, FCS-53 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	102
Figura 17	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-17, FCS-45 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.	103
Figura 18	Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-15, FCS-18, FCS-21, FCS-54, FCS-81 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	104
Figura 19	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 y y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.....	107
Figura 20	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.....	108

	Página	
Figura 21	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.	109
Figura 22	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente(E^+) o denudado (E^-) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	112
Figura 23	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente(E^+) o denudado (E^-) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	113
Figura 24	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente (E^+) o denudado (E^-) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	114
Figura 25	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	117
Figura 26	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	119
Figura 27	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	121
Figura 28	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1×10^{-6} M.....	123
Figura 29	Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-15 en anillos con endotelio sin incubar (E^+), incubados con glibenclamida (Gli) e incubados con tetraetilamonio (TEA).	123

	Página	
Figura 30	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1x10 ⁻⁶ M.....	125
Figura 31	Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-18 en anillos con endotelio sin incubar (E ⁺), incubados con glibenclamida (Gli) o incubados con tetraetilamonio (TEA).	125
Figura 32	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1x10 ⁻⁶ M.	127
Figura 33	Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-21 en anillos con endotelio sin incubar (E ⁺), incubados con glibenclamida (Gli) e incubados con tetraetilamonio (TEA).	127
Figura 34	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1x10 ⁻⁶ M.	129
Figura 35	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1x10 ⁻⁶ M.	131
Figura 36	Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E ⁺) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1x10 ⁻⁶ M.	133
Figura 37	Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.....	135
Figura 38	Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.....	136
Figura 39	Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-21 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.....	137
Figura 40	Fotografía de la planta <i>Marila laxiflora</i>	174
Figura 41	Fotografía de la planta <i>Marila pluricostata</i>	175

	Página
Figura 42 Registro original de la respuesta a acetilcolina en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.....	176
Figura 43 Registro original de la respuesta a acetilcolina en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley sin endotelio.....	176
Figura 44 Registro original de la respuesta relajante de la fenilcumarina sintética FCS-15 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.....	177

ABREVIATURAS

ECV:	Enfermedades cardiovasculares
HTA:	Hipertensión arterial
IC:	Insuficiencia cardiaca
PAD:	Presión arterial diastólica
PAM:	Presión arterial media
PA:	Presión arterial
GC:	Gasto cardiaco
RVP:	Resistencia vascular periférica
SNC:	Sistema nervioso central
NTS:	Núcleo del tracto solitario
FC:	Frecuencia cardiaca
α_1 :	Receptores alfa ₁
α_2 :	Receptores alfa ₂
β_2 :	Receptores beta ₂
SRAA:	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
ANG-I:	Angiotensina I
ANG-II:	Angiotensina II
PNA:	Péptido natriurético auricular
PNB:	Péptido natriurético cerebral
PNC:	Péptido natriurético C
O ₂ :	Oxígeno
CO ₂ :	Dióxido de carbono
ROS:	Especies reactivas derivadas de O ₂
O ₂ ^{•-} :	Radical superóxido
OH [•] :	Radical hidroxilo
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogeno
NO:	Óxido nítrico
PGI ₂ :	Prostaglandina I ₂
EDHF:	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
ET-1:	Endotelina
ADH:	Vasopresina
LTs:	Leucotrienos
PGH ₂ :	Prostaglandina H ₂
TXA ₂ :	Tromboxano A ₂
CE:	Células endoteliales
SNS:	Sistema nervioso simpático
PS:	Presión arterial sistólica
ENaC:	Canal epitelial de sodio
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial
BH ₄ :	Tetrabiopterina
ADMA:	Dimetil arginina asimétrica
DDAH:	Dimetilarginina dimetilamino hidrolasa
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
HV:	Hipertrofia ventricular

AA:	Antagonistas alfa-adrenérgicos
ABs:	Antagonistas beta-adrenérgicos
IECAs:	Inhibidores de la enzima convertidora de ANG
ACC:	Antagonistas de canales de calcio
ARAs:	Antagonistas del receptor de ANG-II
TGF:	Tasa de filtración glomerular
CML:	Células musculares lisas
AINEs:	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
DHP:	Dihidropirimidinas
HVI:	Hipertrofia ventricular izquierda
DE:	Disfunción endotelial
VII-JNC:	Séptimo Reporte del Joint Nacional Committee
ESH/ESC:	European Society of Hipertensión/European Society of Cardiology
FC:	Fenilcumarinas naturales
FCS:	Fenilcumarinas sintéticas
H-CHCl ₃ :	Extracto clorofórmico de las hojas de <i>Marila laxiflora</i>
H-MeOH:	Extracto metanólico de las hojas de <i>Marila laxiflora</i>
R-MeOH:	Extracto metanólico de las ramas de <i>Marila pluricostata</i>
H-CH ₂ Cl ₂ :	Extracto diclorometano de las hojas de <i>Marila pluricostata</i>
Dimetilsulfóxido:	DMSO
ACh:	Acetilcolina
SHR:	Ratas espontáneamente hipertensas
WKY:	Ratas normotensas Wistar Kyoto
CE ₅₀ :	Concentración eficaz 50
E _{MAX} :	Eficacia máxima
FE:	Fenilefrina
NA:	Noradrenalina
KCl:	Cloruro de Potasio
L-NAME:	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
INDO:	Indometacina
AM:	Azul de metileno
Gli:	Glibenclamida
TEA:	Tetraetilamonio
PROP:	Propranolol
ATROP:	Atropina
GCs:	Guanilato ciclasa soluble
PKG:	Proteína cinasa G
PKC:	Proteína cinasa C
PLC:	Fosfolipasa C
IP ₃ :	Trifosfato de inositol
DAG:	Diacilglicerol

RESUMEN

ESTUDIOS DE DIFERENTES EXTRACTOS Y COMPUESTOS DE *Marila pluricostata* y *Marila laxiflora*: ACTIVIDAD VASCULAR "IN VITRO" Y ACTIVIDAD HIPOTENSIVA AGUDA.

Nuestra biodiversidad ha sido poco estudiada, razón por la que, utilizando el método de Bioprospección, evaluamos las acciones vasculares de diferentes extractos provenientes de dos plantas del género *Marila* empleando anillos de aorta aislada de rata precontraídos con fenilefrina. Los extractos clorofórmico hojas y metanólico ramas de *Marila laxiflora*, al igual que metanólico ramas y diclorometano hojas de *Marila pluricostata* exhibieron un efecto vasodilator significativo comparados con el vehículo dimetilsulfóxido. En ensayos "in vivo" en ratas espontáneas hipertensas, estos extractos no mostraron un efecto hipotensivo agudo que fuese coherente con sus acciones vasculares. Contando con 8 compuestos puros naturales (FC) aislados de *Marila pluricostata* y 11 derivados sintéticos (FCS) fenilcumarinas, evaluamos su actividad vascular, encontrando que los compuestos con mejor perfil de actividad eran las 4-fenilcumarinas sintéticas, ya que los compuestos naturales parecen lesionar directamente el músculo liso y los derivados sintéticos presentan respuestas variables. Bajo esta perspectiva, seleccionamos tres derivados 4-fenilcumarinas: FCS-15, FCS-18 y FCS-21 para dilucidar su mecanismo de acción, utilizando diversos protocolos experimentales. De estos resultados observamos que la acción relajante de FCS-18 y FCS-21 es en parte dependiente del endotelio pues la remoción del endotelio reduce las acciones vasculares, no así las de FCS-15. Otros ensayos incubando los anillos con el inhibidor de óxido nítrico sintasa, L-NAME, o con azul de metileno que bloquea a la guanilato ciclasa, confirman estos datos. La implicación de prostaciclina fue descartada incubando con indometacina. La inhibición de canales de potasio (dependientes de ATP o de calcio) no parece mediar la vasodilatación por las 4-fenilcumarinas, hecho que se confirma porque ante contracciones con KCl, los productos disminuyen su eficacia vasodilatadora. El bloqueo con atropina reduce la acción de FCS-18 únicamente, mientras que propranolol no afecta ningún compuesto. En otros ensayos todos los productos inhibieron la curva concentración respuesta a noradrenalina de manera no competitiva. Nuestros resultados indican que los mecanismos del efecto relajante de las 4-fenilcumarinas parecen ser múltiples incluyendo acciones dependientes de endotelio y mecanismos que interfieren con la disponibilidad del calcio en el músculo liso.

SUMMARY

STUDY OF DIFFERENT EXTRACT AND COMPOUNDS FROM *Marila pluricostata* AND *Marila laxiflora*: "IN VITRO" VASCULAR REACTIVITY AND HYPOTENSIVE EFFECT.

Panamanian biodiversity has not been studied completely. Using the Bioprospecting method, we have selected different extracts from plants belonging to the *Marila* genus to evaluate their vascular effects on aortic rings pre-contracted by phenylephrine. Chloroformic extract of leaves and methanolic extract of branches obtained from *Marila laxiflora*, such as the methanolic extract of branches and dichloromethanic of leaves from *Marila pluricostata* showed a significant vasorelaxant response compare with the vehicle. In spontaneous hypertensive rats all extracts showed no acute hypotensive effect that could not be related with their vascular actions.

Eight isolated natural compounds from *Marila pluricostata* and eleven synthetic phenylcoumarins derivatives were used to evaluate and describe their vascular profile. The most interesting effect was observed with 4-phenylcoumarins because the natural compounds exhibited a cytotoxic effect, and other synthetic compounds showed variable responses.

In this way, three derivatives 4-phenylcoumarins: FCS-15, FCS-18 and FCS-21 were selected to assess their mechanism of action using different protocols.

We observed that the relaxing effects of FCS-18 and FCS-21 were endothelium-depend because in denuded aortic rings their response was decreased, however this response was not showed by FCS-15. Other experiments, pretreatment with L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase or methylene blue, an inhibitor of guanilate ciclase, confirm these results. The participation of prostacyclin in vascular effect was discarded by pretreatment with indometacin. Besides, inhibition of potassium channels (ATP dependent and calcium dependent) are not involved on vascular effect, this fact was corroborated when vasorelaxant effect of 4-phenylcoumarins was reduced in aortic rings pre-contracted with KCl.

The membrane receptor antagonist atropine modified vascular effect of FCS-18 only, while experiments with propranolol were unchanged. In other set of assays, all products inhibited curve concentration response to noradrenaline in a non-competitive way. Our results suggest that relaxing effect of 4-phenylcoumarins might therefore be multiple, including endothelium dependence and a mechanism which interfere with calcium disposition into smooth muscle cells.

INTRODUCCIÓN

I. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen hoy por hoy, uno de los principales problemas de la salud pública a nivel mundial y sobretodo en los países desarrollados. Esta realidad ha sido manifestada por diversas organizaciones internacionales, como la organización Mundial de Salud, quien para el año 2002, destacó la importancia de tomar medidas para la prevención de los riesgos atribuibles a enfermedades cardiovasculares y realiza recomendaciones a los gobiernos sobre las posibles estrategias a seguir para evitar resultados adversos a estas enfermedades. (World Health Organization. World Health Report 2002)

Son muchos los factores que intervienen en el desarrollo de las ECV, muchos de los cuales involucran factores intrínsecos como el sexo, raza, predisposición genética, entre otras; sin embargo, los factores externos o ambientales desempeñan un papel importante y constituyen un factor de riesgo modificable. Dentro de estos factores podemos mencionar el consumo de alcohol, cigarrillo, incremento en la automatización del trabajo en los hogares con aumento del sedentarismo y una dieta inadecuada consistiendo principalmente de grasas saturadas y carbohidratos refinados y cuya importancia en el desarrollo de ECV está claramente definida. (Ignarro et al, 2006) Estas observaciones fueron derivadas del estudio Framingham que indica que el riesgo atribuido al estilo de vida está relacionado con el desarrollo de hipertensión arterial (HTA). (Vasan et al., 2002)

Muchos de estos factores inicialmente se consideraron ventajosos, pues la industrialización permitió un mejoramiento de la salud, en el contexto

general, aumentando las expectativas de vida en relación a décadas anteriores, sin embargo trajo consigo la prevalencia y desarrollo de enfermedades crónicas. (Yusuf et al, 2001)

Uno de las principales detonantes de esta situación, ha sido la migración poblacional hacia las capitales de las ciudades, fenómeno que no es exclusivo de los países desarrollados, sino que es una tendencia mundial, lo que ha llevado a incrementos sustanciales de estas enfermedades en países en vías de desarrollo como en el este de Europa y América Latina, entre otros. Aparte que estas patologías son una de las principales causas de muerte en el mundo, cabe señalar que también son las responsables de las discapacidades consecuentes a ellas, señalándose que los países en desarrollo, muestran un mayor nivel de riesgo al presentar, según proyecciones un incremento de la mortalidad relacionada con ECV de 9 millones en 1990 a 19 millones para el año 2020. (Reddy, 2004) Dentro de estos países, es importante destacar que los gobiernos y la población general deben trabajar coordinadamente para unir sus esfuerzos en la prevención y manejo del levantamiento epidémico que sufren las ECV en sus países. (Yusuf, S. et al, 2004)

La realidad en nuestro país, no escapa del contexto de los otros países en vías de desarrollo, observándose una alta tasa de mortalidad relacionada con ECV para el año 2005, tal como se presenta en la **Figura 1** (Contraloría General de la República)

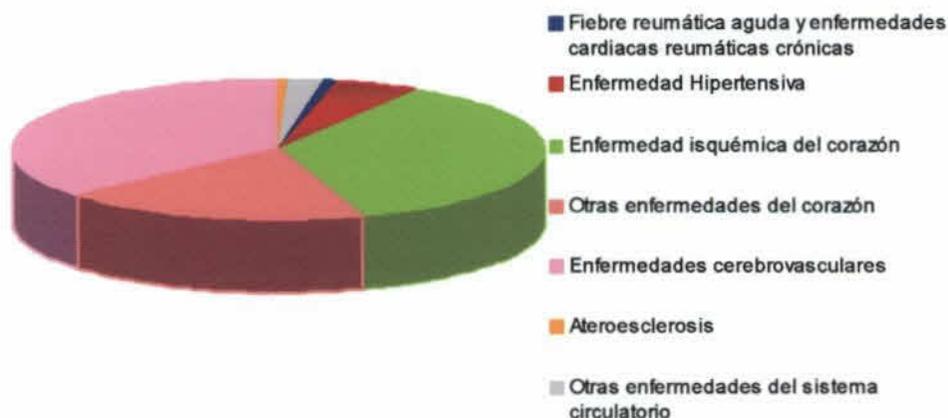


Fig. 1. Defunciones relacionadas con ECV en la República de Panamá para el año 2005. Fuente: Contraloría General de la República.

La gran cantidad de estudios epidemiológicos realizados alrededor del mundo ha demostrado claramente que ciertas patologías preexistentes en el individuo como lo son la diabetes y la obesidad, constituyen otro factor que predispone a los efectos deletéreos de las ECV. En este mismo sentido, está ampliamente descrito en la literatura que algunas patologías cardiovasculares constituyen un factor de riesgo adicional que incide sobre el riesgo general asociado a las ECV, razón por la cual es importante identificarlas y darle un tratamiento adecuado. Dentro de estas patologías destacan los desórdenes de los lípidos plasmáticos y la hipertensión arterial (Kannel et al., 2004); siendo la hipertensión arterial la más importante, no solo por su alta prevalencia en los países industrializados, sino por la fuerte y estrecha relación que existe entre su desarrollo y el riesgo incrementado de accidentes

cerebrovasculares, infartos cardiacos, insuficiencia cardiaca (IC) y daño renal. (Nabel, 2003)

La presión arterial (PA) es una variable fisiológica cuantitativa que presenta una variabilidad marcada en la población general, sin embargo el aumento en los valores de PA son determinantes directos que favorecen el desarrollo de otras ECV. (Carretero et al, Part I, 2000)

II. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

A. CLASIFICACIÓN DE LA HTA

Existen diferentes criterios para la clasificación de la HTA como se mencionan a continuación:

1. Por etiología (Cotran et al, 2000)

- a. Primaria, esencial o idiopática: corresponde a alrededor del 90 al 95 % de los pacientes hipertensos, y su causa es desconocida.
- b. Secundaria: correspondiente del 5 al 10% de los casos. Entre sus causas se mencionan: neuropatías, estenosis de la arterial renal, feocromocitoma, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario, coartación de la aorta, estrés agudo, embarazo, entre otras.

2. Por valores de PA (Chobanian et al. JNC Report, 2003)

Cuadro I. CLASIFICACIÓN DE LA HTA SEGÚN EL SÉPTIMO REPORTE DEL JOINT NACIONAL COMMITTE

Clasificación	Presión sistólica (mm Hg)	Presión diastólica (mm Hg)
Normal	< 120	< 80
Prehipertenso	120-139	80-89
Hipertensión estado 1	140-159	90-99
Hipertensión estado 2	≥ 160	≥ 100

3. Por la repercusión sobre órganos blancos

- a. Estadío I. Sin signos aparentes de repercusión orgánica
- b. Estadío II. Debe estar presente alguno de los siguientes signos:
 - Hipertrofia ventricular izquierda
 - Retinopatía grado II
 - Proteinuria y/o aumento de creatinina plasmática
- c. Estadío III. Aparecen signos y síntomas de daño en órganos:
 - Insuficiencia cardíaca o coronaria
 - Encefalopatía
 - Accidente cerebrovascular
 - Hemorragia retiniana con o sin papiledema
 - Insuficiencia renal manifiesta

B. REGULACIÓN DE LA PA

Como cualquier parámetro biológico, la PA es regulada por diversos mecanismos cuyo objetivo es permitir el flujo sanguíneo adecuado para el metabolismo celular de los tejidos. El control de la PA involucra que los mecanismos participantes en su regulación ejerzan acciones sobre sus dos principales determinantes hemodinámicas: el gasto cardíaco (GC) y la resistencia vascular periférica (RVP), tal y como se define en la ecuación de Pouseuille:

$$PA = GC \times RVP$$

Es importante denotar que aun cuando la PA esta simplificada en la ecuación anterior, existen variables fisiológicas que modifican cada uno de los

parámetros descritos. En este sentido, el GC depende de la frecuencia cardiaca y del volumen de expulsión, y a su vez, este último está determinado por otros factores como lo son la precarga, contractilidad y la poscarga.

Por otro lado, la RVP es directamente proporcional a la longitud del tubo (vasos sanguíneos) y viscosidad del líquido; e inversamente proporcional al radio del tubo elevado a la cuarta potencia. En condiciones normales, la longitud del aparato circulatorio y la viscosidad de la sangre no suelen modificarse, sin embargo, el calibre o radio de los vasos puede cambiar con rapidez, convirtiendo este factor en el determinante principal de la RVP, y que tiene una mayor importancia en las arteriolas. (Houssai, 2001)

En la regulación de la PA intervienen mecanismos de control que pueden agruparse como nerviosos, humorales y locales. (**Figura 2**)

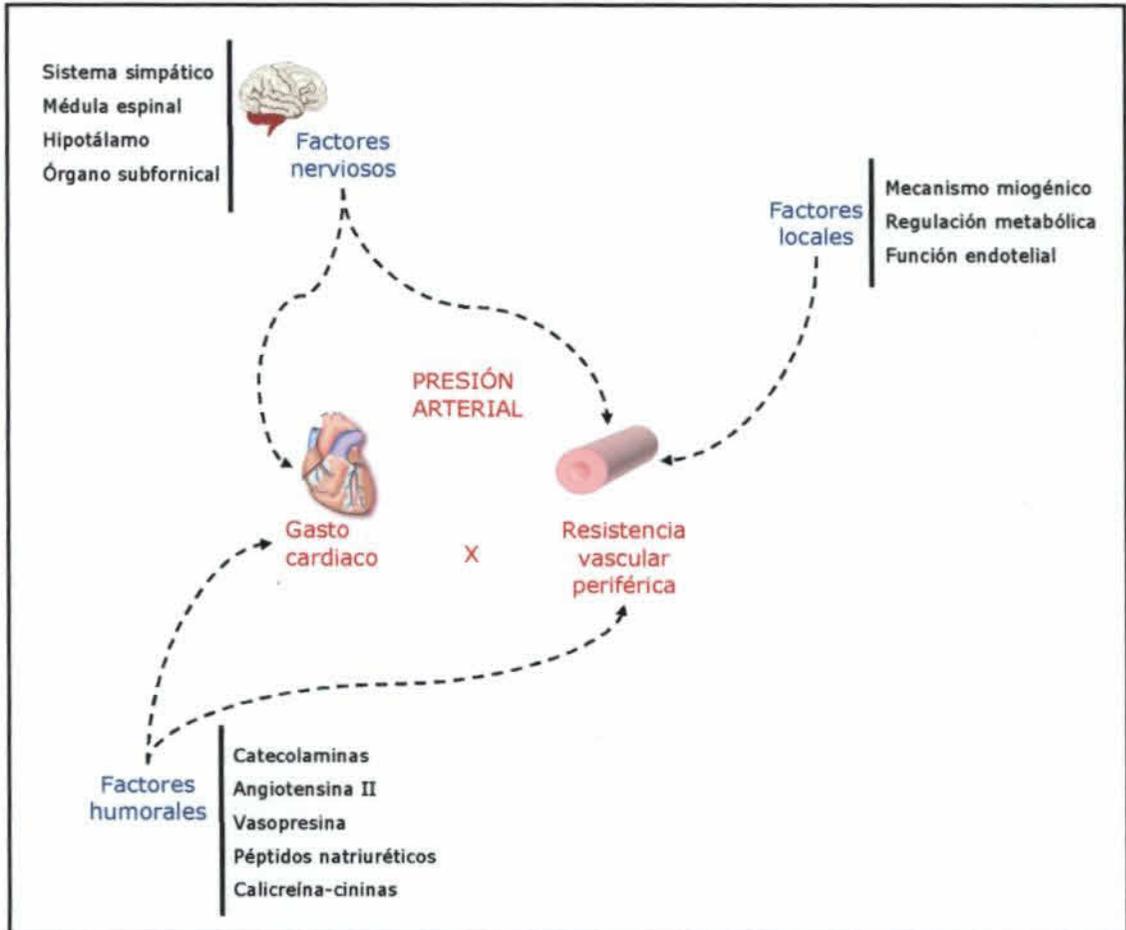


Fig. 2. Factores relacionados con la regulación de la PA.

La PA puede estar regulada por diferentes mecanismos:

1. Mecanismos nerviosos:

Diversas estructuras del sistema nervioso central (SNC) han sido vinculadas con la regulación de la PA, entre las que se mencionan: la corteza cerebral, el hipotálamo, el bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal. (Houssai op. cit.)

Sin embargo, algunas de ellas participan de manera más activa que otras en el mecanismo del reflejo barorreceptor, el cual se considera el principal mecanismo para regular la PA de manera rápida.

Este reflejo constituye básicamente un acto reflejo clásico y posee la particularidad de permanecer activo durante los cambios de PA que se presentan durante cada ciclo cardiaco. (Guyton y May, 2001)

Los barorreceptores son receptores de estiramientos localizados en vasos sanguíneos (seno carotídeo y cayado aórtico), que sensan los cambios de presión, alterando consecuentemente su frecuencia de descarga y que es una función limitada, que tiene su máximo desde valores normales de PA hasta 160 mm Hg, y un mínimo a presiones por debajo de 60 mm Hg.

Por esta razón, al elevarse la PA se determina una inhibición del sistema simpático (generando vasodilatación y menor contractilidad cardiaca) y estimulación del sistema parasimpático con el aumento de la descarga vagal en el tejido cardiaco; y en caso contrario, al manifestarse una disminución de la PA, decrecen las aferencias hacia el centro integrador, se desinhibe el simpático y se inhibe el parasimpático. (Boron et al, 2003)

Toda la información es procesada en el núcleo del tracto solitario (NTS) ubicado en el bulbo raquídeo, y es este núcleo la estructura que posee eferencias tanto parasimpáticas como simpáticas.

Es importante denotar que la respuesta final de los barorreceptores depende de la inervación que el sistema nervioso periférico ejerce sobre los órganos que determinan la PA: el corazón y los vasos sanguíneos.

En el corazón los estímulos simpáticos aumentan la frecuencia cardiaca (FC) y la fuerza de contracción, mientras que la actividad del parasimpático en este órgano produce un efecto que conduce a bradicardia. (Ganong, 2005)

2. Regulación humoral

Se comprenden por sustancias humorales aquellas que son liberadas al torrente sanguíneo una vez sintetizadas y que ejercen sus acciones en órganos blancos distantes. Entre este grupo existe un gran número de hormonas que afectan el sistema cardiovascular y que participan en la regulación de la PA:

a. Catecolaminas suprarrenales

La médula suprarrenal, se comporta como un ganglio que posee inervación simpática, y que durante su estimulación libera al torrente sanguíneo adrenalina (80%) y noradrenalina (20%). Las acciones vasoconstrictoras de ambas sustancias están mediadas por la estimulación de receptores adrenérgicos del subtipo alfa₁ (α_1) y alfa₂ (α_2). Sin embargo, la adrenalina posee una mayor afinidad por los receptores beta₂ (β_2), pero este efecto se manifiesta a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones el efecto α_1 enmascara y rebasa esta acción. En el corazón las catecolaminas aumentan la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca. (Ganong op. cit., Boron op. cit.)

b. Vasopresina o ADH

Esta hormona es sintetizada en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico, desde donde se libera y ejerce acciones vasoconstrictoras arteriolar y venosa, además de regular el balance hídrico al aumentar la reabsorción de agua libre de sales en los tubulos distales y colectores. Por estas acciones se entiende su

participación como factor regulador de la PA tanto en condiciones basales, y en condiciones patológicas donde exista depleción de volumen como en las hemorragias. (Houssai op. cit)

c. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA):

Su relevancia fue destacada luego de que el grupo de Globatt, demostraron que la constricción de la arteria renal generaba hipertensión en perros. (Bruton et al., 2006)

En la década de los cuarenta en Argentina, Braun-Menéndez y su grupo de investigación, al mismo tiempo que Page y Lamer, en Estados Unidos, informaron que la renina, sustancia que había sido propuesta como hipertensora, no era vasopresora "per se", si no que actuaba sobre un sustrato que era realmente el responsable de la actividad contráctil. Ambos grupos denominaron con nombres diferentes a la misma sustancia: angiotonina e hipertensina, respectivamente. Luego de más de veinte años acordaron denominarla angiotensina. (De La Serna, 2003; Bruton op. cit.; Houssai op. cit)

Este sistema, ampliamente descrito, está formado por la renina, una enzima producida en las células yuxtaglomerulares del riñón, cuyo sustrato específico es una alfa globulina hepática denominada angiotensinógeno y que es convertida en angiotensina I (ANG-I), que carece de propiedades biológicas. Este péptido de 10 residuos de aminoácidos a su paso por el endotelio de los pulmones es convertido a Angiotensina II (ANG-II) por acción de la enzima denominada enzima convertidora de angiotensina (ECA) o peptidilcarboxipeptidasa,

convirtiéndose en el principal mediador de este sistema. En diferentes tejidos existen todos los componentes del SRAA, pero también se pueden encontrar enzimas diferentes a la ECA como la quimasa, tonina, catepsina y la enzima generadora de ANG-II sensible a quimostatina o CAGE que convierten ANG-I a ANG-II. (Murray et al, 2002)

Las acciones de ANG-II son variadas y comprenden una gama de efectos que elevan la PA por mecanismos inmediatos y otros a más largo plazo. Entre las acciones rápidas podemos mencionar: el efecto vasoconstrictor directo, aumento de la neurotransmisión noradrenérgica aumentando la liberación de NA e inhibiendo su recaptura, incremento de la descarga simpática en el SNC y liberación de catecolaminas de la médula adrenal. Los mecanismos a largo plazo involucran la alteración de la función renal como: el aumento en la reabsorción de sodio en el túbulo proximal (efecto directo), liberación de aldosterona de la corteza adrenal con el aumento consecuente en la reabsorción de sodio y agua, incremento de la excreción de potasio, vasoconstricción en la arteriola aferente renal y aumento del tono simpático en el riñón. (Bruton op. cit)

Gran parte de estos efectos de ANG-II son mediados por la activación de los receptores AT₁, que se encuentran ampliamente distribuidos en órganos como corazón, vasos sanguíneos, riñón, médula adrenal, cerebro y sistema reproductor, entre otros. (De Gasparo et al, 2000)

d. Sistema de Calicreína-cininas

En el organismo, las calicreínas tanto tisular como plasmática ejercen sus acciones proteolíticas sobre el sustrato cininógeno, produciendo calidina y bradicinina, respectivamente. Estas cininas son potentes relajantes del músculo liso vascular y bronquial y poseen efectos natriuréticos por reducir la resistencia papilar en el riñón. Todos estos efectos en el humano se deben en mayor parte a estímulo de receptores para bradicininas denominado B_2 . Estas sustancias poseen una vida media muy corta pues son degradadas por aminopeptidasas y carboxipeptidasas, destacando la Cininasa II que además convierte ANG-I en ANG-II. (Sharma, 2005)

e. Péptidos natriuréticos

Comprenden una familia de polipéptidos formada por el péptido natriurético auricular (PNA), el péptido natriurético cerebral (PNB) y el péptido natriurético C (PNC); que están involucrados en la regulación cardiovascular. Los dos primeros son sintetizados y liberados por los cardiomiocitos, mientras que el tipo C, es sintetizado principalmente en el cerebro y endotelio vascular. Entre las funciones que poseen estas sustancias se denotan vasodilatación, efecto natriurético, inhibición del SRAA, inhibición del sistema simpático, inhibición de la síntesis y liberación de endotelina (ET-1) e inhibición de la liberación de ADH. (De La Serna, 2003; Houssai op.cit.)

3. Mecanismos locales

Se refiere a la capacidad que poseen los vasos sanguíneos para autoregular el flujo de sangre a través de la modulación del tono vascular por mecanismos intrínsecos, independientemente de factores hormonales y de la influencia del SNC.

Algunos de los mecanismos propuestos son:

a. Mecanismo miogénico

Basado en la propiedad del músculo liso vascular para contraerse por estiramiento y relajarse al disminuir la tensión a la que está sometido. Esta propiedad es independiente de la existencia de endotelio.

b. Regulación Metabólica

Está relacionada con la relación oferta/demanda tisular de oxígeno (O_2), ya que si existe una insuficiencia en el aporte de O_2 , se producen sustancias vasodilatadoras entre las que se postulan: dióxido de carbono (CO_2), ácido láctico e iones hidrógeno. Sin embargo se ha acumulado información más reciente que denota la presencia de especies reactivas derivadas de O_2 (ROS) como los aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (OH^{\bullet}) que poseen propiedades vasoconstrictoras y la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que produce vasodilatación, razón por la cual estas sustancias pueden desempeñar un papel importante en la autorregulación. (Vanhoutte, 2001)

c. Función endotelial

El endotelio vascular ha sido considerado como una capa de tejido especializado cuya función básica es evitar el contacto de la sangre con

el músculo liso vascular, sin embargo, otras muchas funciones le han sido adjudicadas; por lo que se ha considerado un órgano importante en la homeostasis corporal así como también en la regulación de la PA. Para regular la PA, el endotelio produce, en respuesta a diversos tipos de estímulos mecánicos (fuerza de cizalla) o químicos (neurotransmisores u hormonas), una serie de sustancias que contraen o relajan el músculo liso vascular. Esta función se realiza de manera tónica y dinámica, razón por la cual su adecuado funcionamiento está relacionado con el desarrollo de ECV. (Galley y Webster, 2004)

Existen tres sustancias vasodilatorias sintetizadas en el endotelio: el óxido nítrico (NO), la prostaglandina I₂ (PGI₂), H₂O₂ y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). De estas sustancias la más estudiada es el NO, debido a que además de sus funciones vasodilatadoras, se destacan su actividad antiagregante plaquetaria y antiinflamatoria.

Por otro lado, el endotelio también produce y libera sustancias vasoconstrictoras, entre ellas están la ET-1, leucotrienos (LTs), prostaglandina H₂ (PGH₂), superóxido, tromboxano A₂ (TXA₂) y ANG-II. De todas estas sustancias una de las más importantes es la ET-1, pues el vasoconstrictor liberado por células endoteliales (CE) más potente que existe. (De La Serna, op. cit.; Houssai op.cit.; Boron op. cit.)

C. FISIOPATOLOGÍA DE LA HTA

La HTA parece manifestarse cuando se presentan cambios que alteran la relación entre el volumen de sangre y la RVP; siendo estos cambios bien definidos en la HTA secundaria pero no así en la HTA esencial.

Debido a la amplia gama de factores fisiológicos que regulan a la PA, es lógico comprender que la alteración de estos mecanismos puede tener un papel importante en el desarrollo de esta patología.

1. Factores Genéticos

En años recientes el interés sobre la fisiopatología de la HTA se ha enfocado en la genética, tratando de encontrar el o los posibles genes responsables del desarrollo de esta enfermedad. Innumerables estudios realizados no han sido concluyentes ya que es común encontrar hipertensión en hijos de pacientes hipertensos pero no así en individuos adoptados. La información más reciente señala la existencia de múltiples genes en la población, los cuales han sido difíciles de identificar con precisión. Las mutaciones de varios genes pueden estar relacionadas con el desarrollo de HTA esencial como lo son: mutaciones en el gen del angiotensinógeno, el gen de la ECA y el gen de α -aducina, entre otros. (Beevers, 2001; Barlassina, 2002)

A pesar de los avances realizados en la genética molecular, la posibilidad de describir de manera exacta los genes responsables de la HTA son un dilema. Este problema reside en parte, a la posibilidad de polimorfismos existentes en la población y debido a la complejidad de la patología, además de que debe considerarse todos los aspectos ambientales que pueden de una u otra

manera afectar la expresión fenotípica de la información genética. (Lifton, 2001; Harrap, 2003)

2. Gasto cardiaco y resistencia periférica

El balance entre estos dos parámetros fisiológicos determina la PA, razón por la cual cambios en la relación pueden producir HTA. En la mayoría de los pacientes hipertensos se encuentra un GC normal con elevación de la RVP, sin embargo se ha postulado que en la HTA temprana se produce un aumento del GC como consecuencia de la estimulación del sistema nervioso simpático y que el aumento en la RVP es una respuesta compensatoria para evitar que la presión incrementada pase a los capilares. (Beevers op. cit.)

3. Sistema Nervioso Simpático

Debido a la importancia que posee el sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación de la PA, sobretudo ante situaciones particulares (estrés y ejercicio físico), es lógico comprender su implicación en la fisiopatología de la HTA. La sobre estimulación de este sistema puede producir hipertensión al estimular el corazón, los vasos sanguíneos y el riñón, produciendo consecuentemente aumento de las RVP, incrementando el GC y aumento de la retención de fluidos, además de otros cambios metabólicos que incrementan el riesgo cardiovascular. (Beevers op. cit; Oparil et al., 2003)

La importancia de los cambios en la FC ha sido descrita en estudios poblaciones mostrando una relación directa entre la FC y el desarrollo de HTA. (Kim et al, 1999; Grassi, 2004)

Los mecanismos que producen el aumento de la actividad simpática son complejos y parecen involucrar una mezcla de reflejo barorreceptor y

quimiorreceptor tanto a nivel periférico como central. Además, el SNS interactúa con una variedad de otros sistemas y vías fisiológicas que contribuyen al aumento de la PA (Zeng et al, 2005), como lo es el SRAA que posee acciones importantes sobre la carga de fluidos, aumento de la RVP tanto directa como indirectamente y efectos tróficos. (Zhu et al., 2005)

4. Reactividad Vascular

En hipertensos se produce un aumento en la respuesta contráctil a NA cuando se compara con sujetos normales y este efecto se ha demostrado en hijos de padres hipertensos, sugiriendo la probable implicación de factores genéticos. (Beevers, op. cit) Esta particularidad observada en HTA, no es esperada pues ante incrementos de NA circulante debe producirse una regulación hacia abajo de los receptores adrenérgicos. (Oparil op. cit.)

5. Rigidez Arterial

Los cambios en las arterias de conductancia, producto del envejecimiento, generan el fenómeno denominado rigidez arterial que se caracteriza por una disminución en la complianza y distensibilidad de estos vasos que a su vez se traduce en un aumento de la presión arterial sistólica (PS) y presión de pulso. Estos efectos generan incrementos en la demanda metabólica del miocardio y predisponen al desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda (HVI) e IC. (Oparil sup. cit.)

6. SRAA

Este sistema podría considerarse como el más importante en regular la PA (**Figura 3**). El interés sobre este sistema reside en sus principales efectores: la ANG-II y la aldosterona. Existen ciertos tipos de HTA donde los niveles

elevados de renina están correlacionados con la patología, sin embargo en ancianos e individuos de raza negra los niveles de renina suelen no estar alterados y por esta razón, los fármacos que bloquean este eje no suelen ser efectivos para controlar la patología en estos pacientes. (Bruton op cit.; Floréz et al., 2001)

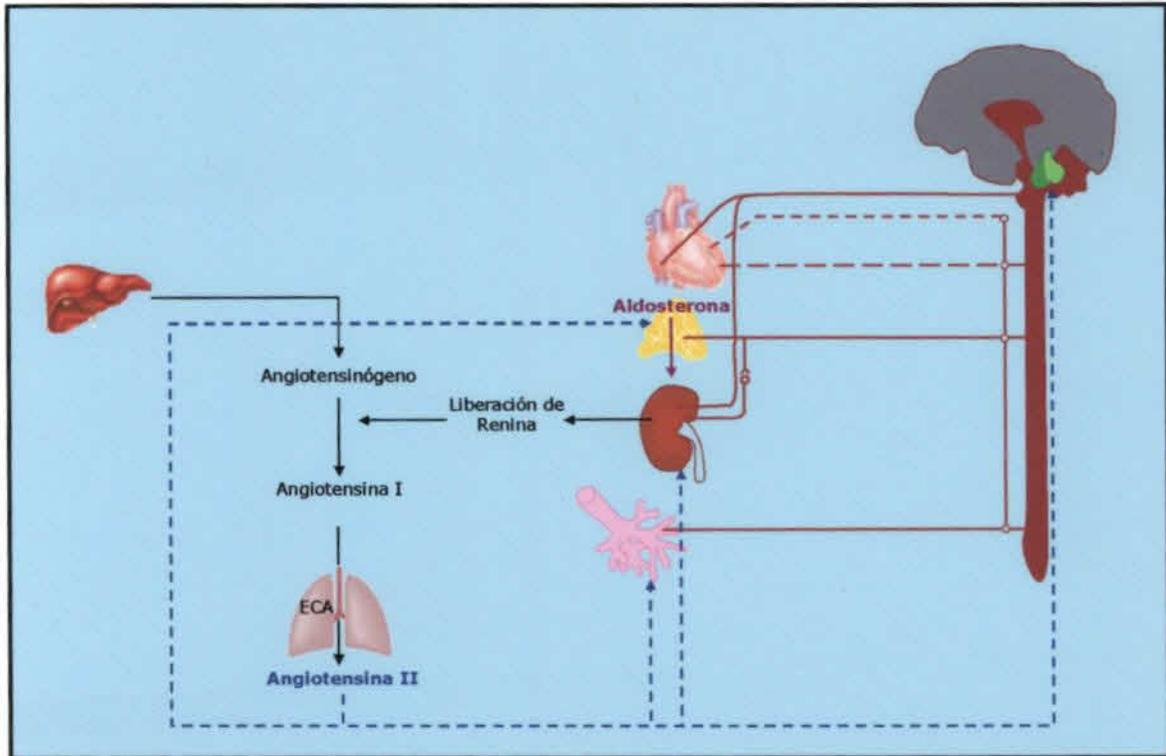


Fig. 3. Interrelación entre el SNS y el SRAA en la fisiopatología de la HTA.

Por un lado, la ANG-II produce un aumento de la PA por mecanismos ya mencionados, y adicional se describe la estimulación de la síntesis de ET-1 y aumenta el flujo simpático con el incremento de NA y liberación de catecolaminas de la medula adrenal. Otras acciones de crecimiento y proliferación celular así como propiedades oxidantes son atribuidas a ANG-II,

las cuales son mediadas por el receptor AT_1 , sin embargo el estímulo sobre AT_2 genera respuestas contrarias. (Oparil op. cit.; De Gasparo op cit.)

La aldosterona por su parte, regula la reabsorción de sodio y agua en los túbulos colectores con la secreción consecuente de hidrogeniones y potasio.

Esta función es realizada a través de la unión a receptores de mineralocorticoides (receptores nucleares) que regulan la expresión principalmente del canal epitelial de sodio (ENaC). (Freel y Connell, 2004)

Otras acciones extrarrenales han sido atribuidas a aldosterona ya que la estimulación de sus receptores en vasos sanguíneos produce alteración en su respuesta presora ante catecolaminas y en el corazón regula la formación de colágeno conduciendo a fibrosis del tejido. (Williams y Williams, 2003)

La existencia de SRAA local en corazón, vasos sanguíneos, riñón y cerebro parece estar relacionado con la regulación del flujo sanguíneo local a la vez que tiene un rol importante en el remodelado tisular. (Akasu et al, 1998)

7. Disfunción endotelial

Este complejo proceso esta caracterizado por un cambio en las acciones del endotelio hacia la reducción de su capacidad para generar vasodilatación, inducción de un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas. Cabe señalar que para algunos autores la disfunción endotelial no es una consecuencia de las ECV, sino que su deterioro precede al desarrollo de estas patologías u otras como la diabetes. (Rizzoni et al., 2001; Beevers op. cit)

De todos los factores producidos por el endotelio uno de los más importante y cuya disminución esta directamente relacionada con ECV, es el NO.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar la disfunción endotelial y que pueden ser resumidos a continuación:

a. NO

Por sus propiedades fisiológicas destacables, esta sustancia es considerada uno de los indicadores más precisos en la disfunción endotelial.

En la disfunción endotelial está reportado un decremento de NO que puede resultar de una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) ya sea por la presencia de inhibidores endógenos o exógenos o por reducción en la disponibilidad de su sustrato, L-arginina. Por otra parte, la presencia de ROS, reducen la función del NO, al generar peroxinitrito, especie reactiva con alto potencial citotóxico y que modifica la función de proteínas celulares por nitración, entre las que se encuentra la propia eNOS. Este radical, también induce la degradación del cofactor de la enzima, tetrahydropterina (BH_4), produciendo su desacople, afectando su actividad oxigenasa pero estimulando la actividad reductasa lo que conlleva a la formación de más ROS y sus efectos deletéreos. (Endemann y Schiffrin, 2004)

Otro nuevo mecanismo que explica la disminución de NO, es la formación de dimetil arginina asimétrica (ADMA), un inhibidor competitivo endógeno de eNOS que está relacionado con disfunción endotelial. Este inhibidor es producido por el recambio proteico o por el metabolismo de citrulina por la enzima dimetilarginina dimetilamino

hidrolasa (DDAH). Altos niveles de ADMA están relacionados inversamente con relajación dependiente de endotelio en individuos con hipercolesterolemia y los niveles plasmáticos se han relacionado con disminución del flujo renal e incremento de la PA. (Endemann y Schiffrin sup. cit.)

b. Estrés oxidativo

En modelos animales de HTA, se ha demostrado que el exceso de agentes oxidantes produce una disfunción endotelial que es revertida luego del tratamiento con antioxidantes. (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006) Estos estudios han sido corroborados con hallazgos realizados en pacientes con insuficiencia renal crónica donde marcadores de estrés oxidativo están relacionados con la disfunción endotelial. (Fortuño et al., 2005)

Estas ROS parecen relacionarse con la injuria endotelial que lleva a apoptosis y que se caracteriza por desprendimiento de las células endoteliales denominado anoikis. (Taniyama et al., 2003)

A pesar de que estas ROS pueden tener múltiple origen, se ha denotado la importancia del sistema enzimático NADPH oxidasa localizado en fagocitos como la principal fuente de ROS. Otras fuentes que intervienen en la génesis de ROS son xantina oxidasa, citocromo p450, ciclooxigenasas y lipooxigenasas. (Fortuño op. cit.)

En estudios animales se ha demostrado que la infusión de ANG-II produce estimulación de la NADPH oxidasa y promueve la inflamación vascular, lo que explica el papel de este péptido en la generación de

estrés oxidativo. Otras sustancias como ET-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) regulan la función de este sistema enzimático. (Pu et al., 2003)

D. Otros factores de riesgo cardiovascular

Un alto porcentaje de pacientes hipertensos presentan además hipercolesterolemia y/o diabetes tipo 2, lo que establece una clara relación entre estas patologías, aumentando consecuentemente los riesgos sobre la morbimortalidad. Otras anomalías incluyen microalbuminuria, altos niveles de ácido úrico, hipercoagulabilidad y aterosclerosis acelerada. (Oparil op. cit.)

Una de las complicaciones de la HTA es la denominada paradoja de Birmingham, la que consiste en que a pesar que los vasos sanguíneos estén expuestos a altas presiones tienden a desarrollar más problemas trombóticos que hemorrágicos. La causa reside en las anomalías subyacentes a los propios vasos (lesión y daño endotelial), constituyentes sanguíneos (factores hemostáticos alterados) y al flujo de sangre. (Beevers op. cit.)

La hiperuricemia ha sido asociada con vasoconstricción renal y activación del SRAA en pacientes hipertensos, sugiriendo que sus posibles acciones adversas están mediadas por la activación del sistema en cuestión. En modelos animales de roedores, la hiperuricemia produce arteriopatía renal y enfermedad tubulointersticial que termina en HTA y estas lesiones son revertidas con inhibidores de la síntesis de ácido úrico, inhibidores de la ECA y losartan, demostrando la importancia de estos compuestos en la HTA. (Mazzali, et al, 2001)

E. Remodelado cardiovascular

Los mecanismos por los que la HTA incrementa la morbimortalidad en los pacientes son diversos e incluyen el desarrollo de arterioesclerosis coronaria, cambios estructurales como la hipertrofia ventricular (HV) y vascular, que comprometen tanto la perfusión cardiaca como la orgánica. (Frey et al, 2004) Estos cambios en el fenotipo están acompañados por la reinducción del programa de genes fetales, en donde predomina el crecimiento de las células observado en el desarrollo embrionario. (Crabtree, 2001; Adams, 2004)

Un gran número de investigaciones se han realizado con la finalidad de determinar cuáles son las causas específicas y los mecanismos celulares que llevan al desarrollo de la hipertrofia, sin embargo, los estudios en modelos animales y ensayos clínicos denotan la importancia de cascadas de señalización intracelular empleadas por hormonas y neurotransmisores comprometidos en el proceso patológico y que pudiesen tener importancia desde el punto de vista terapéutico. (Fortuño et al, 2003)

Estas alteraciones cardiacas parecen estar relacionadas con un incremento en la apoptosis y necrosis tisular combinado con proliferación celular simultánea. (Dorn et al, 2003; August, 2004; Freel y Connell, 2004) Estos procesos pueden desarrollarse por la activación de diversas vías intracelulares a pesar de que su regulación es predominantemente génica. (Watanabe et al., 2005) Al igual que el corazón, los vasos sanguíneos son capaces de generar cambios estructurales (remodelado) como respuesta a condiciones variantes y demandas funcionales. Este remodelado responde a regulación génica, a funciones celulares, a estímulos locales y humorales que en un principio

sirven para adaptarse ante un cambio inicial pero que con su persistencia en el tiempo puede desencadenar en el desarrollo de patologías por una función estructural alterada. (Pries et al, 2005; Daige et al, 2004)

En la HTA las arterias de resistencias sufren dos alteraciones geométricas: remodelado eutrófico y remodelado hipertrófico. (Oparil op. cit.)

En el primero existe una reducción del lumen diámetro externo, sin alteraciones de la capa media, aumento del radio media/lumen en el vaso y carente de rigidez. En el caso de la hipertrofia se produce un crecimiento de la media que invade el lumen e incrementa el radio media/lumen. Este efecto se explica por la hiperplasia/hipertrofia que presentan las células de músculo liso vascular que ocupan la capa media. (Intengan y Schiffrin, 2001)

Por su importancia en la homeostasis de la PA, el riñón es otro de los órganos que sufre alteraciones durante la patología hipertensiva, donde se observan cambios estructurales de hipertrofia en tejido renal y vascular que podrían relacionarse con incremento de la actividad simpática, alteraciones en la regulación del SRAA y disfunción endotelial. Entre mayor es el tiempo de exposición a la HTA mayores serán los efectos nocivos observados que pueden llegar hasta una falla renal. (Oparil op.cit.; O'Rourke y Safar, 2005)

Se ha observado que una de las manifestaciones clínicas de la HTA, el deterioro de la función cardíaca, es consecuencia directa de las alteraciones estructurales en el miocardio y de los vasos sanguíneos. Dichas alteraciones están relacionadas con el depósito de material fibroso, aumento de la apoptosis y alteración del metabolismo celular. Todos estos efectos son la base bioquímica de la disfunción sistólica y diastólica observada en la HTA.

Consecuencia al aumento de la postcarga y de la tensión parietal, la demanda de oxígeno por parte del corazón se incrementa llevando al desarrollo de isquemia miocárdica, situación que es empeorada por el deterioro de la función endotelial y la disminución de la angiogénesis en el músculo cardíaco. (Fortuño et al, 1998) Finalmente, debido a la HV, los pacientes pueden presentar arritmias cardíacas que repercuten en un pobre pronóstico del paciente hipertenso.

El origen de estas alteraciones anatómo-fisiológicas subyace a nivel molecular y están ligados directamente con la fisiopatología de la HTA y los factores humorales que regulan este parámetro fisiológico.

F. TRATAMIENTO DE LA HTA

1. Tratamiento no farmacológico

La HTA considerada una enfermedad nutricional higiénica, posee sus bases en la inactividad física, obesidad, ingesta alta de calorías, exceso de la ingesta de sodio, así como el consumo de cigarrillo y alcohol; aunque como ya hemos mencionado no se descarta la participación de componentes hereditarios. Por esta razón, el tratamiento inicial de la HTA está basado en cambios o modificaciones del estilo de vida, los cuales son considerados efectivos en reducir, tanto solos como conjuntamente con farmacoterapia, las complicaciones relacionadas con la enfermedad en pacientes de alto riesgo cardiovascular. (Flack et al., 2003)

Estos cambios están determinados principalmente por la disminución de los factores antes mencionados, pero es importante denotar que la respuesta varía entre cada parámetro implementado y depende también del individuo. En el **cuadro II** se presentan los cambios en el estilo de vida y la respuesta aproximada sobre la PS. (Chobanian op. cit)

Cuadro II. MODIFICACIONES EN EL ESTILO DE VIDA PARA EL MANEJO DE LA HTA

Modificación del estilo de vida	Recomendación	Reducción aproximada de la PAS
Reducción de peso	Mantenimiento del peso corporal adecuado (Índice de masa corporal de 18.5-24.9)	5-20 mm Hg por cada 10 Kg
Adopción de la dieta recomendada para detener la HTA	Consumir diariamente dieta rica en vegetales, productos bajo en grasas con reducción del contenido de grasas saturadas y totales	8-14 mm Hg
Reducción de la ingesta de sodio	Ingesta diaria no mayor de 2.4 g de sodio o 6 g de cloruro de sodio	2-8 mm Hg
Actividad física	Practicar actividad física aeróbica diariamente por lo menos 30 minutos tres veces por semana	4-9 mm Hg
Moderación del consumo de alcohol	Limitar el consumo de alcohol a no más de 2 onzas de etanol por día	2-4 mm Hg

Traducido de Chobanian et al, 2003.

Para obtener resultados benéficos, adecuados y sin riesgos con cada uno de estos cambios, se recomienda realizarlos bajo supervisión profesional.

2. Tratamiento farmacológico

Actualmente, existe un gran número de fármacos disponibles para reducir la PA y que han demostrado en estudios experimentales y clínicos su eficacia como antihipertensivos. Las recomendaciones dadas por el Joint Nacional Comitee en su Séptimo Reporte, respalda que el objetivo del tratamiento de la HTA debe ser obtener un valor de PA <140/90 mm Hg en pacientes hipertensos y <130/80 mm Hg para hipertensos diabéticos o con problemas renales. Estudios comparativos entre diversos países han demostrado que la HTA constituye uno de los problemas de salud más importantes pues, a parte que muchos pacientes desconocen las complicaciones inherentes a la

patología, otra gran cantidad de enfermos no adoptan adecuadamente los regímenes terapéuticos para controlar su PA. Así podemos mencionar que el objetivo de la terapia antihipertensiva se ha podido obtener aproximadamente en $\leq 10\%$ en los países de Europa, 17 % en Canadá y 29% en los Estados Unidos de Norte América, situación que es de gran importancia para la salud mundial (Wolf-Maier K., et al, 2003; Erdine S. y Nazif S., 2004).

Dentro del amplio porcentaje de pacientes no controlados, pueden existir un gran número de variables que intervienen, pero debe considerarse que en mucho de los casos se requiere un tratamiento más agresivo que está constituido por la combinación de dos o tres fármacos para obtener los beneficios y garantías de protección cardiovascular.

Estos beneficios derivan de la publicación continua de estudios multicéntricos donde se evalúa la eficacia antihipertensiva de fármacos versus placebo, relacionando la disminución de la PA con el desarrollo de eventos cardiovasculares que incluyen enfermedad coronaria, falla cardíaca y daño renal entre otros.

Después que los primeros estudios fuesen publicados en la década de los sesenta, y demostrasen que los diuréticos tiazídicos eran efectivos, un gran número de artículos han brindado información semejante sobre la reducción de la PA y la reducción de sus complicaciones utilizando otros fármacos como antagonistas alfa-adrenérgicos (AA), antagonistas beta-adrenérgicos (ABs), inhibidores de la enzima convertidora de ANG-II (IECAs), antagonistas de

canales de calcio (ACC) y los recientemente introducidos antagonistas del receptor de ANG-II (ARAs). (Franco V. et al, 2004; Chobanian op. cit)

Estos grupos de fármacos actúan en diversos blancos para el control de la PA, demostrando una buena eficacia clínica. A continuación desglosamos las principales propiedades farmacológicas de los diversos grupos de fármacos antihipertensivos (Brunton op. cit.; Opie y Gersh, 2001; The Task Force on Beta-Blockers of the European Society of Cardiology, 2004)

a. Diuréticos Tiazídicos: comprende un gran número de compuestos (ver **Cuadro III**) y son de los fármacos más antiguos usados para el tratamiento de la HTA, sin embargo su mecanismo exacto no está definido y no está relacionado del todo con su efecto diurético, ya que el efecto antihipertensivo se mantiene con el uso crónico a pesar que el gasto cardíaco y el volumen extracelular retornan a sus niveles basales como consecuencia de mecanismos reguladores. Es importante señalar que las tiazidas, en general, requieren un adecuado funcionamiento renal para ejercer su efecto por lo que son ineficaces en pacientes con una tasa de filtración glomerular (TGF) menor de 30 a 40 mL/min, a excepción de metolazona e indapamida.

La inhibición del cotransportador renal de Na^+Cl^- causa una disminución del volumen plasmático y consecuentemente del gasto cardíaco, se postula la activación de canales de potasio activados por calcio llevando a hiperpolarización de las células musculares lisas (CML), con el consecuente bloqueo de canales de calcio tipo L y disminución de su apertura, esto finalmente reducirá la disposición del

calcio en las CML. Este mecanismo podría relacionarse con la inhibición de la anhidrasa carbónica dentro de las CML que activaría los canales de potasio en mención. (Brunton op. cit.)

Otro mecanismo propuesto es la reducción de las respuestas contráctiles a sustancias presoras como ANG-II y catecolaminas.

Cuadro III. VIDA MEDIA Y DOSIS ANTIHIPERTENSIVAS DE ALGUNOS DIURÉTICOS TIAZÍDICOS.

Fármaco	Vida media en horas ($t_{1/2}$)	Dosis en HTA (mg)
Hidroclorotiazida	2.5	12.5- 25
Clorotiazida	1.5	250-1000
Hidroflumetacida	17	12.5- 25
Clortalidona	47	12.5- 50
Bendroflumetiácida	3-3.9	1.25- 2.5
Indapamida	14	1.25- 2.5
Metolazona	No conocida	2.5- 5

Tomado y modificado de Goodman & Gillman, 2006 y Opie, 2001.

Estos fármacos presentan efectos adversos que los hacen restrictivos para algunos pacientes pues tienden a producir depleción de potasio, aumento de glicemia, reducción de la excreción de uratos, incremento de lípidos plasmáticos e impotencia entre otros.

La hipocalcemia ha sido uno de los efectos adversos más importantes ya que se ha relacionado con muerte súbita en ciertos pacientes, razón por la que se recomienda el uso concomitante de otros fármacos que eviten este efecto como los diuréticos retenedores de potasio como amiloride, triamtereno o espironolactona.

Durante su uso, está recomendado la monitorización de los niveles de potasio y evitar el uso de sustitutos de cloruro de sodio o fármacos

como IECAs, ARAs o analgésico antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), pues se incrementa el riesgo de hipercalemias en los pacientes.

b. Antagonistas beta-adrenérgicos (ABs): este grupo constituye uno de los principales fármacos empleados para el tratamiento de diversos estados la HTA, siendo también considerados de primera elección.

Actualmente comprende un gran número de fármacos que se han dividido por generaciones (**Cuadro IV**) y que a su vez están relacionadas con sus propiedades farmacológicas.

Cuadro IV. DOSIS ANTIHIPERTENSIVAS Y OTRAS PROPIEDADES DE ALGUNOS ANTAGONISTAS BETA-ADRENÉRGICOS.

Clasificación	Dosis diaria en HTA (mg)	Otra propiedad
Primera Generación (no selectivos)		
Nadolol	40-120	-----
Pindolol	10-40	Actividad simpaticomimética intrínseca
Propranolol	40-160	Estabilizante de membrana
Timolol	20-40	-----
Segunda Generación (selectivos)		
Acebutolol	200-800	-----
Atenolol	25-100	-----
Betaxolol	10-20	-----
Bisoprolol	2.5-10	-----
Metoprolol	50-100	-----
III Generación (vasodilatadores)		
Carvedilol	12.5-50	Beta No selectivo, estabilizante de membrana, antagonista alfa ₁ y antioxidante
Labetalol	200-800	Beta No selectivo y antagonista alfa ₁
Celiprolol	400	Beta selectivo y agonista beta ₂
Nevibolol	2.5-5	Beta selectivo, antioxidante y estimula producción de NO

Tomado y modificado de Goodman & Gillman, 2006 y Opie, 2001.

La mayoría de estos fármacos no disminuyen la PA en pacientes normales sin embargo son eficaces para pacientes hipertensos. A pesar de su amplia utilización, sus mecanismos no están descritos de forma completa. El bloqueo de la liberación de renina de las células yuxtaglomerulares del riñón, es considerado su principal mecanismo, por lo que pacientes con altos niveles de renina parecen responder de una manera más satisfactoria que aquellos con niveles normales. Otros mecanismos propuestos incluyen la disminución del GC (bloqueo β_1), bloqueo presináptico β_2 , aumento de la síntesis de PNA, aumento de PGI_2 , efecto central (no todos) y reajuste de los barorreceptores.

Estos compuestos están indicados en todos los estados de la HTA, sin embargo existe evidencia clínica que señala que ciertos grupos especiales como ancianos y pacientes de raza negra no son controlados adecuadamente, lo cual parece ser una consecuencia de los bajos niveles de renina plasmática mostrados en estos pacientes.

(Bruton op cit.; Floréz et al., 2001)

Los ABs poseen pocos efectos adversos donde destacan el broncoespasmo en pacientes asmáticos, depresión en pacientes susceptibles, alteraciones metabólicas como incremento de lípidos, interferencia con la regulación de la glicemia, depresión cardiaca y disfunción sexual. La suspensión abrupta de la administración de los ABs produce hipertensión de rebote y taquicardias como consecuencia del proceso de desensibilización de receptores.

c. Antagonistas de los canales de calcio (ACC): comprende tres grupos de fármacos divididos por sus estructuras químicas, como se indican en el **Cuadro V**. Cada grupo posee propiedades farmacológicas diferentes ya que bloquean con cierto grado de especificidad los canales de calcio tipo L ubicados en el miocardio o en la CML.

Cuadro V. ANTAGONISTAS DE CALCIO Y SUS AFINIDADES

Clasificación	Fármaco	Actividad cardíaca	Actividad vascular
Fenilalkilaminas	Verapamilo	+++++	++++
Benzotiazepinas	Diltiazem	+++++	+++
Dihidropiridinas	Nifedipino	+	+++++
	Nicardipino	+	+++++
	Felodipino	+	+++++
	Amlodipina	+	+++++

Tomado de Goodman & Gillman, 2006

Todos estos compuestos presentan un buen efecto hipotensor. Su efecto principal lo ejercen por disminución de la RVP, además de tener un efecto diurético que es mayor en las dihidropiridinas (DHPs), las cuales además poseen menos efectos cardíacos directos.

La eficacia de todos estos compuestos esta demostrada en ancianos, pacientes de raza negra e inclusive pacientes nefrópatas donde los fármacos de elección estén contraindicados. (Opie y Gersh op. cit.)

En términos generales y bajo ciertas circunstancias, los ACC, son considerados fármacos antihipertensivos de primera elección ya que carecen de efectos metabólicos y entre los efectos adversos más comunes están cefaleas, edema bimalear y taquicardia, para el grupo

de las DHPs; mientras que para verapamilo predomina el estreñimiento.

d. Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina

(IECAs): incluye un gran número de agentes están incluidos en el grupo que pueden clasificarse por su estructura química tal y como en el **Cuadro VI** están presentados.

Cuadro VI. CLASIFICACIÓN, VIDA MEDIA Y DOSIS ANTIHIPERTENSIVAS DE ALGUNOS IECAs.

Clasificación	Fármaco	Vida media (t_{1/2}) (horas)	Dosis diaria en HTA (mg)
Compuestos con grupo sulfidril	Captopril	4-6	50-150
	Alacepril*	8	25-50
Compuestos con diácidos carboxilos	Enalapril*	11	5-20
	Benacepril*	11	10-80
	Lisinopril	12	10-40
	Ramipril*	13-17	2.5-10
	Cilacepril*	9	2.5-5
Compuestos con grupos fosforil	Fosinopril*	12	10-40

* *Profármacos. Tomado de Goodman & Gillman, 2006 y Opie, 2001.*

Todos estos fármacos se diferencian por sus propiedades farmacocinéticas y su potencia, sin embargo su mecanismo de acción depende de la inhibición de la síntesis de ANG-II. Este efecto bloquea indirectamente las acciones de aldosterona e incrementa las acciones vasodilatadoras de bradicininas al disminuir su metabolismo por la ECA.

La inhibición de la producción de ANG-II a partir de ECA, es eficaz, sin embargo como respuesta regulatoria se aumenta la liberación de renina y en consecuencia los niveles de ANG-I, que por otras vías

metabólicas se convierte en ANG-II, cuya importancia todavía es discutida.

Por su mecanismo de acción estos fármacos podrían no ser adecuados para pacientes con bajos niveles de renina como ancianos y pacientes de raza negra. Se consideran de primera elección en pacientes diabéticos y nefrópatas ya que su efecto en reducir la progresión del daño renal en estos pacientes ha sido demostrado clínicamente. (The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology 2004)

Los IECAs poseen un bajo perfil de efectos adversos, lo cual ha beneficiado el cumplimiento de la terapia por parte de los pacientes. La tos se considera el principal efecto colateral y en muchos casos puede llevar a discontinuar la terapia, además se ha informado de angioedema, disgeusia, insuficiencia renal, hipotensión e hipercalemia. Este último efecto debe vigilarse en paciente con insuficiencia renal y deben evitarse la administración conjunta de AINEs, diuréticos retenedores de potasio y suplementos de potasio.

En pacientes con estenosis renal bilateral, monorenos y mujeres embarazadas el uso de los IECAs está contraindicado.

e. Antagonistas del Receptor de ANG-II (ARA): es un grupo de reciente introducción en el mercado comparado con los otros grupos antihipertensivos.

Cuadro VII. VIDA MEDIA, DOSIS ANTIHIPERTENSIVAS DE ALGUNOS ARA

Fármaco	Vida media ($t_{1/2}$) (horas)	Dosis diaria en HTA (mg)
Losartán*	6-9	25-100
Candesartán	9	8-32
Irbesartán	11-15	150
Valsartán	6	80-320
Telmisartán	24	40-80

*Posee metabolito activo. Tomado de Goodman & Gillman, 2006 Opie, 2001.

Estos compuestos actúan bloqueando competitivamente el receptor AT_1 de ANG-II, por esta razón sus efectos son muy parecidos a los IECAs, sin embargo la acción de los ARA es mucho más selectiva.

La eficacia antihipertensiva de los ARAs está reforzada por la poca incidencia de reacciones adversas comparadas con los IECAs, sobretodo la tos y el angioedema, razones por las cuales suelen estar indicados cuando existe intolerancia a los IECAs.

Su uso está contraindicado en insuficiencia renal por estenosis y en mujeres embarazadas por su posible potencial fetopático.

G. TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA Y REMODELADO CARDIOVASCULAR

El objetivo principal del tratamiento de la HTA consistió, por mucho tiempo, en el control adecuado del valor de la PA, sin embargo hace algunos años se demostró la relevancia de los daños sufridos por los órganos blancos, razón por la cual los fármacos antihipertensivos, tuvieron que ser evaluados para

demostrar si eran capaces de prevenir o revertir los cambios estructurales y funcionales generados por la patología.

H. TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA E HVI

La HVI, constituye un riesgo adicional de la ECV ya que incrementa el riesgo para una variedad de secuelas cardiovasculares como angina, infarto del miocardio, IC y muerte súbita. Numerosos estudios clínicos indican el efecto preventivo y/o regresivo que poseen las diferentes clases de fármacos antihipertensivos sobre la HVI. (Mosterd et al., 1999)

Estudios experimentales y clínicos comparativos entre fármacos han demostrado el efecto benéfico de todos los grupos antihipertensivos, a excepción de los vasodilatadores.

El resultado más consistente sobre la reducción de la HVI ha sido demostrado con los IECAs y la menor con los ABs y en un plano intermedio se ubican los ACC y los diuréticos. Esta información no es generalizada, pues en algunos estudios como el TOMHS, los diuréticos demuestran el mayor efecto benéfico. (Chobanian op. cit)

Así, el estudio LIVE demostró la superioridad del diurético indapamina sobre el enalapril después de 12 meses de tratamiento. Otros estudios como ELVERA, PRESERVE y FOAM presentan igual grado de regresión entre IECAs y ACC. Estudios más recientes, CATCH y LIFE apoyan las acciones lógicas sobre la HVI que deben tener los ARAs, demostrando una similitud con los IECAs y cierto grado de superioridad sobre los ABs tipo atenolol, característica que no ha sido demostrada a cabalidad, pues en el estudio REGAAL donde se compara losartan versus atenolol, el efecto sobre la HVI, no fue tan

significativamente diferente y además el tratamiento con el ARA produce una disminución de los péptidos natriuréticos, mientras que atenolol presentó una respuesta contraria. (Zanchetti, 2003)

En el caso de los AAs, su efecto sobre la HVI, fue oscurecida por los resultados obtenidos en el estudio ALLHAT, donde los pacientes tratados con doxazocina presentaron mayor riesgo de presentar IC comparado con el grupo de clortalidona, por lo que tuvo que ser suspendido el tratamiento. (González-Juanatey et al., 2003)

Algunos autores coinciden en que el efecto puede variar dependiendo del fármaco utilizado, la duración del tratamiento y características del individuo como la edad, sexo, raza y estilo de vida. (Brown, 2006)

I. TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA Y DISFUNCIÓN VASCULAR

Un gran número de estudios clínicos basados en diferentes grupos de antihipertensivos ha comparado a largo plazo los efectos sobre la hipertrofia vascular y la disfunción endotelial (DE), debido a la repercusión que implica la disfuncionabilidad de estas estructuras sobre la HTA y otras patologías relacionadas.

Para este caso, los ACC han demostrado un mayor beneficio sobre otros grupos como diuréticos y ABs de segunda generación. En adición, el estudio ELSA demostró que el ACC lacidipino, reduce la progresión de la placa aterogénica y favorece su regresión (Zanchetti op. cit), resultados experimentales en ratones señalan efectos similares para amlodipino. (Yoshii et al, 2006)

Estudios más recientes en relación a los ABs de segunda generación parecen ser no concluyentes, pues al compararlos con ABs de tercera generación como nebivolol, el atenolol no mejora la DE, mientras que el nebivolol muestra un efecto beneficioso (Tzemos et al., 2001). Otro estudio que compara ibersartan con atenolol no presenta diferencias significativas en cuanto a la relajación dependiente de endotelio, concluyendo que el tratamiento mayor de 3 meses con ambos fármacos, mejora la DE (von zur Muhlen et al., 2001). Creciente información proveniente de estudios experimentales denota los beneficios de los ABs de tercera generación sobre la HV y la DE (Intengan y Schifrin, 2000; Guerrero et al., 2003), lo cual pudiese estar relacionado con las propiedades mixtas que poseen.

Por su parte los diuréticos tiazídicos no habían demostrado ejercer cambios sobre el remodelado vascular y la DE, sin embargo en estudios en animales de experimentación, indapamida demostró reducir el remodelado hipertrófico de arterias cerebrales de ratas SHR. (Chillon y Baumbach, 2004) A diferencia, espironolactona presenta efectos concisos al prevenir la fibrosis e hipertrofia aórtica inducida por la infusión de ANG-II en ratas, además de mejorar la DE. (Neves y Schifrin, 2003; Stier et al., 2003, Neves et al, 2005) Los resultados de estudios realizados con IECAs, muestran una reducción y reversión del remodelado vascular, además de un mejoramiento de la DE tanto en animales de experimentación (Dupuis et al, 2005) como en pacientes hipertensos. (Suda et al., 2006) Estas acciones, sobre la HV y DE son también esperadas para los ARA.

J. TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA Y DAÑO RENAL

Al igual que en el miocardio y en los vasos sanguíneos, diversos efectos nocivos conllevan al deterioro de la función renal durante la HTA, produciendo un aumento de la síntesis de matriz extracelular, fibrosis y la inducción de mediadores inflamatorios, a pesar de la activación de mecanismos internos de autorregulación. Dentro de las posibles causas se encuentra la activación del SNS, del SRAA y la DE, destacándose el rol preponderante del SRAA en el daño glomerular. (Remuzzi et al., 2002; Mori et al., 2006)

Estudios experimentales realizados en varios modelos de HTA con daño renal han demostrado que los fármacos que inhiben el SRAA como IECAs, ARA y antagonistas de aldosterona promueven beneficios renales a través de mecanismos hemodinámicos y no hemodinámicos (Zhou y Frohlich, 2003). Sin embargo en clínica, la información relacionada a la eficacia de estos compuestos proviene de resultados obtenidos principalmente en pacientes diabéticos o que padecen de enfermedades renales crónicas, en donde estos grupos de fármacos reducen la progresión de la lesión. (Zanchetti op. cit.)

Otros grupos farmacológicos como diuréticos, ABs y ACC parecen tener efectos benéficos al reducir el deterioro de la función renal producida por HTA, sin embargo los estudios no son concluyentes. (Chobanian op. cit.; Zanchetti op. cit.; Wenzel, 2005)

K. SELECCIÓN DEL ANTIHIPERTENSIVO

A pesar de la existencia de un gran número de fármacos antihipertensivos, y a la creciente información proveniente de estudios clínicos comparativos

entre los fármacos nuevos y los antiguos, el Joint National Comitee para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de la HTA de Estados Unidos en su Séptimo Reporte considera a los diuréticos tiazídicos como fármacos de primera elección en el tratamiento de la HTA. Las recomendaciones hechas por el JNC sobre el uso de los diuréticos tiazídicos como fármacos de primera elección están basadas en diferentes estudios comparativos que resaltan la eficacia de ellos sobre las variables estudiadas, además de su buena tolerabilidad.

Esta designación reside en el hecho que este grupo ha sido utilizado ampliamente en estudios clínicos aleatorios y han demostrado, además de su eficacia antihipertensiva, la reducción de los eventos cardiovasculares relacionados como los infartos, IC y el desarrollo de la enfermedad coronaria. Por otra parte, un cúmulo de información proveniente de estudios donde empleando fármacos pertenecientes a otros grupos como IECAs, ARA, ACC, ABs también demuestran reducción significativa de las complicaciones inherentes a la HTA; sin embargo la mayoría de estos ensayos no han mostraron ni superioridad ni inferioridad de los nuevos fármacos sobre los antiguos. Una excepción, la constituye el estudio LIFE, donde la incidencia de enfermedad cardiovascular fue un 13% menor en el grupo que recibió losartan en comparación con el que recibió atenolol.

Dentro del grupo de los ACC no parece existir diferencias entre el grupo de la DHP y los otros fármacos, pero los datos sugieren que el uso de las DHP de corta acción no debe recomendarse para el manejo de la HTA. (Opie, op. cit; Brunton op cit.)

Las recomendaciones generales del JNC (**Cuadro II**) comienzan con cambios en el estilo de vida, si estos no resultan efectivos para alcanzar el control de la HTA, se debe instaurar la terapia con una tiazida sola o en combinación con otro fármaco de otro grupo.

La selección de otro agente como tratamiento inicial está recomendada cuando el tiazídico no puede ser utilizado o cuando una indicación precisa esté presente, la cual requiere el uso específico de un fármaco (**Cuadro VIII**). Si el fármaco elegido no es tolerado o está contraindicado, un nuevo fármaco de otro grupo farmacológico debe ser escogido.

Cuadro VIII. LINEAMIENTOS PARA EL USO DE LAS DIFERENTES CLASES FARMACOLÓGICAS EN HTA DE ACUERDO A INDICACIONES PRECISAS*

Indicación precisa	Grupo antihipertensivo recomendado					Antagonistas de aldosterona
	Diuréticos	ABs	IECAs	ARAs	ACC	
ICC	•	•	•	•		•
Post-Infarto		•	•			•
Riesgo alto de enfermedad coronaria	•	•	•		•	
Diabetes	•	•	•	•	•	
Enfermedad renal crónica			•	•		
Prevención de infarto recurrente	•		•			

**Basadas en los beneficios reportados en estudios clínicos. Tomado de Chobanian et al., 2003.*

Desde que la mayoría de los paciente hipertensos requieren de 2 o mas fármacos para controlar la PA, la adición de un segundo fármaco debe

hacerse una vez que el primer fármaco no ha sido efectivo y se recomienda el uso de bajas dosis de los componentes, pudiéndose obtener mayores disminuciones de la PA con un bajo perfil de efectos adversos.

Toda vez que el tratamiento ha sido instaurado, los pacientes deben tener un seguimiento para los ajustes de la dosificación hasta que el objetivo de la terapia sea logrado.

En contraposición a lo expuesto anteriormente en el Séptimo Reporte del Joint National Committee (VII-JNC), la Sociedad Europea de Hipertensión-Sociedad Europea de Cardiología (European Society of Hipertensión-European Society of Cardiology, ESH/ESC) en su Guía para el Manejo de la Hipertensión del año 2003, considera que la mayoría de los fármacos antihipertensivos; incluidos diuréticos, ABs, IECAs, ACC y ARA, son adecuados para el inicio y mantenimiento de la terapia antihipertensiva. También consideran que el tratamiento debe ser seleccionado de acuerdo a las condiciones del paciente, su preferencia, adherencia al tratamiento y el coste del producto.

Las guías para el manejo de la HTA de la ESH/ESC, establecen que no se puede destacar la ventaja del uso de diuréticos sobre otros fármacos, pues las diferencias no suelen ser tan contundentes, además hay que considerar la gran cantidad de efectos adversos que a largo plazo causan los diuréticos, sobre todo en relación al metabolismo corporal.

Estas concepciones divergentes sobre el tratamiento de la HTA, han suscitado ciertas opiniones donde algunos apoyan las recomendaciones dadas por el JNC, aduciendo que las medidas recomendadas por la ESH/ESC

son más flexibles en cuanto al tratamiento de la HTA (Hopkins, J., 2004); mientras que otros apoyan la postura de la ESH/ESC. (Mancia y Grassi, 2005)

A pesar de que cada grupo defiende su respectivo punto de vista, debe quedar claro que ante un paciente hipertenso el tratamiento debe estar dirigido a mantener los valores de PA dentro del rango recomendado y evitar el desarrollo y progresión de las complicaciones a largo plazo de la patología utilizando un fármaco efectivo y seguro. (Su y Miao, 2005)

ANTECEDENTES

La supervivencia del hombre a través del tiempo, pese a las adversidades a las que ha tenido que hacerle frente, responde a la capacidad casi inherente de adaptación y respuesta oportuna a las nacientes y cambiantes condiciones del medio. Las enfermedades constituyen uno de los grandes obstáculos a los que el hombre ha tenido que hacer frente a lo largo de la historia. Los libros y escritos antiguos cuentan el número importante de seres humanos que han sucumbido ante las plagas y epidemias que han azotado a la humanidad y desde esta perspectiva se puede asumir que son las enfermedades las responsables, no sólo de las muertes, sino también de la menor calidad de vida del ser humano.

El hombre ha desarrollado grados de adaptación para ciertas patologías y para contrarrestar otras, se ha valido de los recursos que la naturaleza le proporciona, siendo las plantas, por su amplia distribución y accesibilidad, la principal fuente de utilización para el alivio de las enfermedades. (Fresquet, 2000; Frusciante et al., 2000)

El constante flujo de personas de un lugar a otro, ha contribuido en el proceso de difusión del conocimiento sobre el uso de las plantas para una determinada enfermedad. Esto ha hecho posible el nacimiento de la Etnofarmacología, ciencia que tiene por objeto la investigación de los remedios de origen natural que utilizan las diferentes culturas para mejorar sus estados patológicos. (Cañigueral y Vila, 2002) El desarrollo de esta ciencia ha sido apoyado por organizaciones como la OMS, quien fomenta y financia planes de desarrollo, con el objetivo de fundamentar la utilización de las plantas medicinales tradicionales con una base científica que valide la

eficacia terapéutica y su seguridad. (WHO monographs on selected medicinal plants, 1999)

La creciente tendencia que existe desde hace varios años, en la utilización de la medicina complementaria y alternativa en el tratamiento de diversas patologías crónicas (Cooper E., 2005) ha provocado el resurgimiento de la fitoterapia en países desarrollados como Alemania, España, Inglaterra, Italia y Estados Unidos de Norteamérica, en los cuales su población utiliza preparados de origen natural para el tratamiento de diversas patologías entre las que destacan los problemas inmunitarios, endocrinos y cardiovasculares. (Nijkamp y Parnham, 1999; Miller et al., 2004; Guarrera, 2005)

Por siglos, las plantas fueron una de las principales fuentes para la producción de fármacos, sin embargo los avances de la química farmacéutica y la biología molecular han aportado nuevos métodos para producir sustancias con actividad terapéutica dentro del laboratorio disminuyendo así el descubrimiento a partir de estudios etnobotánicos. (Lentini, 2000)

En este sentido, la química farmacéutica utilizando prototipos o "cabezas de serie", ha logrado el desarrollo de nuevos compuestos o fármacos a partir de moléculas ya existentes, introduciendo modificaciones estructurales que resultan en cambios en la actividad farmacológica, sin dejar de lado la posibilidad de que el nuevo compuesto sea el mejor de la serie. Este descubrimiento conlleva un elevado coste que está contrastado por el bajo número de fármacos que llegan al mercado cada año, haciendo que la inversión en un compuesto de síntesis no sea tan lucrativa. (Avendaño et al., 2001; Koppitz y Eis, 2006, Ma y Horiuchi, 2006)

La experiencia afirma que la síntesis química no es rentable, ya que de cada diez mil moléculas nuevas sólo una llega al mercado y que esto no necesariamente implica su éxito, ya que han sido muchos los productos retirados del mercado durante los estudios de postcomercialización. (Friedman et al., 1999; Wysowski y Bacsanyi, 1996; Bresalier et al., 2005)

Como consecuencia de este hecho, a inicios de la década de los noventa, la búsqueda de nuevos compuestos tomó un nuevo curso, ya que se denota la importancia que poseen los países, en su mayoría en vías de desarrollo, en cuanto a la biodiversidad con la que cuentan. El pionero de esta nueva tendencia científica fue la compañía Merck & Co., de Estados Unidos, quien firmó un acuerdo con el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio), con la finalidad de explotar la biodiversidad de este país. El descubrimiento de la droga anticancer taxol, sirvió para que otras compañías farmacéuticas enfocarán su atención en países donde existiera una amplia biodiversidad. (Garrity y Hunter-Cevera, 1999) Gracias al surgimiento de este proceso, algunos proyectos han resultado exitosos y se han obtenido compuestos con interesante actividad farmacológica. (Cooper, 2005)

Esta nueva metodología de estudio, basada en la búsqueda de productos naturales con actividad farmacológica significativa, se ha denominado "bioprospección". (Macilwain, 1998; Buenz et al., 2004) La bioprospección en su conjunto busca el descubrimiento de drogas en un amplio margen de organismos que incluye desde eubacterias hasta el reino animal y que durante esa búsqueda, los laboratorios o compañías que financian, aportan beneficios económicos a la comunidad donde se realizan los estudios,

además de brindar capacitación con personal experto sobre las áreas a investigar. (Dedeurwaerdere, 2004) Aunque para algunos autores el propósito y los resultados de esta actividad pueden incluir fines puramente comerciales, este proceso puede considerarse natural y justificable debido a los resultados benéficos que ha aportado al mundo científico y a las comunidades participantes. (Soejarto et al., 2005)

Debido al gran número de posibles blancos terapéuticos que cada día son descritos, la cantidad de compuestos existentes que podrían servir como candidatos nuevos han disminuido, aun cuando se cuenta con los avances en la química farmacéutica, química combinatoria y la biotecnología. Algunos especialistas aseguran que no importa cuan altas sean las cifras de compuestos producidos en el laboratorio, esta cantidad no es posible compararla con aquella que posee la naturaleza. (Onaga, 2001) Es en este punto donde, la bioprospección, ha cobrado un gran auge, ya que los compuestos encontrados en las fuentes naturales, aun cuando no posean una actividad determinada, pueden ser útiles para realizar modelado molecular, permitiendo así la obtención de productos con un perfil de actividad más específico. (Cooper, op. cit.)

Panamá, posee una inmensa biodiversidad y solamente un aproximado del cinco por ciento de las plantas han sido objeto de investigaciones nacionales e internacionales para la búsqueda de compuestos con interesante actividad biológica.

En nuestro laboratorio tenemos el interés de estudiar productos naturales provenientes de la flora panameña que presenten efectos vasculares, dado el

interés que generan los compuestos vasodilatadores en el tratamiento de afecciones cardiovasculares como la HTA y la enfermedad isquémica cardiaca y vascular.

Es conveniente recordar que estas enfermedades constituyen una de las principales causas de morbimortalidad tanto en Panamá, como en el resto del mundo, por lo que está justificado el estudio de productos naturales y sintéticos que perfilen esta propiedad. Si bien es cierto, que ya son muchos los compuestos presentes en el mercado que exhiben propiedades de eficacia y real beneficio en el tratamiento de las ECV, igual se puede afirmar que la morbilidad relacionada con las ECV dista mucho de verse reducida de manera completa.

Bajo esta perspectiva de bioprospección hemos seleccionado dos plantas del género *Marila* a saber, *Marila pluricostata* y *Marila laxiflora*, ninguna de las cuales posee descritos ni usos etnobotánicos ni estudios en el área de actividad cardiovascular.

Descripción taxonómica de la planta *Marila pluricostata*.

Es un árbol de hasta 15 metros de altura, densamente cubierto de ramas jóvenes de las cuales fluye un látex amarillo pálido. Sus hojas miden entre 11 y 26 cm. de largo y de 3 a 9 cm. de ancho; son oblongas, elípticas o lanceoladas y con un acumen de 1 cm., de largo, que algunas veces tiene forma redondeada o glabrosa.

Las inflorescencias son axilares, racemosas y se caracterizan por ser tomentosas y presentar abundantes mínutas, todas con un raquis de 10 a 18

cm de largo y unos pedicelos de 11 a 12 cm de largo, que algunas veces pueden extenderse hasta los 15 cm en la base de la fruta. Las flores presentan una gama de colores que varían desde un rosado brillante a un rojo oscuro; los pétalos tienen forma acorazonada y miden entre 11 y 12 mm de largo. La fruta es fusiforme, frecuentemente se encuentra encapsulada y contiene muchas semillas.

Marila pluricostata crece tan sólo en Panamá, Costa Rica y Colombia. Además, presenta una distribución muy restringida. (D'Arcy, 1980, Correa et al., 2001) En Costa Rica se le conoce con el nombre de camaron (Quesada y Fernández, 2005); sin embargo en los otros países no posee nombres comunes.

Descripción taxonómicas de la planta *Marila laxiflora*

Arbusto o árbol que alcanza los 20 metros de altura, densamente cubierto de ramas jóvenes de las cuales fluye un látex amarillo a chocolate. Sus hojas miden entre 9 y 28 cm. de largo y de 2 a 12 cm. de ancho; son ovaladas, oblongas, elípticas o elípticas-lanceoladas y con un acumen de 1.5 cm. de largo, basalmente redondeado o agudo, densamente chocolate velutinosa antes de abrirse, glabras o ligeramente pubescente a lo largo de entre las venas al madurar.

Las inflorescencias son racemosas y axilares desde los nodos más desfoliados, puberulentos, que contienen de 1 a 4 flores por cm., raquis de 12 a 30 cm. de largo, pedicelos de 5 a 8 cm. de largo y de 1 a 2 cm de grueso en la base. Las flores son verdes, fragantes con sépalos de 6 a 8 mm,

de largo, ovalados o elípticos, puberulentos reflejados en la antesis, pero erectas en el fruto; pétalos de 6 a 9 mm. de largo, oblanceolados a oblanceolado-oblongado; con numerosos estamenes, la antera de 1.5 mm. de largo, el apéndice filiforme, ovario de 3 mm. de largo y estilo de 3 mm. La fruta es linear encapsulada de color amarillo chocolatoso y que mide 4 a 7 cm. de largo conteniendo semillas de 1 mm. de largo.

Se encuentra distribuido desde el norte de América central hasta Bolivia donde no se han encontrado diferencias entre las plantas que crecen en una u otra región y se localiza principalmente en áreas de bosque húmedo de bajas a moderadas elevaciones.

En América tropical recibe diversos nombres entre los que están: goma (Quesada y Fernández op. cit.), pachaqué y lengüillo. (Consortio TLBG / UP /STRI, 2006)

Química de las plantas del Género *Marila*

Existen pocos estudios sobre los componentes de las plantas del género *Marila*.

Para el caso de *Marila laxiflora*, se describe la existencia de ácido betulínico, xantonas (Ioset et al, 1988) y de un derivado poliisoprenilado de floroglucinol, la laxifloranona. (Bokesch et al, 1999) Los estudios realizados sobre actividad farmacológica muestra que la laxifloranona inhibe el efecto citopático de la infección de VIH *in vitro* y que el extracto diclometano de *Marila laxiflora* poseen actividad antifúngica y antiprotozoaria. (Weniger et al., 2001)

Estudios realizados por investigadores del Centro de Investigación de la Flora Panameña (CIFLORPAN, Panamá), del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, España y el Instituto BIOMAR (León, España), encontraron actividad citotóxica del extracto diclorometano de las hojas de *Marila pluricostata* sobre líneas celulares cancerosas (López-Pérez JL., et al., 2005) lo cual sirvió para justificar el aislamiento y determinación estructural de los componentes responsables de esta actividad biológica. El fraccionamiento de este extracto llevó al aislamiento y caracterización de diecisiete 4-fenilcumarinas, tres de las cuales resultaron ser compuestos nuevos. Todos estos compuestos han sido evaluados contra tres líneas celulares cancerosas humanas (MCF-7, H-460 y SF-268), donde los compuestos mamesina, mammea A/AB, mammea A/BA y mesuol resultaron con mayor actividad citotóxica. (López-Pérez sup. cit.)

Algunos derivados cumarínicos presentan actividad anti-VIH (Vlietinck et al., 1998); razón por la cual los productos de *Marila pluricostata* fueron ensayados en modelos de infección *in vitro* para determinar su actividad antiviral, resultando el isodispar B y disparinol A en los compuestos más activos y con un mecanismo de acción caracterizado por la inhibición de la transcripción del VIH al bloquear a la proteína Tat. (Bedoya et al., 2005)

La amplia variedad de compuestos aislados y los derivados sintéticos obtenidos nos ha permitido seleccionar aquellos que no presenten efecto citotóxico, para ser evaluados con el fin de determinar su perfil de acción cardiovascular.

JUSTIFICACIONES

1. Las ECV incluyen las enfermedades isquémicas, insuficiencia cardiaca y la hipertensión, entre otras, siendo esta última uno de los riesgos modificables más importantes para esos resultados. La relación entre los niveles de PA y la mortalidad por enfermedades cardiovasculares es positiva, directa, continua y predecible para aquellos individuos que posean o no otros factores adicionales, y aumenta a lo largo del tiempo (Lewington et al., 2002). Este hecho, respaldado por los resultados derivados del estudio Framingham (Moreno et al., 2005), hace necesario que se continúe la búsqueda de compuestos que reduzcan los riesgos relacionados con la condición cardiovascular en mención.

2. A pesar que hoy día contamos con gran cantidad de fármacos con actividad antihipertensiva, se observa que no logran prevenir o revertir en su totalidad las lesiones orgánicas relacionadas con las ECV. Por otra parte, los meta-análisis de estudios clínicos al azar no muestran diferencias significativas en el total de los eventos cardiovasculares cuando se comparan las diferentes categorías farmacológicas (Wolf-Maier op. cit., 2004; Franco op. cit). Esta es una de las razones por las que cada año las compañías farmacéuticas inviertan millones de dólares en investigaciones para encontrar compuestos con mejor actividad antihipertensiva.

3. Uno de los aspectos más explotados por las compañías farmacéuticas son los ensayos derivados de la bioprospección. Panamá, por ser uno de los países que cuenta con una gran biodiversidad, podría representar una fuente para estudios relacionados. Por esta razón consideramos de relevancia, la

posibilidad de evaluar la actividad vasodilatadora e hipotensora de plantas panameñas del género *Marila*.

4. La sola determinación de la actividad vascular no sería de completo interés, por lo que se requiere de la caracterización de los productos relacionados con dicha actividad para establecer la relación estructura actividad que permita afinar la búsqueda de una molécula que posea un mayor perfil de eficacia cardiovascular en modelos animales.

OBJETIVOS

GENERALES

Evaluar la actividad cardiovascular de extractos obtenidos de las partes aéreas de las plantas *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*.

Determinar el perfil de actividad vascular de productos naturales y sintéticos obtenidos de *Marila pluricostata*.

ESPECÍFICOS

Determinar las acciones vasodilatadoras de diferentes extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*.

Describir el efecto hipotensivo agudo de los extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata* en ratas espontáneamente hipertensas.

Cuantificar las respuestas vasculares de los compuestos naturales: FC-1, FC-1a, FC-3, FC-4, FC-11, FC-12/13; FC-15, FC-16 aislados de *Marila pluricostata* utilizando vasos de conductancia.

Cuantificar las respuestas vasculares de los diferentes derivados sintéticos fenilcumarínicos: FCS-11, FCS-12, FCS-15, FCS-17, FCS-18, FCS-21, FCS-38, FCS-45, FCS-53, FCS-54 y FCS-81 sobre anillos de aorta precontáidos con fenilefrina.

Dilucidar si las acciones de los productos con mayor efecto vasodilatador, son dependientes de la función endotelial.

Establecer el posible mecanismo de acción involucrado en las acciones vasculares de los productos de síntesis con mejor perfil de actividad vascular.

METODOLOGÍA

I. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

A. Recolección e identificación del material vegetal

Las plantas objeto del presente estudio fueron recolectadas en el Parque Soberanía y Llano Cartí, provincia de Panamá, por los Licdos. Alex Espinosa y Carlos Guerra.

La identificación taxonómica definitiva fue establecida por el Licdo. Alex Espinosa y muestras voucher reposan en el Herbario de la Universidad de Panamá. Abajo se desglosan los números de cada voucher por espécimen.

Nombre de la planta	Parte de la planta	No. Voucher
<i>Marila laxiflora</i>	Hojas	2272
	Ramas	4692
<i>Marila pluricostata</i>	Hojas	6905
	Ramas	4740

B. Procesamiento del material vegetal

Las diferentes partes de las plantas recolectadas fueron secadas en un horno a una temperatura no mayor de 40 °C. Después del secado, el material se cortó en trozos pequeños y se pulverizó en un Molino Thomas-Wiley modelo 4 con una malla de 2 mm.

Finalmente, las muestras se almacenan en bolsas plásticas herméticamente selladas y rotuladas con toda la información botánica.

C. Preparación de extractos.

De 30 a 50 gramos del material vegetal pulverizado, correspondiente a las partes aéreas de las plantas *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*, se le añadieron entre 300 a 500 mL de cloroformo o diclorometano y se dejó en maceración con agitación por 24 horas. El extracto se filtró y concentró en un evaporador rotatorio hasta aproximadamente 25 mL, y luego fueron transferidos a viales previamente pesados y rotulados. Los extractos clorofórmicos y/o diclorometano se secaron completamente en el Turbo Vap II con flujo de nitrógeno. Los extractos metanólicos fueron secados siguiendo el mismo procedimiento anterior y adicionalmente fueron colocados en un liofilizador LABCONCO FREZON 6, hasta obtener el extracto en forma de polvo. El % de rendimiento fue calculado para cada extracto resultando como se expone a continuación.

Nombre de la planta	Extracto	% de Rendimiento
<i>Marila laxiflora</i>	Clorofórmico de hojas	4.33
	Metanólico de hojas	3.08
	Metanólico de ramas	4.40
<i>Marila pluricostata</i>	Diclorometano de hojas	4.61
	Metanólico de ramas	4.34

II. OBTENCIÓN DE FENILCUMARINAS

Todos los ensayos para obtener las fenilcumarinas estudiadas fueron realizados en el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, España por el Doctor Dionisio Olmedo bajo la dirección del Doctor José Luis López-Pérez

A. Productos naturales

El extracto diclorometano de las hojas de la planta *Marila pluricostata* (1186.80 g) fue solubilizado en n-hexano caliente y almacenado a -20 °C obteniéndose una fracción soluble que posteriormente fue desgrasada con una solución saturada de urea en metanol. La parte remanente soluble fue fraccionada con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 4%, conduciendo a la obtención de la fracción ácida y neutra. La fracción neutra fue separada por cromatografía de columna de sílica gel utilizando una mezcla de n-hexano/acetato de etilo, y metanol generando las fracciones A, B, C, D, E, F, G, H, I y J.

En base a los datos de bioactividad, las fracciones de la E a la J, fueron sometidas a subsecuentes cromatografías en sílica gel y de columna sephadex LH donde los compuestos obtenidos fueron purificados a través de recristalizaciones repetitivas para obtener los compuestos fenilcumarinícos. Estos productos naturales fueron denotados por el símbolo **FC**, seguido de su respectivo número.

B. Productos sintéticos

Tomando como base la estructura de los productos naturales fueron preparados diversos tipos de derivados sintéticos que fueron abreviados por el símbolo **FCS**:

3-fenilcumarinas: estos derivados se prepararon a partir de la mezcla del 2,3-, 2,4- dihidroxibenzaldehído y el cloruro del ácido fenilacético en acetona seca y en presencia de K_2CO_3 anhidro y agitada a temperatura ambiente por espacio 6 horas. Transcurrido, el tiempo de reacción la acetona fue removida y el residuo lavado con agua fría y filtrado obteniéndose los productos FCS-10 y FCS-11.

4-hidroxi-3-fenilcumarina: fueron preparados de la mezcla 3-metoxifenol y dietilmalonato de fenilo, disueltos en difeniléter y calentados a $250^\circ C$ por tres horas, después de las cuales se aumentó la temperatura entre $300^\circ C$ a $310^\circ C$ por 2 horas adicionales. El crudo de reacción es enfriado y precipitado con una mezcla de tolueno-hexano (1:5), filtrado y lavándose varias veces con hexano, para dar así, las correspondientes 4-hidroxi-3-fenilcumarinas: FCS-12 y FCS-13.

4-fenilcumarinas: todos estos derivados fueron sintetizados por el Método de Peckman que consiste en la condensación de un fenol o sus derivados, con un β -ceto éster en medio ácido manteniendo una temperatura de $0^\circ C$. Por esta metodología se pudieron obtener los siguientes compuestos: FCS-15, FCS-17, FCS-18 y FCS-21.

3,4-dihidro-4-fenilcumarinas: los productos correspondientes a esta serie fueron preparados utilizando un tratamiento con $POCl_3$ y $BF_3 \cdot Et_2O$ en una

atmósfera de nitrógeno o argón mantenida a 0°C y utilizando ácido cinámico permitió la obtención de derivados 3,4-dihidro-4-fenilcumarina: FCS-38, FCS-45, FCS-53 y FCS-81.

III. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

A. ANIMALES

Ratas Sprague–Dawley machos (250-270 g), provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Panamá.

Ratas SHR (Spontaneous Hypertensive Rats) y WKY (Wistar Kyoto) provenientes de Harlan Sprague-Dawley Inc, Estados Unidos, fueron mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria.

Cada protocolo incluirá un mínimo de 6 animales.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar (Massury[®], Canadá) y se mantuvieron en jaulas en grupos de seis animales cada una con acceso libre a la comida y la bebida. El tiempo de luz estuvo determinado por ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, la temperatura se mantenía a 22 ± 1 °C.

Todos los procedimientos experimentales descritos en esta investigación se realizaron siguiendo las instrucciones del Manual "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" del *Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) of the National Research Council* .

B. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo de cirugía

Micropipetas Labnet®

Balanza analítica OHAUS® modelo AP 210S

Balanza para animales

Computador LETICA® modelo LE5007

Baños de órganos

Baño de órganos LETICA® modelo LE 13206

Baño de órganos Ugo Basile® 4050

Sistemas de registro

Transductores de fuerza (isométricos) TRI 201 LETICA®

Amplificador LETICA® modelo AMP 016/2

PowerLab/400 ADInstruments®

Polígrafo 2006 con preamplificadores ISO 506 LETICA®

C. REACTIVOS

Acetilcolina Sigma®, Fenilefrina Sigma®, Noradrenalina Sigma®, Cloruro de Potasio Sigma®, Cloruro de Sodio Sigma®, Cloruro de Potasio Sigma®, Cloruro de calcio Sigma®, Sulfato de Magnesio Sigma®, Bicarbonato de Sodio Sigma®, Glucosa Sigma®, Hidrógeno Monofosfato de Potasio Sigma®, L-NAME Sigma®, Azul de metileno Sigma®, Indometacina Sigma®, Glibenclamida Sigma®, Tetraetilamonio Sigma®, Propranolol Sigma®, Atropina Sigma®.

Las muestras de los diferentes extractos de *Marila pluricostata* y *Marila laxiflora* fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Panamá. Los productos fenilcumarínicos naturales y derivados sintéticos que se evaluaron en este estudio fueron producidos, caracterizados y proporcionados por el Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca.

D. PROCEDIMIENTOS GENERALES

En la realización de los estudios de tamizado vascular de los diferentes extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*, así como de los derivados fenilcumarínicos obtenidos de esta última, se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (250 ± 270 g). Los animales son acondicionados y fueron mantenidos bajo las condiciones especificadas anteriormente durante siete días antes de ser utilizadas en los experimentos.

Las ratas son ligeramente anestesiadas y sacrificadas por exanguinación carotídea. La arteria aorta fue rápidamente removida y colocada en solución Krebs-Henseleit cuya composición (mM) es: NaCl 118, KCl 4.74, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2 y Glucosa 11. La solución se mantiene constantemente gaseada con una mezcla de gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) con la doble finalidad de mantener la oxigenación y un pH de 7.4.

Con mucho cuidado, se procedió a la eliminación del tejido conectivo y graso que rodea la aorta, cortándola en segmentos de aproximadamente 4 mm. A través de la luz de cada segmento se introdujeron dos ganchos de acero

inoxidable (Tissue Holder Letica®), uno se fijó al baño de órganos y el otro se ató al transductor isométrico TRI 201 Letica® que está conectado a un amplificador ISO 501 y a su vez a un polígrafo Letica® 2006. Cada anillo se coloca en el baño de órganos (Letica® modelo LE 13206), conteniendo 15 mL de solución Krebs-Henseleit a 36 ± 1 °C. Los anillos fueron montados ajustando la tensión basal a 2 g y se dejaron estabilizar durante 60 minutos, renovando la solución nutritiva cada 30 minutos y reajustando la tensión cuando fuera necesario.

E. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Efecto vasodilatador de los diferentes extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata* y derivados fenilcumarina en presencia de contracción inducida por la FE.

En todas las técnicas "in vitro" empleadas en el estudio, se realizan curvas a dimetilsulfóxido (DMSO) que fue el agente utilizado para disolver todos los extractos y compuestos.

Antes de realizar cualquier procedimiento en los anillos, se comprobó la existencia de endotelio mediante la adición de una dosis submáxima de ACh en presencia de una contracción inducida con 1×10^{-6} M de FE y considerando que el endotelio está intacto si la relajación producida es ≥ 60 % con relación a la contracción.

Cada anillo fue expuesto a un solo producto a evaluar.

Después del periodo de estabilización se adicionó una concentración de 1×10^{-6} M de FE y en presencia del efecto máximo se realiza una curva concentración respuesta del extracto crudo añadiendo concentraciones

crecientes en el baño y esperando quince minutos entre cada administración. Para los extractos de *Marila laxiflora* se utilizaron concentraciones de 10-300 $\mu\text{g/mL}$; mientras que para *Marila pluricostata* las concentraciones empleadas fueron de 1-30 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de todos los derivados fenilcumarínicos utilizaron tres concentraciones crecientes 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M y 1×10^{-4} M. De estos resultados se seleccionaron los extractos y compuestos con mayor efecto relajante para realizar otras derivaciones protocolares. A partir de los resultados obtenidos con los derivados fenilcumarínicos se seleccionaron los productos con un mejor perfil de actividad para la dilucidación de los posibles mecanismos vasodilatadores.

2. Efecto hipotensor agudo de los extractos con mayor actividad vasodilatadora de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*.

Se utilizaron las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) machos de ocho a diez semanas de nacidas al igual que ratas normotensas de la cepa Wistar Kyoto (WKY), con el fin de establecer y evaluar las diferencias que puedan darse como consecuencia de la hipertensión en ratas SHR. Durante una semana previa al ensayo las ratas son colocadas en cepos, calentadas con un flexo y sometidas a la presión ejercida por el aparato para determinar la presión arterial, con la finalidad de minimizar el estrés en el animal.

Este método no traumático para el animal determina los valores de PAS, PAD, PAM y FC utilizando un detector infrarrojo que es colocado en la cola del animal y ante la presión ejercida por el manguito neumático transforma la señal mecánica en eléctrica, la cual es recogida en el computador modelo LE5007 LETICA®. Para mejorar la captación de la señal, la cola de los

animales debe ser expuestas a un flexo durante unos cinco minutos con la finalidad de favorecer la vasodilatación.

El criterio para la validez de las medidas está basado en la obtención de cinco valores consecutivos que no difieran en más de 10 mm Hg entre sí, estableciendo el valor a considerar como la media de los cinco valores.

Un número mínimo de seis ratas por tratamiento recibieron la administración intraperitoneal de los extractos de las plantas que presentaron el mayor efecto hipotensor en estudios *in vitro*. Durante este protocolo se les determinaron los parámetros de presión arterial sistólica y diastólica y frecuencia cardiaca a los tiempos 1, 3 y 6 horas después de la administración. Simultáneamente se mantuvieron dos grupos controles: un grupo SHR que recibió el vehículo (control hipertenso) y otro grupo de ratas WKY sin tratamiento (control normotenso).

3. Estudio de los mecanismos vasodilatadores de los derivados sintéticos con mayor actividad.

a. Efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en presencia de contracción inducida por KCl.

Después del periodo de estabilización se adicionan 80 mM de KCl y en presencia del efecto máximo se realiza una curva dosis respuesta del producto añadiendo en el baño concentraciones crecientes desde 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M y 1×10^{-4} M y esperando un periodo de 15 minutos entre cada adición.

b. Efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21 dependientes o independientes de la función endotelial.

Se utilizaron arterias cuyo endotelio fue removido pasando una aguja con superficie rugosa a través del lumen del vaso y se repitió el procedimiento descrito para los ensayos de actividad vascular.

La pérdida de la función endotelial se comprobó por adición de una dosis submáxima de ACh, en presencia de contracción con FE. Los anillos de aorta seleccionados fueron los que presentaron una relajación menor del 10%.

El tejido se lava varias veces y se dejó estabilizar durante 60 minutos, ajustando la tensión cada 30 minutos si fuese necesario.

Al baño se añade FE y en presencia de contracción máxima se realizó la curva dosis respuesta de cada producto a evaluar usando las concentraciones descritas previamente.

c. Evaluación de los posibles mecanismos endoteliales involucrados en el efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21.

Una vez comprobada la presencia del endotelio y luego del periodo de estabilización de 60 min, la preparación se incubó con L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) a una concentración de 1×10^{-4} M durante 20 minutos. Posteriormente se adicionó FE y en presencia de contracción máxima se realiza la curva concentración respuesta de cada producto.

Otra serie de experimentos fueron realizados utilizando el mismo protocolo, solamente que en lugar de L-NAME, se incubó con indometacina 1×10^{-5} M

durante 20 minutos, que tiene la capacidad de inhibir la dilatación dependiente de la producción de prostaciclina.

Un tercer grupo de anillos fue incubado con azul de metileno a una concentración de 1×10^{-5} M. Este compuesto es un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, cuyo efecto media la vasodilatación inducida por diversas sustancias, incluyendo al NO.

d. Evaluación de la participación de canales de potasio en el efecto vasodilatador de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18 y FCS-21.

En anillos de aorta con endotelio, se evaluó si la incubación con diferentes bloqueadores de canales de potasio influyen sobre el efecto vasodilatador de las fenilcumarinas.

Después de transcurrido el periodo de estabilización de 60 min, las preparaciones se incubaron con glibenclamida (inhibidor de los canales de potasio dependientes de ATP) a una concentración de 1×10^{-5} M durante 20 minutos o con tetraetilamonio (TEA) 1×10^{-2} M durante 20 minutos, que es un bloqueador inespecífico de canales de potasio. Luego del periodo indicado se realiza la curva concentración respuesta a cada fenilcumarina tal y como se describió previamente.

e. Efecto de atropina sobre la vasodilatación inducida por las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21

Este protocolo requirió de la comprobación el endotelio; posteriormente el tejido se lava y se estabiliza durante una hora. Acto seguido se añade Atropina 1×10^{-6} M y se incuba durante 20 minutos para luego obtener la

curva concentración respuesta de la fenilcumarina FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en presencia de la contracción inducida por 1×10^{-6} M de FE. El bloqueo con atropina fue confirmado por la adición de 1×10^{-4} M de ACh al baño y no observando respuesta alguna.

f. Efecto de propranolol sobre la vasodilatación inducida por las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21

Transcurrido el periodo de estabilización de 60 min, la preparación se incubó, durante 20 min. con una concentración de 1×10^{-6} M de Propranolol. Posteriormente se adicionó FE y cuando se alcanzó la contracción máxima se realizó la curva dosis respuesta de cada producto. El bloqueo efectivo con propranolol fue demostrado por la adición de 1×10^{-3} M de isoproterenol sin observar respuesta vasodilatadora.

g. Evaluación del efecto de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21 sobre la curva concentración respuesta a noradrenalina.

En diferentes anillos, después del periodo de estabilización se realizó una curva dosis respuesta a Noradrenalina (desde 1×10^{-10} M hasta 1×10^{-3} M) hasta alcanzar el efecto máximo. Inmediatamente después, el tejido se lavó y dejó estabilizar durante 60 minutos ajustando la tensión.

Luego se añadió al baño la máxima concentración (1×10^{-4} M) de cada uno de los derivados sintéticos, incubando durante 30 minutos, tiempo tras el cual se realizó nuevamente la curva a NA. Cada anillo fue expuesto una sola vez a cada producto.

F. ANÁLISIS y EXPRESIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS

Todos los valores utilizados en el análisis estarán expresados como promedio \pm el error estándar de la media de 6 valores en cada grupo o protocolo.

Las comparaciones entre los diferentes grupos fueron realizadas utilizando el Test de ANOVA de dos vías para gráficas lineales considerando como significativas cuando $p < 0.05$. Utilizaremos para tales fines el GraphPad Prism® 4.0.

Para el efecto hipotensor agudo, los parámetros evaluados fueron la presión arterial media y frecuencia cardiaca. Estos resultados son expresados como media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de 6 valores. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se emplea el test de ANOVA seguido de "Bonferroni", considerándose diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Utilizaremos en todas las tablas la siguiente equivalencia: * = $p < 0,05$ frente al grupo SHR.

RESULTADOS

1. Actividad vascular de los extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata*

Como parte de los objetivos de este trabajo, estaba evaluar las acciones vasodilatadoras de tres extractos de *Marila laxiflora*, clorofórmico hojas (H-CHCl₃), metanólico hojas (H-MeOH) y metanólico ramas (R-MeOH) y dos extractos de *Marila pluricostata* diclorometano y metanólico hojas (H-CH₂Cl₂ y R-MeOH, respectivamente).

En el **Cuadro IX** podemos observar que dos de los extractos obtenidos de *Marila laxiflora* produjeron un efecto vasodilatador significativo frente al observado con DMSO, solvente empleado para la disolución de los extractos. El extracto R-MeOH fue el que presentó una mayor actividad (57.90 ± 2.48), seguido por el H-CHCl₃ cuya actividad vasodilatadora fue ligeramente inferior (48.25 ± 6.09).

Con respecto a la CE₅₀, no pudimos determinar si existen diferencias significativas entre los extractos que generaron la máxima capacidad vasodilatadora, ya que para realizar el cálculo es recomendable que los productos exhiban respuestas considerables (mayores del 60%) para evitar errores con el programa empleado.

Por otra parte, determinamos que a concentraciones bajas el extracto H-MeOH de esta planta, produce relajaciones menores que el grupo DMSO, sin embargo con la concentración de 300 mcg/ml, que fue la máxima concentración empleada, no se observan diferencias significativas entre el extracto y el grupo control. (**Figura 4**)

Además, pudimos observar que todos los extractos presentaron un efecto reversible cuando el tejido fue nuevamente expuesto a la acción vasoconstrictora de la FE, lo que indica que los efectos observados no son productos de una acción citotóxica, ya que la respuesta fue contráctil fue similar a la observada con anterioridad.

Cuadro IX. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDOS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila laxiflora* REALIZADAS EN AORTAS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY. [†]= $p < 0.05$ frente a DMSO. ND= NO DETERMINADO.

Extracto	E_{MAX} (% Relajación)	CE_{50} (g/mL)
DMSO	13.30 ± 5.64	ND
H-CHCl ₃	48.25 ± 6.09 [†]	ND
R-MeOH	57.90 ± 2.48 [†]	4.7X10 ⁻⁵
H-MeOH	21.94 ± 4.96	ND

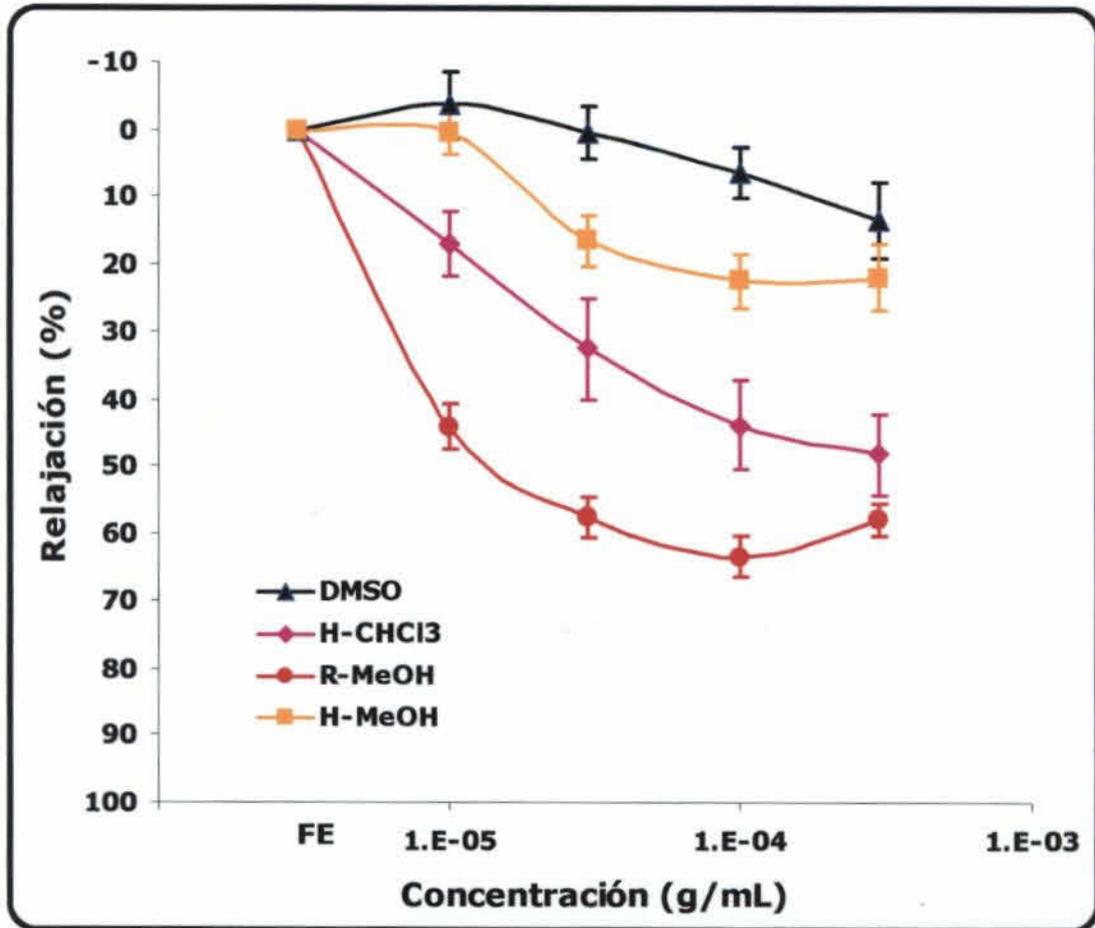


Fig. 4. Curvas concentración-respuesta obtenidas con diferentes extractos de *Marila laxiflora* y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

En cuanto a la evaluación de la actividad vascular de diferentes extractos obtenidos de *Marila pluricostata* pudimos constatar que componentes de esta planta también poseen actividad vasodilatadora significativa, que resultó ser mayor que la observada con los extractos de *Marila laxiflora* ensayados. Así como se observa en la **Figura 5 y Cuadro X** que resume los parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta. Ambos extractos, H-CH₂Cl₂ y R-MeOH mostraron una relajación mayor del 90% sin que se observaran diferencias entre ellos.

Cuadro X. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDOS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila pluricostata* REALIZADAS EN AORTAS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY. †= $p < 0.05$ frente a DMSO. ND= NO DETERMINADO.

Extracto	E_{MAX} (% Relajación)	CE_{50} (g/mL)
DMSO	13.30 ± 5.64	ND
R-MeOH	92.80 ± 4.76 [†]	6.1X10 ⁻⁶
H-CH ₂ Cl ₂	95.60 ± 2.40 [†]	9.5X10 ⁻⁶

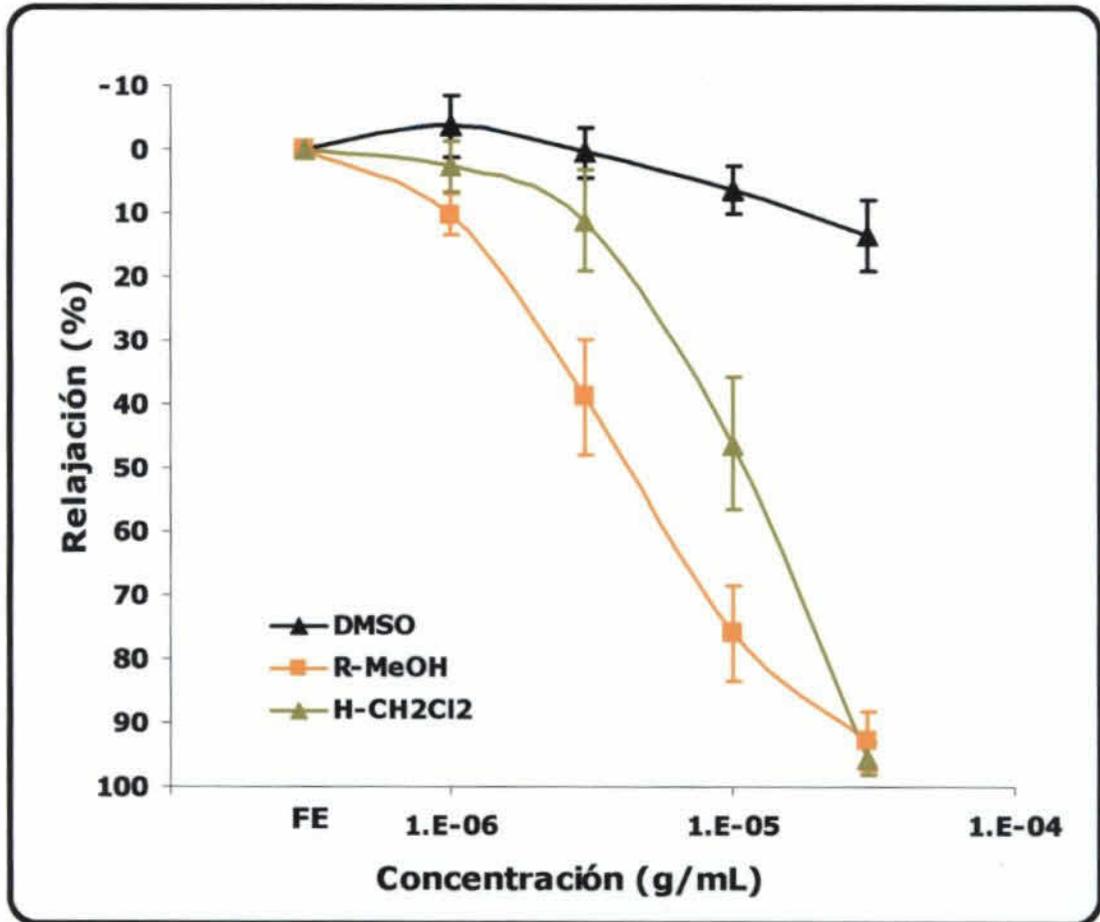


Fig. 5. Curvas concentración-respuesta obtenidas con diferentes extractos de *Marila pluricostata* y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

a. Actividad vascular del extracto de diclorometano de *Marila pluricostata* en anillos sin endotelio.

Los resultados obtenidos en anillos con endotelio intacto fueron sugerentes, tanto que nos permitimos evaluar si el efecto vasodilatador generado por el extracto de H-CH₂Cl₂ de *Marila pluricostata* era mediada, en parte o en su totalidad, por la función endotelial.

Tal como se observa en la **Figura 6 y Cuadro XI**, el efecto vasodilatador es apenas del 29.43% en anillos con endotelio denudado.

Cuadro XI. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE₅₀) OBTENIDOS DE LAS CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DEL EXTRACTO DICLOROMETADO DE LAS HOJAS DE *Marila pluricostata* REALIZADAS EN AORTAS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY CON ENDOTELIO (E⁺) Y SIN ENDOTELIO (E⁻). [†]=p<0.05 frente a DMSO; ^ψ=p<0.05 frente a (E⁺). ND= NO DETERMINADO.

Extracto	E_{MAX} (% Relajación)	CE₅₀ (g/mL)
DMSO (E+)	13.30 ± 5.64	ND
DMSO (E-)	11.06 ± 7.15	ND
H-CH ₂ Cl ₂ (E+)	95.60 ± 2.40 [†]	9.5X10 ⁻⁶
H-CH ₂ Cl ₂ (E-)	29.43 ± 8.06 ^ψ	ND

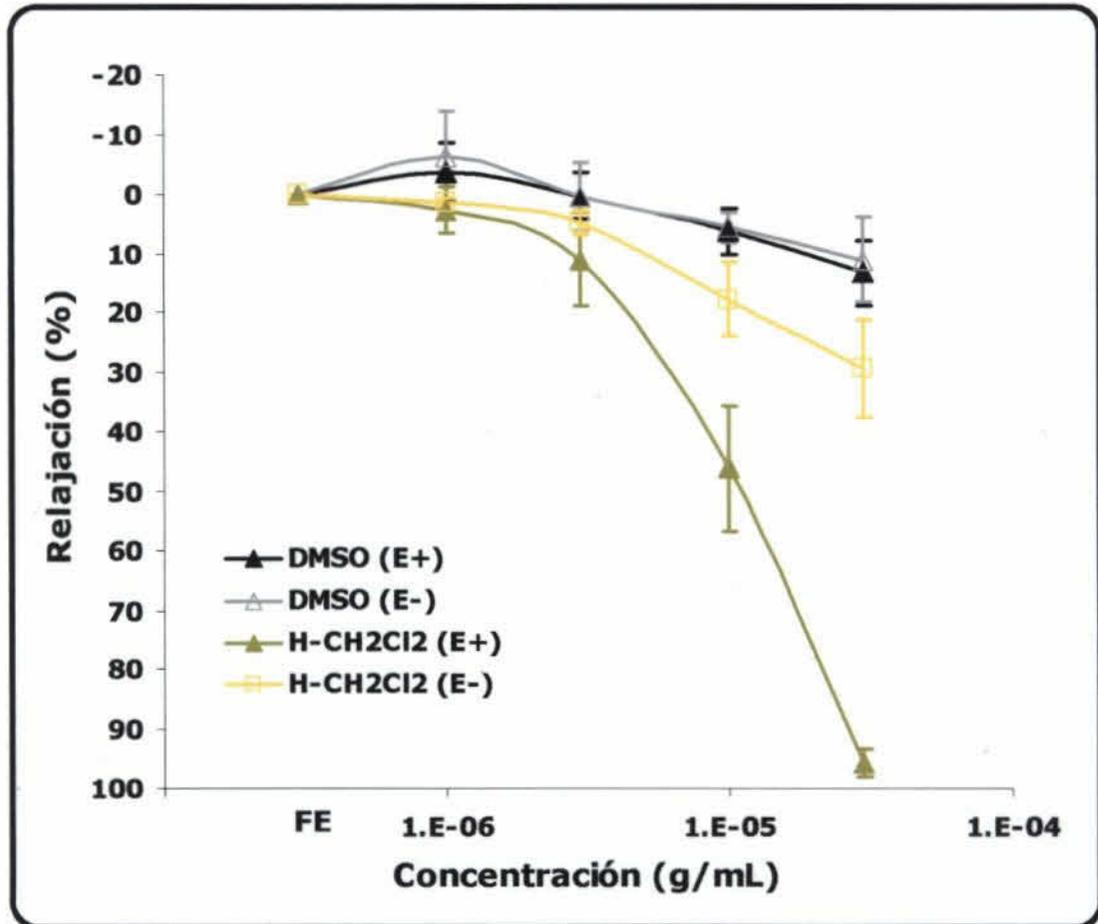


Fig. 6. Curvas concentración-respuesta obtenidas con el extracto diclorometano de *Marila pluricostata* y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) y sin endotelio (E⁻), precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

2. Efecto hipotensor agudo de los extractos de las plantas del género *Marila*.

Una vez determinadas las acciones vasculares de los diferentes extractos de las plantas en estudio, se seleccionaron para los estudios "in vivo", aquellos extractos que presentaron un mayor efecto vascular, resultando de esta selección el H-CHCl₃ y R-MeOH de la planta *Marila laxiflora* y los extractos H-CH₂Cl₂ y H-MeOH de *Marila pluricostata*.

Los efectos cardiovasculares en ratas SHR, tras la administración de 150 mg/Kg de los extractos de *Marila laxiflora* se resumen en el **Cuadro XII y XIII y las Figuras 7 y 8**.

Partimos que los grupos poseen valores de PA y FC muy similares antes de recibir ningún tratamiento.

Después de la primera hora de administración se observa que las ratas que recibieron los extractos desarrollan una PAM inferior a la inicial, en tanto que las SHR controles muestran un incremento de este parámetro en el tiempo.

Podemos observar que después de seis horas de tratamiento, las ratas que recibieron H-CH₃Cl mantienen diferencias significativas con el grupo control, pero esta desigualdad no es producida por un descenso real de la PAM, sino más bien por el incremento que desarrolla el grupo control. En cuanto a la frecuencia cardiaca (FC) los extractos no presentaron efecto significativos. Ninguno de los extractos redujo la PAM ni la FC de manera similar a los parámetros de las ratas WKY.

Cuadro XII. EFECTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA PRODUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN I.P., DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila laxiflora* EN RATAS SHR. $^{\dagger}=p<0.05$ frente a CMC.

Extracto	t= 0	t= 1	t= 3	t= 6
H-CH ₃ Cl	143.30 ± 4.79	140.40 ± 3.33 [†]	145.92 ± 6.05	137.52 ± 4.09 [†]
R-MeOH	137.08 ± 3.70	131.74 ± 2.85 [†]	144.88 ± 5.20	162.19 ± 8.03
CMC	142.79 ± 5.89	152.99 ± 4.18	154.60 ± 3.88	149.00 ± 4.37
WKYs	90.67 ± 1.85	92.57 ± 1.47	96.46 ± 2.17	93.26 ± 2.17

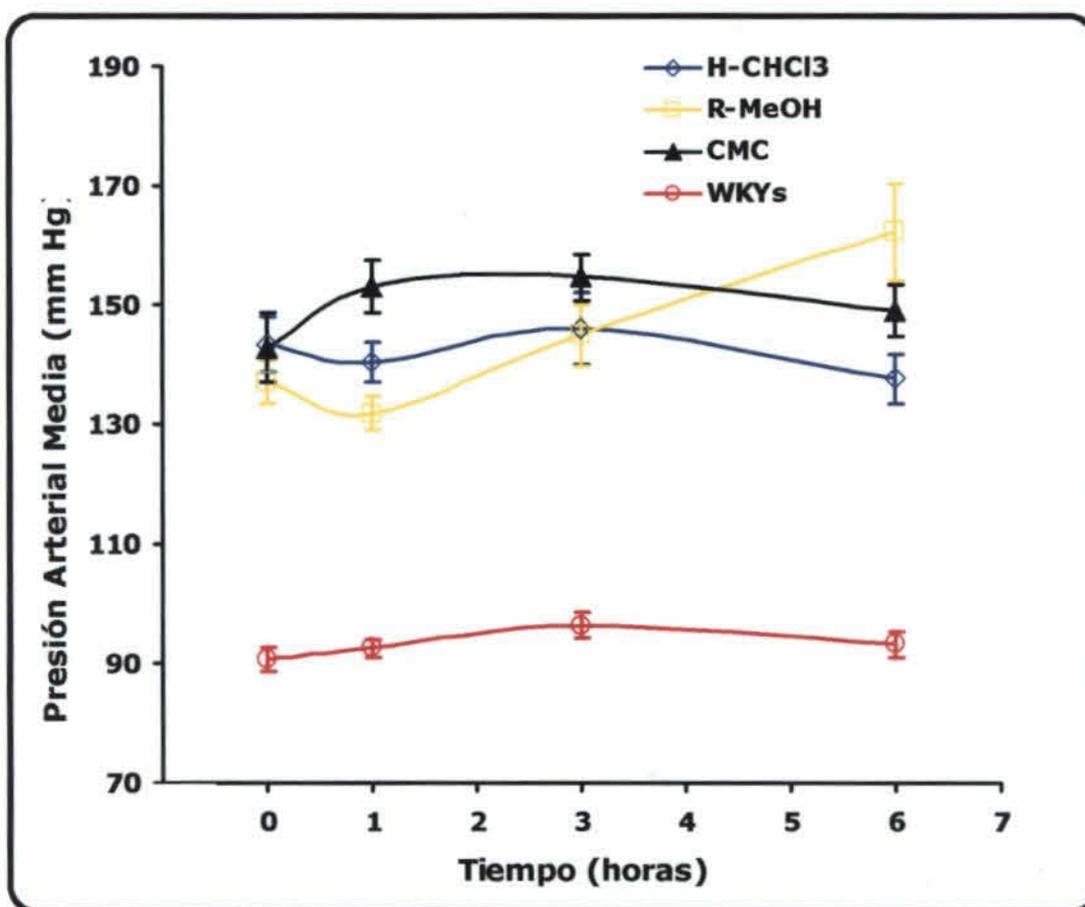


Fig. 7. Variación de la presión arterial media (PAM) (mm Hg) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de *Marila laxiflora*, SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).

Cuadro XIII. EFECTOS SOBRE LA FRECUENCIA CARDIACA PRODUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN I.P. AGUDA, DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila laxiflora* EN RATAS SHR. [†]= $p < 0.05$ frente a CMC.

Extracto	t= 0	t= 1	t= 3	t= 6
H-CH ₃ Cl	400.33 ± 6.47	386.50 ± 13.10	400.77 ± 6.66	412.83 ± 12.83
R-MeOH	395.40 ± 13.42	391.87 ± 7.92	397.77 ± 8.78	411.90 ± 3.71
CMC	407.28 ± 20.84	405.48 ± 4.55	404.8 ± 18.36	400.08 ± 8.62
WKYs	337.58 ± 9.50	329.85 ± 6.40	324.07 ± 5.34	314.87 ± 3.85

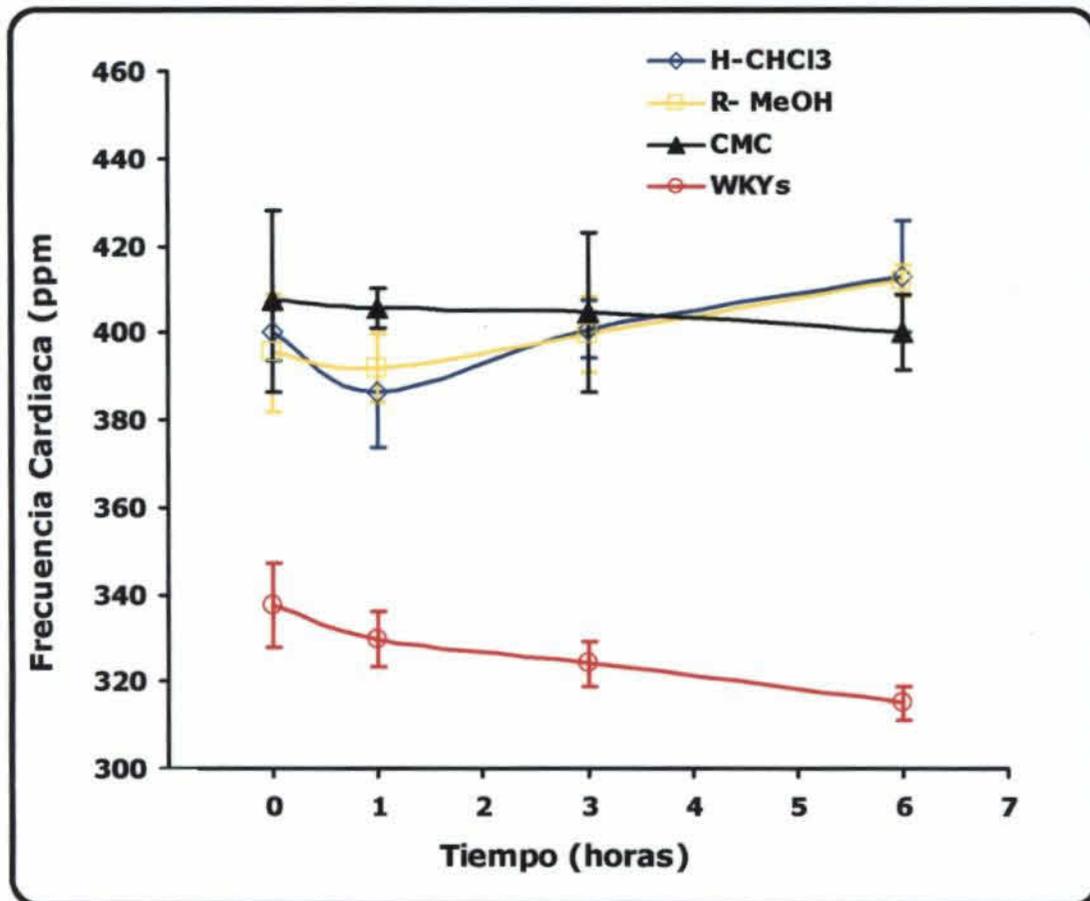


Fig. 8. Variación de la frecuencia cardiaca (FC) (ppm) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de *Marila laxiflora*, SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).

Por su parte, los extractos de *Marila pluricostata* presentan un efecto hipotensor significativo que se manifiesta desde la primera hora hasta las 6 horas después de la administración; sin embargo el efecto es más intenso a durante la primera hora tanto para H-CH₂Cl₂ (133.93 ± 2.75) como para el extracto H-MeOH (127.84 ± 4.07) en comparación con el control (158.75 ± 6.58). Los datos están resumidos en el **Cuadro XIV y la Figura 9**.

Después de la primera hora de medición, la FC se disminuyó significativamente en el grupo que recibió el extracto H-MeOH para luego aumentar durante las posteriores mediciones. Por su parte, el extracto H-CH₂Cl₂ produjo un decremento significativo de la FC durante todos periodos de medición, tal como se indica en el **Cuadro XV y Figura 10**.

Cuadro XIV. EFECTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA DE LA ADMINISTRACIÓN I.P., DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila pluricostata* EN RATAS SHR Y WKY.
[†]= $p < 0.05$ frente a CMC.

Extracto	t= 0	t= 1	t= 3	t= 6
H-CH ₂ Cl ₂	156.23 ± 3.70	133.93 ± 2.75 [†]	144.19 ± 4.97 [†]	142.31 ± 1.11 [†]
R-MeOH	147.57 ± 5.53	127.84 ± 4.07 [†]	143.09 ± 2.66 [†]	133.25 ± 4.21 [†]
TWEEN	155.4 ± 3.88	158.75 ± 6.58	160.22 ± 5.23	160.27 ± 4.62
WKYs	90.67 ± 1.85	92.57 ± 1.47	96.46 ± 2.17	93.26 ± 2.17

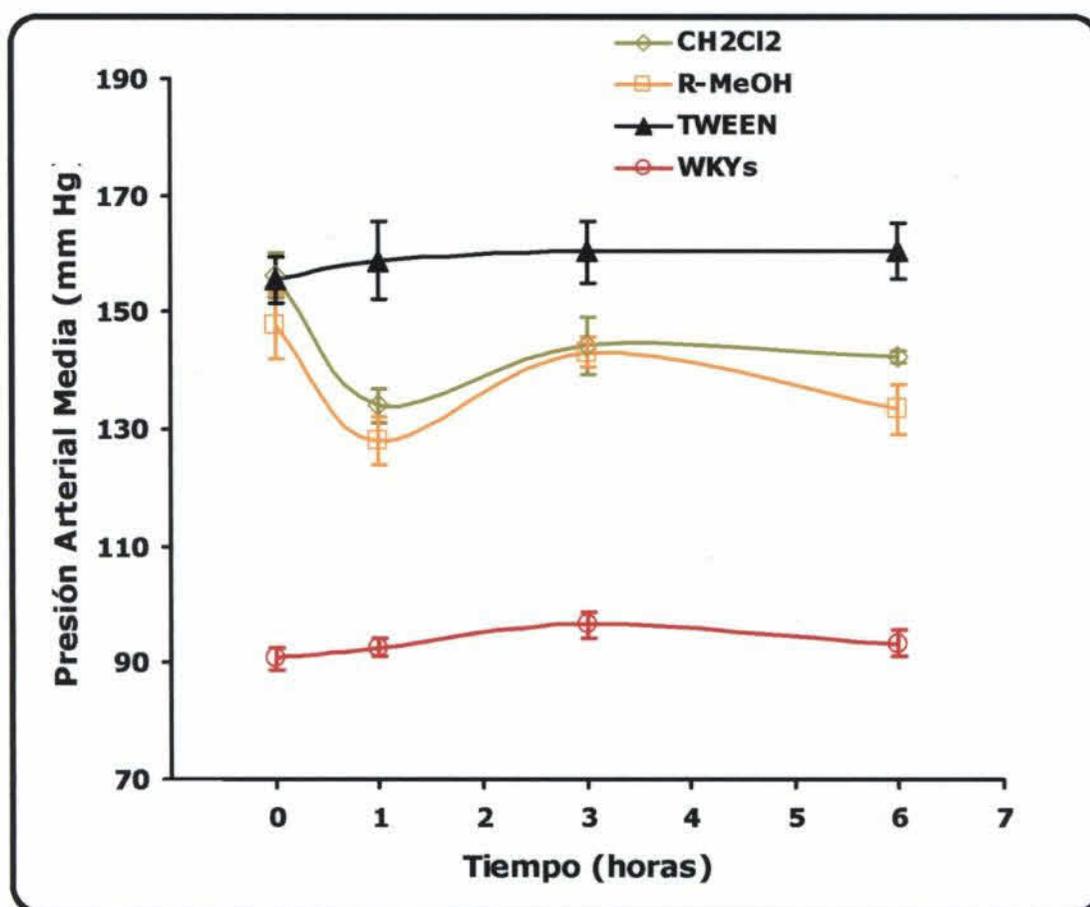


Fig. 9. Variación de la presión arterial media (PAM) (mm Hg) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de *Marila pluricostata*, SHR tratadas con el vehículo (CMC) y ratas normotensas (WKY).

Cuadro XV. EFECTOS SOBRE LA FRECUENCIA CARDIACA DE LA ADMINISTRACIÓN I.P., DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Marila pluricostata* EN RATAS SHR Y WKY. [†]= $p < 0.05$ frente a TWEEN.

Extracto	t= 0	t= 1	t= 3	t= 6
H-CH ₂ Cl ₂	383.37 ±7.82	393.83 ±12.51	369.77 ±11.83 [†]	372.23 ±14.61 [†]
R-MeOH	387.43 ±12.19	389.47 ±14.96	411.67 ±5.10	424.93 ±4.73 [†]
TWEEN	433.3 ±13.25	419.7 ±11.36	412.25 ±3.74	440.9 ±8.62
WKYs	337.58 ± 9.50	329.85 ± 6.40	324.07 ±5.34	314.87 ± 3.85

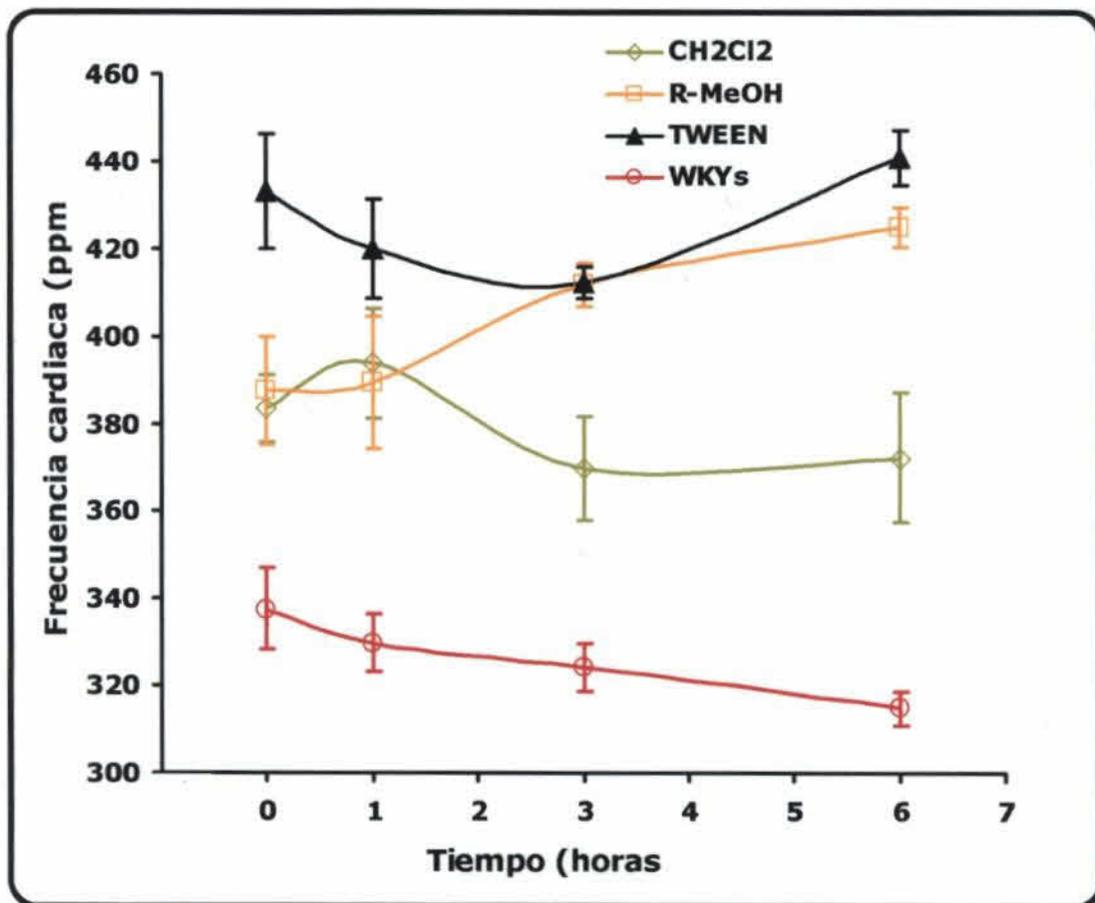


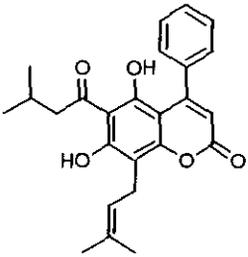
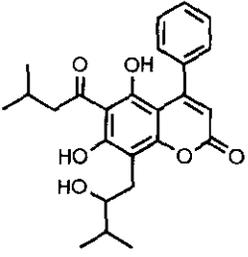
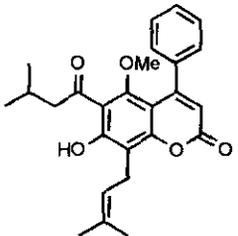
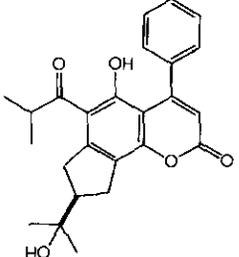
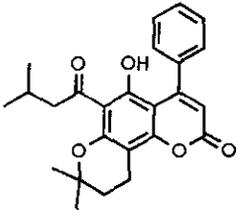
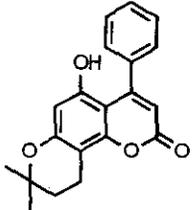
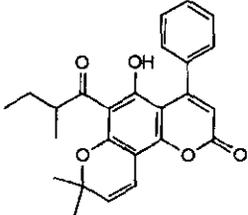
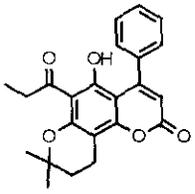
Fig. 10. Variación de la frecuencia cardiaca (FC) (ppm) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) tratadas con 150 mg/kg I.P. de diferentes extractos de *Marila pluricostata*, SHR tratadas con el vehículo (TWEEN) y ratas normotensas (WKY).

3. Screening de la actividad vascular de diferentes productos, naturales y de síntesis, obtenidos del extracto diclorometano de *Marila pluricostata*

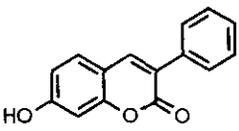
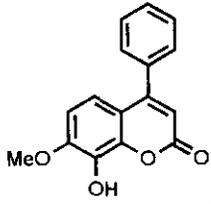
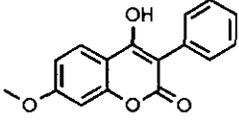
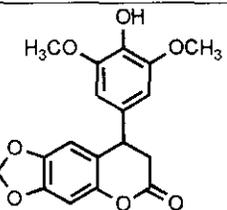
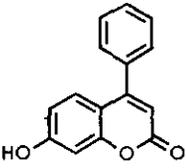
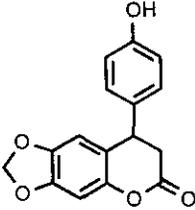
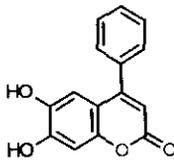
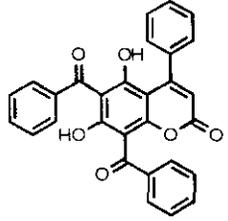
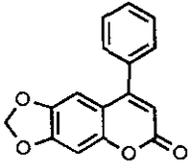
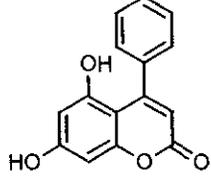
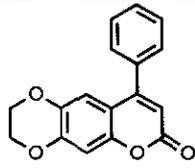
Como se señaló en el capítulo de la Metodología, los productos naturales obtenidos de *Marila pluricostata*, así como la obtención de los productos de síntesis, fue realizada en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, España; por el Dr. Dionisio Olmedo, bajo la orientación y tutoría del Dr. José Luis López-Pérez.

Las estructuras químicas correspondientes para cada uno de los productos, naturales y de síntesis, evaluados se observan en los **Cuadro XVI y XVII.**

Cuadro XVI. ESTRUCTURAS Y PESOS MOLECULARES (PM) DE LAS *Fenilcumarinas* DE ORIGEN NATURAL (FC)

CLAVE USAL	ESTRUCTURAS	CLAVE USAL	ESTRUCTURAS
FC-1	 <p>PM 406</p>	FC-11	 <p>PM 424</p>
FC-1a	 <p>PM 420</p>	FC-12/13 Mezcla	 <p>PM 406</p>
FC-3	 <p>PM 406</p>	FC-15	 <p>PM 406</p>
FC-4	 <p>PM 404</p>	FC-16	 <p>PM 378</p>

Cuadro XVII. ESTRUCTURAS Y PESOS MOLECULARES (PM) DE LAS *Fenilcumarinas* DE SÍNTESIS (FCS)

CLAVE USAL	ESTRUCTURAS	CLAVE USAL	ESTRUCTURAS
FCS-11	 PM 238	FCS-21	 PM 268
FCS-12	 PM 268	FCS-38	 PM 344
FCS-15	 PM 238	FCS-45	 PM 284
FCS-17	 PM 254	FCS-53	 PM 462
FCS-18	 PM 266	FCS-54	 PM 462
		FCS-81	 PM 280

De los productos naturales evaluados pudimos observar actividades vasculares variables como se describe el **Cuadro XVIII**. En este sentido, como se observa en la **Figura 11**, los productos FC-1a y FC-15 muestran una tendencia hacia la generación de actividad contráctil.

Otros productos naturales evaluados bajo el mismo protocolo de actividad vascular, en anillos de ratas Sprague Dawley, desarrollaron diferentes grados de actividad vasodilatadora, así observamos que FC-16 y FC-4 generaron una respuesta entre el 21 y 26% de relajación (**Figura 12**); mientras que FC-12/13 alcanzó un efecto vasodilatador cercano al 40% (**Figura 13**).

Los efectos vasodilatadores más significativos observados con las fenilcumarinas de origen natural fueron generados por FC-11, FC-1 y FC-3, en ese mismo orden de efectividad (**Figura 14**).

Después de exponer el tejido a cualquiera de estos últimos tres (3) productos, se observó una pérdida total de la reactividad frente a una nueva contracción con FE, lo que hace denotar que, aunque pudieran existir efectos vasculares importantes, no se pueden diferenciar de las posibles acciones citotóxicas posiblemente generadas por los productos. Este resultado hace que no se pueda ahondar en los mecanismos de acción posiblemente implicados en la respuesta vascular observada.

Cuadro XVIII. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE FENILCUMARINAS NATURALES AISLADAS DE *Marila pluricostata* EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS SPRAGUE DAWLEY CON ENDOTELIO, PRECONTRAÍDAS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a DMSO. ND= NO DETERMINADO.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FC-1a	-0.75 ± 8.85	ND
FC-15	-13.45 ± 11.73	ND
FC-4	$26.34 \pm 6.01^{\dagger}$	ND
FC-16	$21.12 \pm 4.02^{\dagger}$	ND
FC-12/13	$39.17 \pm 8.78^{\dagger}$	ND
FC-3	$79.89 \pm 4.94^{\dagger}$	8.16×10^{-7}
FC-1	$91.92 \pm 3.30^{\dagger}$	3.50×10^{-6}
FC-11	$97.71 \pm 0.84^{\dagger}$	4.74×10^{-6}
DMSO	$4.93 \pm 1.84^{\dagger}$	ND

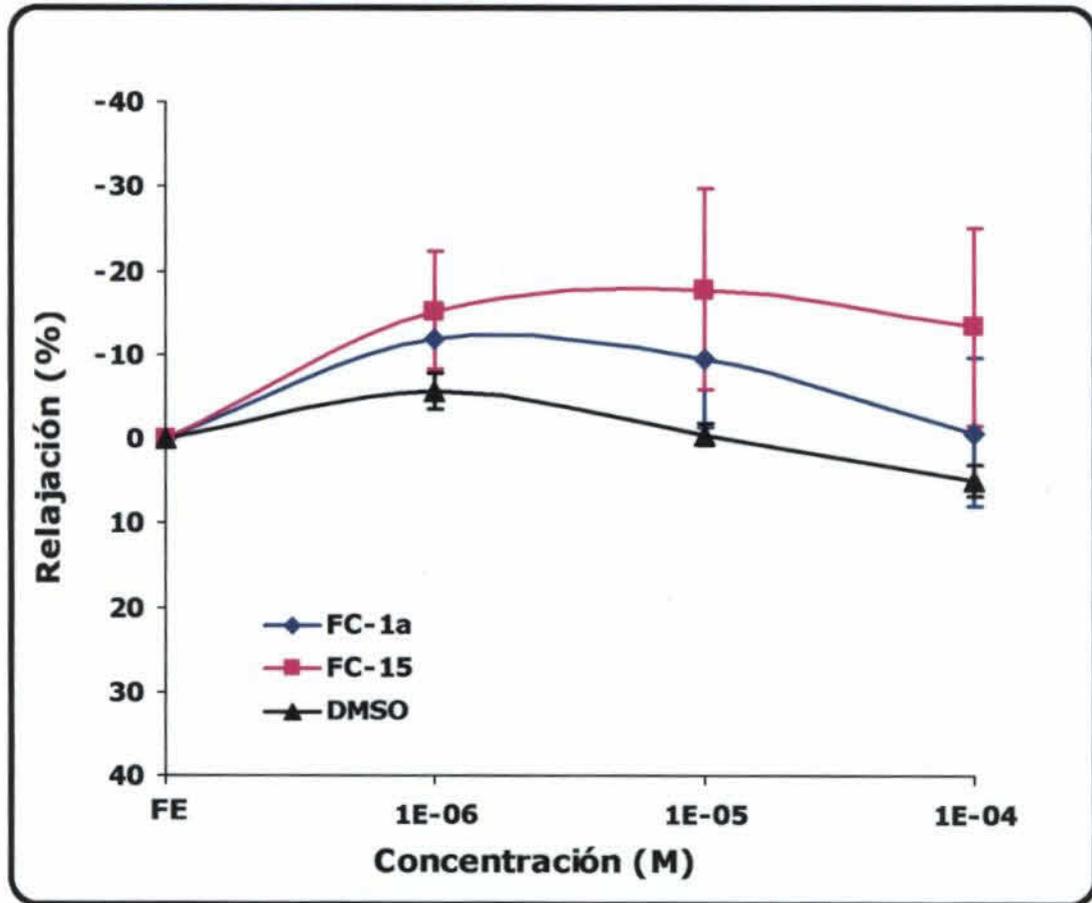


Fig. 11. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-1a, FC-15 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

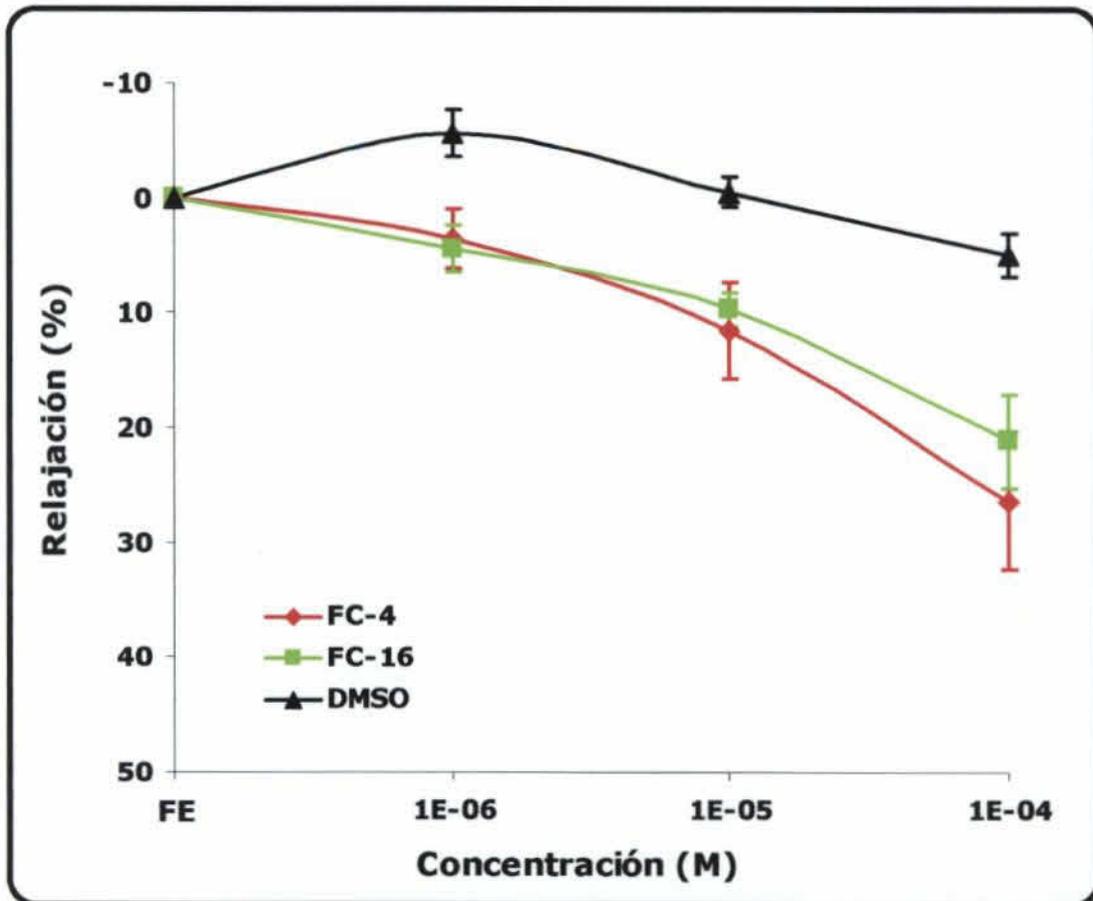


Fig. 12. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-4, FC-16.y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

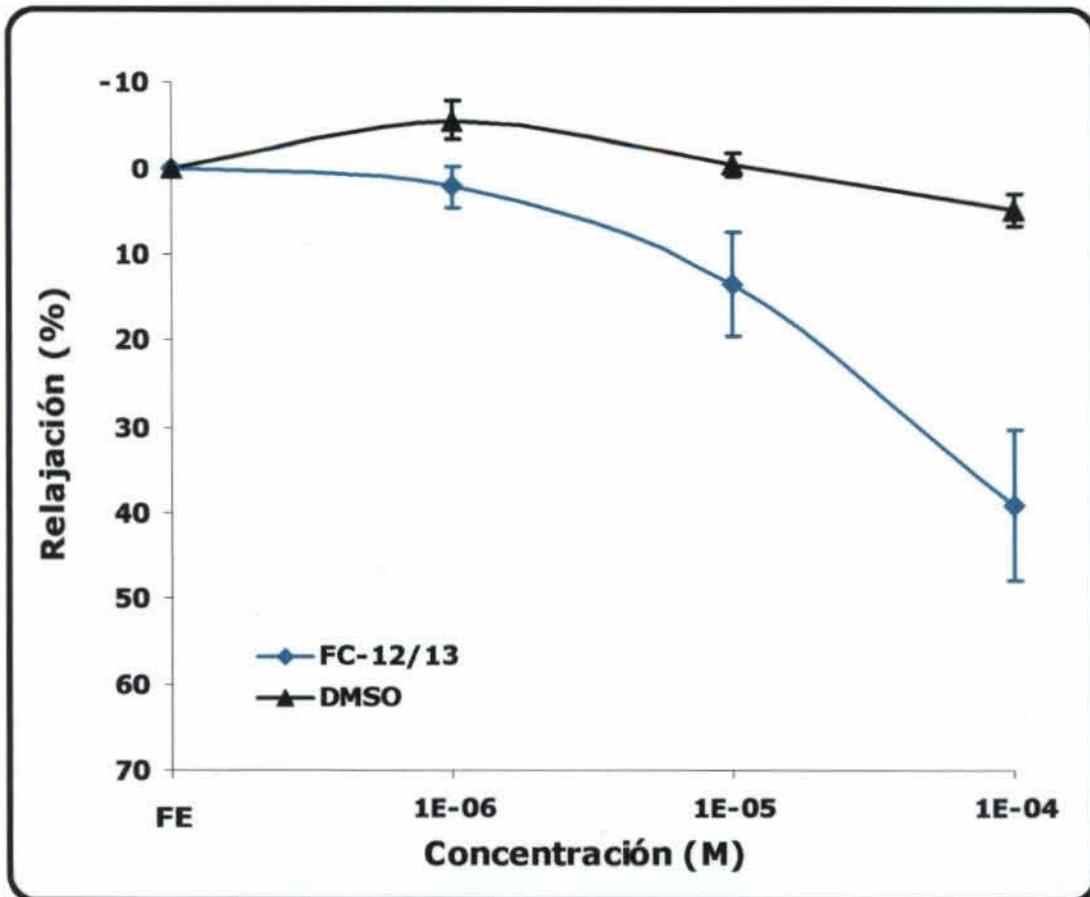


Fig. 13. Curva concentración-respuesta obtenida con la fenilcumarina natural FC- 12/13 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

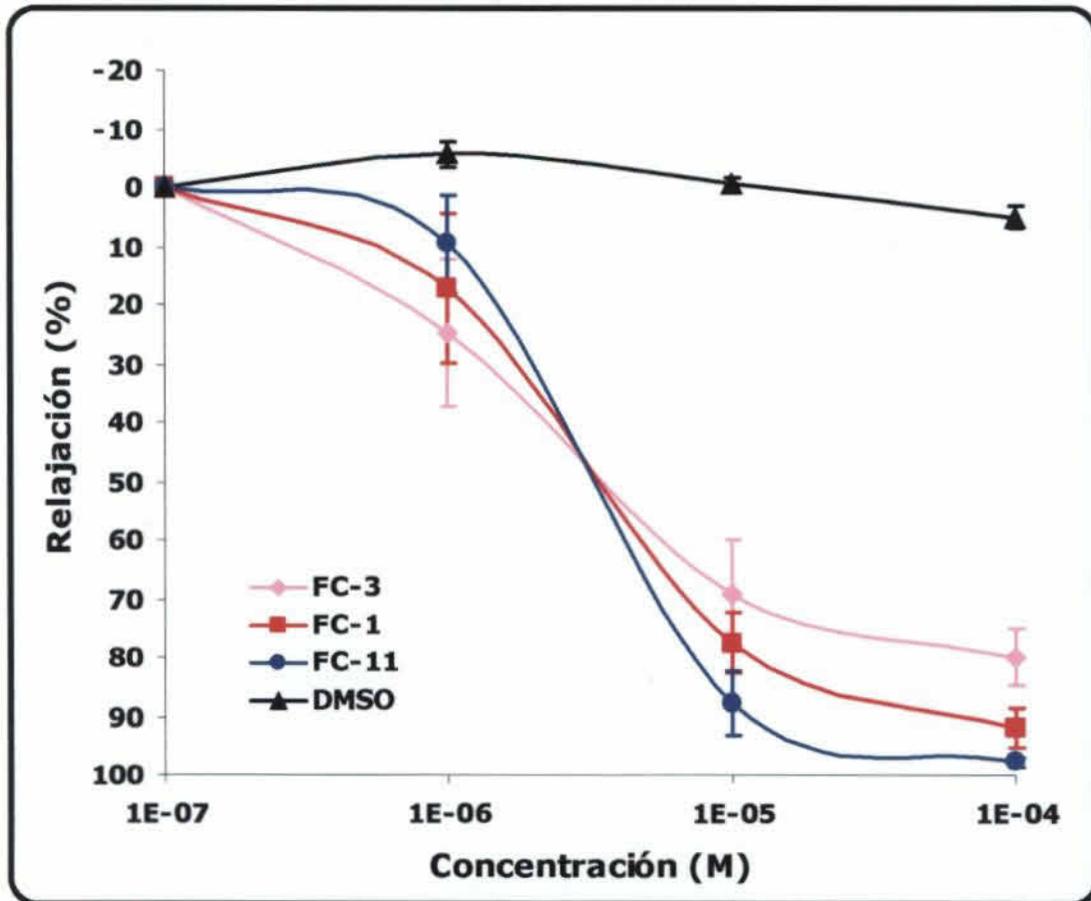


Fig. 14. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas naturales FC-1, FC-3, FC-11 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

Lo que respecta a las fenilcumarinas de síntesis, el perfil de actividad vascular fue igualmente variable. Como se muestra en el **Cuadro XIX**, sólo uno de los productos, específicamente el FCS-38, mostró actividad contráctil significativa (**Figura 15**), el resto de los productos evaluados desarrollaron un efecto vasodilatador que fue mayor del 85 % para FCS-15, FCS-18, FCS-21 y FCS-81. Para el resto de los productos ensayados se observó un perfil de eficacia menor que las fenilcumarinas ya mencionadas; aunque el efecto vasodilatador también fue significativo con respecto al control DMSO, a excepción de FCS-53 que presentó la menor respuesta. Las **Figuras 16, 17** y **18** presentan estos resultados.

Cuadro XIX. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE FENILCUMARINAS SINTÉTICAS EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS SPRAGUE DAWLEY CON ENDOTELIO, PRECONTRAÍDAS CON $FE\ 1 \times 10^{-6}$ M. $^{\dagger} = p < 0.05$ frente a DMSO. ND= NO DETERMINADO.

Producto	E_{MAX} ($X \pm E.S$)	CE_{50}
FCS-38	$-85.10 \pm 20.84^{\dagger}$	ND
FCS-11	$28.41 \pm 6.53^{\dagger}$	ND
FCS-12	$30.21 \pm 8.37^{\dagger}$	ND
FCS-53	10.25 ± 5.95	ND
FCS-17	$57.34 \pm 7.69^{\dagger}$	6.51×10^{-5}
FCS-45	$44.50 \pm 4.87^{\dagger}$	ND
FCS-15	$91.76 \pm 2.65^{\dagger}$	1.38×10^{-5}
FCS-18	$85.31 \pm 4.86^{\dagger}$	6.74×10^{-6}
FCS-21	$89.92 \pm 4.12^{\dagger}$	6.46×10^{-6}
FCS-54	$75.11 \pm 7.11^{\dagger}$	4.00×10^{-5}
FCS-81	$85.51 \pm 2.61^{\dagger}$	4.74×10^{-6}
DMSO	$4.93 \pm 1.84^{\dagger}$	ND

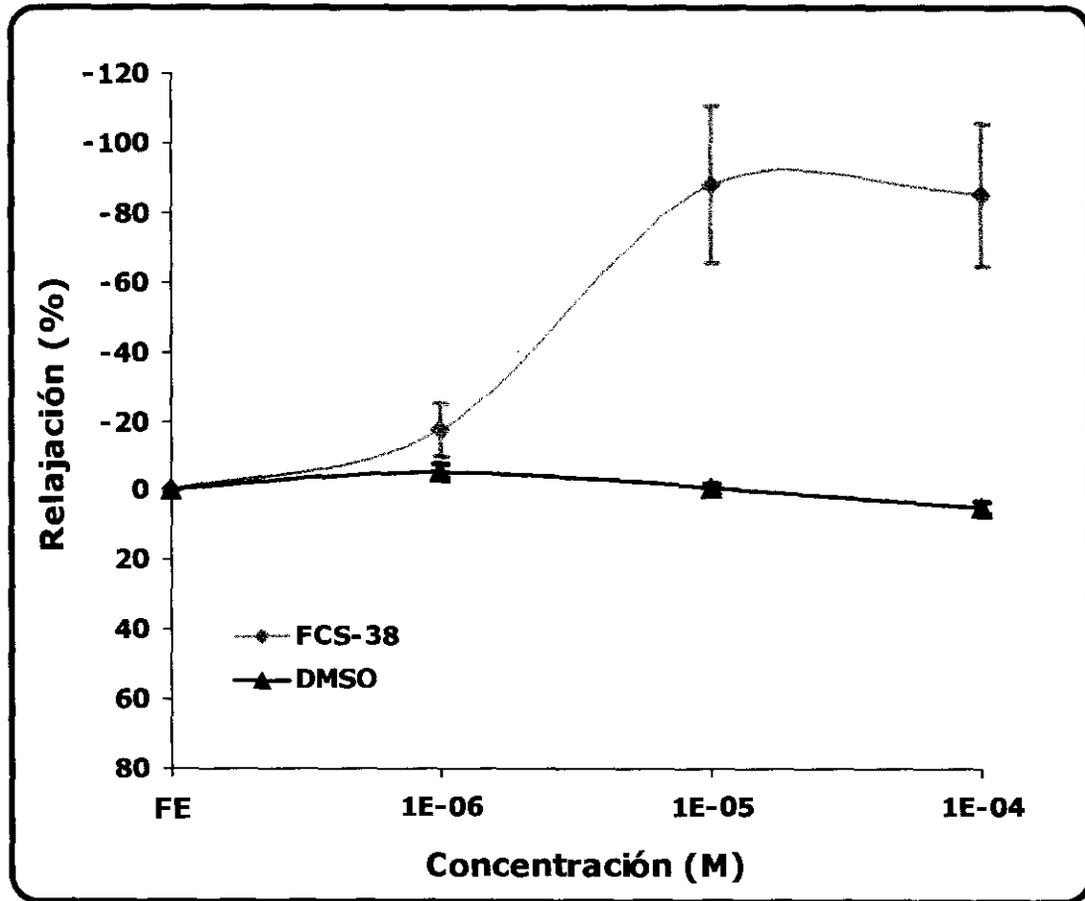


Fig. 15. Curva concentración-respuesta obtenida con la fenilcumarina de síntesis FCS-38 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

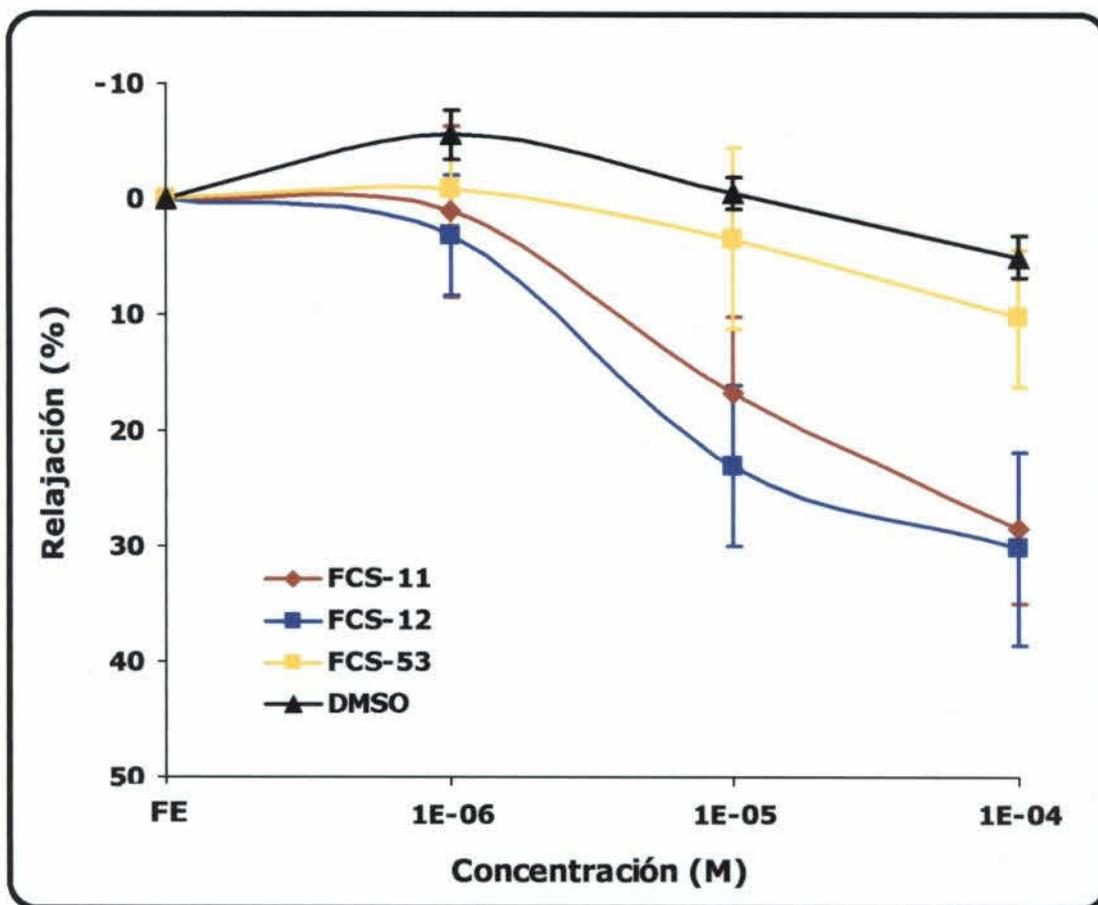


Fig. 16. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-11, FCS-12, FCS-53 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

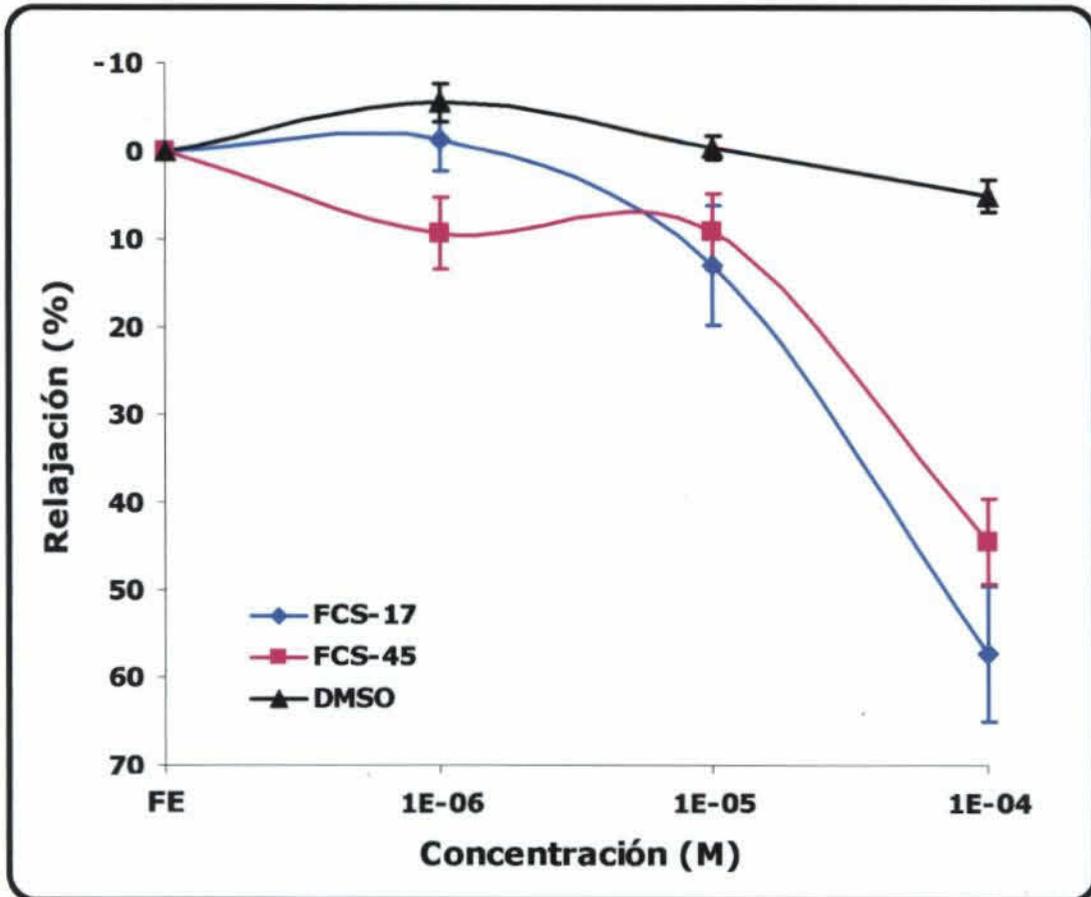


Fig. 17. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-17, FCS-45 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

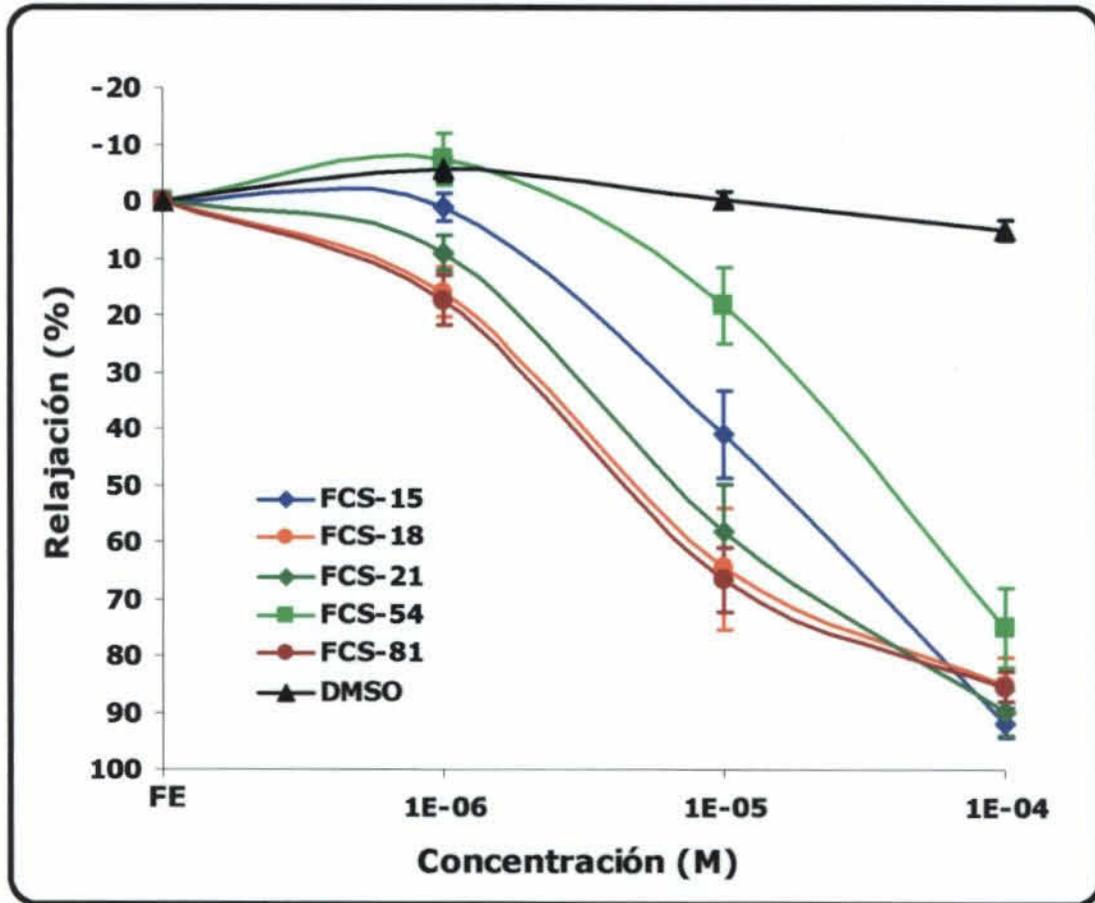


Fig. 18. Curvas concentración-respuesta obtenidas con las fenilcumarinas de síntesis FCS-15, FCS-18, FCS-21, FCS-54, FCS-81 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

4. Descripción de los mecanismos de acción implicados en la actividad vascular de fenilcumarinas sintéticas con mejor perfil

Como hemos observado en este grupo de experimentos, fueron las fenilcumarinas de síntesis FCS-15, FCS-18, FCS-21, FCS-54 y FCS-81 las que generaron un mayor efecto vasodilatador. Dada la similitud en la respuesta máxima, reversibilidad del efecto relajante y relación estructural seleccionamos tres (3) fenilcumarinas de síntesis que fuesen evaluadas en ensayos para profundizar y conocer sobre los posibles mecanismos de acción implicados en la actividad vascular desarrollada. Bajo este precepto seleccionamos los compuestos FCS-15, FCS-18 y FCS-21.

a. Efecto vascular de FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en contracción inducida por KCl

El comportamiento vasodilatador de los productos puede variar de acuerdo al tipo de agente vasoconstrictor empleado, por lo que parte de los protocolos descritos para corroborar las acciones, es medir la capacidad dilatadora no sólo frente a FE, si no también frente a KCl. En esta serie de experimentos pudimos observar que al contraer los anillos con esta sal, la actividad vasodilatadora máxima de los compuestos FCS-15, FCS-18 y FCS-21 se reduce de manera significativa cuando se compara con el efecto vasodilatador desarrollado en aortas contraídas con FE (**Cuadro XX y Figuras 19, 20 y 21**). La reducción más significativa se observó con FCS-18 que al ser ensayado frente a una contracción con FE desarrolló un efecto máximo de 89.9% de relajación, en comparación con la actividad máxima frente a KCl que fue de 50.8% (Δ 47.1%). Como ya se mencionó, FCS-15 y

FCS-21 también desarrollaron una menor relajación en anillos precontraídos con KCl, presentando una diferencia de 33.7 y 42.8% respectivamente, con respecto al efecto generado frente a FE.

Cuadro XX. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE FENILCUMARINAS SINTÉTICAS EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO, PRECONTRAÍDAS CON FE 1×10^{-6} M O CON 80 mM KCl. $^{\dagger} = p < 0.05$; $^{\Psi} = p < 0.05$ frente a FE. ND= NO DETERMINADO.

Producto	FE		KCl	
	E_{MAX}	CE_{50} (M)	E_{MAX}	CE_{50} (M)
FCS-15	$91.76 \pm 2.65^{\dagger}$	1.38×10^{-5}	$58.11 \pm 3.46^{\dagger\Psi}$	7.48×10^{-5}
FCS-18	$85.31 \pm 4.86^{\dagger}$	6.74×10^{-6}	$34.49 \pm 3.74^{\dagger\Psi}$	ND
FCS-21	$89.92 \pm 4.12^{\dagger}$	6.45×10^{-6}	$42.76 \pm 3.99^{\dagger\Psi}$	ND
DMSO + FE	4.93 ± 1.84	ND	-----	-----
DMSO + KCl	-----	-----	2.36 ± 1.53	ND

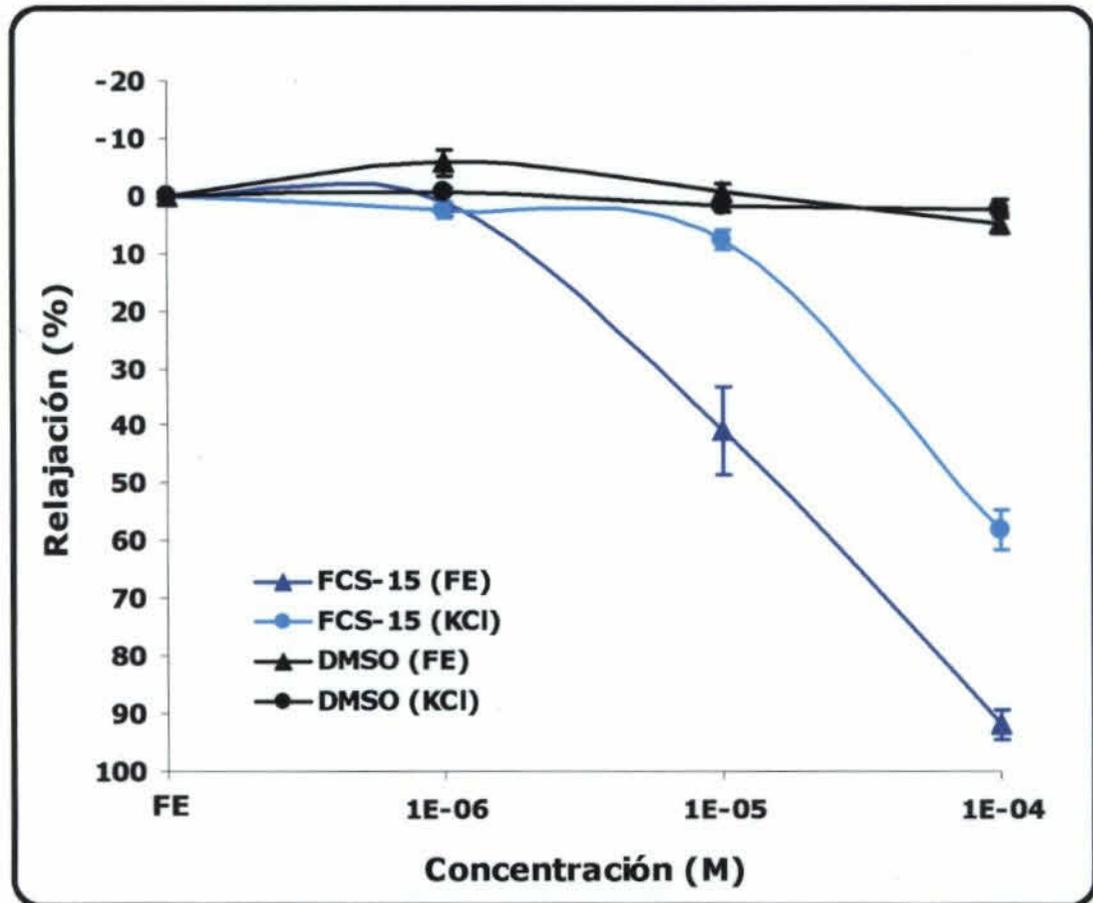


Fig. 19. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 y y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.

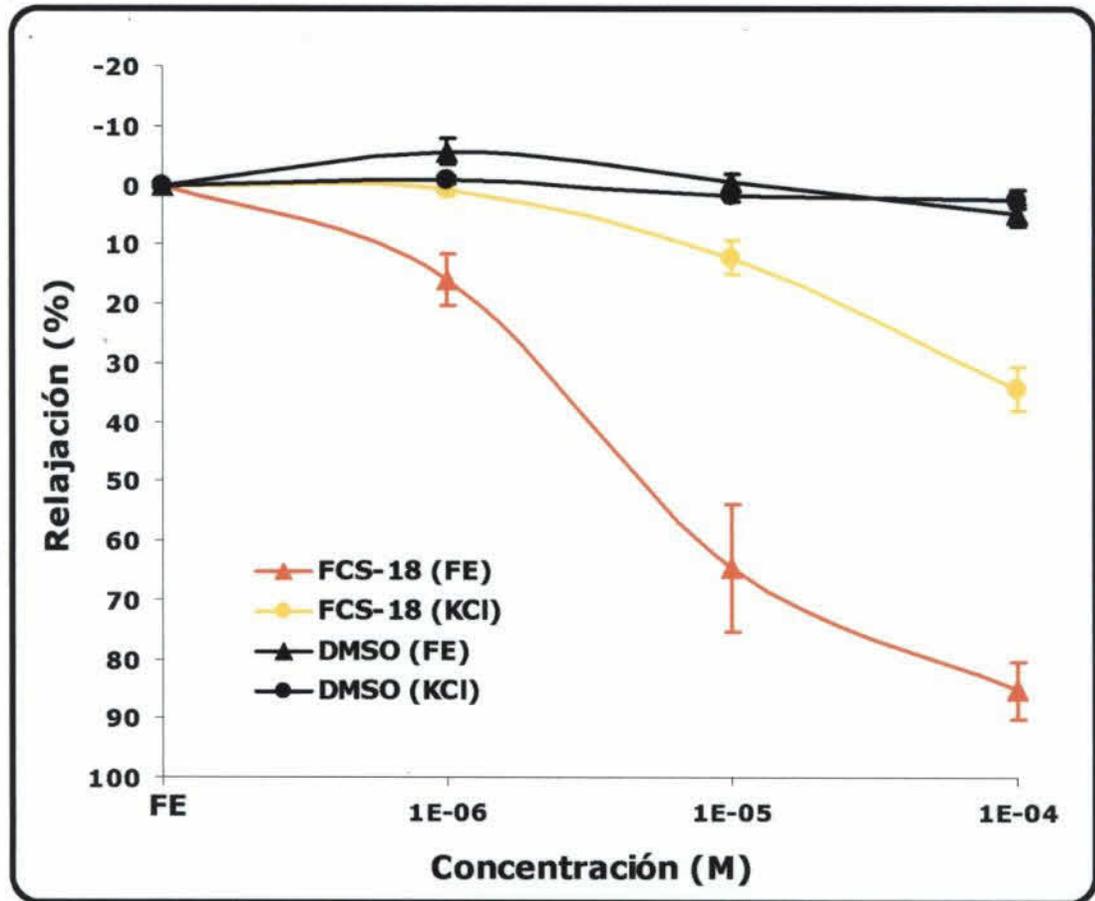


Fig. 20. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.

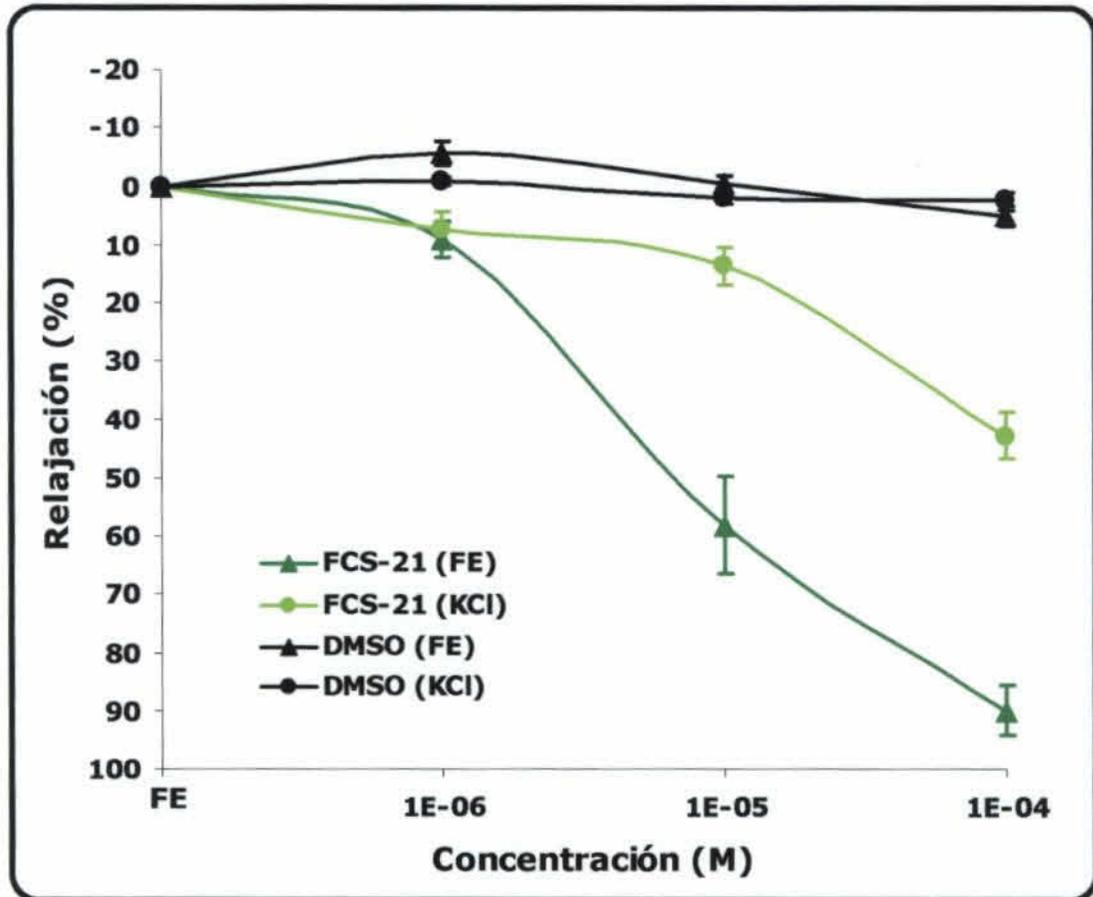


Fig. 21. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 y dimetilsulfóxido (DMSO), en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M o con KCl 80 mM.

b. Efecto vascular de FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta con endotelio denudado

Después de determinar la actividad vasodilatadora, nuestro objetivo fue dilucidar si dicha actividad era mediada, en su totalidad o en parte, por la función endotelial. Para lograr este objetivo se realizaron curvas concentración-respuesta en anillos de aorta con endotelio denudado y se observó que el efecto vasodilatador máximo para el compuesto FCS-15 se mantiene, sin embargo, observamos ligera variación en cuanto a la CE_{50} , que en anillos con endotelio intacto fue de 1.38×10^{-5} M, mientras que en anillos de aorta sin endotelio fue de 2.29×10^{-5} M. (**Figuras 22, 23 y 24**)

La ausencia de la función endotelial afectó significativamente la actividad vasodilatadora máxima del FCS-18. Se observa en el **Cuadro XXI**, que en anillos de aorta con endotelio el efecto máximo alcanzado con FCS-18 fue de 85.3% de relajación y en anillos a los que se les retira la capa endotelial dicha actividad se reduce en aproximadamente un 49%, lo que refleja que parte del efecto de este compuesto depende de componentes dilatadores derivados del endotelio.

La dilatación arteriolar por FCS-21 en anillos sin endotelio se modificó en cuanto al $Emax$ y CE_{50} (**Cuadro XXI**). Obsérvese una ligera pero significativa reducción del efecto vasodilatador cuando se retira el endotelio. En relación a la CE_{50} , se observa que en prevalencia de la función endotelial fue de 6.45×10^{-6} M y en ausencia de dicha función la CE_{50} fue de 3.08×10^{-5} M.

Cuadro XXI. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE FENILCUMARINAS SINTÉTICAS EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO PRESENTE (E^+) Y DENUDDADO (E^-) CONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. $^{\dagger} = p < 0.05$ frente a DMSO; $^{\psi} = p < 0.05$ frente a E^+ . ND = NO DETERMINADO

Producto	E_{MAX}	CE_{50} (M)		
		E^+	E^-	
FCS-15	$91.76 \pm 2.65^{\dagger}$	1.38×10^{-5}	$89.16 \pm 5.35^{\dagger}$	2.29×10^{-5}
FCS-18	$85.31 \pm 4.86^{\dagger}$	6.74×10^{-6}	$36.33 \pm 4.46^{\dagger\psi}$	ND
FCS-21	$89.92 \pm 4.12^{\dagger}$	6.45×10^{-6}	$78.08 \pm 5.95^{\dagger}$	3.08×10^{-5}
DMSO + FE	4.93 ± 1.84	ND	3.30 ± 6.66	ND

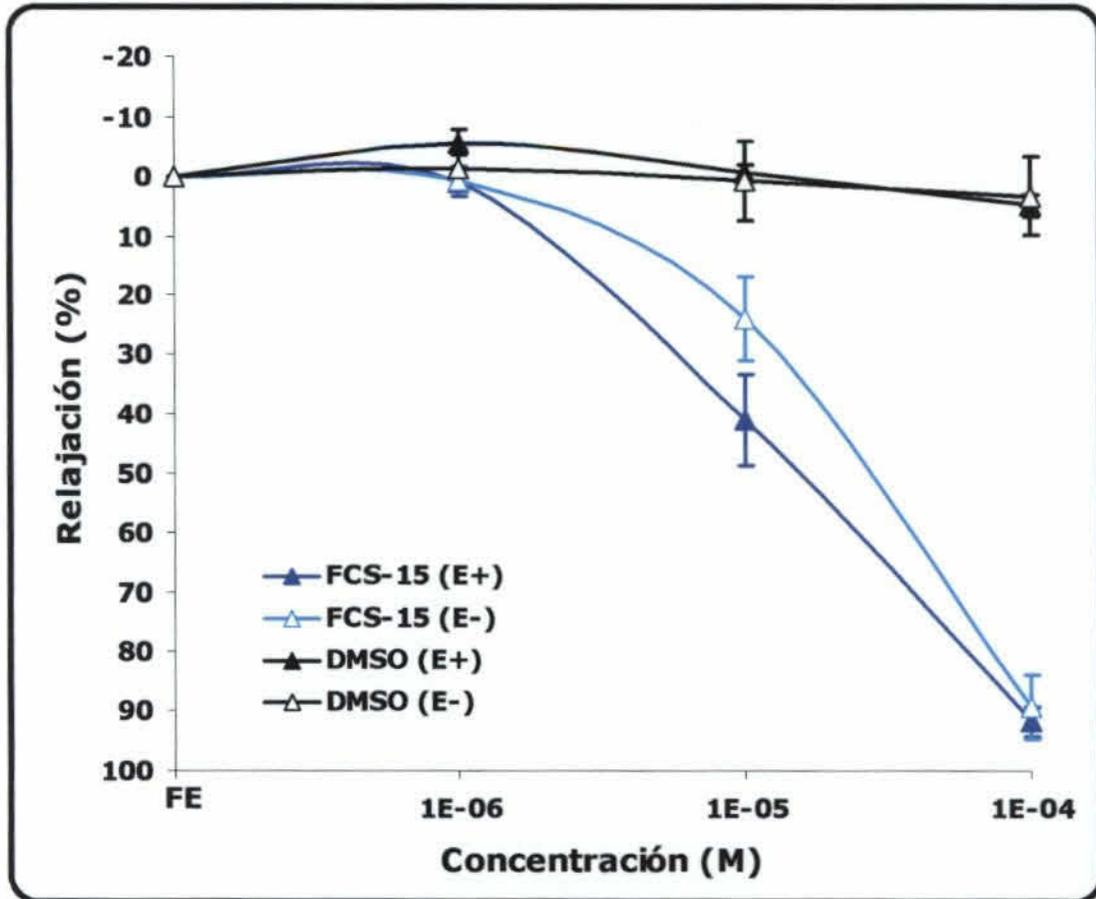


Fig. 22. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente (E⁺) o denudado (E⁻) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

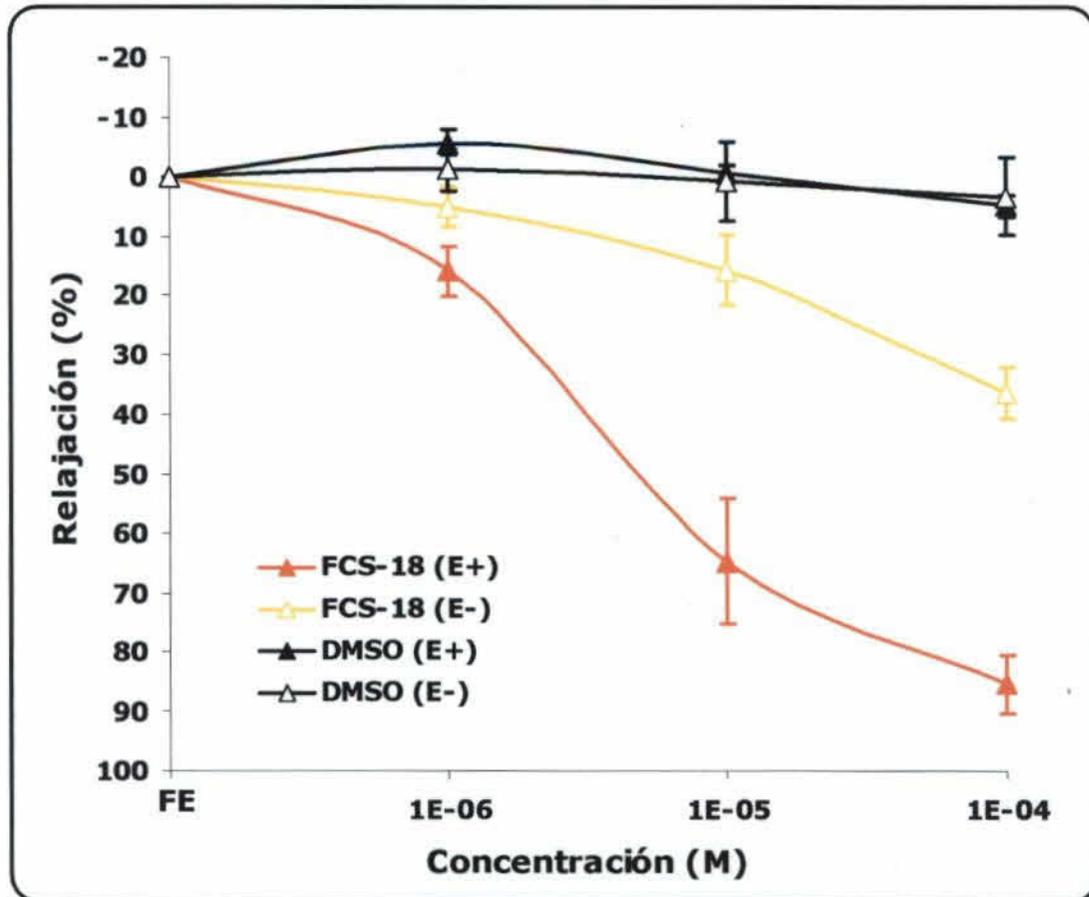


Fig. 23. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente (E⁺) o denudado (E⁻) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

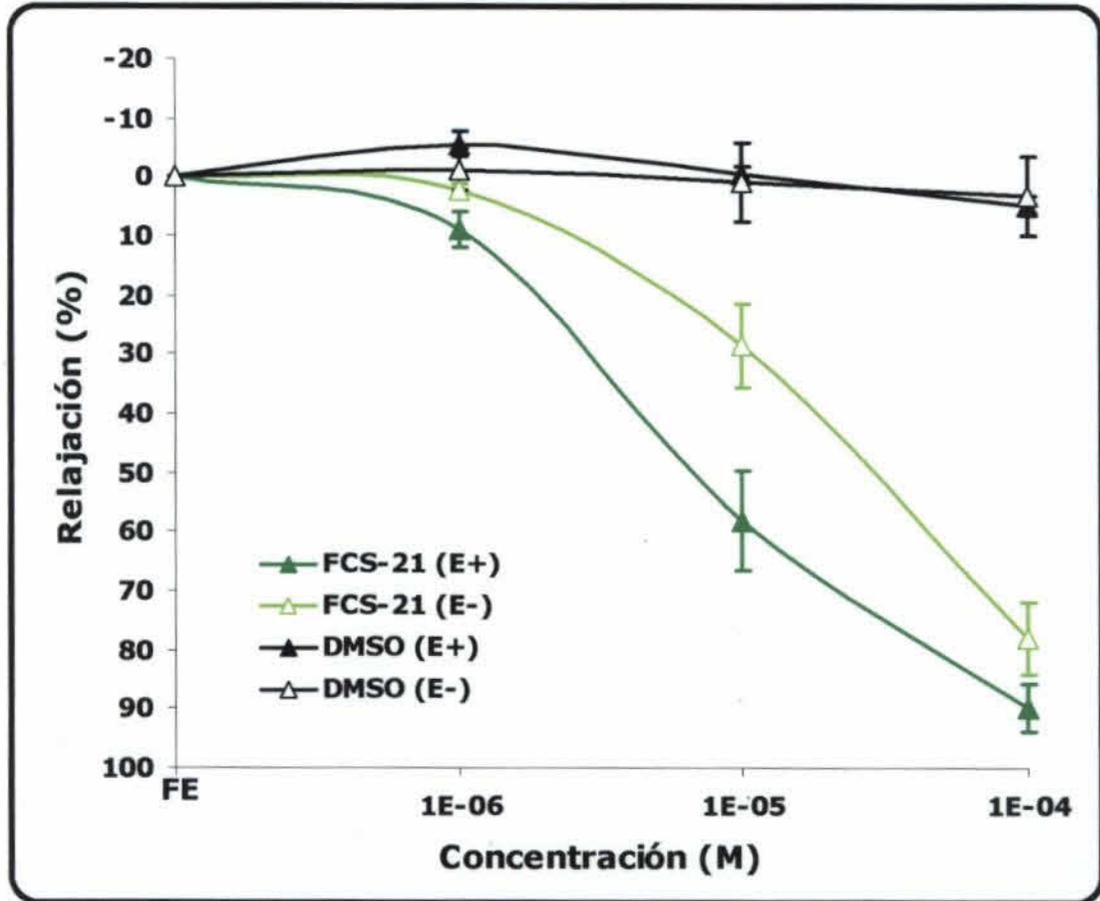


Fig. 24. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 y dimetilsulfóxido (DMSO) en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio presente (E⁺) o denudado (E⁻) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

c. Dilucidación de los mecanismos implicados en el desarrollo del efecto vascular generado por FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta

En vista que cuando a los anillos de aorta se les retiró el endotelio, la actividad vascular de las fenilcumarinas ensayadas se modificaron en uno o ambos parámetros a saber, E_{max} o CE_{50} , se considera de interés poder determinar cuál o cuales de los factores derivados o dependientes del endotelio podrían estar implicados en el desarrollo de la vasodilatación arterial por FCS-15, FCS-18 y FCS-21.

Para lograr este objetivo se emplearon los protocolos de realización de curvas concentración-respuesta en anillos de aorta fueron incubados con L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), Indometacina, inhibidor de la síntesis de prostaciclina o azul de metileno que inhibe la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs).

Todos los protocolos de incubación modificaron la CE_{50} del FCS-15, tal y como se muestra en el **Cuadro XXII y Figura 25** sin embargo, sólo la inhibición de NOS por L-NAME o el bloqueo de GCs por Azul de metileno modifican ligeramente la respuesta vasodilatadora máxima, donde se observó un 91.76 % en los anillos no incubados frente al 81.94% y 78.18 % de respuesta máxima, respectivamente.

Cuadro XXII. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-15 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON L-NAME, INDOMETACINA O AZUL DE METILENO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†] $\approx p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-15 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	91.76 ± 2.65	1.38×10^{-5}
L-NAME (1×10^{-4} M)	81.94 ± 6.92	3.69×10^{-5}
INDOMETACINA (1×10^{-5} M)	92.71 ± 3.48	2.54×10^{-6}
AZUL DE METILENO (1×10^{-5} M)	$78.18 \pm 5.58^{\dagger}$	6.22×10^{-5}

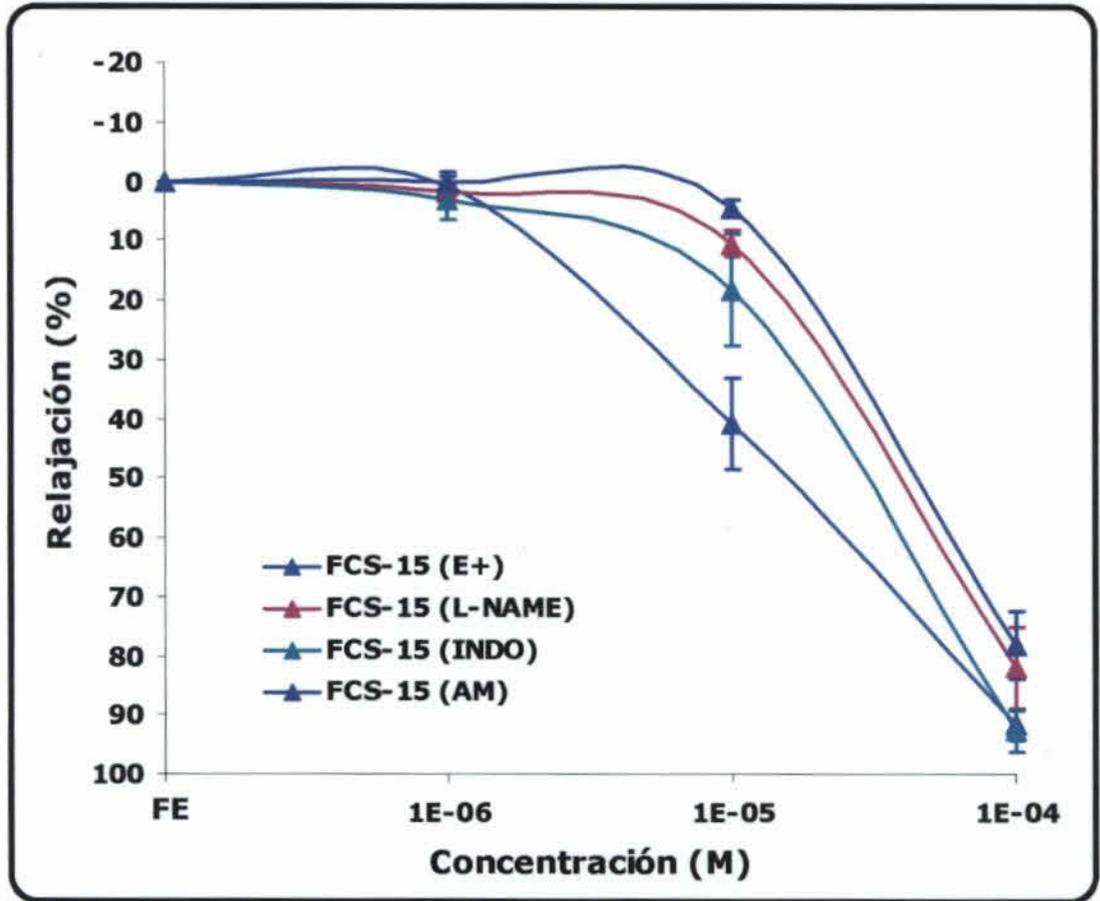


Fig. 25. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

Cuando estos protocolos fueron utilizados para definir las acciones farmacológicas del FCS-18 se observó que la sola inhibición de eNOS o por su parte, la inhibición de la GCs, logra abolir prácticamente en su totalidad, el efecto dilatador máximo de este compuesto. Como se muestra en el **Cuadro XXIII**, el E_{max} generado por FCS-18 fue de 85.3% en anillos controles y cuando los anillos fueron incubados con L-NAME o Azul de metileno, los E_{max} fueron de 22.8% y 24.9%, respectivamente. Por su parte, la inhibición de la síntesis de prostaciclina tiende a reducir el E_{max} , además de modificar significativamente la CE_{50} del efecto dilatador por FCS-18. La **Figura 26** presenta estos resultados.

Cuadro XXIII. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-18 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON L-NAME, INDOMETACINA O AZUL DE METILENO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación. ND = NO DETERMINADO

Producto	E_{MAX} ($X \pm E.S$)	CE_{50}
FCS-18 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	85.31 ± 4.86	6.74×10^{-6}
L-NAME (1×10^{-4} M)	$22.76 \pm 2.64^{\dagger}$	ND
INDOMETACINA (1×10^{-5} M)	70.98 ± 9.32	3.46×10^{-5}
AZUL DE METILENO (1×10^{-5} M)	$24.91 \pm 3.36^{\dagger}$	ND

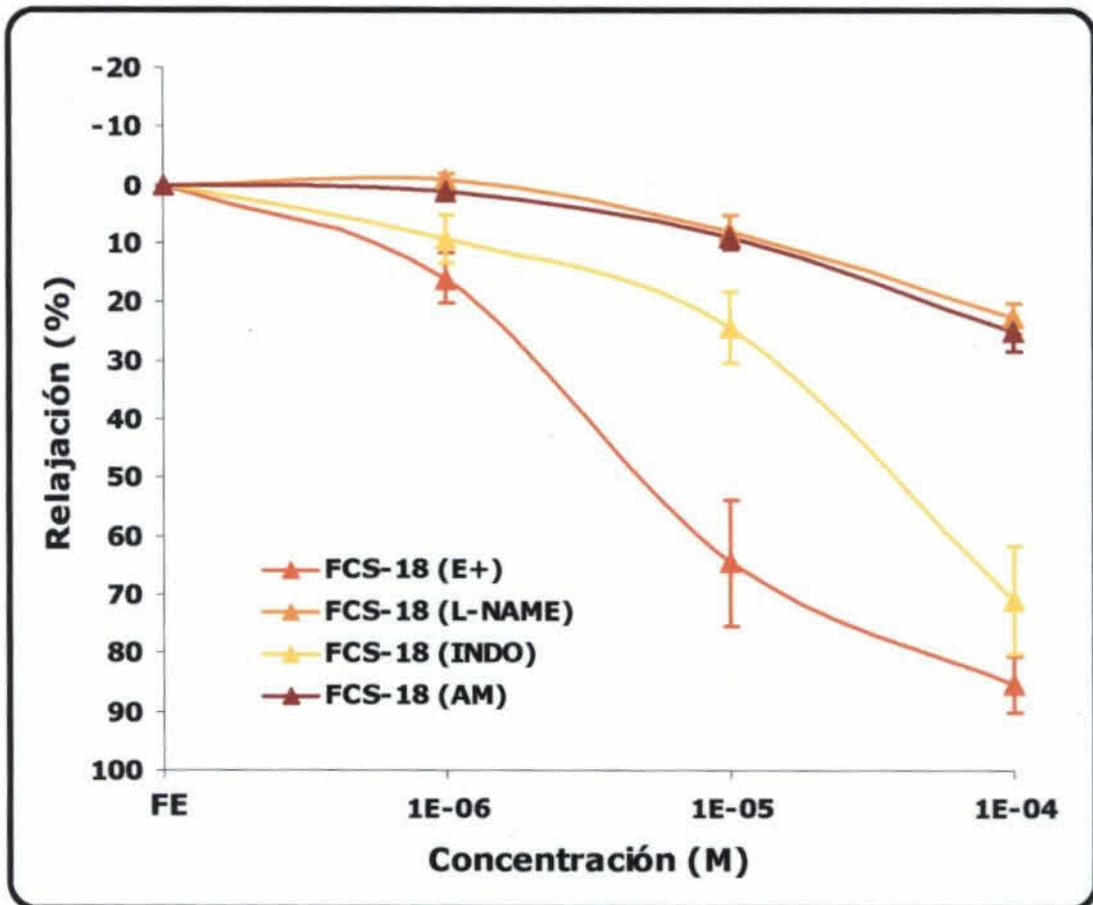


Fig. 26. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1x10⁻⁶ M.

El efecto máximo observado con FCS-21 en condiciones de normalidad (anillos con endotelio sin protocolos de incubación o inhibición) fue de 89.9% y el mismo se modifica al incubarse con L-NAME o Azul de metileno, donde los E_{max} alcanzados fueron de 58.1% y 58.9%, respectivamente, lo que refleja una reducción de aproximadamente el 30% del efecto vasodilatador, que para ambos casos es significativa. **Cuadro XXIV y Figura 27**

De manera similar a lo observado con FCS-18, la Indometacina sólo modifica significativamente la CE_{50} (6.46×10^{-6} M vs. 1.95×10^{-5} M), sin afectar el E_{max} generado por el FCS-21.

Cuadro XXIV. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-21 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON L-NAME, INDOMETACINA O AZUL DE METILENO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-21 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	89.92 ± 4.12	6.46×10^{-6}
L-NAME (1×10^{-4} M)	$58.10 \pm 2.16^{\dagger}$	6.81×10^{-5}
INDOMETACINA (1×10^{-5} M)	86.33 ± 1.62	1.95×10^{-5}
AZUL DE METILENO (1×10^{-5} M)	$58.87 \pm 4.19^{\dagger}$	7.15×10^{-5}

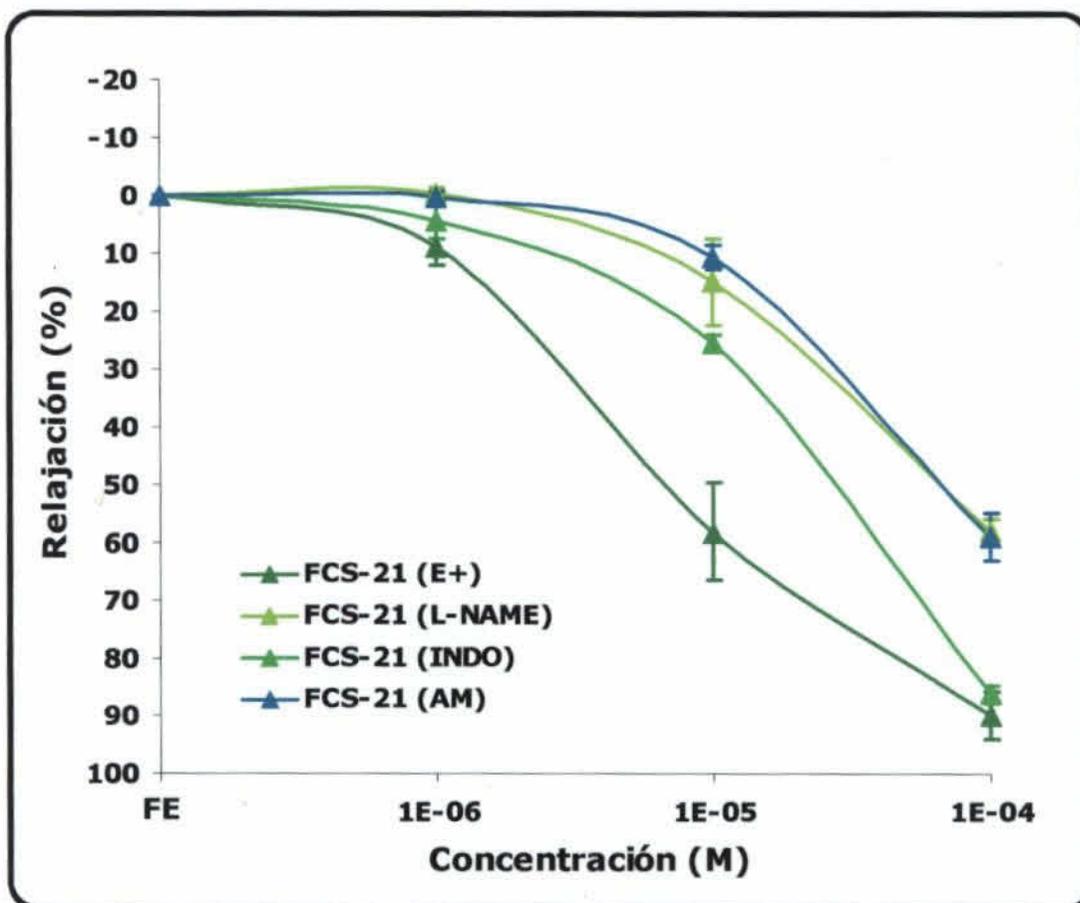


Fig. 27. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21 en anillos de aorta de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con L-NAME, Indometacina (INDO) o Azul de metileno (AM) precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

Para demostrar si los canales de K^+ estaban o no implicados en el desarrollo de actividad vasodilatadora de la fenilcumarinas ensayadas, anillos de aorta fueron incubados con diferentes antagonistas de canales de K^+ , incluyendo tetraetilamonio (TEA) que bloquea canales de K^+ dependientes de calcio de manera no específica y glibenclamida (Gli) que bloquea canales de K^+ sensibles a ATP.

Después de la exposición previa al antagonista de canales de K^+ sensibles a ATP, la curva concentración-respuesta a FCS-15 permaneció inalterada, sin cambios de interés ni en el E_{max} ni en la CE_{50} . Por otra parte, la incubación con TEA (**Cuadro XXV y Figura 28 Y 29**), aunque no modificó el E_{max} del FCS-15, si indujo un cambio ligero sobre la CE_{50} , que en anillos bajo condiciones de normalidad fue de 1.38×10^{-5} M, en comparación con 2.21×10^{-5} M que se obtiene en la curva concentración-respuesta a este compuesto.

Cuadro XXV. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-15 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON GLIBENCLAMIDA O TETRAETILAMONIO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. $^{\dagger} = p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($X \pm E.S$)	CE_{50}
FCS-15 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	91.76 ± 2.65	1.38×10^{-5}
GLIBENCLAMIDA (1×10^{-5} M)	95.64 ± 1.05	2.13×10^{-5}
TETRAETILAMONIO (1×10^{-2} M)	95.43 ± 1.41	2.21×10^{-5}

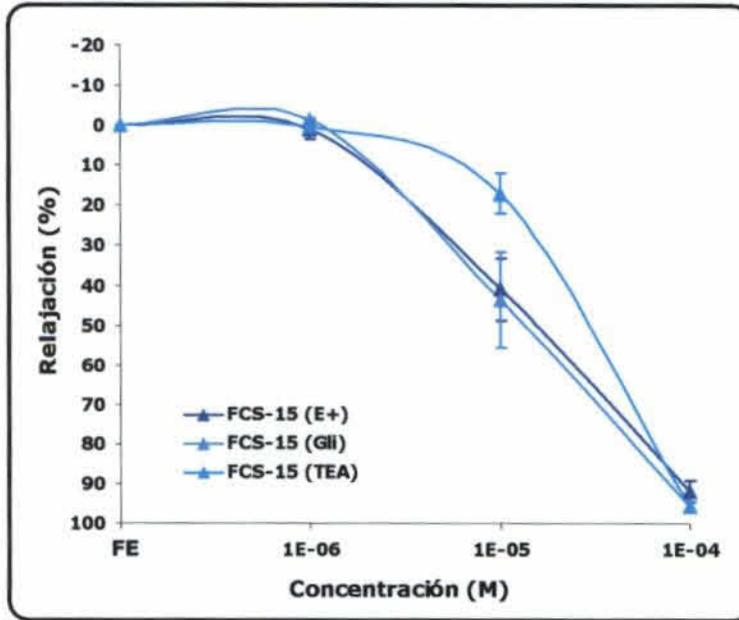


Fig. 28. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1×10^{-6} M.

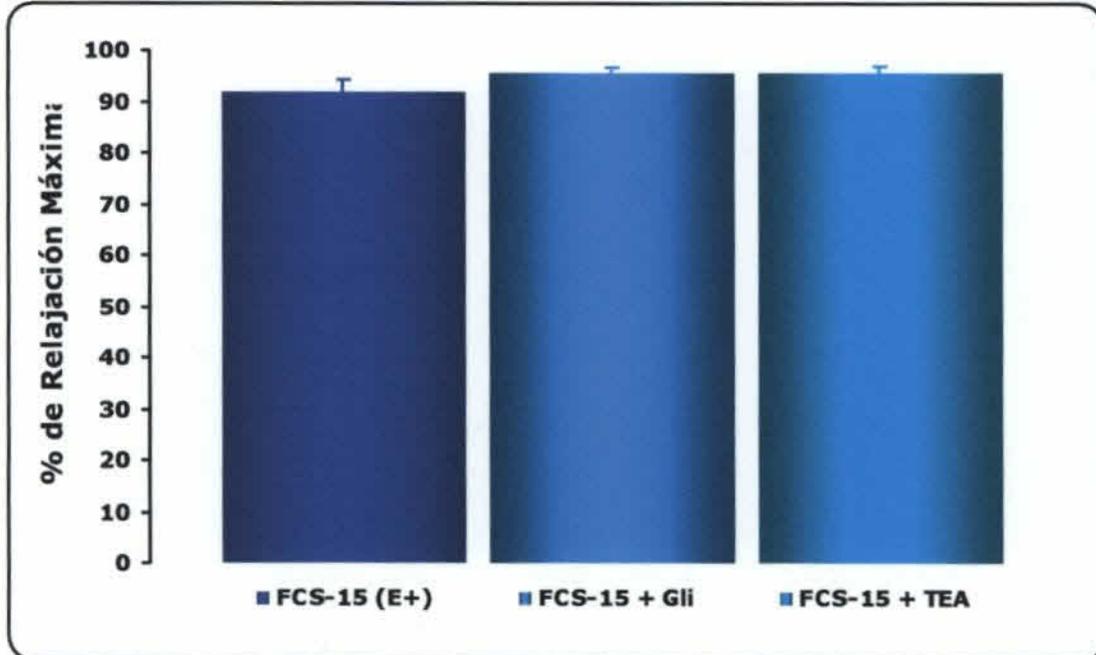


Fig. 29. Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-15 en anillos con endotelio sin incubar (E^+), incubados con glibenclamida (Gli) e incubados con tetraetilamonio (TEA).

De manera similar a lo observado con FCS-15, en anillos con endotelio intacto, TEA modifica la CE_{50} para FCS-18 (**Cuadro XXVI y Figuras 30 y 31**) y FCS-21 (**Cuadro XXVII y Figuras 32 y 33**), sin afectar el E_{max} que se mantiene muy similar al observado en anillos sin exposición previa al antagonista de canales de K^+ . La incubación con Glibenclamida no modificó ninguno de los parámetros de las curvas concentración-respuesta obtenidas con estas dos fenilcumarinas.

Cuadro XXVI. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-18 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON GLIBENCLAMIDA O TETRAETILAMONIO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-18 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	85.31 \pm 4.86	6.74×10^{-6}
GLIBENCLAMIDA (1×10^{-5} M)	85.36 \pm 5.94	5.81×10^{-6}
TETRAETILAMONIO (1×10^{-2} M)	83.27 \pm 3.20	2.64×10^{-5}

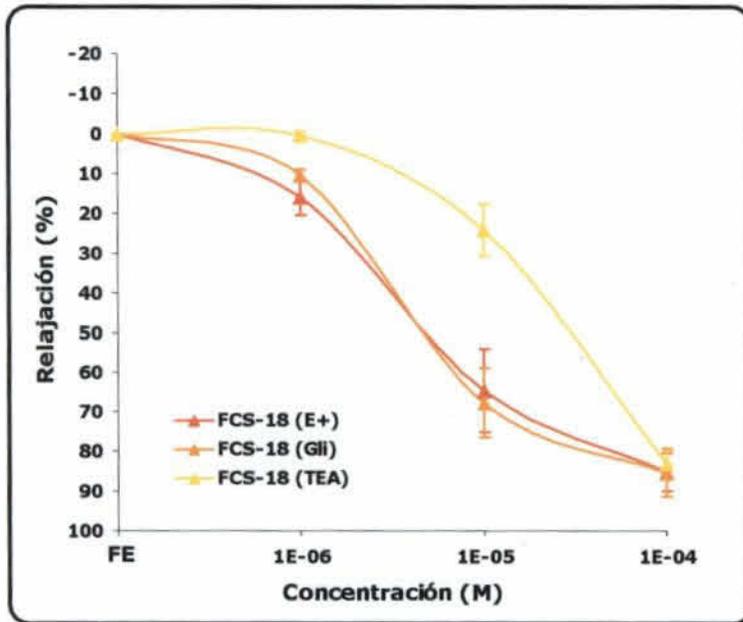


Fig. 30. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1×10^{-6} M.

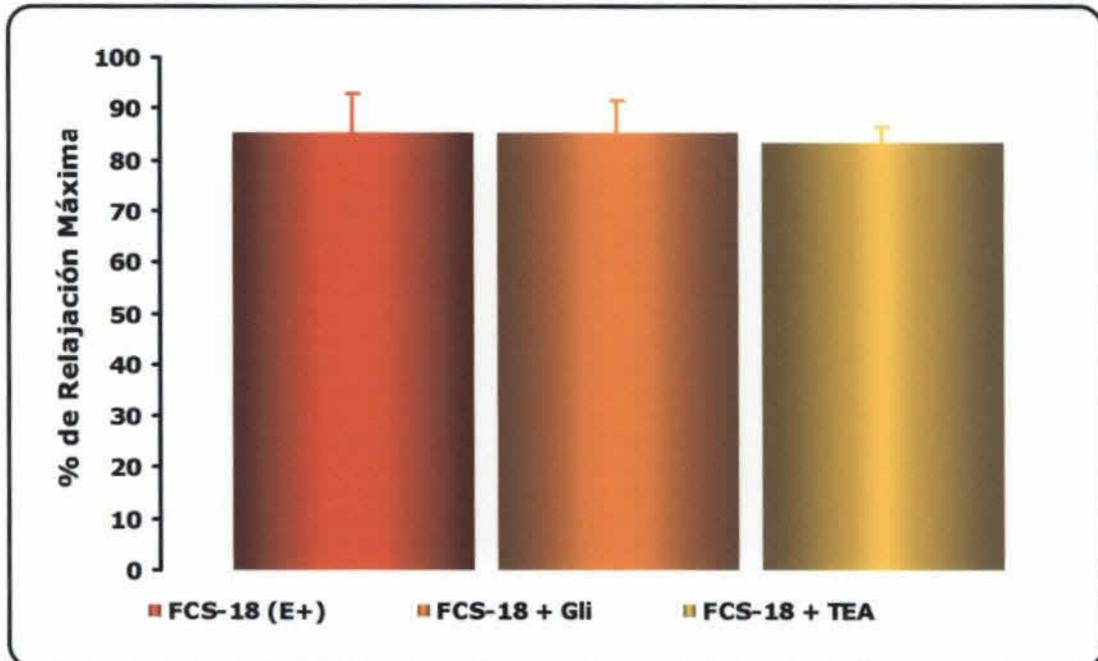


Fig. 31. Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-18 en anillos con endotelio sin incubar (E⁺), incubados con glibenclamida (Gli) e incubados con tetraetilamonio (TEA).

Cuadro XXVII. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-21 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON GLIBENCLAMIDA O TETRAETILAMONIO PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-21 (E^+ , SIN INCUBACIÓN)	89.92 ± 4.12	6.46×10^{-6}
GLIBENCLAMIDA (1×10^{-5} M)	94.78 ± 3.19	6.24×10^{-6}
TETRAETILAMONIO (1×10^{-2} M)	87.12 ± 2.78	1.59×10^{-5}

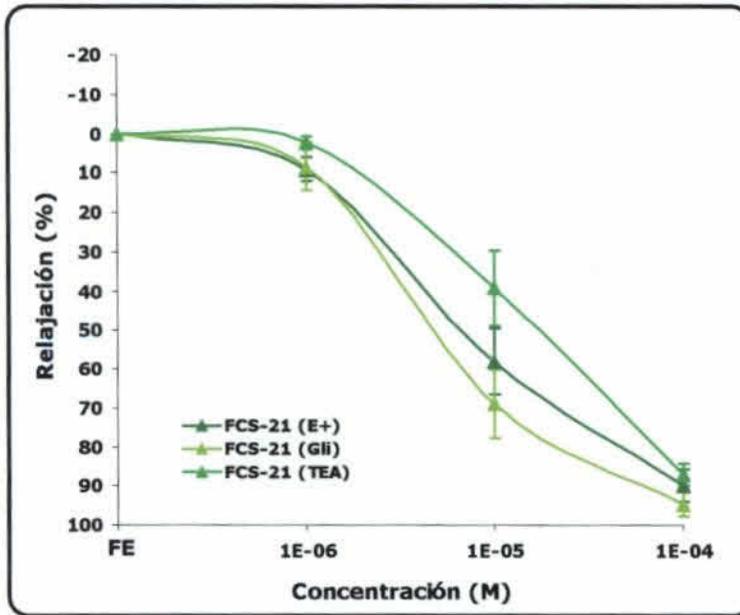


Fig. 32. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) e incubados con Gli o TEA y posteriormente contraídos con FE 1×10^{-6} M.

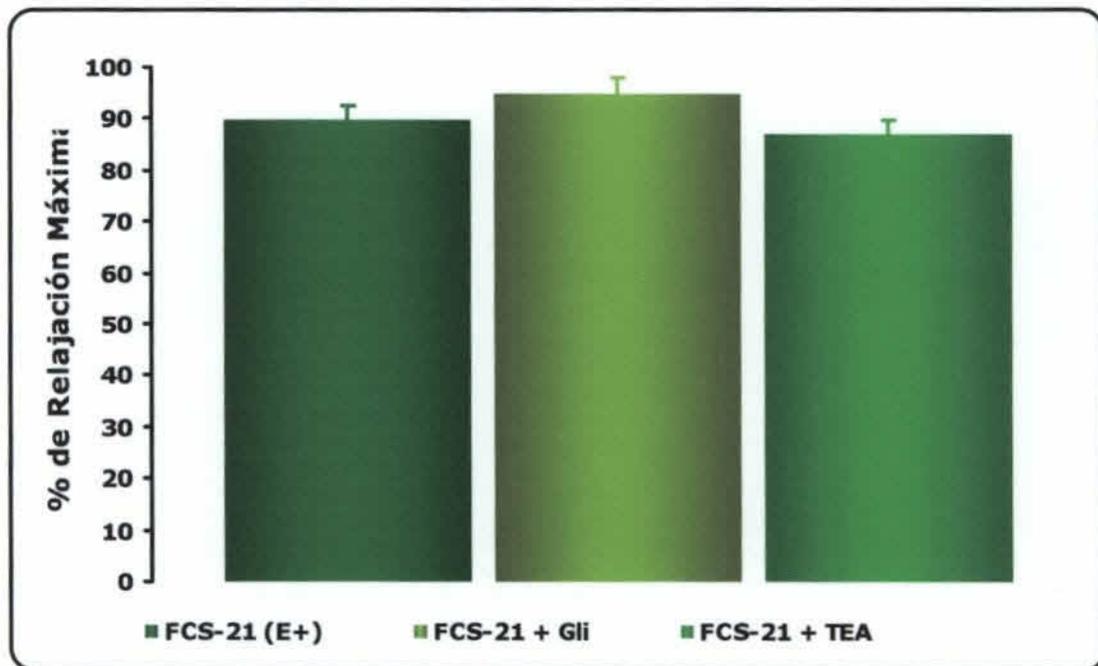


Fig. 33. Efecto de relajación máxima obtenida con FCS-21 en anillos con endotelio sin incubar (E⁺), incubados con glibenclamida (Gli) e incubados con tetraetilamonio (TEA).

d. Determinación de otros posibles mecanismos implicados en el desarrollo del efecto vascular generado por FCS-15, FCS-18 y FCS-21 en anillos de aorta dependiente de estimulación muscarínicos o beta-adrenérgicos.

Este objetivo se realizó incubando anillos de aorta de rata con endotelio con una sola concentración 1×10^{-6} M de Atropina (ATROP) para antagonizar los receptores muscarínicos o propranolol (PROP), antagonista de receptores beta-adrenérgicos a una concentración 1×10^{-6} M.

Para el derivado cumarínico FCS-15, tanto la incubación con atropina como la de propranolol no producen diferencias significativas en E_{max} , ni en CE_{50}

(Cuadro XXVIII y Figura 34)

Cuadro XXVIII. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-15 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON ATROPINA O PROPRANOLOL PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. $^* = p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-15 (E+, SIN INCUBACIÓN)	91.76 ± 2.65	1.38×10^{-5}
ATROPINA (1×10^{-6} M)	88.63 ± 8.15	2.07×10^{-5}
PROPRANOLOL (1×10^{-6} M)	81.64 ± 11.49	1.97×10^{-5}

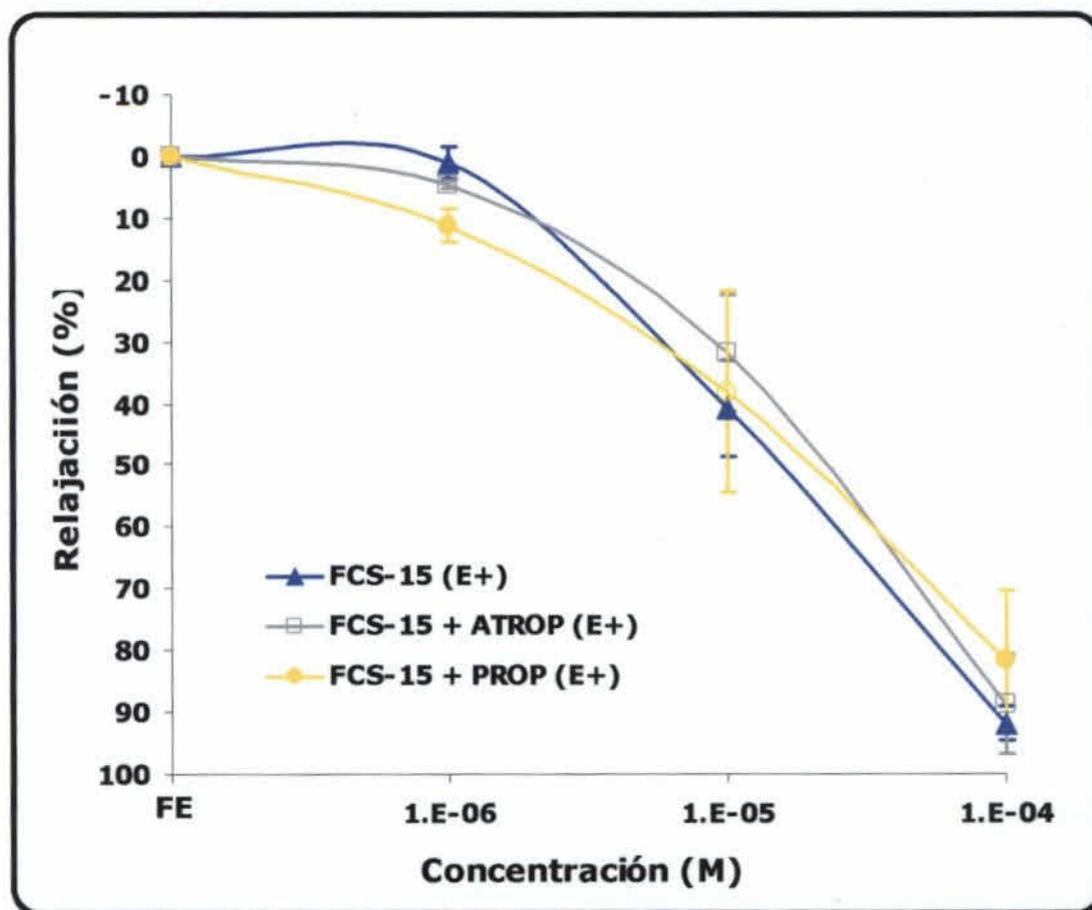


Fig. 34. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-15, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1x10⁻⁶ M.

Por su parte, FCS-18 al estar en presencia de atropina se modifica el Emáx (85.31% vs. 64.58%), además de incrementar la CE₅₀ comparado con anillos sin bloqueadores. La presencia de propranolol no ejerce efectos sobre la acción vasodilatadora de FCS-18. Los resultados están resumidos en el **Cuadro XXIX y Figura 35.**

Cuadro XXIX. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE₅₀) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-18 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON ATROPINA O PROPRANOLOL PRECONTRAÍDOS CON FE 1x10⁻⁶ M. †=p<0.05 frente a anillos sin incubación.

Producto	E _{MAX} (X ± E.S)	CE ₅₀
FCS-18(E+, SIN INCUBACIÓN)	85.31 ± 4.86	6.74X10 ⁻⁶
ATROPINA (1x10 ⁻⁶ M)	64.58 ± 14.71	2.86X10 ⁻⁵
PROPRANOLOL (1x10 ⁻⁶ M)	82.48 ± 8.99	7.24X10 ⁻⁶

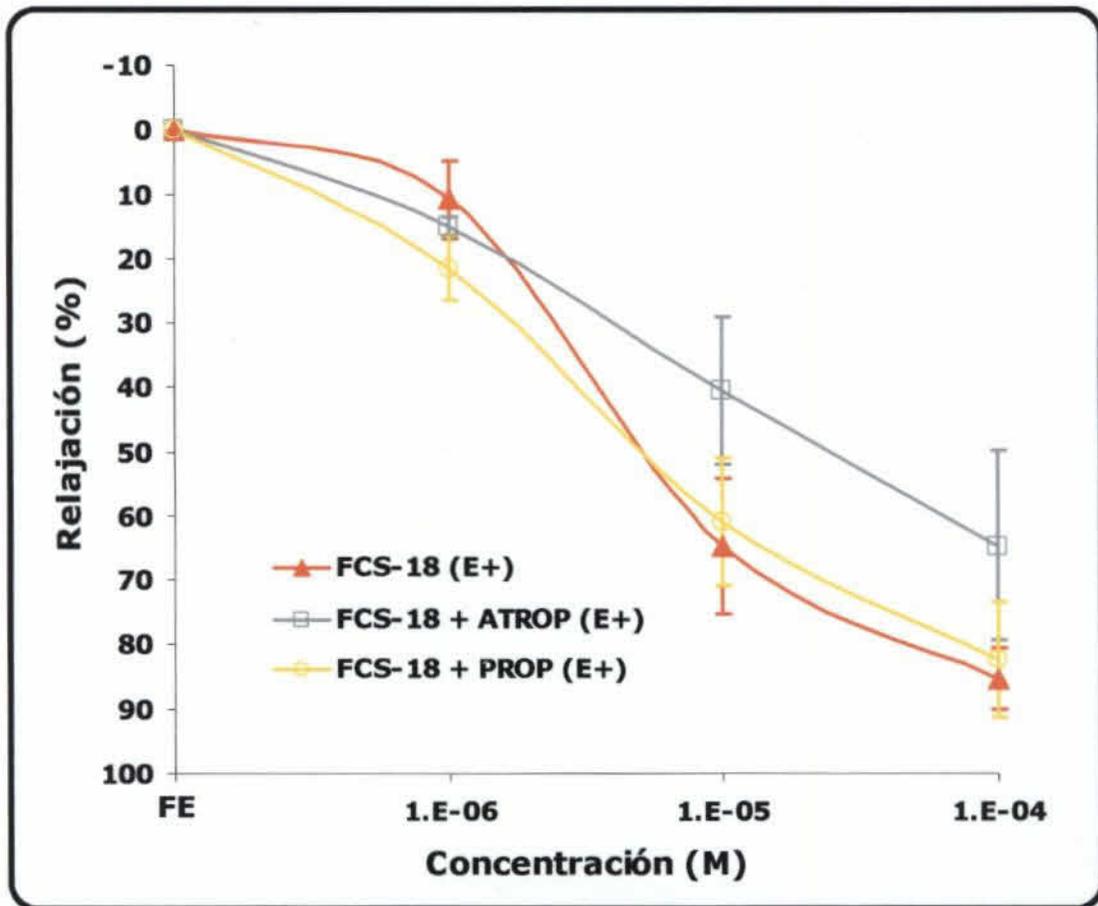


Fig. 35. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-18, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E^+) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

El efecto de FCS-21 se incrementa por la presencia de atropina, aumentando el $E_{\text{máx}}$ (89.82 % vs. 109.54 %) y con una ligera modificación de la CE_{50} (6.46×10^{-6} M vs. 1.56×10^{-6} M). En el caso del propranolol, este agente modifica el $E_{\text{máx}}$, sin causar modificaciones considerables de la CE_{50} . En el **Cuadro XXX** y la **Figura 36** se muestran los detalles.

Cuadro XXX. VALORES MÁXIMOS DE RELAJACIÓN (E_{MAX}) Y DE CONCENTRACIÓN EFICAZ 50 (CE_{50}) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LA FENILCUMARINA SINTÉTICA FCS-21 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO E INCUBADOS CON ATROPINA O PROPRANOLOL PRECONTRAÍDOS CON FE 1×10^{-6} M. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	E_{MAX} ($\bar{X} \pm E.S$)	CE_{50} (M)
FCS-21 (E+, SIN INCUBACIÓN)	89.92 \pm 4.12	6.46×10^{-6}
ATROPINA (1×10^{-6} M)	109.54 \pm 2.36 [†]	1.56×10^{-6}
PROPRANOLOL (1×10^{-6} M)	104.10 \pm 4.94 [†]	2.01×10^{-6}

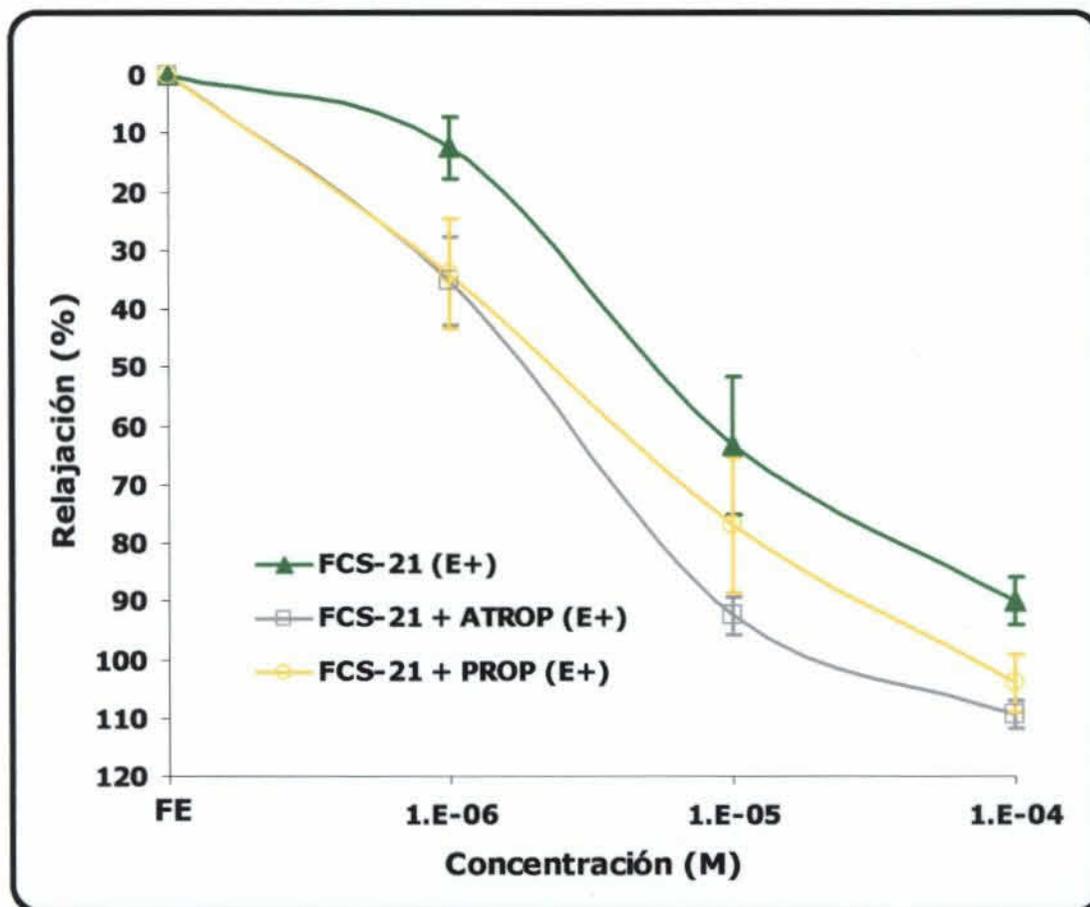


Fig. 36. Curvas concentración-respuesta obtenidas con la fenilcumarina de síntesis FCS-21, en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio (E⁺) e incubados con Atropina o Propranolol precontraídos con FE 1×10^{-6} M.

e. Evaluación del efecto de las fenilcumarinas sintéticas FCS-15, FCS-18, FCS-21 sobre la curva concentración respuesta a noradrenalina.

Para evaluar si los compuestos 4-fenilcumarinas ejercieran efecto sobre la contracción inducida por NA, procedimos a realizar curvas concentración respuesta a este agente en presencia de los productos.

En estos experimentos los tres productos ensayados FCS-15, FCS-18 y FCS-21 a concentraciones de 1×10^{-4} M, inhibieron de manera significativa la curva concentración respuesta a NA en anillos de aorta; siendo FCS-15 y FCS-21 los que mayor efecto inhibitorio poseen (Ver **Cuadro XXXI y Figuras 37, 38 y 39**)

Cuadro XXXI. VALORES MÁXIMOS DE CONTRACCIÓN (E_{MAX}) OBTENIDAS A PARTIR DE LA CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A NA EN PRESENCIA DE 1×10^{-4} M DE LAS FENILCUMARINAS SINTÉTICAS FCS-15, FCS-18 Y FCS-21 EN ANILLOS DE AORTA CON ENDOTELIO. [†]= $p < 0.05$ frente a anillos sin incubación.

Producto	Efecto máximo de NA en presencia de derivados 4-fenilcumarinas ($X \pm E.S$)
Control	100 \pm 0
FCS-15	10.7 \pm 2.69 [†]
FCS-18	64.9 \pm 20.16 [†]
FCS-21	31.9 \pm 12.5 [†]

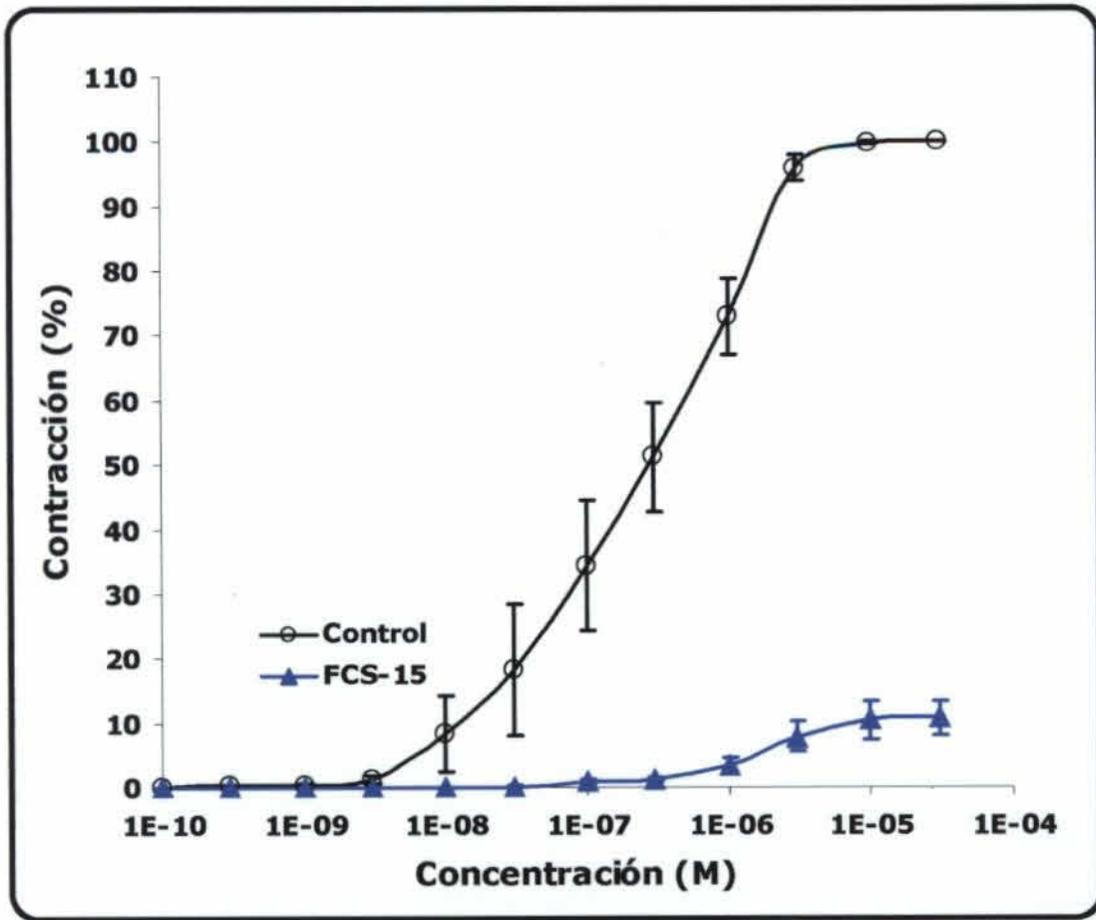


Fig. 37. Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-15 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.

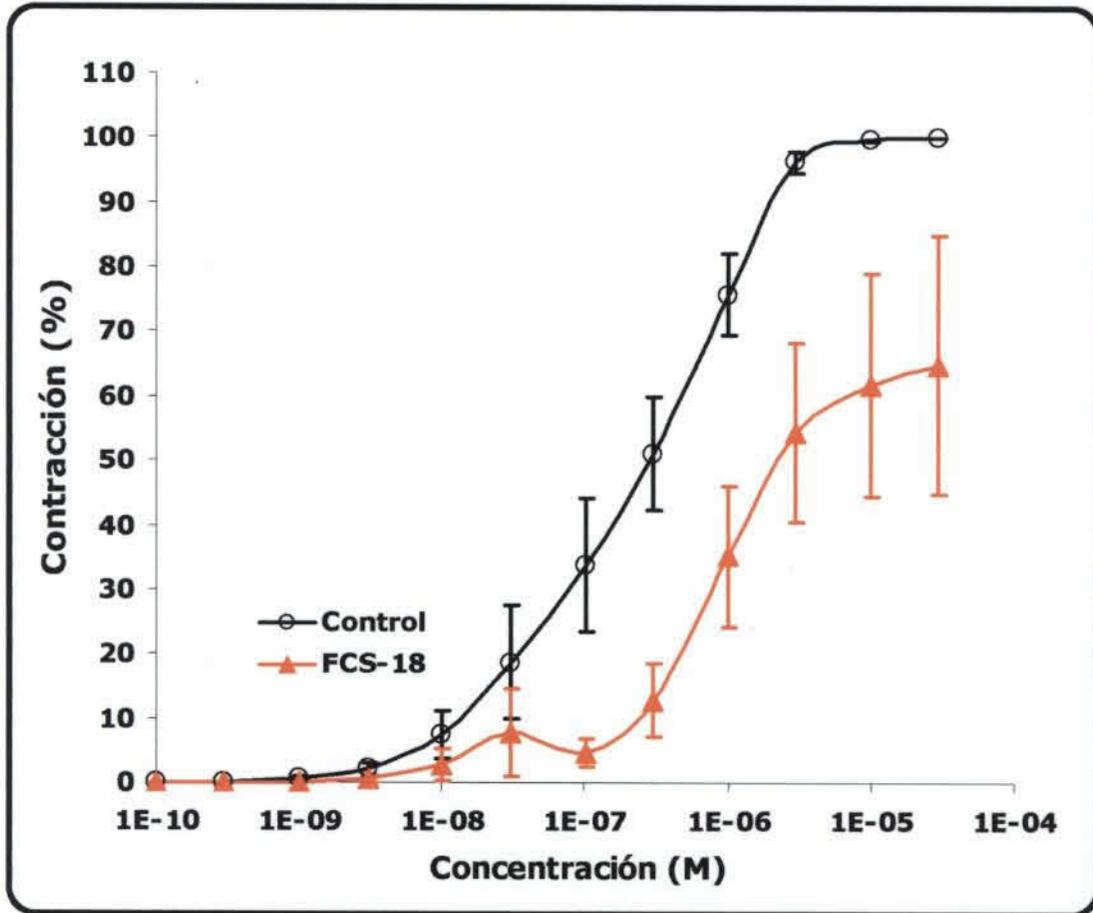


Fig. 38. Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-18 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.

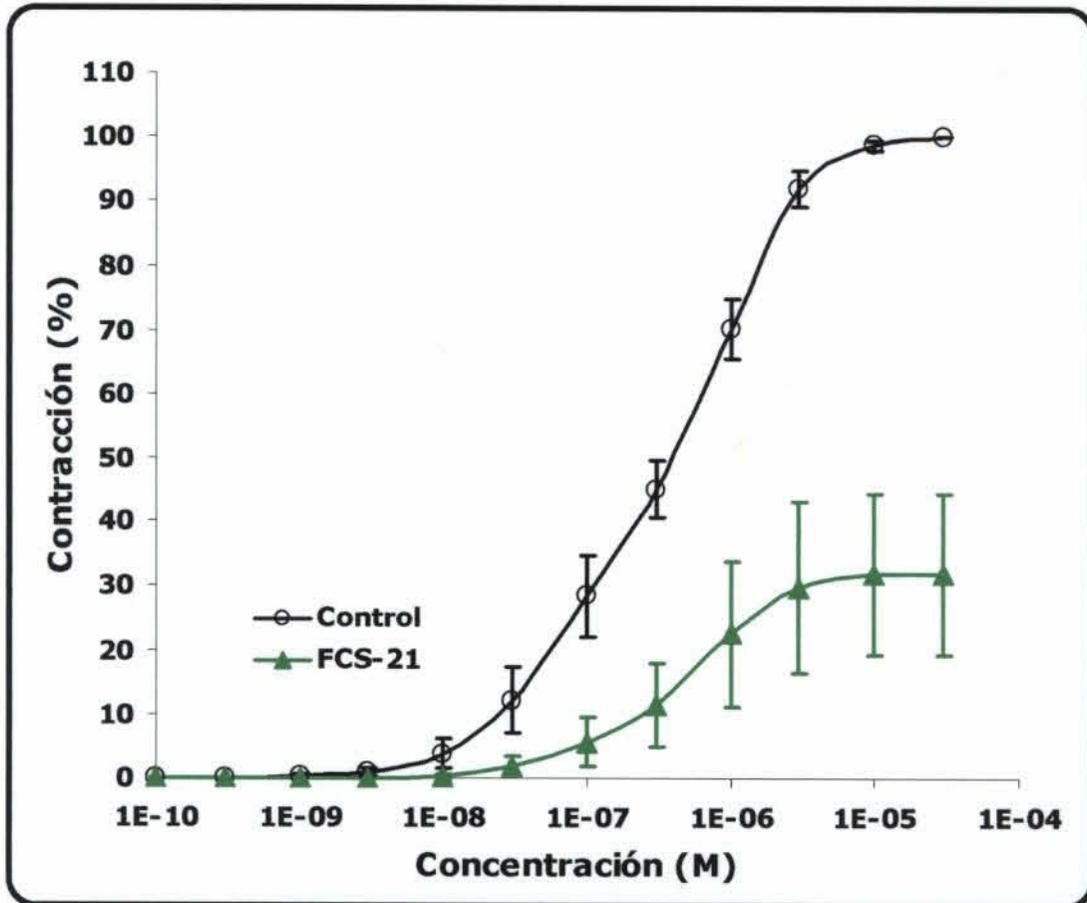


Fig. 39. Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fenilcumarina de síntesis FCS-21 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio.

DISCUSIÓN

El presente estudio investigó, por primera vez, el efecto relajante vascular de diferentes extractos de plantas del género *Marila*. En la primera parte de la investigación realizamos un screening para determinar la capacidad de los extractos, acumulativamente adicionados al baño de órgano aislado, para inducir relajación frente a las contracciones causadas por el agonista de receptores α_1 , FE en anillos de aorta aislada.

Nuestros resultados demuestran claramente que los extractos de *Marila laxiflora* y *Marila pluricostata* exhiben, efecto vasodilatador de manera concentración dependiente en anillos con endotelio funcional y estadísticamente significativo comparado con el vehículo DMSO.

Es importante denotar, que en el caso de los extractos de *Marila laxiflora*, se observó un ligero efecto relajante para el extracto H-MeOH; mientras que los extractos H-CHCl₃ y R-MeOH presentaron el mayor efecto.

Por su parte, los extractos de *Marila pluricostata*, fueron los que mostraron la mayor intensidad de efecto (mayor del 90%), lo que sugiere que los compuestos presentes en esta planta ejercen una marcada actividad. Además, cabe señalar que según nuestros resultados, los extractos de *Marila pluricostata* muestran una mayor potencia, referenciado por las diferentes CE₅₀ obtenidas.

Ninguno de estos extractos generó efectos irreversibles pues en todos los casos el tejido respondió a la estimulación con el agente contracturante, después de la exposición a los diferentes extractos, lo que indica que carecen de algún tipo de toxicidad tisular y que sus efectos vasculares se pueden

explicar por modificaciones fisiológicas o bioquímicas generadas sobre el tejido.

Una amplia gama de mecanismos han sido descritos para la relajación del músculo liso vascular, por lo que no nos es posible postular un mecanismo probable que explique el efecto relajante de los extractos a partir de estos únicos datos. Relacionando el efecto contracturante inducido por la FE, el cual está determinado por la activación de receptores α_1 -adrenérgicos y su mecanismo de señalización, que involucra aumento de la actividad de fosfolipasa C (PLC) para producir trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que finalmente aumentarán los niveles de calcio intracelular (Horowitz et al., 1996, Karaki et al., 1997), existe la posibilidad que los compuestos presentes en el extracto intervengan en el mecanismo desarrollado como puede ser bloqueo de receptores α_1 -adrenérgicos, inhibiendo la entrada de calcio o bloqueando su salida del retículo sarcoplásmico. (Consolini y Migliori, 2002)

Otros mecanismos vasodilatadores, de relevancia, en el CML es el efecto mediado por productos derivados del endotelio como son el NO, PGI₂ y EDHF. (Moncada y Higos, 2006) La apertura de canales de potasio tanto en endotelio como en CML (Houssay T op. cit.; Boron op. cit.; Gannon, op cit.), podrían también explicar el mecanismo empleado por los compuestos presentes en los extractos de las plantas del género *Marila* para generar sus acciones vasculares, ya que como se ha descrito, los derivados de productos naturales pueden utilizar diversos mecanismo para relajar la CML. (MacNeill y Jurgens, 2006)

Para determinar el rol del endotelio vascular en el efecto relajante de los extractos, seleccionamos el extracto H-CH₂Cl₂ de *Marila pluricostata*, observando que la eliminación del endotelio, reduce significativamente el efecto vasodilatador, tanto que no presenta diferencia con el solvente empleado, por esto podemos decir que el extracto ensayado ejerce acciones dependientes de endotelio.

A la vista de los resultados vasodilatadores mostrados por los extractos, consideramos interesante evaluar su posible efecto hipotensor agudo en el modelo de hipertensión genética, utilizando ratas genéticamente hipertensas (SHR); pues esta ampliamente descrito el efecto hipotensor de compuestos con acción vasodilatadora. (Nicasio y Meckes, 2005; Abreu et al, 2003; Consolini y Migliori, op. cit.)

El modelo utilizado para medir el efecto hipotensor se escogió dada la similitud que posee con la HTA en seres humanos, en donde un gran número de factores intervienen en el desarrollo de la patología. Esta cepa de ratas se caracteriza por mostrar incrementos progresivos de la PA, así como las complicaciones a órganos blancos, por lo que tienen utilidad en estudios de productos con la finalidad de determinar su perfil hipotensor y antihipertensivo (Guerrero et al., 2006; Yang et al., 2002; Badyal et al., 2003).

Con la administración I.P de los extractos de *Marila laxiflora* observamos una aparente disminución de la PAM, pero la diferencia significativa que existe entre las ratas que recibieron los extractos y el grupo que recibe CMC, está acentuada por el incremento de la PA que presentó el grupo control. Esta

conclusión es válida por el hecho que no existen diferencias significativas de los valores de PA a tiempo cero cuando se compara frente a la PAM obtenida a los diferentes tiempos después de la administración de los extractos.

Podemos decir que aunque el método empleado para medir la PA no es traumático, no deja de ser estresante por lo que es lógico que el animal desarrolle cierto grado de estrés durante las mediciones. Este efecto se ve reflejado quizás en los valores de PAM del grupo control donde se observó un aumento significativo. Los grupos que recibieron los extractos de *Marila laxiflora*, sin embargo no desarrollaron incrementos de la PA, lo que podría ser atribuido a un ligero efecto sedante o estar relacionado con sus acciones vasodilatadores descritas en tejidos "in vitro".

Sobre la frecuencia cardiaca, los extractos ensayados no presentaron efectos consistentes, pero durante la primera hora de medición se observa un ligero efecto bradicardizante, que revierte completamente al final de las seis horas.

En cuanto a los extractos de *Marila pluricostata*, observamos que ambos producen un efecto hipotensor desde la primera hora y que dicho efecto se mantiene a lo largo de la medición. Estos extractos presentaron respuestas un poco distintas sobre la frecuencia cardiaca, en el caso del extracto R-MeOH genera un efecto taquicardizante, siendo probable que este efecto se deba a un respuesta refleja, como consecuencia del efecto hipotensor. Por otro lado, el extracto H-CH₂Cl₂ presenta inicialmente un efecto taquicardizante, que se pierde durante las próximas horas de medición y manifestando al final un efecto cronotrópico negativo, que también podría contribuir con el efecto hipotensivo observado.

En base a las acciones cardiovasculares presentadas por los extractos ensayados en ratas SHR, podríamos decir que el efecto hipotensivo puede estar relacionado con sus acciones vasodilatadores (Testai et al, 2002; Abreu et al., 2003) demostradas en arteria aorta. Sin embargo para este último punto habrá que recordar que el efecto vasodilatador "in Vitro" demostró ser dependiente de la función endotelial, y son muchos los reportes que señalan que en las SHR el progreso de la HTA se acompaña con hipertrofia vascular y disfunción endotelial (Mori et al., 2006; Cuzzocrea et al., 2004). Esta lesión endotelial, si estuviera instaurada en los animales empleados, sería quizás el punto que contrarrestaría la acción hipotensora de los extractos. Cabe señalar que debido a las diversas acciones manifestadas sobre la frecuencia cardiaca, no podemos descartar la posibilidad que el extracto esté ejerciendo acciones cardiacas directas que podrían también estar involucradas con el efecto hipotensor.

Estos efectos manifestados por los diferentes extractos de las plantas del género *Marila*, son muy interesantes y aportan información relevante sobre sus acciones cardiovasculares, además la similitud tanto en el efecto vascular como en los estudios "in vivo" de ambas plantas nos sugiere la existencia de componentes químicos similares que pueden estar en diferente proporción o cantidad en cada una de ellas, dados los resultados obtenidos.

Teniendo como base los resultados descritos, y considerando además el estudio realizado por López-Pérez et al, en el cual se aislaron y caracterizaron los constituyentes del extracto H-CH₂Cl₂ de *Marila pluricostata*, decidimos evaluar aquellos productos naturales que no presentaron un perfil

de acción citotóxica en estudios de cultivos celulares, a la par que nos permitimos ensayar diferentes derivados fenilcumarínicos de origen sintético. Las respuestas vasculares encontradas con los productos naturales fueron muy variadas, observándose que algunos de ellos como el FC-1a y FC-15 presentaron un efecto contracturante; mientras que FC-4, FC-16 y FC-12/13 muestran un leve efecto relajante. Los resultados más interesantes, en cuanto al efecto relajante, fueron obtenidos con el FC-1, FC-3 y FC-11 (Emáx > 75%).

En base a los resultados obtenidos podemos evidenciar que para la actividad vascular de los productos naturales parece ser necesario la estructura básica 4-fenilcumarinas, en donde la adición de grupos alquilos en posición 6 favorece la acción relajante en todos los productos, a excepción de FC1a. Obsérvese que la adición de grupos furanos y piranos (FC-3, FC-4 y FC-16) también parece influir sobre el efecto relajante, sin embargo FC-1 y FC-11 (mayor efecto relajante) carecen de esta sustitución, pero recordemos que estos compuestos presentan la sustitución alquilo que parece ser más importante. Otra sustitución relevante para todos los compuestos, es el OH en posición 5, que podría estar muy relacionada a la actividad vasodilatadora, hecho que se confirma con FC-1a, donde la adición de un grupo metoxi cambia la actividad vascular. En resumen podemos decir que las sustituciones más importantes relacionadas con un efecto vasodilatador son el OH en pos 5 y la cadena alquil en pos 6.

Resultados parecidos, en cuanto al efecto relajante, fueron obtenidos durante el screening de los diferentes tipos de derivados sintéticos fenilcumarínicos.

Así, el grupo de 3-fenilcumarinas: FCS-11 y FCS-12 presentan ligeros efectos relajante (28 a 30%). Los resultados más variados son los observados dentro del grupo de las 3,4 dihidro-4-fenilcumarinas, donde encontramos que compuestos como FCS-38 exhibe un efecto contracturante, mientras que FCS-45, FCS-53, FCS-54 y FCS-81 presentan valores de relajación que van desde 10 hasta 85 %, como efectos máximos. El grupo que presentó mayor consistencia en los resultados fue el de las 4-fenilcumarinas: FCS-15, FCS-17, FCS-18 y FCS-21, las cuales producen efectos mayores del 85 %, a excepción del FCS-17 que produjo un 57%.

De estos resultados podemos concluir sobre la relación estructura actividad de los compuestos sintéticos que la estructura 4-fenilcurinas parece ser básica para la acción vascular, aun cuando los derivados 3-fenilcumarinas también presentan efectos.

Para las 4-fenilcumarinas observamos que la adición de OH en las posiciones 5, 6 y 7, o metóxi en posición 7 son importantes en el efecto vasodilatador, al igual que la sustitución con metiledioxi en el anillo de cromona para FCS-81 y FCS-45.

La sustitución del anillo fenol en pos 4, reduce el efecto como se demuestra con FCS-45 y el efecto es mayor cuando se adicionan grupos más voluminosos como en FCS-38. La adición de bifenilos a la estructura causa una pérdida del efecto relajante como se observó con FCS-53.

Estos resultados, no nos permiten postular un mecanismo exacto que explique el efecto relajante, razón por la que escogimos tres derivados 4-

fenilcumarinas: FCS-15, FCS-18 y FCS-21, para realizar estudios más exhaustivos que nos permitiesen dilucidar su posible mecanismo de acción.

El uso de KCl como agente contracturante para evaluar el efecto relajante de productos esta ampliamente descrito en la literatura (Ganado et al, 2005; Fu et al, 2005; Zhang et al., 2005)

Frente a contracciones inducidas por KCl, los derivados 4-fenilcumarinas mostraron un efecto relajante de menor intensidad que el observado con FE, siendo este efecto reducido en mayor proporción con los productos FCS-18 y FCS-21 que el producto FCS-15.

Considerando que la contracción con KCl esta determinada por la activación de canales de calcio voltaje dependiente (Horowitz op. cit.; Guerrero et al. 2002), podríamos suponer que un efecto relajante estará íntimamente relacionado con el bloqueo de esos canales o por la activación de las acciones hiperpolarizantes como la apertura de canales de potasio. Nuestros resultados indican que en la contracción inducida por KCl, la eficacia vasodilatadora de los tres productos ensayados, se reduce de manera significativa al compararla con el efecto sobre la contracción con FE. Esta disminución en el efecto relajante frente a KCl podría deberse a la remoción de la influencia de corrientes hiperpolarizantes de la membrana o por eliminación del bloqueo de la entrada del calcio a través de canales voltaje dependiente. (Rodríguez-Rodríguez et al. 2004) En adición a este aspecto, existe evidencia científica que la despolarización inducida por concentraciones de KCl mayores de 60 mM, bloquean la relajación provocada por compuestos activadores de canales de potasio (Magnon et al. 1998).

Los efectos vasculares de FCS-15 son significativos con respecto al DMSO, y esta capacidad vasodilatadora no se vio afectada cuando el producto se ensayó en tejidos con endotelio denudado, lo que indica que la actividad vascular del FCS-15 no se apoya de la función endotelial para desarrollarse. Sin embargo, este resultado no descarta la implicación de otros eventos celulares que pueden bien relacionarse con activación de otros componentes como lo es la guanilato ciclasa soluble (GCs), que como ya se mencionó, participa de eventos vasodilatadores. En este sentido, pudimos observar que la incubación con azul de metileno, agente que inhibe esta enzima, redujo significativamente la relajación producida por FCS-15. Existen diferentes sustancias capaces de activar al sistema GCs, entre ellos el propio NO proveniente de diversas vías, incluyendo aquella en la que el NO es donado por el compuesto ensayado (Wanstal et al., 1997; Hacker et al, 2001; Wanstall et al. 2001). En vista que la incubación con L-NAME no modificó significativamente el E_{MAX} y que por su parte el AM sólo inhibió parte del efecto, sin llegar a anularlo, podemos decir que, por lo menos parte del efecto vasodilatador producido por FCS-15, podría estar mediado por la donación de NO o de algunas de sus formas activas.

Numerosos estudios han demostrado que entre los mecanismos celulares involucrados en la relajación pueden ser mediados por la apertura de diferentes canales de K, inducida tanto por GCs como por proteína cinasa G (PKG). (Archer et al., 1994; Irving et al, 2001;)

Actualmente se reconocen diferentes tipos de canales de potasio: voltaje dependiente (K_v), dependientes o activados por calcio (K_{Ca}), rectificadores

hacia dentro (Kir) y los que poseen dos poros-dominios (K_{2p}), con una amplia distribución en la membrana celular de las CML y CE, donde regulan el potencial de membrana; el flujo sanguíneo y la PA al inducir hiperpolarización. (Nelson y Quayle, 1995; Haddy et al. 2006)

Entre los diferentes grupos de canales de potasio, los dependientes de calcio son de relevancia y están reconocidos varios subtipos de canales como los de baja conductancia (SK_{Ca}), intermedia conductancia (IK_{Ca}) y los de larga conductancia (BK_{Ca}); siendo estos últimos los de mayor relevancia en los vasos sanguíneos. (Kwan et al. 2004; Calderone et al. 2004)

El efecto final por la activación de canales dependiente de calcio, dependerá del sitio específico donde se localicen. Así, los canales ubicados en CML, producen una disminución del potencial de membrana, con la consecuente inactivación del influjo del calcio, llevando a un efecto relajante; sin embargo su activación en la CE promueve la salida del potasio generando la fuerza conductora para la entrada de calcio (control del influjo del calcio) lo que a su vez activa a la eNOS, además de cooperar en la transducción de señales eléctricas a las vecinas CE o CML a través de las uniones intercelulares. (Yashiro y Duling, 2000; Nilius y Droogmans, 2001; Li et al, 2001; Kwan sup. cit.)

Algunos estudios postulan que la salida de potasio, a través de dichos canales, aumenta la concentración de potasio en el espacio intercelular mioendotelial, produciendo su acumulación, que podría activar a los canales Kir y a la bomba Na^+/K^+ en las CML conduciendo a una hiperpolarización y finalmente la relajación. (Edwards et al., 1998; Haddy op. cit.)

La contribución de los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} (bloqueados con TEA) y los dependientes de ATP (bloqueados con Gli) fue evaluada en nuestro estudio. En los resultados observamos que Gli no posee la capacidad de inhibir el E_{MAX} producido por FCS-15, por lo que se descarta que en la cascada de eventos pro vasodilatadores se de la participación de canales de potasio sensibles a ATP y tampoco parece ser importante la participación de los canales que dependen de Ca^{2+} . Esto último también se corrobora con el hecho que el FCS-15, aunque produce vasodilatación en presencia de contracción con KCl es significativamente inferior que la producida sobre tejidos contraídos con FE, lo que indica que la repolarización en la que participan los canales de potasio sensibles a Ca^{2+} , no se afecta con este agente.

No descartemos la vía de la actividad antioxidante, en la que algunas sustancias pueden captar radicales libres que participan de los eventos contráctiles. En este sentido, existen autores que señalan la capacidad de diferentes 4-hidroxi fenilcumarinas para producir una actividad antioxidante, que para nuestro caso, podría favorecer la acción descrita para la FCS-15. (Kabeya et al., 2007)

En vista que los mecanismos que pueden describir las acciones de la FCS-15 no se lograron establecer con los ensayos propuestos, evaluamos otras vías que nos permitieran lograr una conclusión de mayor validez. En este sentido, aunque partimos del hecho ya demostrado que el FCS-15 genera vasodilatación, aún en ausencia de endotelio o bloqueo de la síntesis de NO, decidimos evaluar el efecto de atropina sobre la actividad vascular del

agente, más que todo a modo de corroboración de los efectos, reconociendo de antemano que el resultado esperado era que no se viera afectada la actividad del agente evaluado, y tal como esperábamos, el bloqueo muscarínico no afectó ninguno de los parámetros de la respuesta vascular.

Tampoco se afectó la respuesta al FCS-15 cuando los anillos se incubaron con propranolol, lo que descarta como posible mecanismo que el agente estimule receptores β_2 -adrenérgicos. En contraste, si pareciera existir un impedimento de la actividad contráctil por estímulo del receptor α_1 , ya que la incubación de la aorta con FCS-15 casi abolió la contracción inducida por noradrenalina. El resultado de este ensayo nos proporciona nuevas teorías que expliquen las acciones vasculares descritas, (1) Posible antagonismo no competitivo de FCS-15 sobre receptor α_1 -adrenérgico, y decimos no competitivo, ya que como pudimos observar, se reduce la respuesta contráctil máxima; (2) Cambios en la disponibilidad de Ca^{2+} , pues recordemos que la activación del sistema PLC va a promover segundos mensajeros que por una parte estimulan la entrada de Ca^{2+} desde el exterior a través de canales L activados por DAG y proteína cinasa C (PKC) o bien la salida desde los sitios de almacenamiento intracelular (IP_3); (3) Promoción de una mayor recaptación de Ca^{2+} hacia el retículo. Por su parte, cualquiera de estos eventos que reduzcan los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} , podrían bien explicar que durante la contracción con KCl no se observe una clara repolarización, ya que esta fase de la recuperación de la actividad contráctil, depende en gran medida de la activación de canales de potasio, que a su vez está determinada por los niveles de Ca^{2+} citoplasmático.

En el caso de la evaluación de la FCS-18, observamos un efecto vasodilatador ligeramente inferior que el generado por FCS-15. Señalar que la diferencia estructural entre estos compuestos radica en la ciclación de la cadena que presenta el compuesto FCS 18, lo que podría influir sobre la eficacia dilatadora de este agente.

Al igual que describimos para el FCS-15, en los ensayos con el FCS-18 se observa que la respuesta vasodilatadora es significativamente inferior cuando el producto se evalúa frente a contracción inducida por KCl, en comparación con el Emax obtenido en anillos precontraídos con FE. De los posibles mecanismos propuestos, observamos que ni TEA ni Gli modifican la respuesta a FCS-18.

La implicación de la actividad endotelial sobre el efecto vasodilatador de FCS-18 quedó demostrada, ya que la denudación del endotelio reduce significativamente las acciones vasculares de este agente. De igual forma, este efecto quedó demostrado cuando al incubarlo con el inhibidor de la síntesis de NO el efecto presentó similar grado de inhibición. En la cascada de eventos dependientes de NO participa la GCs, que es estimulada por el propio NO o por agentes que lo contengan (Koesling et al., 1991). Como es lógico esperar para las acciones mediadas por FCS-18 y a su vez el efecto vascular final, si son dependientes de NO están sujetas en segunda instancia a que el NO estimule a la GCs, por lo que, si esta última es inhibida, el mecanismo de señalización para producir la respuesta a FCS-18 queda bloqueado. De tal forma lo demuestran nuestros resultados, donde se evidencia claramente que en endotelio intacto, con una correcta estimulación

de NO, la inhibición de la GCs, inhibe el efecto vasodilatador del agente. Nuestros resultados indican que parte de la respuesta podría involucrar a otras sustancias dependientes del endotelio, como lo es la PGI₂, pues como pudimos comprobar, aunque la incubación con indometacina no afecta el efecto dilatador máximo, sí modifica la CE₅₀, indicativo que el prostanoide vasoactivo, también está implicado en la actividad descrita.

En este punto, podemos decir que la actividad del FCS-18 depende parcialmente de la actividad endotelial y es en parte mediada por el NO. Este resultado concluyente nos conduce a evaluar si dichas acciones dependen de la estimulación de receptores M₃ en células endoteliales. Cuando la curva concentración respuesta a FCS-18 fue generada en presencia del antagonista muscarínico, se observó una disminución del Emáx y aumento de la CE₅₀, pero dicha inhibición de la respuesta no se equiparó a los valores obtenidos en protocolos con endotelio desnudo o en incubación con L-NAME o AM. El hecho que atropina no lograra los mismo grados de inhibición puede explicarse por (1) Para equiparar la inhibición habría que utilizar una mayor concentración del antagonista; (2) Que la fenilcumarina evaluada además utiliza otros mecanismos, independientes de M₃, para generar su acción. A pesar de las posibles dudas planteadas, este resultado definitivamente demuestra que en la actividad vascular de FCS-18 hay una implicación de los receptores muscarínicos.

Por otra parte, descartamos la posible implicación de una estimulación de receptores adrenérgico del tipo β₂, ya que la incubación con su agente antagonista no modifico ni la respuesta máxima, ni la CE₅₀ del FCS-18. Pero

por su parte, el FCS-18 si modificó la respuesta contráctil a la noradrenalina. Como ya hemos mencionado con anterioridad, la vasoconstricción producida por esta catecolamina es mediada por varios mecanismos que conlleva al incremento de Ca^{2+} intracelular. Para el caso del FCS-18, más que impedir la acción del agonista, postulamos la posibilidad que se esté desarrollando un antagonismo fisiológico, en el que el estímulo M_3 y consecuente aumento de NO, promoverá, como parte de su mecanismo de acción, una menor disponibilidad citoplasmática Ca^{2+} , donde es indispensable para el desarrollo de una adecuada contracción.

La importante actividad vascular desarrollada en anillos con endotelio nos llevó a seleccionar a la FCS-21 para la realización de estudios para determinar sus posibles mecanismos de acción. Observamos que FCS-21 desarrolla una tendencia a perder actividad vasodilatadora cuando se evalúa en aortas sin endotelio funcional, sin embargo al incubarse con L-NAME la inhibición de la respuesta máxima se hizo notoria y resultados similares se observaron con la inhibición de la GCs. El efecto más significativo de la inhibición de la síntesis de NO y la actividad de GCs, se vio reflejado en la CE_{50} , que se incrementa de manera significativa. Esto indica que a concentraciones bajas, el FCS-21 modula respuestas dependientes del endotelio, pero que a medida que se incrementa las concentraciones se da la participación de otros mecanismos que conllevan a la acción dilatadora significativa. Esto último parece también quedar evidenciado con la incubación con indometacina, ya que aunque no muestra una modificación de la respuesta máxima, si se observan cambios significativos de la CE_{50} .

El efecto de FCS-21 no es modificado por el bloqueo de canales de K_{ATP} , pero la adición de TEA, reduce la potencia del compuesto, al producir un desplazamiento de la curva hacia la derecha.

Los resultados obtenidos con antagonistas de canales son muy importantes, ya que al parecer las acciones vasodilatadoras de los derivados 4-fenilcumarinas no poseen relación directa con la activación de canales de K_{ATP} , pero si podrían relacionarse con la posible activación de canales de potasio dependientes de calcio, los cuales pueden variar su respuesta de acuerdo a los estímulos. Cabe señalar que conjuntamente con los canales de potasio voltaje dependiente, los canales dependientes de calcio, son los que se encuentran en mayor proporción en las fibras musculares lisas; mientras que en la CE predominan los del tipo rectificadores de potasio (K_{ir}) (Korovkina y England, 2002)

A diferencia de lo ocurrido con la FCS-18, en la que la inhibición de su acción es dependiente del NO producido tras el estímulo de receptores M_3 , la acción vascular de la FCS-21 no se vincula con la estimulación del receptor colinérgico, ya que la incubación con atropina, lejos de inhibir su efecto, lo potenció. Algo similar ocurrió cuando la curva dosis respuesta a FCS-21 se realizó en tejidos incubados con propranolol, donde la respuesta vasodilatadora fue mayor que la generada por el agente solo.

Las acciones vasculares ya descritas para FCS-21 se hacen acompañar de una potente y significativa inhibición de la respuesta contráctil desarrollada por noradrenalina. Un aumento en la producción de NO podría ser parte del mecanismo que contrarreste la contracción por estímulo α_1 , sin embargo, no

se puede descartar un posible efecto antagónico directo y no competitivo, producido por FCS-21 sobre este receptor u otros mecanismos donde se vincula cambios en la disponibilidad de Ca^{2+} .

Basados en los resultados obtenidos, podemos señalar que las acciones o mecanismos por medio de los cuales las fenilcumarinas ensayadas desarrollan efecto vasodilatador, ocurren a través de múltiples mecanismos y que los mismos son variables entre unas y otras.

Por otro lado debemos mencionar que la multiplicidad, en cuanto a los posibles mecanismos involucrados en su efecto vasodilatador esta respaldada por la revisión sistemática sobre productos naturales y derivados realizada por MacNeill y Jurgens (2006), donde se demuestra claramente que los productos originados de plantas exhiben efectos dilatadores a través de diversos mecanismos como los planteados en este trabajo.

Los resultados obtenidos toman especial interés cuando se plantean la obtención de nuevas fenilcumarinas sintéticas, que en estudios bioguiados permitirán obtener las de mayor eficacia o las que desarrollan un perfil de actividad que brinde mayor potencial de utilidad.

Cabe señalar que nuestros resultados sobre los extractos de las plantas del género *Marila* son consistentes con los presentados en una reciente publicación donde otra planta perteneciente a la misma familia (*Guttiferae*) presentó efectos vasodilatadores. Adicionalmente fueron ensayados tres derivados cumarínicos, los que también presentaron efecto vasodilatador. (Dongmo et al, 2007)

Los diferentes ensayos realizados en esta investigación constituyen una parte de la amplia variedad de mecanismos responsables de producir relajación en los vasos sanguíneos, razón por la cual otros mecanismos relacionados con el calcio deberán ser evaluados para obtener conclusiones definitivas a cerca de sus mecanismos de acción.

CONCLUSIONES

Los extractos de *Marila laxifora* y *Marila pluricostata* ejercen efecto vasodilatador en anillos de aorta precontraídos con FE de forma concentración dependiente; siendo los extractos de *M. pluricostata* los que presentan un mayor de efecto.

Los extractos de *Marila pluricostata* presentaron un efecto hipotensor en ratas SHR que se puede relacionar con la actividad vasodilatadora demostrada en ensayos "in vitro".

Las cumarinas naturales y sintéticas estudiadas presentan efectos variables sobre la respuesta vascular existiendo productos que inducen contracción mientras que otros ejercen efectos vasodilatadores de diferente intensidad.

La eliminación del endotelio modifica las acciones vasorelajantes de FCS-18 y FCS-21 sin alterar considerablemente el efecto de FCS-15, por lo que su actividad vasodilatadora no está relacionada con la función endotelial.

La incubación con inhibidores de la función endotelial modificaron en mayor proporción los efectos de FCS-18 y FCS-21, indicando la implicación de la función endotelial en las acciones vasodilatadoras de ambos compuestos.

La incubación con atropina solo modifico el efecto de FCS-18 indicando posibles acciones muscarínicas de este compuesto.

Ninguno de los compuestos genera sus acciones vasodilatadoras a través de la activación de receptores β_2 -adrenérgicos.

El bloqueo de canales de potasio activados por ATP parece no tener implicación en las acciones de los derivados 4-fenilcumarinas; sin embargo TEA modificó ligeramente los efectos, lo cual sugiere que la activación de estos canales podría ser en parte responsable de los efectos de los productos.

Todos los compuestos 4-fenilcumarinas se comportan como antagonistas no competitivos de NA, al trasladar la curva hacia la derecha sin alcanzar el efecto máximo.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABREU, I.C., MARINHO, A.S., PAES, A.M., FREIRE, S.M., OLEA, R.S., BORGES, M.O. y BORGES AC. 2003 Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. *Fitoterapia*. 74: 650-657.
2. ADAMS, K.F. JR. 2004 Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am J Health Syst Pharm*. 61 Suppl 2:S4-S13.
3. AKASU, M., URATA, H., KINOSHITA, A., SASAGURI, M., IDEISHI, M. y ARAKAWA, K. 1998 Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension* 32(3): 514-520.
4. ARCHER, S.L., HUANG, J.M., HAMPL, V., NELSON, D.P., SHULTZ, P.J. y WEIR, E.K. 1994 Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*. 91(16): 7583-7587.
5. AUGUST, P. 2004 Overview: mechanisms of hypertension: cells, hormones, and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 15(8): 1971-1973.
6. Avendaño, C., Claramunt, R. y Espada, M. 2001. Introducción a la Química Farmacéutica. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Pág: 25-40.
7. BADYAL, D.K., LATA, H. y DADHICH, A.P. 2003 Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 349-362.
8. BARLASSINA, C., LANZANI, C., MANUNTA, P. y BIANCHI G. 2002 Genetics of essential hypertension: from families to genes. *J Am Soc Nephrol. Suppl* 3: S155-S164.
9. BEDOYA, L., BELTRÁN, M., SANCHO, R., OLMEDO, D., SANCHEZ-PALOMINO, S., DEL OLMO, E., LOPEZ-PEREZ, J.L., MUNOZ, E., SAN FELICIANO, A. y ALCAMI, J. 2005 4-Phenilcoumarins as HIV transcription inhibitors. *J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15(20): 4447-4450.
10. BEEPERS, G., LIP, G.Y. y O'BRIEN, E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* 322(7291): 912-916.
11. BOKESCH, H.R., GROWEISS, A. y MCKEE TC. 1999 Laxifloranone, a new phloroglucinol derivative from *Marila laxiflora*. *J Nat Prod*. 62: 1197-1199.
12. BORON, W. y BOULPAEP, E. 2003. Medical Physiology. First Edition. Sauders. USA, 1319 págs.
13. BRESALIER, R., SANDLER, R. y QUAN H. 2005 Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention Trial. *N Engl J Med*. 352: 1092-1102.
14. BROWN NJ. 2006. Blood pressure reduction and tissue-type plasminogen activator release. *Hypertension*., 47(4):648-649.

15. BRUTON, L., LAZO, J. y PARKER, K. 2001 Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V México, D.F. 2148 págs.
16. BUENZ, E.J., SCHNEPPLE, D.J. y BAUER, B.A. 2004 Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 494-498.
17. CALDERONE, V., CHERICONI, S., MARTINELLI, C., TESTAI, L., NARDI, A., MORELLI, I., BRESCHI, M.C. y MARTINOTTI, E. 2004 Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 370(4): 290-298.
18. CAÑIGUERAL, S. y VILA, R. 2002. Fitoterapia. Editorial Masson. España. 590 Págs.
19. CÁRDENAS-RODRÍGUEZ y PEDRAZA-CHAVERRI 2006 Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17(2): 164-173.
20. CARRETERO, O.A. y OPARIL, S. 2000 Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 101: 329-335.
21. CARRETERO, O.A. y OPARIL, S. 2000 Essential hypertension. Part II: Treatment. *Circulation* 101: 446-453.
22. CHILLON, J.M. y BAUMBACH, G.L. 2004 Effects of indapamide, a thiazide-like diuretic, on structure of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Hypertension* 43(5): 1092-1097.
23. CHOBANIAN, A.V., BAKRIS, G.L., BLACK, H.R., CUSHMAN, W.C., GREEN, L.A., IZZO, J.L. JR, JONES, D.W., MATERSON, B.J., OPARIL, S., WRIGHT, J.T. JR, ROCCELLA, E.J.; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. 2003 The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 report. *Hypertension* 42: 1206-1252.
24. CONSOLINI, A.E. y MIGLIORI, G.N. 2005 Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *J Ethnopharmacol.* 96(3): 417-422.
25. Consorcio TLBG / UP /STRI Informe Final de la Región Occidental de la Cuenca del Canal. Págs 233-288. *Disponible en www.pancanal.com/*
26. COOPER, E. 2005 Bioprospecting: a CAM Frontier. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 1-3.
27. COOPER, E. 2005 CAM, eCAM, Bioprospecting: The 21st Century Pyramid. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 125-127.
28. CORREA, M.D., FOSTER, R. y GALDAMES, C. 2001 Flora of Panama Checklist. *Smithsonian Tropical Research Institute.*

29. COTRAN, R.S., KUMAR, V. y COLLINS, T. 2000 Patología estructural y funcional de Robbins. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.U. México D.F. 1670 págs.
30. CRABTREE, G.R. 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem.* 276(4): 2313-2316.
31. CUZZOCREA, S., MAZZON, E., DUGO, L., DI PAOLA, R., CAPUTI, A.P., SALVEMINI, D. 2004 Superoxide: a key player in hypertension. *FASEB J.* 18(1): 94-101.
32. D'ARCY, W.G. 1980 Annals of the Missouri Botanical Garden. In Flora of Panama. Part. VI. Vol 67.
33. DAIGLE, C., MARTENS, F.M., GIRARDOT, D., DAO, H.H., TOUYZ, R.M. y MOREAU, P. 2004 Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord.* 4(6):1-8.
34. DE GASPARO, M., CATT, K., INAGAMI, J.T., WRIGHT, J.W. y UNGER T. 2000 International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 415-472.
35. DE LA SERNA, F. 2003 Insuficiencia Cardíaca Crónica. Capítulo cuatro, Capítulo cinco y Capítulo seis. Segunda Edición. Publicaciones de la Federación Argentina de Cardiología. Disponible en:
<http://www.fac.org.ar/1/publicaciones/libros/inscard.php>
36. DEDEURWAERDERE, T. 2004 Bioprospection: from the economics of contracts to reflexive governance. Disponible en:
<http://www.feem.it/Feem/Pub/Publications/Wpapers/default.htm>
37. DONGMO, A.B., AZEBAZE, A.G., NGUELEFACK, T.B., OUAHOUE, B.M., SONTIA, B., MEYER, M., NKENGFACK, A.E., KAMANYI, A. y VIERLING, W. 2007 Vasodilator effect of the extracts and some coumarins from the stem bark of *Mammea Africana* (Guttiferae). *J Ethnopharmacol.* 111(2): 329-334.
38. DORN, G.W., ROBBINS, J. y SUGDEN, P.H. 2003 Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 92(11): 1171-1175.
39. DUPUIS, F., ATKINSON, J., LIMINANA, P. y CHILLON, J.M. 2005 Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 144(3): 349-356.
40. EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J. y WESTON, A.H. 1998 K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 396(6708): 269-72.
41. ENDEMANN, D.H. y SCHIFFRIN, E.L. 2004 Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 15(8):1983-1992.
42. ERDINE, S. y NAZIF, S. 2004 Current status of hypertension control around the World. *Clinical and Experimental Hypertension* 26(7): 731-738.
43. FLACK, J., PETERS, R., SHAFI, T., ALREFAI, H., NASSER, S.S. y CROOK, E. 2003 Prevention of hypertension and its complications: theoretical basis and guidelines for treatment. *J Am Soc Nephrol* 14: S92-S98.

44. FLOREZ, J., ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, Á. 2005 Farmacología Humana. Editorial Masson S. A. España 1355 págs.
45. FORTUÑO, M.A., ZALBA, G., ETAYO, J.C., FORTUÑO, A., BEAUMONT, J., RAVASSA, S., GONZÁLEZ, A. y DÍEZ, J. 1998 Cardiopatía Hipertensiva. *Anales del Sis San Navarra* 21 (Sup 1): 55-67.
46. FORTUNO, M.A., GONZALEZ, A., RAVASSA, S., LOPEZ, B. y DIEZ, J. 2003 Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284(5): H1495-H1506.
47. FORTUÑO, A., JOSE, G.S., MORENO, M.U., DIEZ, J. y ZALBA, G. 2005 Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol*. 90(4): 457-462.
48. FRANCO, V., OPARIL, S. y CARRETERO, O. 2004 Hypertensive Therapy: Part I. *Circulation* 109:2053-2058.
49. FRANCO, V., OPARIL, S. y CARRETERO, O. 2004 Hypertensive Therapy: Part II. *Circulation* 109:3081-3088.
50. FREEL, E.M. y CONNELL, J.M. 2004 Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*. 15(8): 1993-2001.
51. FRESQUET J. 2000. Plantas y medicinas. *Fitoterapia* 1: 49-57
52. FREY, N., KATUS, H.A., OLSON, E.N. y HILL JA. 2004 Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109(13): 1580-1589.
53. FRIEDMAN, M., WOODCOCK, J. y LUMPKIN, M. 1999 The Safety of Newly Approved Medicines: Do Recent Market Removals Mean There Is a Problem? *JAMA*. 281: 1728-1734.
54. FRUSCIANTE, L., BARONE, A. y CARPUTO, D. 2000 Evaluation and use of plant biodiversity for food and pharmaceuticals. *Fitoterapia*, 71: S66-S72.
55. FU, X.C., WANG, M.W., LI, S.P., ZHANG, Y. y WANG H.L. 2005 Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study. *Biol Pharm Bull*. 28(1):37-41.
56. GALLEY, H.F. y WEBSTER, N.R. 2004 Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 93 (1): 105-113.
57. GANADO, P., SANZ, M., PADILLA, E. y TEJERINA, T. 2004 An in vitro study of different extracts and fractions of *Allium sativum* (garlic): vascular reactivity. *J Pharmacol Sci*. 94(4): 434-442.
58. GANONG, W. 2005. Fisiología Médica. Tercera edición. MANUAL MODERNO SA de CV., México, 1800 págs.
59. GARRITY, G. y HUNTER-CEVERA J. 1999 Bioprospecting in the developing world. *Curr Opin Microbiol.*, 2(3): 236-240.
60. GONZALEZ-JUANATEY, J.R., MAZÓN, P., SORIA, F., BARRIOS, V., RODRÍGUEZ, L. y BERTOMEU, V. 2003 Actualización (2003) de las guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*. 56(5): 487-497.

61. GRASSI, G. 2004 Sympathetic and baroreflex function in hypertension: implications for current and new drugs. *Curr Pharm Des.* 10(29): 3579-3589.
62. GUARRERA, P. 2005 Tradicional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia:* 76: 1-25.
63. GUERRERO, E., VOCES, F., ARDANAZ, N., MONTERO, M.J., AREVALO, M. y SEVILLA, M.A. 2003 Long-term treatment with nebivolol improves arterial reactivity and reduces ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 42(3): 348-355.
64. GUERRERO, E.I., ARDANAZ, N., SEVILLA, M.A., AREVALO, M.A. y MONTERO, M.J. 2006 Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J Hypertens.* 24(1): 151-158.
65. GUERRERO, M.F., PUEBLA, P., CARRON, R., MARTIN, M.L., ARTEAGA, L. y ROMAN, L.S. 2002 Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 80(1): 37-42.
66. GUYTON, A.C. y MAY, J.E. 2001. Tratado de Fisiología Médica. Décima Edición. McGraw-Hill Interamericana, México D.F. 1280 págs.
67. HACKER A, MULLER S, MEYER W y KOJDA G. 2001 The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 132(8): 1707-1714.
68. HADDY, F., VANHOUTTE, P y FELETOU M. 2006 Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am. J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 290(3): R546-R552.
69. HARRAP, S.B. 2003 Where are all the blood-pressure genes? *Lancet* 361(9375):2149-2151.
70. HOPKINS, J. 2004. European guidelines on hypertension more flexible than those in United States. *BJP* 328: 1279-1281.
71. HOROWITZ, A., MENICE, C.B., LAPORTE, R. y MORGAN K.G. 1996 Mechanisms of smooth muscle contraction *Physiol Rev.* 76: 967-1003.
72. HOUSSAI T. 2001 Fisiología Humana. Editorial El Ateneo, Argentina. 750 Págs.
73. IGNARRO, L.J., BALESTRIERI, M.L. y NAPOLI, C. 2007 Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovasc Res.* 73(2):326-340.
74. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES COMMISSION ON LIFE SCIENCES NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, D.C. 125 págs.

75. INTENGAN, H. y SCHIFFRIN, E. 2001 Vascular Remodeling in Hypertension: roles of Apoptosis, Inflammation, and Fibrosis *Hypertension* 38: 581-587.
76. INTENGAN, H.D. y SCHIFFRIN, E.L. 2000. Links Disparate effects of carvedilol versus metoprolol treatment of stroke-prone spontaneously hypertensive rats on endothelial function of resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35(5): 763-768.
77. IOSET, J.R., MARSTON, A. y GUPTA M. 1988 Anfifungal xanthenes froma roots of Marila Laxiflora. *Pharm. Biol.* 36: 103-106.
78. IRVINE, J.C., FAVALORO, J.L. y KEMP-HARPER, B.K. 2003 NO-activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension* 41(6): 1301-1307.
79. KABEYA, L.M., DE MARCHI, A.A., KANASHIRO, A., LOPES, N.P., DA SILVA, C.H., PUPO, M.T. y LUCISANO-VALIM, Y.M. 2007 Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem.* 15(3): 1516-1524.
80. KANNEL, W.B., D'AGOSTINO, R.B., SULLIVAN, L., y WILSON, P.W. 2004 Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. *Am Heart J.* 148:16-26.
81. KARAKI, H., OZAKI, H., HORI, M., MITSUI-SAITO, M., AMANO, K., HARADA, K., MIYAMOTO, S., NAKAZAWA, H., WON, K.J. y SATO, K. 1997 Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 49(2): 157-230.
82. KIM, J.R., KIEFE, C.I., LIU, K., WILLIAMS, O.D., JACOBS, D.R. JR y OBERMAN, A. 1999 Heart rate and subsequent blood pressure in young adults: the CARDIA study. *Hypertension* 33(2): 640-646.
83. KOESLING, D., BOHME, E. y SCHULTZ, G. 1991 Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 5(13): 2785-2791.
84. KOPPITZ, M. y EIS, K. 2006 Automated medicinal chemistry. *Drug Discovery Today* 12(11): 561-568.
85. KOROVKINA, V.P. y ENGLAND, S.K. 2002 Detection and implications of potassium channel alterations. *Vascul Pharmacol.* 38: 3-12. *Abstract.*
86. KWAN, C.Y., CHEN, C.X., DEYAMA, T. y NISHIBE, S. 2004 Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv. Leaf and bark: implications on their antihypertensive action. *Vascul Pharmacol.* 40: 229-235.
87. LENTINI, F. 2000. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Silicy. *Fitoterapia* 71: S83-S88.

88. LEWINGTON, S., CLARKE, R. y QIZILBASH, N. 2002 Age-specifying relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta analysis of individual data for one million adults in 61 prospective study. *Lancet* 360: 1903-1913.
89. LI, Z., CHEN, X., NIWA, Y., SAKAMOTO, S. y NAKAYA Y. 2001 Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in ginsenosides-induced aortic relaxation in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37(1): 41-47.
90. LIFTON, R.P., GHARAVI, A.G. y GELLER, D.S. 2001 Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* 104(4): 545-556.
91. LÓPEZ-PÉREZ, J.L., OLMEDO, D., DEL OLMO, E., VASQUEZ, Y., SOLIS, P.N., GUPTA, M.P. y SAN FELICIANO, A. 2005 Cytotoxic 4-Phenilcoumarins from leaves of *Marila pluricostata*. *J. Nat. Prod.* 68: 369-373.
92. MA, H y HORIUCHI, K. 2006 Chemical microarray: a new tool for drug screening and discovery *Drug Discovery Today* 13(11): 661-668.
93. MACILWAIN, C. 1998 When rhetoric hits reality in debate on bioprospecting. *Nature* 392: 535-540
94. MAGNON, M., CALDERONE, V., FLOCH, A. y CAVERO, I. 1998 Influence of depolarization on vasorelaxant potency and efficacy of Ca^{2+} entry blockers, K^+ channel openers, nitrate derivatives, salbutamol and papaverine in rat aortic rings. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 358(4):452-63. *Abstract.*
95. MANCIA, G. y GRASSI, G. 2005 Joint National Committee VII and European Society of Hypertension/European Society of Cardiology Guidelines for Evaluating and Treating Hypertension: A Two-Way Road? *J Am Soc Nephrol* 16: S74-S77.
96. MAZZALI, M., HUGHES, J., KIM, Y.G., JEFFERSON, J.A., KANG, D.H., GORDON, K.L., LAN, H.Y., KIVLIGHN, S. y JOHNSON, R.J. 2001 Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 38(5): 1101-1106.
97. MILLER, K., LIEBOWITZ, R. y NEWBY, K. 2004 Complementary and alternative medicine in cardiovascular disease: a new review of biologically based approaches. *Am Heart Journal* 147(3): 401-408.
98. MONCADA, S. y HIGGS, E.A. 2006 The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1: S193-S201.
99. MORENO, A., DIVISÓN, J.A. y LLISTERRI, C. 2005 Conducta del médico de atención primaria ante el mal control de la presión arterial. *Rev. Atención Primaria* 36: 204-210.
100. MORI, T., COWLEY, A. e ITO, S. 2006 Molecular mechanism and therapeutic strategies of chronic renal injury: Physiological role of angiotensin II-induced oxidative stress in renal medulla. *J Pharmacol Sci.* 100: 2-8

101. MORI, Y., OHYANAGI, M., KOIDA, S., UEDA, A., ISHIKO, K. y IWASAKI, T. 2006 Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 29(3): 187-195.
102. MOSTERD, A., D'AGOSTINO, R.B., SILBERSHATZ, H., SYTKOWSKI, P.A., KANNEL, W.B., GROBBEE, D.E. y LEVY, D. 1999 Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *N Engl J Med.* 340(16): 1221-1227
103. MURRIA, R., MAYES, P., GRANNER, D. y RODWELL, V. 2002. Bioquímica de Harper. 15ª Edición. El Manual Moderno. México D.F. 900 págs.
104. NABEL, E.G. 2003. Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 349:60-72.
105. NELSON, M.T. y QUAYLE, J.M. 1995 Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 268(4):C799-C822. *Abstract*
106. NEVES, M.F., AMIRI, F., VIRDIS, A., DIEP, Q.N. y SCHIFFRIN, E.L. 2005 Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 83(11): 999-1006.
107. NEVES, M.F. y SCHIFFRIN, E.L. 2003 Aldosterone: a risk factor for vascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 5(1): 59-65.
108. NICASIO, P. y MECKES, M. 2005. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from Jacaranda mimosaeifolia leaves in rats. *J Ethnopharmacol.* 97(2): 301-304.
109. NIJKAMP, F. y PARNHAM, M. 1999 Principles of Immunopharmacology. Birkhäuser. Pág. 450 págs.
110. NILIUS, B. y DROOGMANS, G. 2001 Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 81(4): 1415-1459.
111. ONAGA, L. 2001 Cashing in on nature's pharmacy: Bioprospecting and protection of biodiversity could go hand in hand. *EMBO Rep.* 2: 263-265.
112. OPARIL, S., ZAMAN, M.A. y CALHOUN, D.A. 2003 Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med.* 139(9): 761-776.
113. OPIE, L. y GERSH, B. 2001 Fármacos en cardiología. Quinta Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, D.F. 523 págs.
114. O'ROURKE, M.F. y SAFAR, M.E. 2005. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 46(1): 200-204.
115. PRIES, A.R., REGLIN, B. y SECOMB, T.W. 2005 Remodeling of blood vessels: responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli. *Hypertension* 46(4):725-731.

116. PU, Q., NEVES, M.F., VIRDIS, A., TOUYZ, R.M. y SCHIFFRIN, E.L. 2003 Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 42(1): 49-55.
117. QUESADA, R. y FERNÁNDEZ, J. 2005 Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2(4): 1-45. Disponible en: www.wicr.ac.cr/revistakuru/
118. REDDY, K.S. 2004 Cardiovascular disease in non-Western countries. *N Engl J Med.* 350:2438-2440.
119. REMUZZI, G., RUGGENENTI, P. y PERICO, N. 2002 Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med.* 136: 604-615
120. RIZZONI, D., PORTERI, E., GUELFY, D., MUIESAN, M.L., VALENTINI, U., CIMINO, A., GIRELLI, A., RODELLA, L., BIANCHI, R., SLEIMAN, I. y ROSEI, E.A. 2001 Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 103(9): 1238-1244.
121. RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R., HERRERA, M.D., PERONA, J.S. y RUIZ-GUTIERREZ, V. 2004 Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in "orujo" olive oil, on rat aorta. *Br J Nutr.* 92(4):635-642.
122. SHARMA, J.N. 2005. The kallikrein-kinin system: from mediator of inflammation to modulator of cardioprotection. *Inflammopharmacology* 12 (5): 591-596.
123. SOEJARTO, D., FONG, H. y TAN, G. 2005 Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: issues on intellectual property and benefit-sharing. *J Ethnopharmacol.* 100: 15-22.
124. STIER, C.T. JR, KOENIG, S., LEE, D.Y., CHAWLA, M.Y y FRISHMAN, W.H. 2003 Aldosterone and aldosterone antagonism in cardiovascular disease: focus on eplerenone (Inspra). *Heart Dis.* 5(2): 102-118.
125. SU, D-F. y MIAO, C-Y. 2005. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for treatment of hypertension. *Trends Pharmacol Sci.* 26 (8): 388-390
126. SUDA, O., TSUTSUI, M., MORISHITA, T., HORIUCHI, M., NAKATA, S., KOUZUMA, R., OKAZAKI, M., SUMIYAMA-FUJINISHI, A., MIZUKI, T., YANAGIHARA, N., TASAKI, H. y NAKASHIMA, Y. 2006 Long term treatment with imidapril but not with nifedipine enhances plasma Nox concentration in patients with essential hypertension. *J Pharmacol Sci.* 101: 159-165
127. TANIYAMA, Y. y GRIENGLING, K.K. 2003 Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 42(6): 1075-1081.

128. TESTAI, L., CHERICONI, S., CALDERONE, V., NENCIONI, G., NIERI, P., MORELLI, I. y MARTINOTTI E. 2002 Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol.* 81(1): 105-109.
129. THE TASK FORCE ON ACE-INHIBITORS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. 2004. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *European Heart Journal* 25: 1454-1470.
130. THE TASK FORCE ON BETA-BLOCKERS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. 2004. Expert consensus document on β -adrenergic receptor blockers. *European Heart Journal* 25: 1341-1362.
131. TOUYZ, R. Y SCHIFFRIN, E. 2000. Signal transduction mechanism mediating the physiological and pathophysiological actions of Angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 52: 639-672.
132. TZEMOS, N., LIM, P.O. y MACDONALD, T.M. 2001 Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 104(5):511-514.
133. VANHOUTTE, P.M. 2001. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest.* 107(1): 23-25.
134. VASAN, R.S., BEISER, A., SESHADRI S., LARSON, M.G., KANNEL, W.B., D'AGOSTINO, R.B. y LEVY D. 2002 Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA* 287(8):1003-1010.
135. VLIETINCK, A.J., DE BRUYNE, T. y APERS, S. 1998 Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64: 97-109.
136. VON ZUR MUHLEN, B., KAHAN, T., HAGG, A., MILLGARD, J. y LIND, L. 2001 Treatment with irbesartan or atenolol improves endothelial function in essential hypertension. *J Hypertens.* 19(10): 1813-1818.
137. WANSTALL, J.C., JEFFERY, T.K., GAMBINO, A., LOVREN, F. y TRIGGLE, C.R. 2001 Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol.* 134(3): 463-472.
138. WANSTALL, J.C., KAYE, J.A. y GAMBINO, A. 1999 The in vitro pulmonary vascular effects of FK409 (nitric oxide donor): a study in normotensive and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 121(2): 280-286.
139. WATANABE, T., BARKER, T.A. y BERK, B.C. 2005 Angiotensin II and the Endothelium: Diverse Signals and Effects. *Hypertension* 45: 163-169.

140. WENIGER, B., ROBLEDO, S. y ARANGO, G. 2001 Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol.* 78: 193-200.
141. WENZEL, R. 2005 Renal Protection in hypertensive patients: selection of antihypertensive therapy. *Drugs* 65: Suppl 2: 29-39.
142. WILLIAMS, J.S. y WILLIAMS, G.H. 2003 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(6): 2364-2372.
143. WOLF-MAIER, K., COOPER R., KRAMER, H., BANEGAS, J., GIAMPOLI, S., JOFFES, M., POULTER, N., PRIMATESTA, P., STEGMAYR, B. y THAMM, M. 2003 Hypertension treatment and control in five European Countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 43: 10-17
144. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1999 WHO monographs on selected medicinal plants, 1999. Disponible en: whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf
145. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2002 World Health Report: Reducing risks, promoting Healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2002>.
146. WYSOWSKI, D.K. y BACSANYI, J. 1996 Cisapride and Fatal Arrhythmia. *N Engl J Med.* 335: 290-291.
147. YANG, D., FELETOU, M., BOULANGER, C.M., WU, H.F., LEVENS, N., ZHANG, J.N. y VANHOUTTE, P.M. 2002 Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 136(1): 104-110.
148. YASHIRO, Y. y DULING BR. 2000 Integrated Ca²⁺ signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels. *Circ Res.* 87(11): 1048-1054.
149. YOSHII, T., IWAI, M., LI, Z., CHEN, R., IDE, A., FUKUNAGA, S., OSHITA, A., MOGI, M., HIGAKI, J. y HORIUCHI, M. 2006 Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. *Hypertens Res.* 29(6): 457-466.
150. YUSUF, S., REDDY, S., ÔUNPUU, S. y ANAND, S. 2001 Global Burden of Cardiovascular Diseases Part I: General Considerations, the Epidemiologic Transition, Risk Factors, and Impact of Urbanization. *Circulation* 104:2746-2753.
151. YUSUF, S., VAZ, M. y PAIS, P. 2004 Tackling the challenge of cardiovascular disease burden in developing countries. *Am Heart J.* 148:1-4.
152. ZANCHETTI, A. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J. Hyperten.* 21:1011-1053.
153. ZENG, C., EISNER, G.M., FELDER, R.A. y JOSE PA. 2005 Dopamine receptor and hypertension. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 3(1): 69-77.

154. ZHOU, X. y FROHLICH, E.D. 2005. Physiologic evidence of renoprotection by antihypertensive therapy. *Curr Opin Cardiol.* 20(4): 290-295.
155. ZHU, H., POOLE, J., LU, Y., HARSHFIELD, G.A., TREIBER, F.A., SNIEDER, H. y DONG, Y. 2005 Sympathetic nervous system, genes and human essential hypertension. *Curr Neurovasc Res.* 2(4): 303-317.

ANEXOS



Fig. 40. Fotografía de *Marila laxiflora*. Tomada por Licdo. Alex Espinosa en Llano Cartí, Panamá.



Fig. 41. Fotografía de *Marila pluricostata*. Tomada por Licdo. Alex Espinosa en Llano Cartí, Panamá.

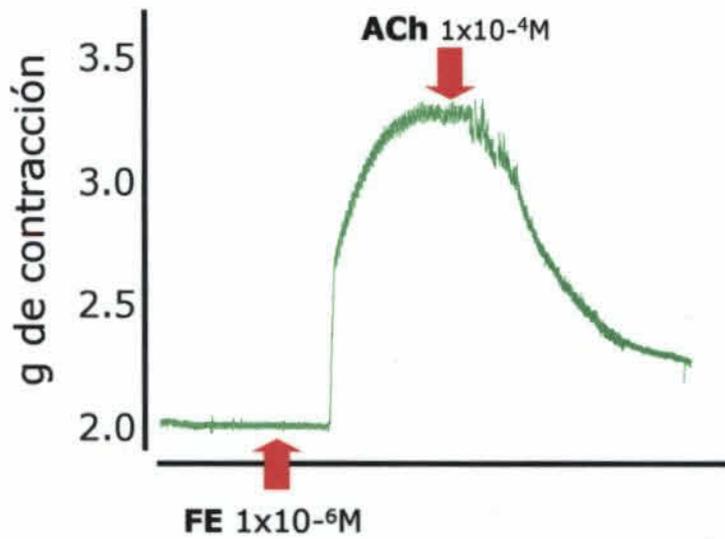


Fig. 42. Registro original de la respuesta a acetilcolina en anillos de aortas con endotelio de ratas Sprague Dawley.

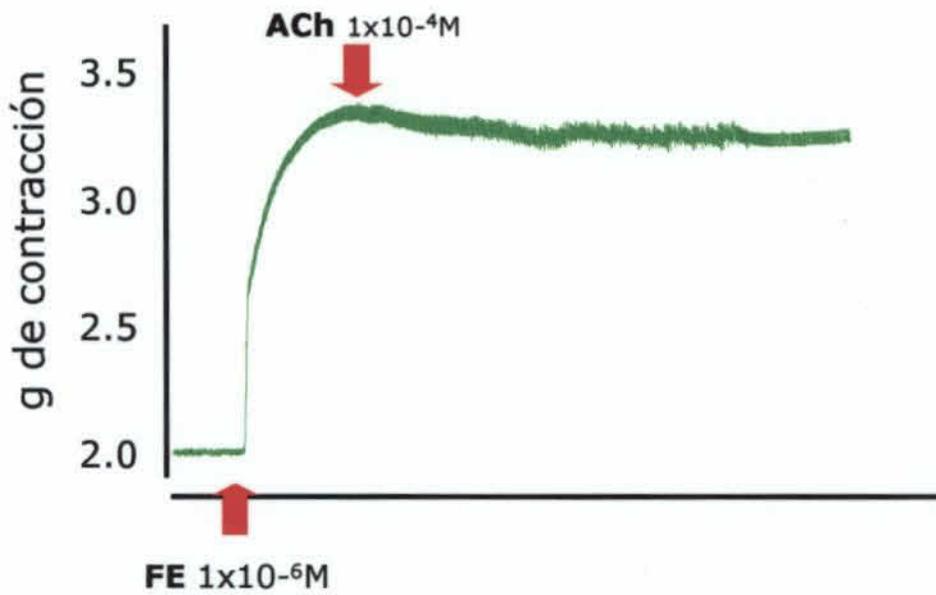


Fig. 43. Registro original de la respuesta a acetilcolina en anillos de aortas sin endotelio de ratas Sprague Dawley.

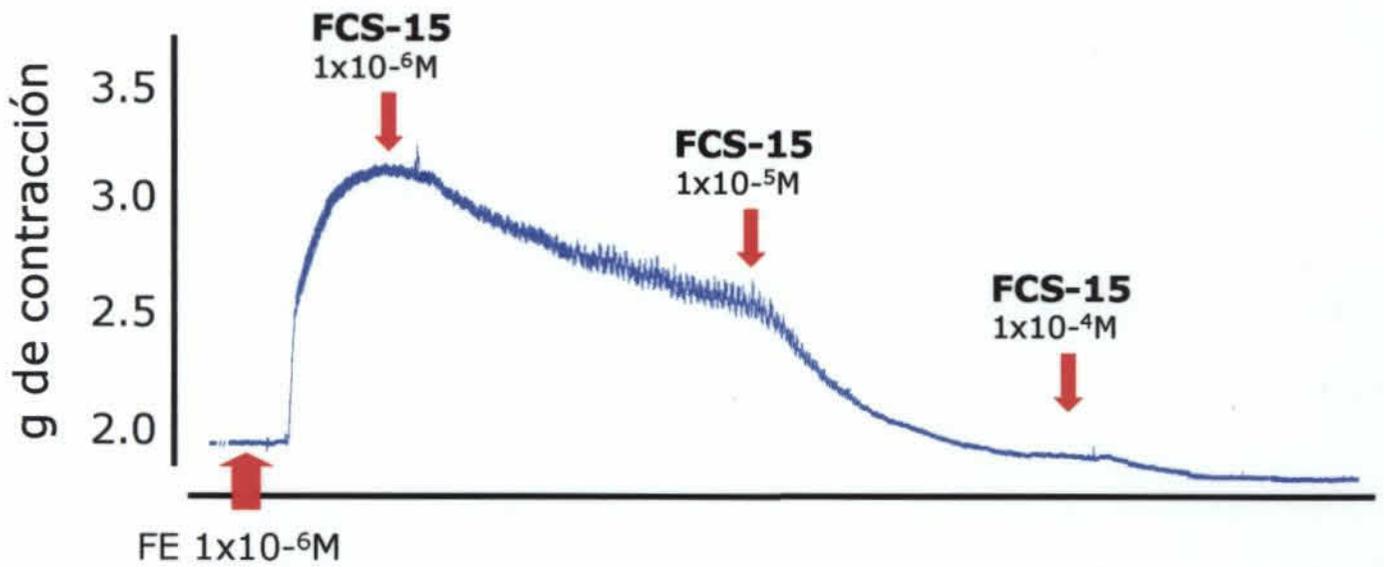


Fig. 44. Registro original de la respuesta relajante de la fenilcumarina sintética FCS-15 en anillos de aortas de ratas Sprague Dawley con endotelio precontraídos con FE 1×10^{-6} M.