



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE *ANACARDIUM OCCIDENTALE*: AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DEL COMPUESTO ACTIVO Y POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre, Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Herimar Maria Bellera Hernández** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Omar Estrada

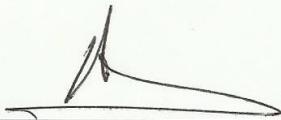
Caracas, Venezuela

Mayo, 2018

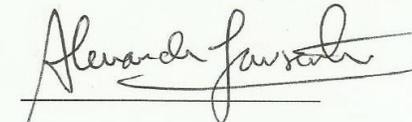
**DEL EXAMEN PUBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE
LA BR. HERIMAR MARIA BELLERA HERNANDEZ**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designados por el Consejo de la Escuela de Biología, de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), para examinar el Trabajo Especial de Grado (T.E.G.) presentado por la Br. Herimar Maria Bellera Hernández, C.I. 22.784.947, intitulado "**Actividad vasorrelajante de *Anacardium occidentale*: Aislamiento biodirigido del compuesto activo y posible mecanismo de acción**", para optar al título de Licenciado en Biología, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela y, por lo tanto, lo declaramos aprobado con una calificación de veinte (20) puntos.

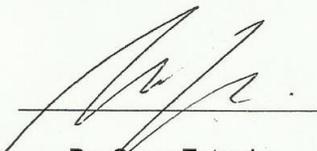
Para dar fe de ello se levanta la presente acta, en Caracas, a los 21 días del mes de mayo de 2018, dejando constar que la Prof. Vincenza Cervino actuó como coordinadora del jurado exterminador



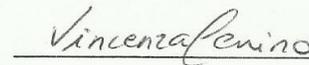
Dr. Antonio a Gutiérrez
Jurado Principal



Dr. Alexander Laurentin
Jurado Principal



Dr. Omar Estrada
Tutor



Dra. Vincenza Cervino
Asesora Académica

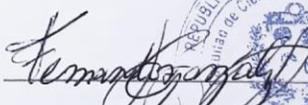


Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que a través de una consulta de fecha 28/05/2018, los miembros del Consejo de la Escuela de Biología acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller. **Bellera H., Herimar M.**, titular de la cédula de identidad No. 22.784.947; titulado: "**Actividad vasorrelajante de *Anacardium occidentale*: Aislamiento biodirigido del compuesto activo y posible mecanismo de acción.**"; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los ocho días del mes de junio del año dos mil dieciocho.


Prof. Fernando González
Director (E)



FG/mb.-

AGRADECIMIENTOS

Culminar este trabajo, que me ha sido arduo, extenso y me ha hecho sentir todas las emociones, es inevitable no dar la mayor parte del mérito en el aporte que se ha hecho. Sin embargo, debería ser obvio que un trabajo tan grande como considero que es este, hubiese sido imposible sin la participación y el apoyo de personas que han estado conmigo a lo largo de esta experiencia.

Agradezco a mi madre, Irma, el apoyo que me ha dado, la educación que me brinda y los valores inculcados. Por escucharme, desvelarse conmigo, ayudarme a buscar siempre la solución al problema, recordarme lo que soy, lo que puedo ser y por todo lo que tengo en esta vida y sobre todo por el amor incondicional.

A mi padre, Hernán por enseñarme desde pequeña el mundo de la investigación y el amor por el conocimiento y aprendizaje, por llevarme de la mano siempre a todos lados y estar siempre presente. Por ser mi mejor transporte y cuidar de que no me faltara nada.

A mi tutor, Omar por todas las enseñanzas, paciencia, dedicación y empeño para llevar a cabo este proyecto. Por confiar en mí, enseñarme a que siempre puedo dar más, por apoyar todas mis ideas ser un guía y un papá en el laboratorio.

A mi compañera de laboratorio, Whendy por encaminarme en este proyecto, por sus excelentes consejos y enseñanzas. Por las buenas costumbres inculcadas, por el café de todas las mañanas y las tardes de plática.

A Gabriel por estar todos los días, más presente que nadie incluso a pesar de la distancia, por las mejores palabras de apoyo y motivación que alguien puede dar, por confiar en mí, aguantarme, trasnocharse y buscar siempre la manera de tenerme con buen ánimo.

A mis amigas, Oriana C, Cassandra, Oriana O, Dayanna y Anny por los infinitos desvelos, las risas, los llantos, las quejas, todas las experiencias compartidas, pero sobre todo por hacer de estos años de carrera los mejores, sin ustedes nada hubiera sido igual.

A Antonella, Nelson y Radha por hacer del laboratorio un hogar, por todo lo enseñado, las experiencias compartidas y el apoyo.

A todos mis distinguidos profesores de la carrera, porque de cada uno he aprendido valiosas lecciones, por darlo todo en las clases, y dedicarse a nosotros.

Al jurado. Prof. Antonio Gutiérrez, Prof. Alexander Laurentin por tomarse el tiempo de leer y corregir este trabajo.

Infinitas Gracias.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud a nivel mundial. Actualmente, la presión arterial alta es la principal causa de muerte en la población. En Venezuela existe una prevalencia de hipertensión arterial, donde el factor de riesgo es uno de los más altos de los países latinoamericanos. Los tratamientos antihipertensivos pueden ser la mejor solución para reducir el riesgo sufrir enfermedades cardiacas. El desarrollo de nuevos tratamientos continúa siendo un reto y la diversidad de metabolitos encontrados en plantas representa una plataforma para la búsqueda de compuestos vasorrelajantes.

Estudios previos han demostrado que *Anacardium occidentale* comúnmente conocido como marañón o merey tiene efectos antioxidantes, propiedades hipoglucémicas y antihipertensivas. Basado en el fundamento teórico y en esta evidencia, en este trabajo se planteó un ensayo biodirigido para evaluar el efecto vasorrelajante de *A. occidentale*, caracterizar el compuesto de mayor actividad y proponer un posible mecanismo de acción.

La actividad vasorrelajante se evaluó mediante la técnica de órgano aislado en anillos aórticos de rata. Los resultados demostraron que el extracto metanólico de corteza de *A. occidentale* poseía varios compuestos con efecto vasorrelajante endotelio-dependiente. Mediante un método de solubilidad por solvente y cromatografía de columna Sephadex LH-20 se logró aislar el compuesto activo de mayor actividad vasorrelajante, E3III. Este compuesto fue caracterizado cualitativamente por cromatografía de capa fina y posteriormente analizado por EM y RMN ¹H determinándose que era un tanino condensado de tipo proantocianidinas, formado por un trímero de catequina polihidroxiladas.

Mediante la técnica de órgano aislado se determinó que E3III tenía una actividad vasorrelajante dependiente de endotelio, que actúa mayoritariamente por óxido nítrico y GMPc a través de la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca⁺² en las células endoteliales. También E3III interviene parcialmente en la generación de PGI en las células endoteliales e involucra a receptores acoplados a proteína G: muscarínico M3 y purinérgicos P2Y y los receptores rianodina del retículo sarcoplásmico.

PALABRAS CLAVE: ANACARDIUM. OCCIDENTALE, VASORELAJACIÓN, ANILLO DE AORTA, TANINO, ENDOTELIO.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP: 4-Aminopiridina

AC: Acetona

ACET: Acetato de etilo

AcFo: Ácido fórmico

AcOH: Ácido acético

ACh: Acetilcolina

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

AnOc: Anacardium occidentale

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

Cch: Carbacol

COX: Enzima Ciclooxygenasa

DAG: Diaglicerol

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EDHF: Factor hiperpolarizante de endotelio

EDRF: Factor relajante derivado de endotelio

eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial

E+ Con endotelio

E- Sin endotelio

EM: Espectroscopia de masa

ET-1: Endotelina 1

FE: Fenilefrina

HTA: Hipertensión arterial

IP₃: Inositol trifosfato

IR: Infrarrojo

L-NAME: NG-Nitro-L-arginina metil ester

MeOH: Metanol

MLCK: Enzima quinasa miosina de cadena ligera

MLCP: Enzima fosfatasa miosina de cadena ligera

NO: Óxido nítrico

NPS: Nitroprusiato de sodio

PKC: Proteína quinasa C

PGI₂: Prostaciclina

RhoA: Rho- quinasa

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNS: Sistema Nervioso Simpático

TEA: Tetraetilamonio

TLC: Cromatografía de capa fina (Thin layer Chromatography)

XO: Extracto metanólico de corteza

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Lista de abreviaturas	4
Índice General	5
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
Fisiopatología de la Hipertensión arterial.....	12
Estructura arterial.	13
Mecanismos asociados con la HTA.....	14
Mecanismos de la musculatura lisa.....	14
El endotelio vascular.....	17
Disfunción endotelial y estrés oxidativo.....	20
Participación de los receptores acoplados a proteína G en el musculo liso vascular.....	20
Función de los canales de potasio y su relación con la HTA.....	23
La investigación de productos naturales en el tratamiento de la hipertensión.....	24
2. ANTECEDENTES.....	25
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31

4.1 Ensayo biodirigido.....	31
4.2 Materia Biológico	33
4.3 Materiales y reactivos.....	33
4.4 Equipo utilizado.....	34
4.5 Fraccionamiento y aislamiento del compuesto activo del extracto de corteza de <i>Anacardium occidentale</i> (AnOc)	34
4.5.1 Método de solubilidad por solventes orgánicos.	34
4.5.2 Cromatografía de columna Sephadex LH-20.....	35
4.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC).....	35
4.5.4 Caracterización del compuesto aislado por pruebas cualitativas	36
4.5.5 Análisis Espectroscópicos del compuesto aislado	37
4.6 Ensayo biológico mediante la técnica de órgano aislado.....	37
4.6.1 Disección de aorta torácica y montaje de la preparación.....	38
4.6.2 Condiciones de estabilización del tejido.....	39
4.6.3 Evaluación de la viabilidad del endotelio.....	40
4.6.4 Construcción de la curva acumulativa concentración-respuesta (Evaluación de actividad vasorrelajante del extracto, fracciones, y subfracciones de <i>AnOc</i>).....	41
4.6.5 Evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto activo aislado de <i>AnOc</i>	42
4.6.5.1 Calculo de la concentración efectiva media del compuesto	42
4.6.5.2 Respuesta vasorrelajante del compuesto ante diferentes agonistas	43
4.6.5.3 Competitividad del compuesto en el α -adrenorreceptor	43
4.6.6 Evaluación de la participación del óxido nítrico y prostaciclina en el efecto relajante del compuesto aislado de <i>AnOc</i>	44

4.6.7	Evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto activo aislado de <i>AnOc</i> en presencia de Nitroprusiato de sodio	45
4.6.8	Evaluación de la participación del GMPc en el efecto relajante del compuesto aislado de <i>AnOc</i>	45
4.6.9	Evaluación de la participación de los receptores acoplados a proteína G: β -adrenérgicos, muscarínico Y purinérgico en el efecto relajante del compuesto aislado de <i>AnOc</i>	46
4.6.10	Evaluación de la participación de los canales de potasio en el efecto relajante del compuesto aislado de <i>AnOc</i>	46
4.6.11	Evaluación de la participación de los canales de calcio tipo L, y receptores de rianodina en el efecto relajante del compuesto aislado de <i>AnOc</i>	47
4.7	Análisis de los datos.....	48
5.	RESULTADOS.....	51
5.1	Actividad Vasorrelajante del extracto <i>AnOc</i>	51
5.2	Fraccionamiento del extracto etanólico de corteza <i>AnOc</i>	52
5.3	Actividad vasorrelajante de las fracciones obtenidas a partir del extracto <i>AnOc</i>	53
5.4	Subfraccionamiento de la fracción E3 obtenida a partir del extracto <i>AnOc</i>	55
5.5	Actividad vasorrelajante de las subfracciones obtenidas de la fracción E3.....	58
5.6	Caracterización del compuesto E3III.....	59
5.6.1	Caracterización cualitativa de E3III por reveladores cromatográficos.....	59
5.6.2	Análisis de E3III por técnicas espectroscópicas de IR, EM y RMN H-1.....	60
5.7	Actividad vasorrelajante del compuesto E3III.....	61
5.8	Mecanismo de acción de la vasorelajación inducida por E3III.....	64
5.8.1	Participación de los factores derivados de endotelio.....	64
5.8.2	Participación del GMPc como segundo mensajero.....	66

5.8.3	Participación de los receptores muscarínicos, beta adrenérgicos y purnérgicos.....	67
5.8.4	Participación de los canales de potasio (K^+_V , K_{ATP} , $K_{Ca^{+2}}$).....	69
5.8.5	Participación de Canales de calcio tipo L y Receptores rianodina.....	70
6.	DISCUSIÓN.....	71
	Efecto vasorrelajante endotelio dependiente del extracto, fracciones E2 Y E3 de <i>A. occidentale</i>	71
	Fracción E2. Flavonoides, efecto vasorrelajante y vasoconstrictor dependiente de endotelio.....	71
	Fracción E3. Taninos, la fracción con mayor efecto vasorrelajante dependiente de endotelio.....	72
	Efecto vasorrelajante de las subfracciones de E3: E3I, E3II Y E3III.....	73
	E3III: Efecto vasorrelajante de un tanino condensado.....	74
	Respuesta vasorrelajante de E3III frente a diferentes agonistas.....	76
	Antagonismo no competitivo en los adrenorreceptores α	77
	Respuesta vasorrelajante endotelio dependiente de E3III.....	78
	Participación de los EDRF: Óxido nítrico y Prostaciclina.....	79
	Vasorelajación inducida vía NO/GMPc.....	80
	Participación de los receptores β -Adrenérgico Muscarínico y Purinérgicos.....	81
	Participación de los Canales de K^+ y el flujo de Ca^{+2} en la respuesta vasorrelajante endotelio- dependiente.....	83
7.	CONCLUSIONES.....	86
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	87
9.	ANEXOS.....	97
	Anexo 1. Diagrama Componentes implicados en la técnica de órgano aislado	97
	Anexo 2. Espectro de masas para el compuesto activo E3III extraído de <i>AnOc</i>	98
	Anexo 3. Espectro de Infrarrojo para el compuesto activo E3III extraído de <i>AnOc</i>	99
	Anexo 4. Espectro RMN 1H para el compuesto activo E3III extraído de <i>AnOc</i>	100

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Diagrama de la estructura arterial.....</i>	14
<i>Figura 2 Diagrama Sistema renina-angiotensina-aldosterona.</i>	15
<i>Figura 3 Mecanismo de vasoconstricción en células del músculo liso, vías de señalización intracelular: Principales receptores acoplados a proteína G y ligandos que los activan.</i>	16
<i>Figura 4 Mecanismos de vasodilatación directa e indirecta en células de músculo liso, vías de señalización intracelular: Principales receptores acoplados a proteína G y ligandos que los activan.</i>	19
<i>Figura 5 Clasificación de compuestos vasodilatadores obtenidos de plantas acorde de su naturaleza química.....</i>	26
<i>Figura 6 Estructura del Ostole aislado de Angelica pubescens.....</i>	27
<i>Figura 7. Estructura de la quercetina</i>	27
<i>Figura 8 Esquema general del ensayo biodirigido de A. occidentale.....</i>	31
<i>Figura 9. Elementos evaluados en la participación del mecanismo vasodilatador del compuesto activo.....</i>	32
<i>Figura 10 Esquema general del protocolo realizado para el ensayo biológico ex vivo, mediante la técnica de órgano aislado.....</i>	37
<i>Figura 11 Imágenes tomadas del proceso de obtención de los anillos de aorta.</i>	38
<i>Figura 12 Diagrama del protocolo de estabilización del anillo de aorta en el baño.....</i>	40
<i>Figura 13 Diagrama del protocolo de viabilidad de endotelio.....</i>	41
<i>Figura 14 Diagrama del protocolo para la evaluación de la actividad vasorrelajante del extracto, fracción y subfracciones en anillos con endotelio y anillos sin endotelio.</i>	42
<i>Figura 15 Diagrama del protocolo para la evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto frente a diferentes agonistas.</i>	43
<i>Figura 16 Diagrama del protocolo para la evaluación de la competitividad del compuesto (Curva concentración creciente de Fenilefrina)</i>	44
<i>Figura 17 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación del NO en presencia de NPS.....</i>	45

<i>Figura 18 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación de los canales K^{+}_{Ca+2}.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 19 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación de segundos mensajeros, receptores y canales iónicos, con los inhibidores expuestos.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 20 Curva concentración-respuesta del extracto de corteza de AnOc en anillos aórticos con endotelio (XO E+) y sin endotelio (XO E-)</i>	<i>51</i>
<i>Figura 21. Fracciones E2 Y E3 obtenidas por el método de solubilidad a partir de de 1 gr de Extracto en 200 mL en Acetona.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 22. Cromatograma del extracto etanólico de AnOc (XO) y las fracciones obtenidas E2 Y E3.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 23. Curva concentración-respuesta de las fracciones E2 (A) y E3 (B) de AnOc en anillos aórticos con E+ y E 54</i>	
<i>Figura 24. Cromatogramas de las subfracciones de E3: E3I, E3II y E3III.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 25. Cromatograma de las subfracciones de E3: E3I, E3II y E3III bajo luz UV (254 nm).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 26 Curva concentración-respuesta de las subfracciones E3I, E3II Y E3III de AnOc en anillos aórticos E+</i>	<i>58</i>
<i>Figura 27 Caracterización de E3III; Revelado en distintos reactivos (Sulfato cérico, Dragendorff y Ácido fosfomolibdico).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 28 Cromatograma de E3, catequina y ácido gálico.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 29 Estructura propuesta para E3III a partir de espectroscopia de masas, infrarrojo y RMN H-1</i>	<i>61</i>
<i>Figura 30 Efecto vasorrelajante de la CE_{50} E3III en anillos aórticos E+ con contracción inducida por FE y KCl.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 31 Curva concentración-respuesta para fenilefrina en anillos aórticos E+ y en presencia del compuesto E3III incubado a su CE_{50}</i>	<i>63</i>
<i>Figura 32 Regresión lineal de la dependencia del endotelio en la relajación de E3III</i>	<i>64</i>
<i>Figura 33 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} frente al inhibidor de NO, L-NAME y el inhibidor de las PGI_2, Indometacina en anillos aórticos E+</i>	<i>65</i>
<i>Figura 34 Curva Concentración respuesta de NPS previamente incubado con E3III EC_{50} en anillos aórticos E+</i>	<i>65</i>

<i>Figura 35 Efecto vasorrelajante de E3III EC₅₀ frente al inhibidor del guanilato ciclasa, Azul de metileno en anillos aórticos E+</i>	66
<i>Figura 36 Efecto vasorrelajante de E3III EC₅₀ frente a los inhibidores de receptores Muscarínico, β-adrenérgicos y Purinérgicos en anillos aórticos E+</i>	67
<i>Figura 37 Efecto vasorrelajante de E3III EC₅₀ frente a los inhibidores de canales de potasio, K⁺_v y K⁺_{ATP} en anillos aórticos E+</i>	68
<i>Figura 38 Efecto vasorrelajante de E3III EC₅₀ frente al inhibidor de canales de potasio, K⁺_{Ca+2}. Tetraetilamonio a 10 mM, y Tetraetilamonio a 1 mM, en anillos aórticos E+</i>	69
<i>Figura 39. Efecto vasorrelajante de E3III EC₅₀ frente al inhibidor de los canales de calcio tipo L, Nifedipina y receptores rianodina, Tetracaina en anillos aórticos E+</i>	70
<i>Figura 40. Estructuras de los taninos condensables: Epicatequina, catequina, Galocatequina y epigalocatequina</i>	74
<i>Figura 41. Estructura de las proantocianidinas tipo prodelfinidinas</i>	74
<i>Figura 42. Mecanismo de acción propuesto para el efecto vasorrelajante del compuesto activo E3III aislado de un extracto etanólico de corteza de A. occidentale.....</i>	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Fases móviles usadas para cromatografía de capa fina de las subfracciones de E3	36
Tabla II. Reactivos para la caracterización cualitativa de metabolito secundario en compuesto aislado.....	36
Tabla III n: Número de anillos de aorta utilizado en cada experimento	50
Tabla IV Rendimiento del fraccionamiento del extracto de corteza de AnOc.....	52
Tabla V Rendimiento del subfraccionamiento de E3.....	55

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es un importante factor de riesgo cardiovascular para la población en general. Evidencia clínica muestra una relación continua entre altos niveles de presión arterial y el riesgo cardiovascular, pero la definición de hipertensión sigue siendo en gran medida arbitraria, dado que un nivel umbral real para la hipertensión es flexible y depende en gran parte al perfil de riesgo cardiovascular de cada sujeto (Beevers, 2007). En pacientes que la padecen puede ocasionar un aumento de masa del ventrículo izquierdo, disfunción diastólica, arritmias y anomalías de la perfusión cardiaca por disfunción endotelial, causando propensión a infartos de miocardio o el desarrollo de otras enfermedades vasculares (Diamond, 2004). Actualmente, a nivel mundial, la presión arterial alta representa más muertes que muchas afecciones comunes. La organización mundial de la salud dio a conocer en el 2012 que las enfermedades cardiovasculares o cardiopatías isquémicas son la principal causa de muerte en hombres y mujeres a nivel mundial. En Venezuela existe una prevalencia de HTA donde el factor de riesgo es uno de los más altos de los países latinoamericanos. Solo el 68% de las personas hipertensas reciben tratamiento y de estos aún la mitad permanecen hipertensos (Hernández, 2014).

Fisiopatología de la Hipertensión arterial.

Operacionalmente se puede considerar un individuo hipertenso cuando presenta valores superiores de presión arterial sistólica de 140 mmHg y presión arterial diastólica de 90 mmHg, A estos valores se le asocia el doble de riesgo cardiovascular en comparación con valores que caracterizan un individuo normotenso. (Mancia, 2005). La HTA se puede clasificar en esencial (primaria) y secundaria, y solo el 5% de la población presenta hipertensión secundaria asociada a enfermedades renales, por otro lado, el 98% de los pacientes que presentan HTA esencial se considera de origen multifactorial, está determinada genéticamente por una variación alélica en los genes involucrados en la absorción renal de sales. Factores ambientales, estilo de vida y alimentación están asociados en el desarrollo de esta enfermedad (Beevers y col. 2007; Lifton y Geller, 2001).

Una amplia variedad de mecanismos fisiopatológicos están involucrados en el mantenimiento de la presión sanguínea, los trastornos de estos pueden resultar en el desarrollo de hipertensión. La presión arterial depende del equilibrio entre el gasto cardiaco, como cantidad de sangre bombeada por el corazón y la resistencia vascular periférica (Raman, 2006). La resistencia periférica está determinada principalmente por la parte distal de la vasculatura arterial, que consiste en las arterias pequeñas (arterias con diámetro, 3 mm) y las arteriolas (las arterias que conducen a los capilares). El espacio arterial es en buena medida donde se controla la presión arterial, por lo que es el principal órgano blanco de las alteraciones asociadas a la HTA (Diamond, 2005).

Estructura arterial.

La pared arterial contiene cantidades importantes de musculatura lisa y componentes elásticos. Las grandes arterias que tienen un diámetro superior de 10 mm, como la aorta, la arteria pulmonar y la arteria carótida, se denominan arterias elásticas por contener gran cantidad de membranas elásticas, y las más pequeñas son denominadas arterias musculares (Geneser, 1991).

Las arterias están formadas por tres túnicas; íntima, media y adventicia. En la túnica íntima se encuentran células poligonales endoteliales dispuestas longitudinalmente, subsiguiente se encuentra la lámina elástica interna que separa las células endoteliales de la túnica media, que corresponde a células musculares lisas fijadas a membranas elásticas fenestradas (Geneser, 1991). Adicionalmente posee una lámina elástica externa que la separa de la túnica adventicia que está provista de colágeno, fibroblastos y componentes nerviosos del sistema simpático. (Humar y col., 2005) (Fig. 1) Estas características estructurales brindan integridad y elasticidad frente a los cambios de presión sistólica y diastólica (Beevers, 2007).

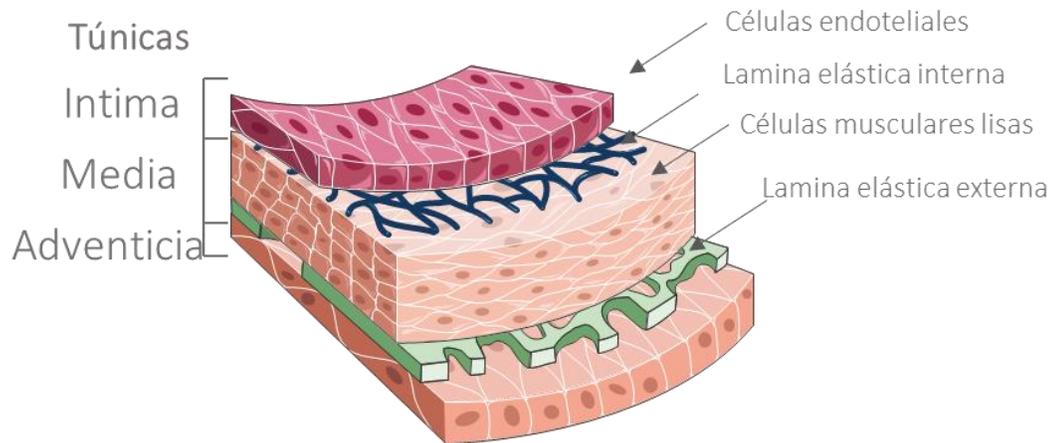


Figura 1 Diagrama de la estructura arterial

Mecanismos asociados con la HTA

El mecanismo más obvio en el incremento de la resistencia al flujo sanguíneo en las arterias es la vasoconstricción, pequeños cambios en el tamaño del lumen son requeridos para hacer grandes ajustes de flujo y presión. Esta resistencia está controlada por regulación local o metabólica y por el sistema nervioso simpático.

Adicionalmente sustancias paracrinas liberadas por las células endoteliales juegan un papel importante en el control del tono vasomotor (Safar, 2005). La resistencia vascular puede verse afectada por alteraciones funcionales estructurales y mecánicas de las arterias. Los cambios funcionales incluyen mayor reactividad vascular a agentes vasoconstrictores, disminución de la vasodilatación, alteración de las células del musculo liso vascular y disfunción endotelial. Entre las alteraciones estructurales más destacadas, incluyen diámetro de lumen reducido y engrosamiento de las paredes, cambios en el crecimiento de las células musculares lisas. Mientras que los cambios mecánicos incluyen rigidez y distensibilidad por cambios de contenido de colágeno. (Korner, 1989; Touyz, 2003)

Mecanismo contráctil en la musculatura lisa.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fig. 2) es uno de los principales sistemas hormonales que influyen en la presión arterial. La contractibilidad de la musculatura lisa vascular es aumentada cuando la renina es segregada en respuesta a la perfusión glomerular, ingesta reducida de sal o estimulación del sistema nervioso simpático (SNS)

que libera catecolaminas como norepinefrina. La renina segregada aumenta los niveles de Angiotensina I (Ang I) que es una sustancia fisiológicamente inactiva, ECA, la enzima convertidora de angiotensina produce su conversión a angiotensina II (Ang II) quien es un vasoconstrictor potente que conduce al aumento de la presión arterial. La Ang II estimula la liberación de aldosterona y esta causa la retención de líquidos y aumento de concentración de sales como sodio, dando como resultado un mayor aumento de la presión arterial. (Beevers, 2007).

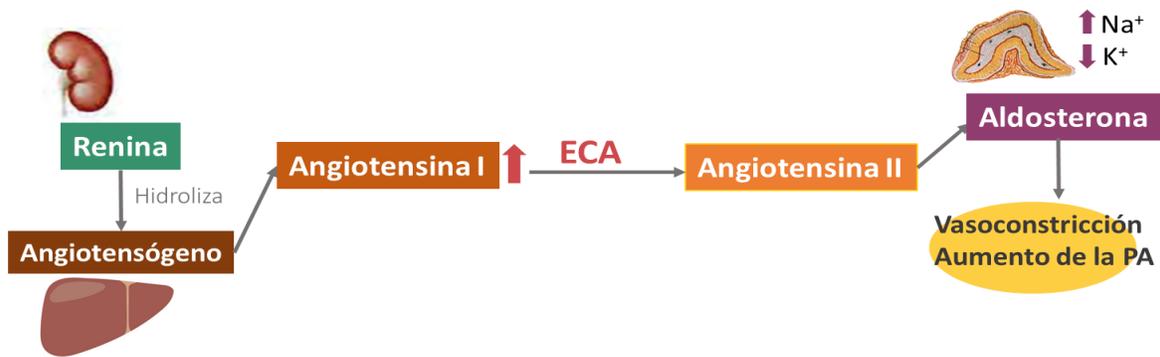


Figura 2 Diagrama Sistema renina-angiotensina-aldosterona. ECA: enzima convertidora de angiotensina.

Ang II, norepinefrina y endotelina I son los principales agonistas vasoconstrictores implicados en la hiperreactividad vascular en la hipertensión. La vasoconstricción por estos agonistas, se atribuye a un aumento en la concentración de calcio (Ca^{2+}) libre en el citoplasma mediado por receptores acoplados a proteínas G, activando la maquinaria contráctil del músculo liso vascular (Touyz, 2003). (Fig. 3)

Los receptores de los agonistas mencionados, están acoplados a la proteína G que estimula la actividad de la fosfolipasa C, esta enzima es específica para los lípidos de membrana fosfatidinositol-4,5-bisfosfato. Al ser activada se produce la cadena fosfadilinositol que cataliza la formación de dos potentes segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP_3) y diaclicerol (DAG) (Somlyo, 1994; Webb, 2003). La unión de IP_3 a los receptores del retículo sarcoplásmico da como resultado el aumento de la concentración Ca^{2+} en el citosol. También se activa la proteína quinasa C (PKC) que tiene efectos promotores de la contracción como la fosforilación de los canales de Ca^{2+} tipo L (Webb, 2003).

Vasoconstrictores De Acción Directa

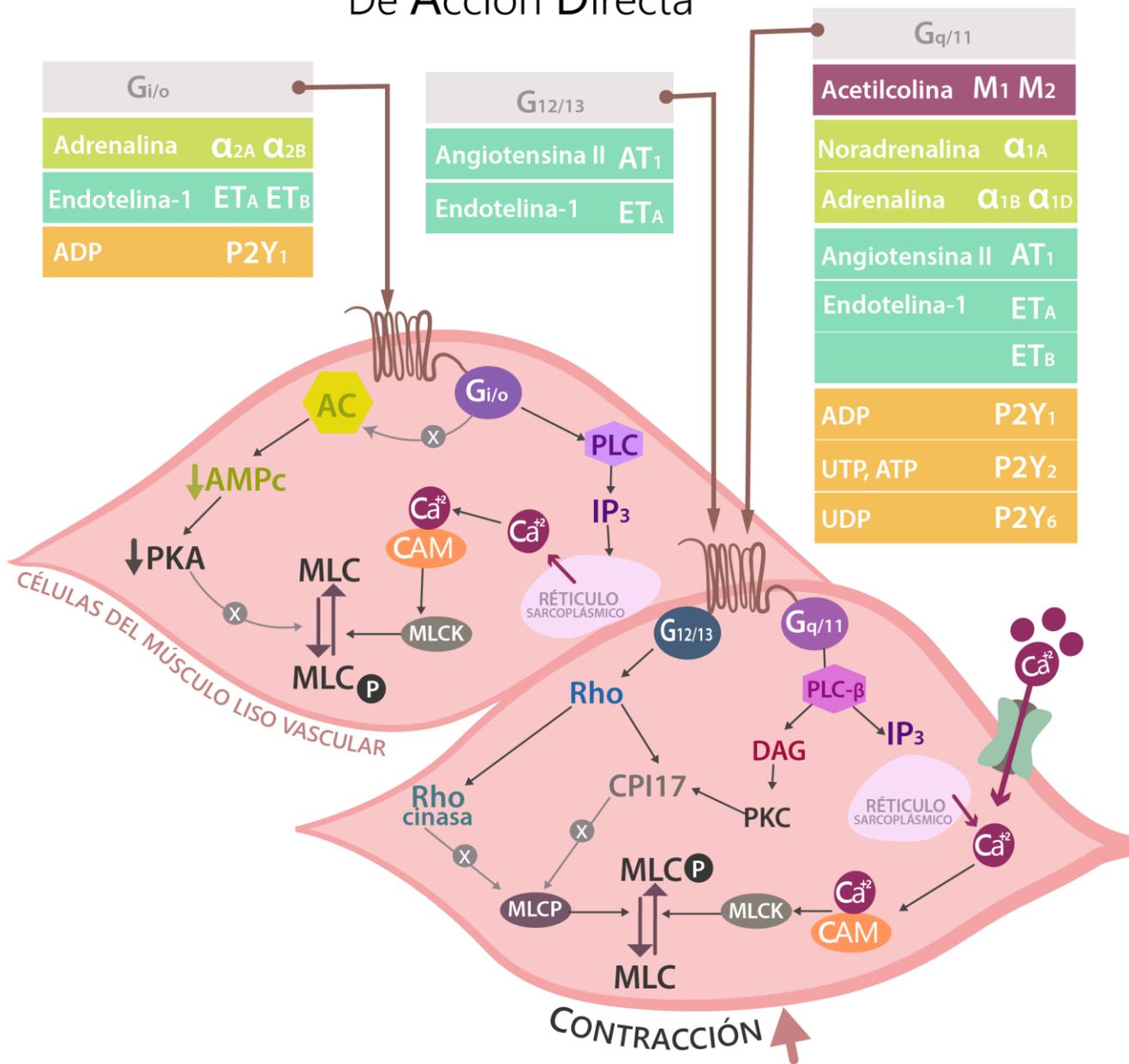


Figura 3 Mecanismo de vasoconstricción en células del músculo liso, vías de señalización intracelular: Principales receptores acoplados a proteína G y ligandos que los activan.

Ligandos agrupados en cajas de color según su estructura química. Abreviaciones: AC: Adenilato ciclasa CAM-Ca²⁺: Complejo calmodulina-calcio CPI17: Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 DAG: Diacil glicerol IP3: Inositol trifosfato MLCK: Cinasa de cadena ligera de miosina MLCP: Fosfatasa de cadena ligera de miosina MLC: Cadenaligera de miosina desfosforilada MLCp: Cadena ligera de miosina fosforilada PKA: Proteína cinasa A PKC: Proteína cinasa C PLC: Fosfolipasa C. PLC-β: Fosfolipasa Cβ. Diagrama a partir de: Webb (2003) y Maguire (2005)

El calcio que viene del retículo endoplasmático forma un complejo con la proteína ácida calmodulina. Este complejo activa la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y fosforila la cadena ligera de miosina, produciendo la contracción. Por otro lado, la relajación resulta de la desfosforilación de la cadena ligera de miosina, por la MLCP (Webb, 2003; Somlyo 1997). El aumento de Ca^{2+} es transitorio, y la respuesta contráctil se mantiene por inhibición de la actividad de la MLCP por Rho quinasa (RhoA). Este mecanismo se inicia al activarse la fosfolipasa C, e implica la activación de la proteína RhoA de unión a GTP (RhoA-GTP) (Touyz 2003; Webb, 2003) Este probablemente constituya a un importante mecanismo subyacente al aumento de la contractibilidad vascular en la hipertensión (Somlyo, 1997). El mecanismo aquí descrito se observa en la figura 3.

El endotelio vascular.

El endotelio juega un papel importante en la regulación y el mantenimiento del tono vascular. La superficie endotelial es expuesta a factores humorales y físicos constantemente, sirve como sensor y transductor de señales, pero más importante aún actúa como un efector que provoca respuestas biológicas a través de la activación y liberación de sustancias involucradas en el cambio del tono vascular, causando vasodilatación como el óxido nítrico (NO) y las prostaciclina (PGI₂) (Geneser 1991; Humar y col., 2005).

En 1980 Fur Furchgott y Zawadski descubrieron el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, y describen por primera vez la relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Demostraron que anillos arteriales previamente contraídos se podían relajar en respuesta a la activación de los receptores muscarínicos por la acetilcolina sólo si las células endoteliales estaban intactas, lo que sugería que esta estaba mediada por alguna sustancia derivada de endotelio (EDRF) que posteriormente se demostró que era NO (Vanhoutte, 1986). El NO es un radical libre que difunde con facilidad a través de la membrana celular. Después de la difusión desde el endotelio al músculo liso vascular, NO aumenta los niveles intracelulares de la guanosina monofosfática cíclica (GMPc) por la activación de la enzima guanilato ciclasa el GMPc disminuye el calcio citosólico produciendo la relajación (Spieker y col., 2000). (Fig. 4)

El NO es sintetizado principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOs) a partir de L-arginina. La síntesis de NO depende de la unión de la NOS a la proteína calmodulina, requiere un aumento de Ca^{+2} intracelular. (Corson y col, 1996). La síntesis de NO es activada por diversos factores, como respuesta al estrés oxidativo y a la activación de una variedad de receptores (Fig 4.) Que pueden evocar en la célula del músculo liso un efecto vasoconstrictor o un efecto vasodilatador. La endotelina-1 (ET-1) ejerce su efecto vasoconstrictor a través de la activación de los receptores ET_A , por el contrario, los receptores ET_B endoteliales median la vasodilatación a través de la liberación del NO y PGI_2 . (Spieker y Lüscher, 2005).

El ácido araquidónico, acetilcolina (ACh), histamina o serotonina puede evocar contracciones dependientes del endotelio que están mediados por tromboxano A_2 o prostaglandina H_2 . Estos contrarrestan el NO y la PGI_2 . La PGI_2 es un factor de relajación derivado de endotelio adicional que es liberado por estrés oxidativo, este es sintetizado por la enzima CO_x , a partir de ácido araquidónico. PGI_2 aumenta el AMPc intracelular en las células del músculo liso a través de la activación del adenilato ciclasa (AC) por la proteína G acoplada a un receptor (Lüscher, 1995) que es activado por agentes vasoactivos como ACh, bradiquinina (BK), trombina (Thr) que evocan la liberación del NO y producen la vasorelajación de la musculatura lisa (Spieker y Lüscher, 2005). Los aumentos de niveles de AMPc, activan la proteína quinasa A (PKA) esta disminuye la sensibilidad de la captación de calcio y por lo tanto disminuye la contractibilidad en la célula del músculo liso. (Maguire y col. 2005)

La conversión de L-arginina a NO puede ser inhibida por falsos sustratos de la NO sintasa como lo es L-NG-monometil arginina citrato (L-NMMA) o L-NAME. Dado que hay una liberación basal continua de NO que determina el tono de los vasos sanguíneos periféricos sistémicos, la inhibición de la síntesis de NO provoca un aumento en la presión arterial (Spieker y col., 2000). Pero estos inhibidores no previenen todas las relajaciones dependientes de endotelio. Bajo estas condiciones las células están hiperpolarizadas y se ha propuesto un factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) con estructura química desconocida, que actúa a través de un canal de potasio calcio dependiente (Canal K_{Ca+2}) (Spieker y col. 2000).

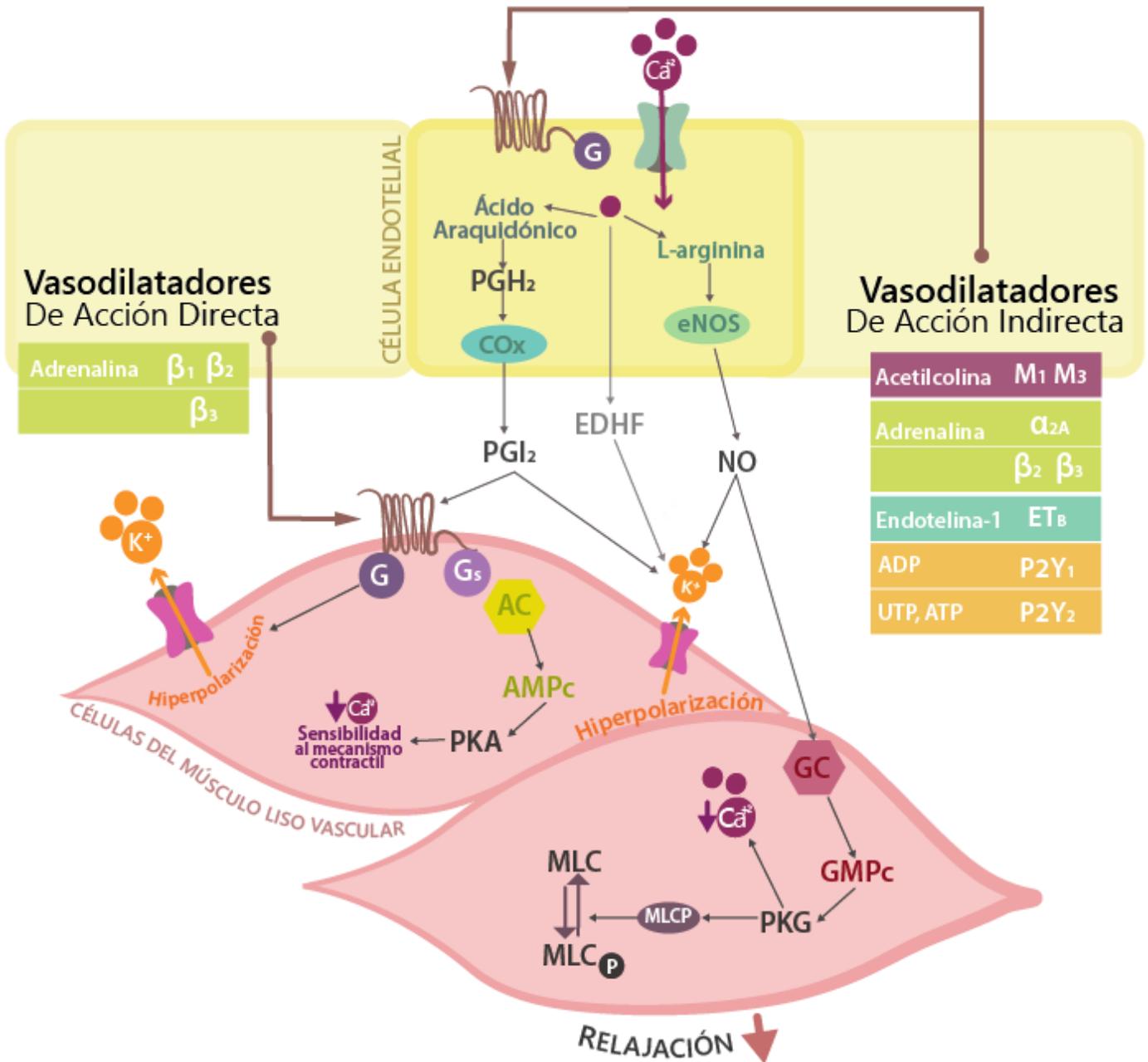


Figura 4 Mecanismos de vasodilatación directa e indirecta en células de músculo liso, vías de señalización intracelular: Principales receptores acoplados a proteína G y ligandos que los activan.

Ligandos agrupados en cajas de color según su estructura química. Abreviaciones: AC: Adenilato ciclasa GC: Guanilato ciclasa MLCP: Fosfatasa de cadena ligera de miosina MLC: Cadena ligera de miosina desfosforilada MLC_p: Cadena ligera de miosina fosforilada PGH₂: Prostaglandina H2 PKA: Proteína cinasa A PKG: Proteína cinasa G. Diagrama a partir de: Lüscher y Noll (1995) y Maguire y col. (2005)

Disfunción endotelial y estrés oxidativo.

El término disfunción endotelial indica que ya sea en condiciones basales o luego de estimulación, el endotelio no cumple sus funciones. Una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), una alteración en la producción de prostanoïdes, un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de ET-1, pueden estar asociados a contribuir a la disfunción endotelial. Sin embargo, la menor biodisponibilidad de NO, causada por una disminución en su síntesis o un aumento de la velocidad con que se degrada, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial (Lüscher y Noll. 1995; Sainani, 2004).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes moléculas de señalización celular pero estas moléculas pueden promover desórdenes que pueden conducir a la hipertensión. El estrés oxidativo vascular ha sido propuesto como el mecanismo intracelular involucrado en la patogenia de la disfunción endotelial, que resultan en menor biodisponibilidad de NO y conducen a la hipertensión. La formación de ROS resulta principalmente de la activación de la enzima NADPH-oxidasa, que es activada por estiramiento mecánico, por lo tanto, es posible que el estiramiento causado por la hipertensión incremente la formación de O_2 . (Spieker y col. 2000).

Participación de los receptores acoplados a proteína G en el músculo liso vascular.

Los receptores acoplados a proteína G junto con la disfunción del sistema endotelio vascular pueden dar lugar a un cambio en el equilibrio de vasodilatación y vasoconstricción, posteriormente hipertensión y remodelación vascular que pueden contribuir a enfermedades como la aterosclerosis. Los receptores acoplados a proteína G de clase 1 son el principal objetivo para casi la mitad de todos los medicamentos actualmente disponibles, tales drogas incluyen antagonistas del receptor de angiotensina II y antagonistas del β -adrenorreceptor (Maguire y Davenport, 2005).

Los receptores acoplados a proteína G asociados a células musculares lisas vasculares se dividen en tres principales familias: $G_{i/o}$, $G_{11/12}$, $G_{q/11}$ y estas familias se subdividen según la estructura del ligando que se unen al

ser activados. En los vasos sanguíneos hay tres tipos: Los vasoconstrictores que se acoplan y actúan directamente en el músculo liso (Fig 2.), los vasodilatadores que actúan directamente en el músculo y los vasodilatadores que actúan de manera indirecta a través del endotelio vascular (Fig. 3) (Manguire y Davenport, 2005) La figura 3 y 4. resume las respuestas vasoactivas funcionales predominantes por la activación de los receptores acoplados a proteína G en los vasos sanguíneos.

Los adrenorreceptores

En 1948 Ahlquist demuestra por primera vez la existencia de dos subtipos de receptores adrenérgicos. El α -adrenorreceptor y los β -adrenorreceptores. Ambos receptores para catecolaminas endógenas epinefrina y norepinefrina y se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema cardiovascular.

Los α_1 -adrenorreceptor median la vasoconstricción, están principalmente acoplados a la proteína G, que estimula la actividad de la fosfolipasa C, esta enzima promueve la hidrólisis de fosfatidinositol bifosfato produciendo IP3 y DAG, moléculas que actúan como segundos mensajeros que median la liberación de Ca^{+2} intracelular y activando la proteína quinasa C (García y col. 2000). Por otro lado, los α_2 -adrenorreceptores están predominantemente acoplados de manera inhibitoria a la proteína GTP inhibiendo la actividad de adenilato ciclasa disminuyendo AMPc y activando los canales de K^+ , inhibiendo la apertura de los canales voltaje dependientes de Ca^{+2} (Serafim y Goura, 2001).

En cuanto a los β -adrenorreceptores, a la fecha se reconocen tres subtipos (β -ar1, β -ar2, β -ar3) En el sistema cardiovascular los β -ar1 se encuentran predominantemente en el corazón donde aumentan la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción (inotropia positiva) además de aumentar la tasa de relajación. Por otro lado, β -ar2 se localizan en las células del músculo liso donde causan vasodilatación, y en las plaquetas donde inhiben la agregación plaquetaria. También se encuentran en las células endoteliales vasculares y en menor grado en el miocardio, donde los efectos de estimulación de β -ar2 son similares a β -ar1. Causando indirectamente la vasodilatación (Queen y Ferro 2006). Existe evidencia de la existencia de β -ar3 en el corazón humano que puede inhibir la contractilidad

miocárdica a través de un mecanismo NO-GMPc, aunque en la actualidad la relevancia fisiológica sigue siendo baja y no hay confirmación al respecto (Gauthier, 1998)

Receptores Muscarínicos

Los receptores muscarínicos se dividen principalmente en 3 subtipos (M1, M2 Y M3).

En general los receptores M3 median la relajación endotelio-dependiente mientras que la contracción puede ser mediada vía diferentes subtipos. La vasorelajación también puede ser mediada por mecanismos endotelio-independiente, pero esto depende de la locación anatómica del vaso. Se ha reportado la vasorelajación mediada por M3 en aortas de ratas hipertensas (Boulanger y col. 1994) y también en arterias pulmonares humanas (Norel y col. 1996). Por otro lado, en vasos aislados del pulmón de rata el receptor M1 Y M2 median indirectamente y directamente la vasodilatación. (Wilson y col. 1995) Por otro lado M1 y M2 generalmente median directamente la contracción en las células musculares lisas vasculares. La acetilcolina puede contraer y relajar el tejido vascular pero esta principalmente actuando mediante el incremento de factores relajantes derivados de endotelio como el NO.

La vía de señalización para los receptores muscarínicos puede ser principalmente por hidrólisis de fosfoinositol. También inducen relajación directa en el musculo liso por la apertura de los canales de potasio. La literatura evidencia que los receptores muscarínicos pueden ser modulados por la actividad de la adenilatoil ciclasa resultando también en un efecto vasorrelajante. (Eglen y col. 1996)

En el tejido vascular el rol más importante de los receptores muscarínicos M3 es aumentar la producción de óxido nítrico, el factor relajante derivado de endotelio, también activar el factor hiperpolarizante derivado de endotelio u otros agentes que evoquen la relajación del musculo liso (Eglen y Whithing 1990). En el endotelio estos receptores están acoplados al adenilato ciclasa. La contracción en el musculo liso que involucra a los receptores muscarínicos se dan vía guanina un nucleótido unido a la proteína G que estimula PLC e induce la generación de los segundos mensajeros IP3 y DAG, lo que resulta en un incremento de Ca²⁺ intracelular que sale del retículo sarcoplásmico evocando la contracción, pero también inicia otras vías de señalización que incluyen la estimulación de adenilato ciclasa y guanilato ciclasa. (Eglen y col. 1996)

Receptores purinérgicos

Los nucleótidos extracelulares también están implicados en la activación de eNOS, incrementando la generación del NO y evocando la vasodilatación. Los nucleótidos extracelulares funcionan como mediadores paracrinos o autocrinos activando los receptores purinérgicos P2 en las células de la musculatura lisa. Estos receptores están clasificados en dos principales grupos P2X, ligados a canales iónicos y P2Y receptores acoplados a proteína G. 7 y 8 subtipos respectivamente han sido caracterizados a la fecha. (Gonçalves y col. 2007)

Los P2X facilitan la entrada de calcio extracelular, mientras que la activación de los receptores P2Y resulta en la captación de Ca^{+2} por los compartimientos intracelulares. Otra diferencia radica que los P2X son activados únicamente en por ATP mientras que los P2Y son activados por ATP, ADP, UDP, UTP. Específicamente las células endoteliales expresan P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₂ (Wang y col. 2002). Resultados han demostrado que los nucleótidos ATP, UTP y ADP inducen la fosforilación de eNOS activando la enzima y produciendo NO en las células endoteliales y con ello evocando una respuesta vasorrelajante en la musculatura lisa. (Goncalves y col. 2009)

Función de los canales de potasio y su relación con la HTA

Existen tres principales canales de potasio asociados con la función vascular, Canales de potasio dependientes de voltaje (K^+_v) los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) y los canales de potasio dependientes de calcio. (K^+_{Ca+2}) cuando estos se abren, producen la hiperpolarización, el cierre de los canales dependientes de voltaje de calcio, disminuyendo la entrada de calcio y produciendo la vasodilatación. Los K^+_v se activan por la despolarización de la membrana y cumplen una importante función de amortiguación contra la despolarización y vasoconstricción. Se ha demostrado que NO, y GMP pueden activar los K^+_v (Sobey, 2001) Mientras que los K^+_{ATP} son inhibidos por ATP intracelular, pero estímulos vasodilatadores endógenos, como hipoxia, acidosis, y mediadores que aumentan los niveles intracelulares de AMPc (por ejemplo, adenosina, prostaciclina y norepinefrina), también pueden activar estos canales. Los canales KCa^{+2} pueden ser activados por vasodilatadores que aumentan los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. También los aumentos focales de los niveles de calcio en el subsarcolemma debido al calcio liberado

a través de los receptores de rianodina en el sarcoplasma tienen un papel en la regulación de estos canales y por lo tanto en el tono vascular (Sobey, 2001).

La investigación de productos naturales en el tratamiento de la hipertensión.

La principal preocupación para los médicos es qué nivel de sangre la presión necesita tratamiento farmacológico. Dado que la fisiopatología de la hipertensión conduce a las enfermedades cardíacas, los tratamientos antihipertensivos pueden ser la mejor solución para reducir el riesgo de estas complicaciones. (Diamond, 2004). Aunque se disponen de una variedad de fármacos que logran modificar el curso de la enfermedad, un importante número de pacientes permanece vulnerable a las complicaciones de la hipertensión arterial y a los efectos adversos de la medicación (Thrall, 2004). Es por ello que la búsqueda de productos naturales como alternativa farmacológica puede reducir el impacto de esta enfermedad. Newman, Cragg y Snader (2012) demostraron que en los últimos 30 años las drogas derivadas de los productos naturales siguen siendo una fuente significativa de nuevos medicamentos especialmente anticancerígenos y antihipertensivos. Por otro lado, la Organización mundial de la salud estima que el 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional que implica el uso de plantas o sus principios activos. La enorme diversidad, la disponibilidad creciente de técnicas de aislamiento e identificación y la introducción de ensayos farmacológicos que permiten detectar moléculas con un principio activo, son argumentos adicionales en favor de la vigencia de los productos naturales como fuente terapéutica. (Guerrero, 2009).

El término de productos naturales hace referencia principalmente a metabolitos secundarios, que son compuestos sintetizados por los seres vivos que en la mayoría de los casos no tienen una utilidad aparente para el ser que los sintetiza a diferencia de los metabolitos primarios. (Marcano y Hasegawa, 2002). Las estrategias en el campo de investigación de estos productos se han ido desarrollando en las últimas décadas, y se puede dividir en dos categorías, las viejas estrategias que se enfocan en la estructura química de estos compuestos pero no en su actividad, o en la selección de los organismos basados únicamente en registros etnofarmacológicos y las nuevas estrategias que se enfocan en la bioactividad del compuesto mediante ensayos biodirigido para el aislamiento e

identificación del compuesto activo proveniente de una fuente natural. Este bioensayo parte de un material vegetal de donde se obtiene un extracto, que es fraccionado y aislado el compuesto activo mientras que se evalúa de forma continua y paralela su actividad mediante ensayos que pueden ser *in-vivo*, *ex -vivo* o *in-vitro* (Satyajit y col. 2006).

La técnica de órgano aislado permite describir de forma directa el registro de los cambios de tensión producidos en las paredes de los vasos sanguíneos en respuesta a compuestos (Bevan y Osher, 1972). En 1961 Bohr utiliza por primera vez esta técnica para el estudio directo del músculo liso de los vasos sanguíneos, y desde entonces se ha convertido en una herramienta principal para la evaluación de la actividad farmacológica de una molécula en los receptores, canales y enzimas de un tejido contráctil (Ramírez, 2007). La principal ventaja de la técnica es que se trabaja con un tejido vivo que presenta respuestas fisiológicas (contracción o relajación) que son registradas como un cambio de tensión resultado de la síntesis de pasos que abarca la interacción fármaco-receptor, la transducción de señales, la generación de segundos mensajeros, el cambio de excitabilidad del músculo liso y finalmente el cambio en la función del tejido. Mientras que otras técnicas permiten el estudio individual de cada uno de estos pasos, esta técnica permite el estudio integrado. (Jeepersen y col. 2015).

2. ANTECEDENTES

Los modelos de ensayos que consisten en tejidos aislados como, anillos vasculares, han demostrado ser eficientes en la evaluación de extractos fracciones y compuestos naturales, siendo posible estimar su potencial terapéutico y hacer aproximaciones importantes sobre su mecanismo de acción farmacológica (Guerrero,2009).

Protocolos ya han sido establecidos para la estabilización y evaluación de la viabilidad del tejido en el baño de órgano aislado, como lo exponen Kenakin (1984) y Jeepersen (2015). También un diverso grupo de fármacos vasodilatadores útiles ha demostrado tener actividad en ensayos con anillos de aorta. Se han presentado diversos trabajos con protocolos reportados para bloqueadores de receptores alfa (Catret y col., 1998) bloqueadores de receptores serotoninérgicos y adrenérgicos (Tsuchihashi y col. 1987) bloqueadores de canales de calcio (Polster y col.,

1920) activadores de la enzima guanilato ciclasa (Yu y Kuo. 1995) y la evaluación de la participación del endotelio en la relajación (Spokas y col. 1983).

Los metabolitos secundarios aislados de plantas, han demostrado tener efecto antihipertensivo. El trabajo realizado por Vázquez y col. (2013) presenta una revisión de los pasados 22 años de compuestos derivados de plantas con actividad vasodilatadora, específicamente se enfocan en los compuestos en los que su actividad involucra mecanismos de acción asociados con el endotelio vascular. Clasificaron los compuestos de acuerdo a su

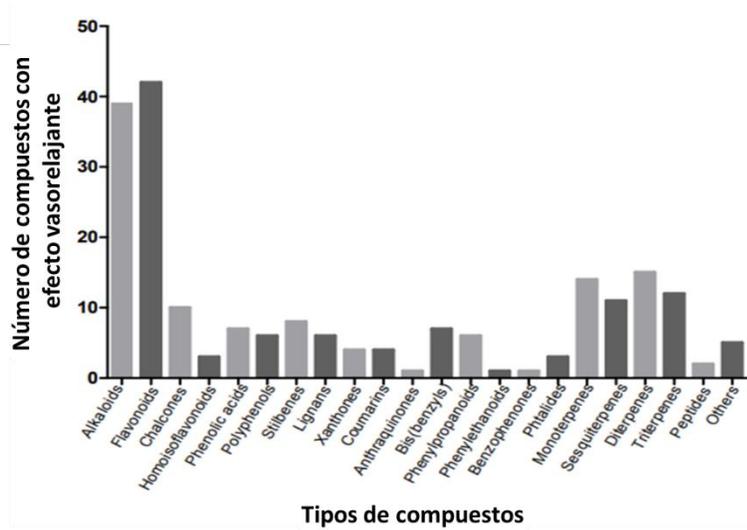


Figura 5 Clasificación de compuestos vasodilatadores obtenidos de plantas acorde de su naturaleza química. Extraído de Vázquez y col (2013)

naturaleza química, encontrando que la mayoría de los compuestos con actividad vasodilatadora son alcaloides, flavonoides y terpenoides (Fig. 5) El análisis de los mecanismos de acción de estos compuestos revelo que un número significativo de compuestos está involucrado en dos o más mecanismos vasodilatadores y que la mayoría de estos compuestos requieren de la participación

del endotelio para tener efecto vasorrelajante. El mecanismo de acción más frecuente presentado fue la activación de la vía NO/GMPc, el bloqueo de los canales de Ca⁺² y la activación de los canales de K⁺. (Vázquez y col. 2013)

Ko y col. (1992) describieron el efecto farmacológico terapéutico que tenían las cumarinas, el ostole el principio

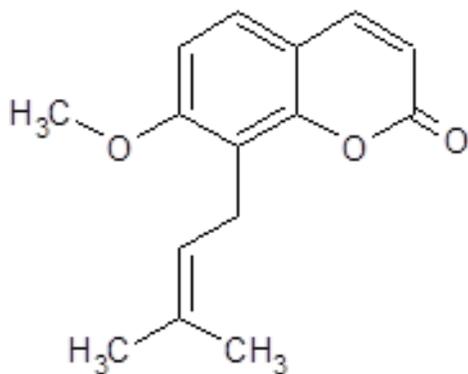


Figura 6 Estructura del Ostole aislado de *Angelica pubescens*. (Ko y col. 1992)

activo aislado de *Angelica pubescens* (Fig. 6) demostró tener una actividad vasorrelajante frente anillos precontraídos con norepinefrina, cuya respuesta no se vio inhibida por indometacina y era conservada la actividad vasorrelajante aun cuando los anillos eran desprovistos de endotelio. Se afirmó que el ostole intervenía en la acción de la GMPc elevando su actividad y bloqueando los canales de Ca^{2+} .

Los flavonoides han demostrado tener un efecto vasorrelajante en el musculo liso de aortas de rata. En 1993 Duarte y col. Demostraron que el principal mecanismo vasodilatador de los flavonoides estaba relacionado con la inhibición de la PKC, del AMPc o la disminución de la captación de Ca^{2+} . Mas adelante Ajay y col. (2003) presentan en su trabajo el efecto de las diferentes subclases de flavonoides en aortas de rata. Probando que el efecto vasorrelajante de estos implicaba una liberación de óxido nítrico y prostaglandinas derivadas del endotelio, adicionalmente encontraron perdida en la respuesta vasorrelajante al inhibir los adrenorreceptores. También afirman la intervención de los flavonoides en la afluencia y liberación de calcio intracelular.

Por otra parte, ese mismo año, Fitzpatrick y col. (1993) Evaluaron el efecto del ácido tánico y la quercetina (Fig.

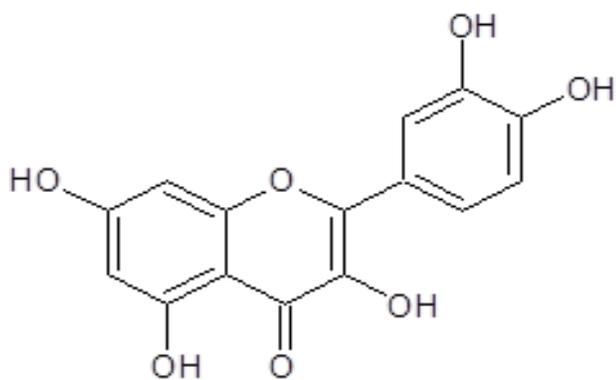


Figura 7. Estructura de la quercetina (Fitzpatrick y col. 1993)

7) aislados a partir de vinos, jugos de uva y extractos de piel de uva y encontraron que tenían una relajación dependiente de endotelio. Mientras que el resveratrol y malvidina no presentaron ningún efecto. Los extractos aumentaron los niveles de GMPc y este efecto fue revertido por la presencia de inhibidores del óxido nítrico. Luego Andriambelosen y col. (1998) investigaron estos principios activos producidos por el vino que respaldaban la relajación endotelial

dependiente de óxido nítrico, encontrando que las fracciones enriquecidas en antocianinas y taninos exhibieron la mayor actividad vasorrelajante dependiente de endotelio, mientras que los derivados de ácido fenólico, ácido hidroxicinámico o las clases de flavonol no indujeron este tipo de respuesta.

Anacardium occidentale comúnmente conocido como marañón, merey o anacardo, es un árbol que puede llegar a medir hasta 10 metros. Es una especie nativa de Centro y Sudamérica, introducida y cultivada en algunas regiones tropicales. En Venezuela, el merey crece ampliamente disperso sobre una gran parte del país; las principales áreas de concentración son al norte del estado Bolívar, la parte sur de los estados Anzoátegui y Monagas y la parte suroeste del estado Guárico, así como en el estado Zulia (Sindoni, 2009).

Paulino, (2001) muestra datos etnobotánicos sobre el uso de las plantas por herencia cultural en Brasil y se reporta que la infusión de extracto de corteza de *A. Occidentale* presenta actividad terapéutica antiinflamatoria. Esta actividad antiinflamatoria también fue demostrada anteriormente por Mota (1985) en donde la atribuye a taninos obtenidos de la corteza de *A. occidentale*. Por otra parte, Vit (2003) en la ficha botánica de esta planta, hace una recopilación de las propiedades medicinales reportadas, destacando el uso del jugo como antidiarreico, la decocción de la corteza como antidiabético y el ácido anacárdico presenta actividad antimicrobiana.

En el 2004 se expone el trabajo de Runnie y col. En donde se evalúa la vasorelajación inducida por diferentes extractos de plantas tropicales en anillos de aorta aislados. Entre las plantas evaluadas se utilizó un extracto de corteza de *A. occidentale*. Esta planta dio como respuesta en anillos precontraídos con fenilefrina, un 80% de efecto relajante en anillos de aorta con endotelio mientras que en anillos aórticos sin endotelio la respuesta vasorrelajante era de un 5%, perdiéndose un 75% de la actividad vasorrelajante. En anillos con endotelio que fueron incubados con NOLA (inhibidor de NO) *A. occidentale* presentaba una disminución de la actividad vasorrelajante con actividad residual cerca del 20% de vasorelajación. De esto concluyen que la actividad vasorelajante de *A. occidentale* es dependiente de endotelio pero que esta no dependía únicamente de NO, los autores infieren la participación de prostanoïdes y el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF) como mecanismo paralelo de

vasorelajación. Por otro lado, los autores hacen una evaluación de la cantidad presente de ácido gálico (GAE) y determinan que, aunque el contenido presente en el extracto es bajo, de igual manera se presenta una actividad antioxidante alta, por lo que el GAE no es el compuesto principal relacionado con la actividad antioxidante evaluada mediante FRAP (potencial antioxidante reductor de hierro).

Mas adelante Tchikaya (2011) estudio el efecto de un extracto de *A. occidentale* sobre los parámetros cardiovasculares en modelos de animales, midiendo la presión sanguínea en conejos normotensos y la actividad contráctil en corazón aislado de rata. El extracto produjo una disminución dosis-dependiente en la presión sanguínea de los conejos, mientras que en el corazón aislado de rata indujo efectos inotrópicos cronotrópicos negativos. De este trabajo concluyen que extractos de *A. occidentale* inducen fuertes efectos hipoténsivos y cardio-inhibidores en modelos de animales.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad vasorrelajante en un ensayo biodirigido a partir del extracto etanólico de corteza de *Anacardium occidentale* y determinar el posible mecanismo de acción mediante la técnica de órgano aislado.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto vasorrelajante del extracto de corteza de *Anacardium occidentale* en presencia y ausencia de endotelio vascular mediante la técnica de órgano aislado.
- Evaluar el efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas por fraccionamiento por ensayo de solubilidad en solvente orgánico mediante la técnica de órgano aislado.
- Evaluar el efecto vasorrelajante de las subfracciones obtenidas por métodos cromatográficos a partir de la fracción con mayor actividad mediante la técnica de órgano aislado.
- Evaluar la actividad vasorrelajante de compuestos aislado a partir de la fracción con mayor actividad vasorrelajante, mediante la técnica de órgano aislado.
- Caracterizar por técnicas cualitativas y espectroscópicas de RMN y EM el compuesto aislado del extracto de *Anacardium occidentale* con efecto vasorrelajante.
- Determinar la participación de segundos mensajeros, receptores y canales iónicos en el mecanismo vasorrelajante inducido por el compuesto activo aislado del extracto de *Anacardium occidentale*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ensayo Biodirigido

La figura 8. Muestra el esquema general del ensayo biodirigido que se llevó a cabo para la evaluación de la actividad vasorelajante de *Anacardium occidentale* a partir de un extracto etanólico de corteza. En grises se aprecian las técnicas fitoquímicas de fraccionamiento, aislamiento y caracterización del compuesto activo, mientras que en naranja se colocan los puntos en donde se realizó la evaluación de la actividad vasorelajante mediante la técnica de órgano aislado.

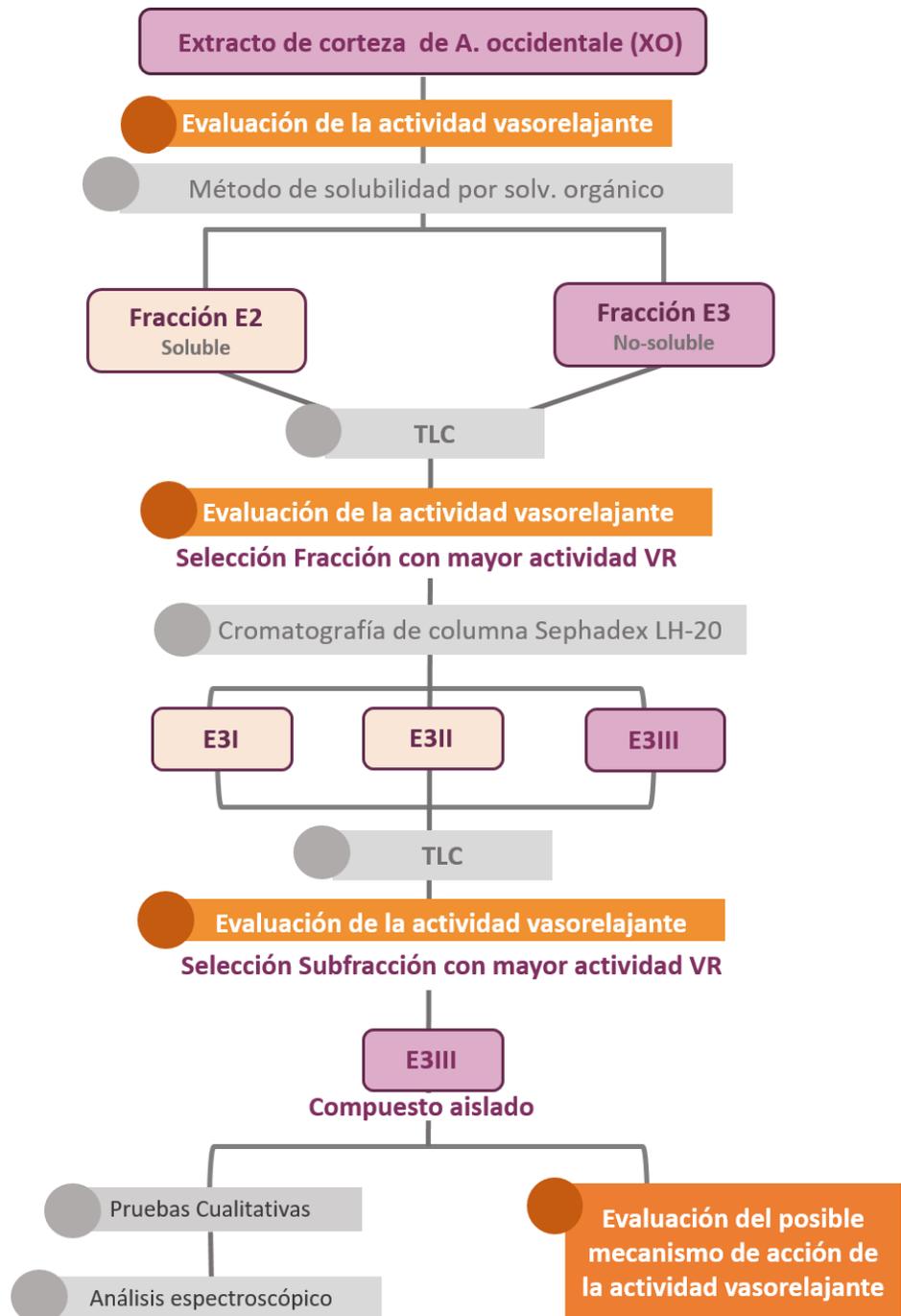


Figura 8 Esquema general del ensayo biodirigido de *A. occidentale*.

Una vez evaluada la actividad vasorrelajante del extracto de la corteza de *A. occidentale* (XO) Se obtienen las fracciones mediante el método de solubilidad por solvente orgánico. Se realizó una TLC de las fracciones resultantes (E2 Y E3) y del XO. Posteriormente se evaluó la actividad vasorrelajante de ambas fracciones y se eligió la de mayor actividad para luego ser subfraccionada mediante una cromatografía de columna Sephadex LH-20, a las subfracciones resultantes se les realizo un TLC y se procedió a evaluar la actividad vasorrelajante de cada una para elegir la de mayor actividad, una vez obtenido el compuesto aislado de esta subfracción se procedió a la caracterización mediante pruebas bioquímicas colorimétricas, y análisis espectroscópicos. Se evaluó la participación de los elementos mencionados en la figura 9. En el proceso de vasorelajación del compuesto activo que permitió elucidar un posible mecanismo de acción.

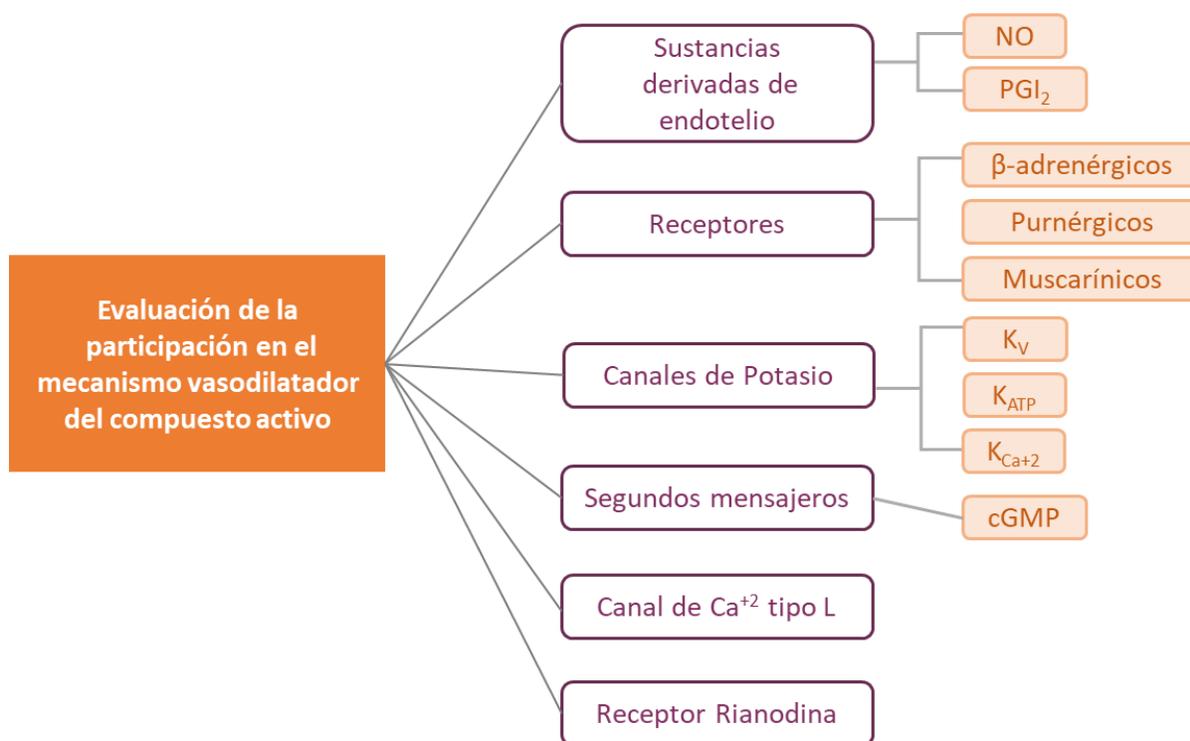


Figura 9. Elementos evaluados en la participación del mecanismo vasodilatador del compuesto activo.

4.2 Material biológico.

Extracto etanólico de corteza de *Anacardium occidentale*.

El material vegetal fue colectado en Departamento del Cesar, Municipio de Valledupar, Corregimiento de Mariangola, Colombia, por Sergio Granados. La especie fue identificada en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) en donde se le asignó el número de registro 205507. La obtención del extracto de corteza fue realizada en la Universidad de Antioquia por el Lcdo. Sergio Granados mediante la técnica de extracción continua Soxhlet.

Ensayo biológico

Para la evaluación de la actividad vasorrelajante en aorta, se utilizaron ratas machos y hembras de la cepa Sprague Dawley, en edades comprendidas de 3 a 5 meses y de peso corporal entre 250 g a 400 g. Fueron provistas por el bioterio central del IVIC. Se mantuvieron en el bioterio del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC bajo condiciones controladas a temperatura de 25° C y acceso libre de agua y alimento.

4.3 Materiales y Reactivos.

Solventes para el fraccionamiento y procedimientos cromatográficos

Los solventes utilizados son de grado analítico, se empleó acetona, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, ácido fórmico y ácido acético, estos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Caracterización cualitativa del compuesto

Se usaron reveladores como sulfato cérico de Sigma-Aldrich, Dragendorff adquirido de Fluka analytical y ácido fosfomolibdico de Fluka analytical.

Agonistas, fármacos e inhibidores utilizados en los ensayos de anillo de aorta en la técnica de órgano aislado:

Fenilefrina (FE), Cloruro de potasio (KCl), Carbacol (Cch), Nitro-L-arginina metil ester hidroclicado (L-NAME), Indometacina (Indo), Propranolol hidroclicado, Atropina, Suramina, Glibenclamida, Trietanolamina (TEA), 4-Aminopiridina (4-AP), Azul de metileno, nitroprusiato de sodio (NPS), Nifedipina y Tetracaina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Mantenimiento de la preparación de los anillos de aorta en el baño del equipo

Se utilizó Buffer Krebs- Henseleit, Composición (mM): NaCl (118); KCl (4,7); KH₂PO₄ (1,2); MgSO₄ (1,2); NaHCO₃ (25,0); Glucosa (11,1); CaCl₂ (2,5); EDTA (0,026).

4.4 Equipo utilizado.

El equipo utilizado para la obtención de fracciones y compuesto fue un evaporador rotatorio Marca Heidolff, una columna Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals).

Para los ensayos biológicos se utilizó un equipo de órgano aislado cuádruplo (cuatro baños) LE.1140 PanLab, amplificador PanLab. Se utilizó ganchos sujeta tejidos LE 0140, y LE 0145 (PanLab). se contó con una bombona de oxígeno-dióxido de carbono (95%-5%) y un termo circulador. El software empleado para el registro fue LabChart 7 (ADInstruments), (Ver esquema general del equipo en Anexo 1)

4.5 Fraccionamiento y aislamiento del compuesto activo del extracto de corteza de *Anacardium occidentale* (AnOc)

4.5.1 Método de solubilidad por solventes orgánico.

Para el fraccionamiento por cada gramo del extracto etanólico de corteza de *Anacardium occidentale* (XO) pesado se añadió 200 mL de acetona al 99% a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en ultrasonido por 30 minutos y se dejó reposar. De este procedimiento se obtuvo una fracción soluble (E2) y una fracción no

soluble (E3). Posteriormente se filtró cada fracción y se evaporó el solvente a presión reducida en el evaporador rotatorio. Este procedimiento se realizó cinco veces.

4.5.2 Cromatografía de columna Sephadex LH-20

De la fracción seleccionada con mayor actividad vasorrelajante se pesó 1 g y se sometió a una separación por cromatografía de columna empaquetada con Sephadex LH-20. La separación se realizó utilizando un gradiente de polaridad de solventes de 3 fases, el primero 50 mL de agua, seguido de 50 mL de Metanol (99%) y por último 50 mL de Acetona (99%). Lo eluido de la columna se analizó por cromatografía de capa fina, para formar las subfracciones, y posteriormente se evaporó el solvente a presión reducida en evaporador rotatorio. Este procedimiento se hizo por duplicado

4.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC)

- Para el extracto y fracciones: Se utilizaron placas cromatográficas base de vidrio sílica gel RP-18 marcadas con el indicador fluorescente F_{254S} como fase estacionaria. El sistema de elusión estuvo formado por una mezcla de Acetonitrilo: Acido fórmico 0.1% en una proporción de 3:7. Las placas fueron reveladas con sulfato cérico al 10% (solución saturada de sulfato cérico en H_2SO_4 concentrado) en metanol. Para luego colocar a una temperatura de $100^\circ C$ y fueron observadas a luz ultravioleta a longitud de onda de 254 nm.
- Para las subfracciones: Se utilizaron placas cromatográficas base de aluminio sílica gel marcadas con el indicador fluorescente F_{254S} (Fase estacionaria). Se realizaron 4 sistemas de fase móvil (Tabla I) propuestos por Wagner (1996) y Marcano y Hasegawa (2002). Las placas fueron reveladas con sulfato cérico al 10% (solución saturada de sulfato cérico en H_2SO_4 concentrado) en metanol. Para luego colocar a una temperatura de $100^\circ C$ y fueron observadas a luz ultravioleta a longitud de onda de 254 nm.

Tabla I. Fases móviles usadas para cromatografía de capa fina de las subfracciones de E3

	Fase móvil	Proporción
1	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Agua	100:11:26
2	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua	100:11:11:27
3	Metanol: Acido fórmico 0.1%	3:7
4	Ácido acético: Metanol: Agua	1:35:65

4.5.4 Caracterización del compuesto aislado por pruebas cualitativas

La caracterización del compuesto por pruebas cualitativas consistió en cambios de coloración por uso de reactivos reveladores como sulfato cérico, reactivo de Dragendorff y Ácido fosfomolibdico (Tabla II). La muestra diluida del compuesto fue colocada sobre placas base de vidrio sílica gel RP-18 marcadas con el indicador fluorescente F₂₅₄S. Fueron rociadas con los reveladores y calentadas a 100° C. Adicionalmente se observaron bajo luz UV con una longitud de onda de 254 nm.

Tabla II. Reactivos para la caracterización cualitativa de metabolito secundario en compuesto aislado

Reactivo	Identificación	Resultados
Sulfato cérico*	Flavonoides	Naranja (+) Fluorescencia Rojo (+) Fluorescencia Fucsia (+) Fluorescencia Amarillo (+) Fluorescencia
Dragendorff	Alcaloides y aminas terciarias o secundarias	Naranja Rojizo (+) Amarillo-naranja (+) Rojo-negro (+) Rosado-púrpura (+)
Ácido fosfomolibdico	Esteroides Alcaloides Terpenos	Azul Intenso fondo amarillo (+)

* Solución de Sulfato cérico al 10% (solución saturada de sulfato cérico en H₂SO₄ concentrado) en metanol

4.5.5 Análisis espectroscópicos

Al compuesto aislado se le realizaron espectros de Espectrometría de Masas, Infrarrojo y RMN H-1. El análisis de RMN se realizó utilizando como solvente metanol deuterado (MeOD) y se lleva a cabo en un equipo Bruker DRX Avance 600 MHz en el laboratorio de RMN del Centro de Química del IVIC, los experimentos de espectrometría de masas se llevaron a cabo en un equipo QTOF II Micromas Bruker en el Centro de Biología Estructural del IVIC.

4.6 Ensayo biológico ex vivo, mediante la técnica de órgano aislado

Para evaluar el efecto vasorrelajante del extracto, las fracciones, subfracciones y el compuesto, se estableció el protocolo mostrado en la figura 10. En este apartado se explicará en detalle en que consistió cada etapa.

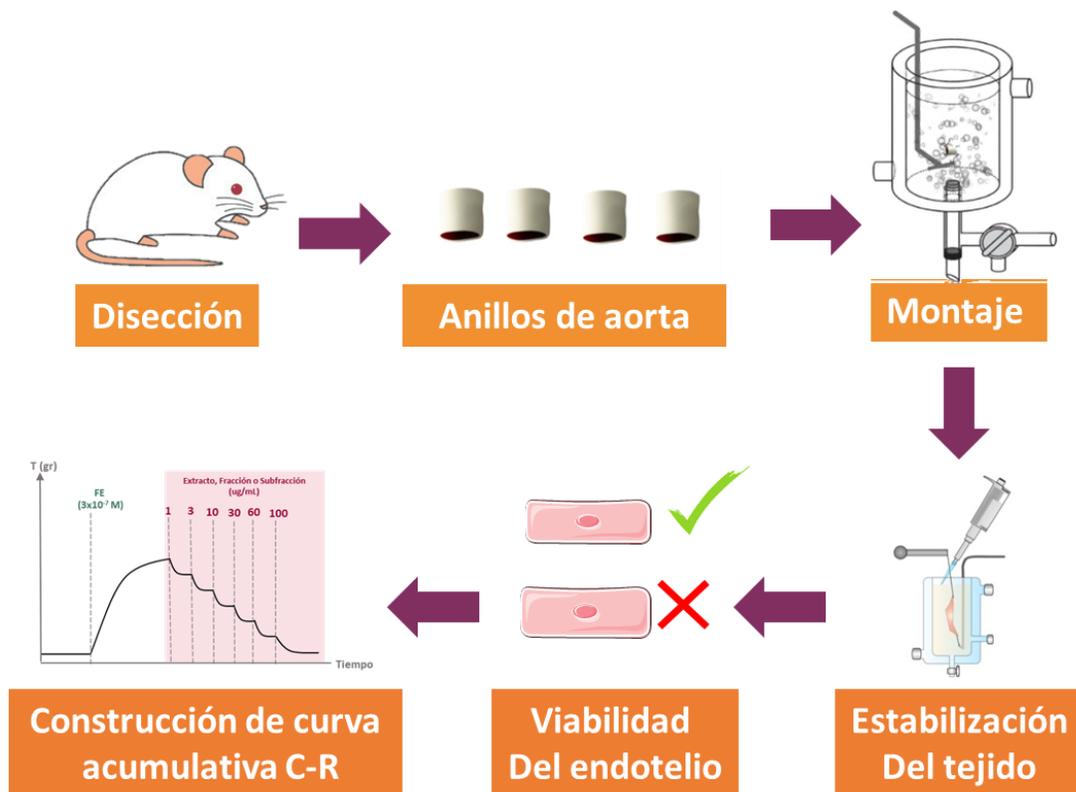


Figura 10 Esquema general del protocolo realizado para el ensayo biológico ex vivo, mediante la técnica de órgano aislado.

4.6.1 Disección de aorta torácica y montaje de la preparación

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital de sodio (60 mg/Kg, IP) mediante una inyección intraperitoneal. Se confirmó el efecto de la anestesia aplicando presión con pinzas a las patas y cola, para corroborar la pérdida de reflejo a estímulos de dolor. Con unas tijeras se realizó una incisión desde la parte inferior de la caja torácica hasta el esternón en donde se biseccionó hasta las axilas. Se colocaron a un lado los órganos que se encuentran en la parte superior de la columna vertebral y se ubicó la aorta, se cortaron todas las conexiones a la aorta y esta se cortó perpendicular a la columna vertebral a nivel del diafragma. La aorta se sostuvo con unas pinzas y utilizando unas tijeras se disecciono de la columna vertebral, comenzando desde el diafragma inferior hacia el corazón. Posteriormente se colocó la aorta en una placa de disección con Buffer Krebs-Henseleit (K-H) a pH 7.4 con burbujeo continuo de una mezcla de 95% O₂/5% CO₂.

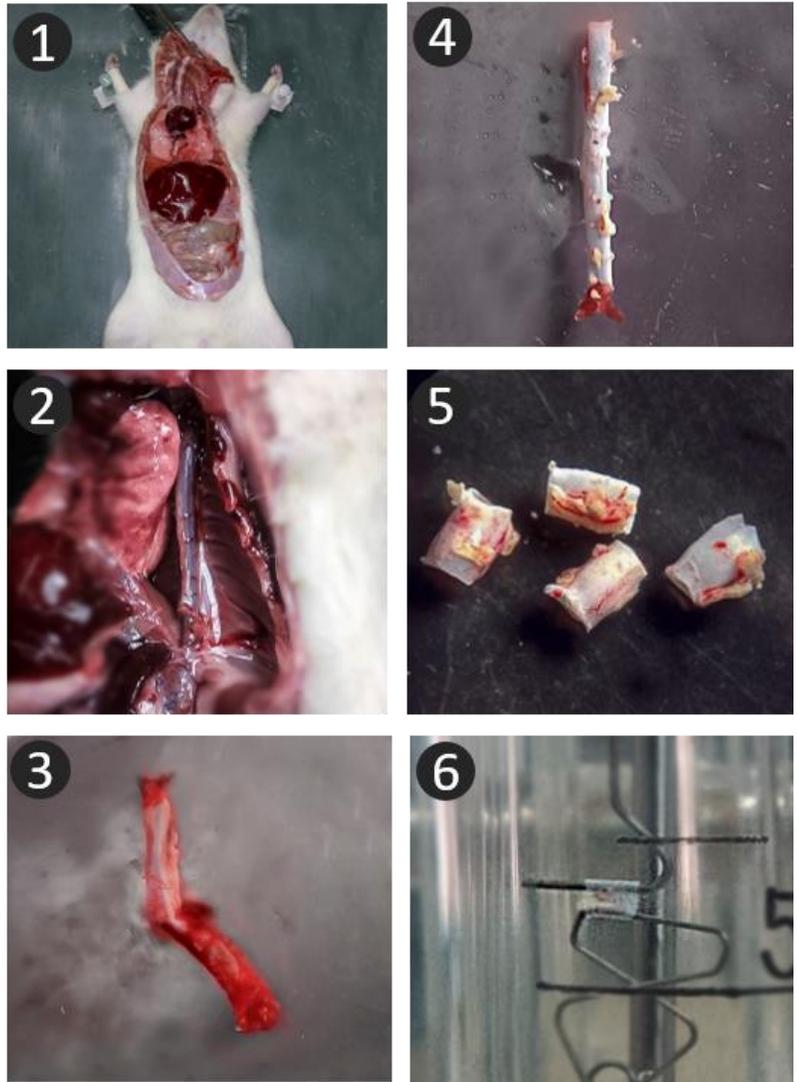


Figura 11 Imágenes tomadas del proceso de obtención de los anillos de aorta. 1. Disección 2. Ubicación de la aorta torácica 3. Aorta diseccionada con tejido adiposo y coágulos 4. Aorta limpia 5. Anillos de aorta 6. Anillo de aorta entre los ganchos dentro del baño de órgano aislado

Usando tijeras y pinzas pequeñas se retiró el tejido adiposo perivascular, demás tejidos conectivos y coágulos de sangre, hasta que se observó la aorta torácica blanca. Posteriormente con unas tijeras se cortó la aorta en anillos de aproximadamente 4-5 mm de largo. Los anillos que se trabajaron sin presencia de endotelio, se obtuvieron de la misma manera y adicionalmente se pasó un palillo por dentro del haz del anillo y se dio vuelta, por ambos extremos de manera que se retiró el endotelio.

Los anillos se colocaron en uno de los ganchos de tejido. Uno de los ganchos esta anudado a la varilla de acero mientras que el otro gancho es atado al transductor del equipo. Una vez que el anillo de aorta está asegurado a los ganchos, se montó en el baño del equipo del órgano aislado. Este procedimiento se puede ver resumido en las imágenes presentadas en la figura 11.

4.6.2 Condiciones de estabilización del tejido

Los baños del equipo de órgano aislado, fueron llenados con 15 mL de buffer Krebs- Henseleit a pH 7.4 y provistos de aireación continua de una mezcla de 95% O₂/5% CO₂, a una temperatura de 37° C. La estabilización del tejido consto de dos etapas (Figura 12) La primera etapa consistió en llevar al anillo a una tensión final de 2 g, usando el micrómetro, se fue aumentando la tensión del anillo de 0,5 g cada 15 min, el tejido se dejó estabilizar por 30 minutos. Cumplido este periodo se hizo un cambio de Buffer K-H previamente calentado a 37°C. La segunda etapa permitió evaluar la viabilidad del anillo: El baño se llevó a un volumen de 10 mL y se añadió 100 µl de KCl quedando a una concentración final en el baño de 50 mM. Una vez que el anillo alcanzó una meseta se realizó un lavado con buffer K-H a temperatura de 37°C, el anillo se dejó estabilizar por 45 minutos. Por cada experimento esta segunda etapa se realizó dos veces.

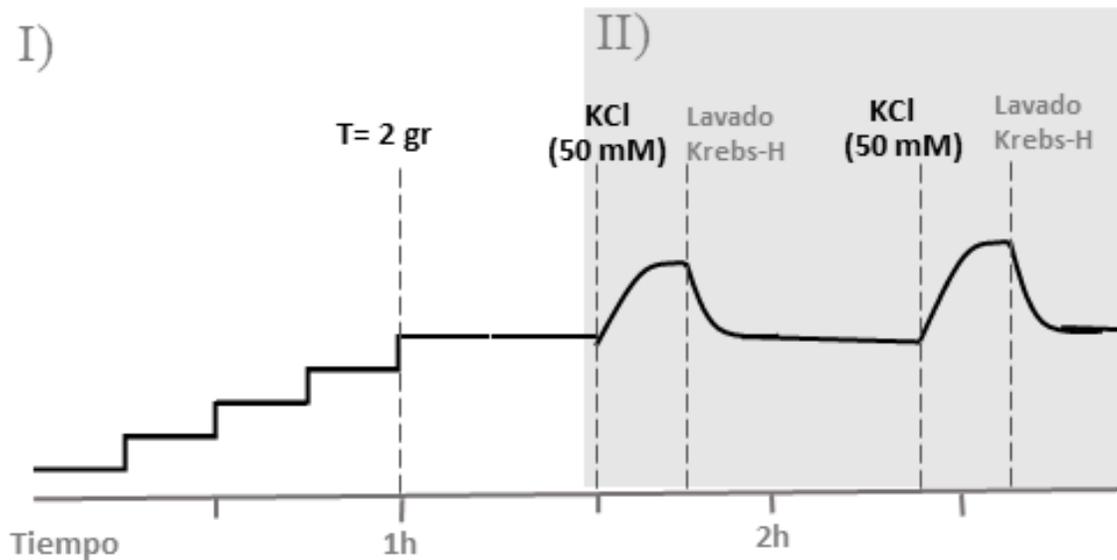


Figura 12 Diagrama del protocolo de estabilización del anillo de aorta en el baño. I) Aumento de tensión gradual. II) Contracciones con Cloruro de potasio.

4.6.3 Evaluación de la viabilidad del endotelio

Una vez el anillo estabilizado, se contrajo con el agonista Fenilefrina (FE), para ello se preparó una solución de FE a 3×10^{-5} M, para añadir al baño (10 mL) un volumen de 100 μ L, quedando una concentración de 3×10^{-7} M. Una vez que la contracción alcanzó un plato se añadió 100 μ L de Carbacol (Cch) a 1×10^{-3} M para quedar una concentración en el baño de 1×10^{-5} M.

La respuesta fue expresada en porcentaje de relajación alcanzado por el anillo (luego de ser añadido el Cch), mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de Relajación} = \frac{T_{\text{maxima}} - T_{\text{relajación}}}{T_{\text{maxima}} - T_{\text{basal}}} \times 100$$

En donde la T_{basal} está dada por la tensión del anillo en estado basal o reposo, la $T_{\text{máxima}}$ está dada por la tensión alcanzada luego de ser añadida la FE y la $T_{\text{relajación}}$ está dada por la tensión que se alcanzó luego de ser añadido el Cch. (Figura 13)

Los anillos que respondieron con un porcentaje mayor al 70% de relajación son considerados anillos con endotelio funcional mientras que los anillos que respondieron con un porcentaje menor al 10% de relajación son considerados anillos sin endotelio.

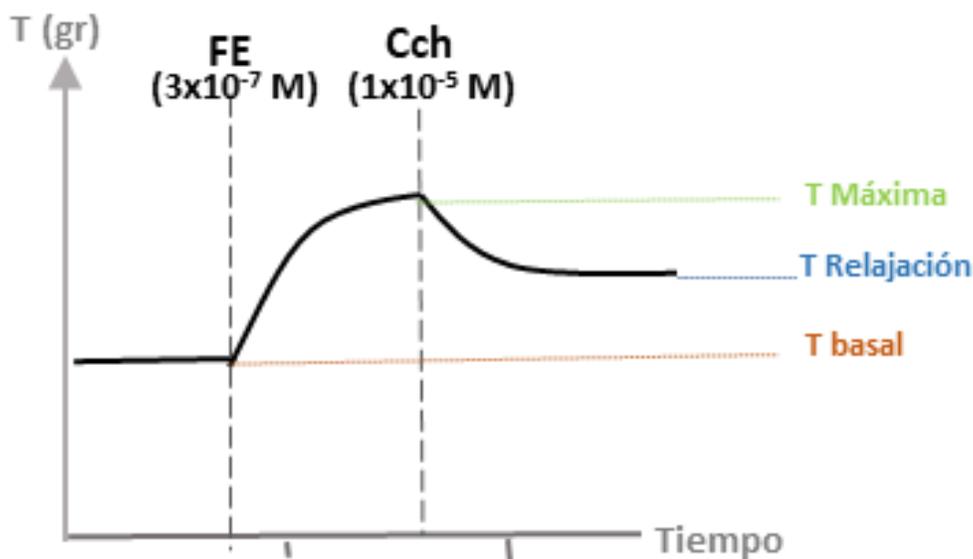


Figura 13 Diagrama del protocolo de viabilidad de endotelio

4.6.4 Construcción de la curva acumulativa concentración-respuesta (Evaluación de actividad vasorrelajante del extracto, fracciones, y subfracciones de AnOc)

Una vez el anillo alcanza una tensión basal, se lavó con buffer K-H (pH 7.4 a 37°C) y se procedió a realizar el experimento para la evaluación de la actividad vasorrelajante del extracto y las fracciones en anillos con endotelio (E+) y anillos sin endotelio (E-) para evaluar la dependencia del efecto a la viabilidad del endotelio.

Para la construcción de la curva acumulativa C-R (Figura 14) los anillos fueron pre contraídos con FE (3×10^{-7} M) Y se añadieron concentraciones acumulativas de 1, 3, 10, 30, 60, y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto, fracción o subfracción evaluadas (experimentos independientes), entre cada concentración se esperó un intervalo de tiempo de 3 minutos para añadir la siguiente concentración, si no se observaba un cambio en la tensión del anillo. Las soluciones madres estuvieron diluidas en DMSO a una concentración menor del 1% en el baño. El

vehículo de estos experimentos será disoluciones de DMSO a las concentraciones antes mencionadas (siempre teniendo DMSO $\leq 1\%$ en el baño). De esta manera se escogió la fracción y subfracción con mayor actividad, es decir la que tuviera un mayor efecto vasorrelajante a una menor concentración.

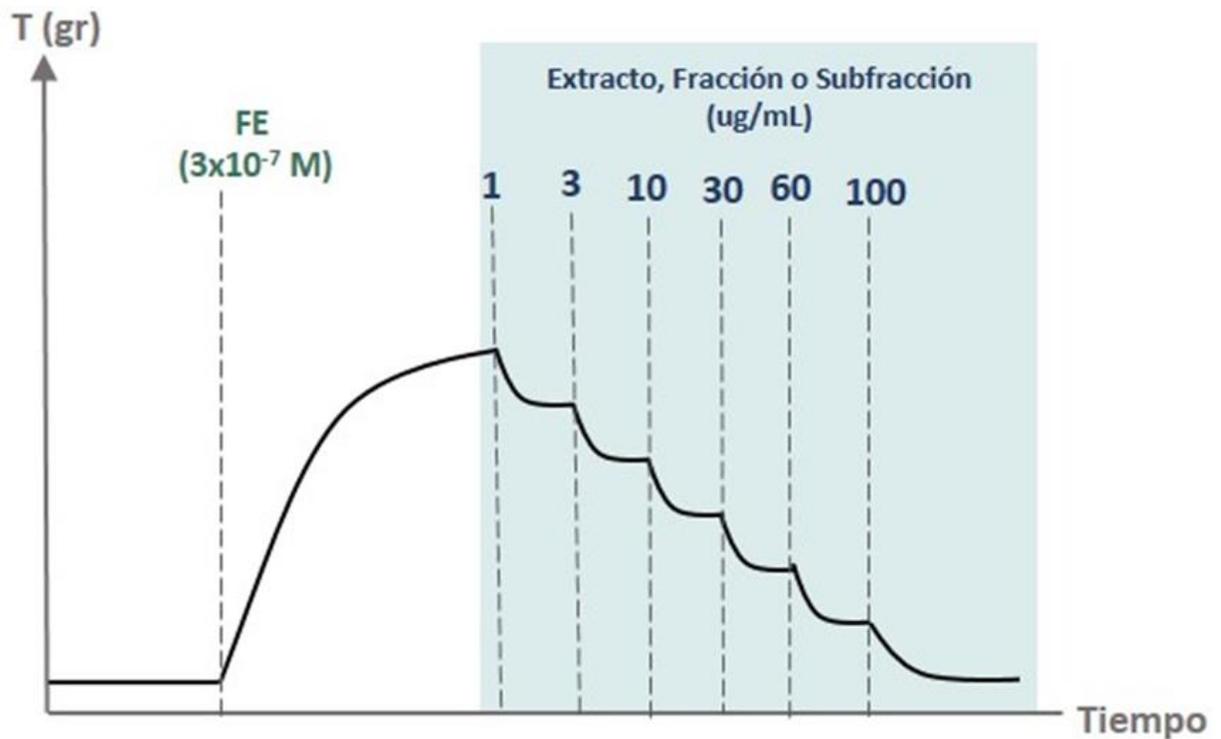


Figura 14 Diagrama del protocolo para la evaluación de la actividad vasorrelajante del extracto, fracción y subfracciones en anillos con endotelio y anillos sin endotelio.

4.6.5 Evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto activo aislado de *AnOc*.

4.6.5.1 Cálculo de la concentración efectiva media del compuesto

A partir de la curva acumulativa concentración- respuesta en anillos precontraídos con FE (3×10^{-7} M) se calculó el valor de la concentración efectiva media (CE_{50}) mediante una regresión no lineal, logística. Esta concentración representa el 50% de respuesta tomado desde la línea basal a la máxima respuesta encontrada (contracción con FE)

4.6.5.2 Respuesta vasorrelajante del compuesto ante diferentes agonistas.

Se evaluó el efecto vasorrelajante del compuesto activo en el tejido precontraído con fenilefrina y KCl. Este ensayo se realizó en anillos con endotelio (E+) y FE (3×10^{-7} M) y KCl (0.05 M) en experimentos independientes. Una vez alcanzada la meseta se utilizó la CE_{50} del compuesto. (Fig. 15)

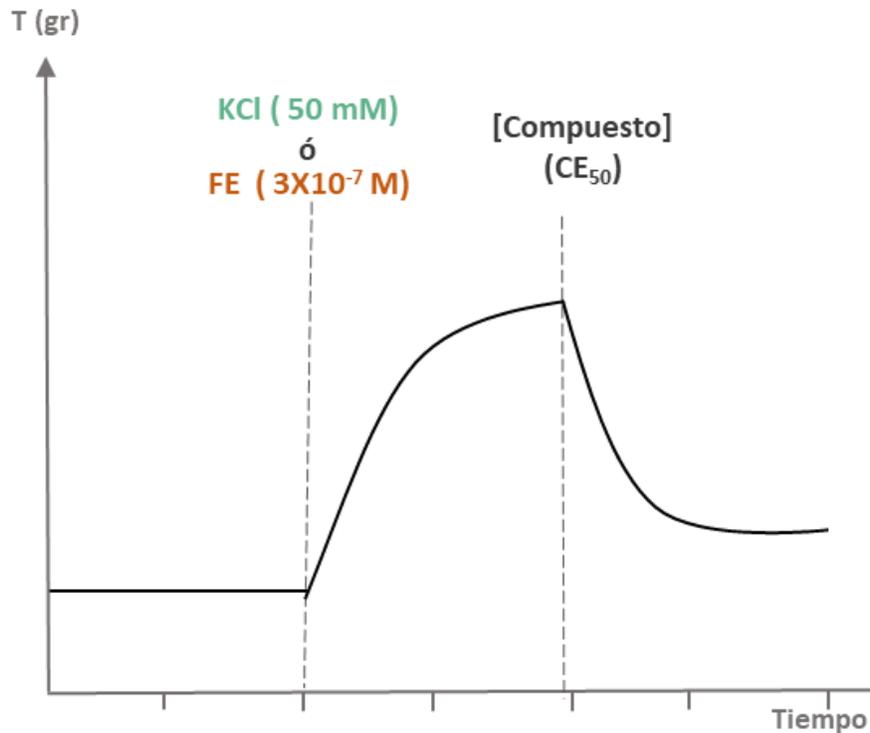


Figura 15 Diagrama del protocolo para la evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto frente a diferentes agonistas.

4.6.5.3 Competitividad del compuesto en el α -adrenorreceptor

Para evaluar la relación del compuesto con el receptor α -1 y si este actúa de manera competitiva con el agonista fenilefrina. Se realizó el procedimiento descrito en la figura 16. En donde en anillos con endotelio se incubó la CE_{50} del compuesto por 30 minutos y luego se agregó de manera acumulativa concentraciones de FE, desde 1×10^{-11} M hasta 1×10^{-5} M. El control de este experimento consistió en construir la misma curva sin la incubación previa del compuesto, usando una disolución de DMSO

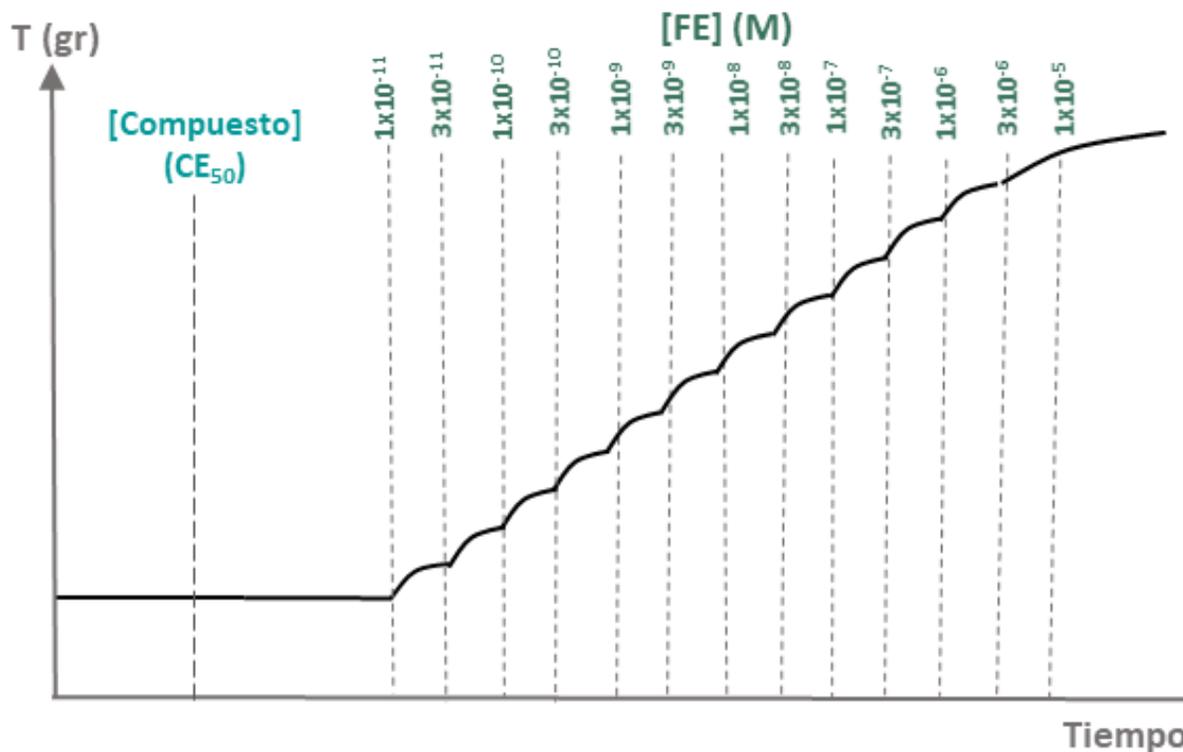


Figura 16 Diagrama del protocolo para la evaluación de la competitividad del compuesto (Curva concentración creciente de Fenilefrina)

4.6.6 Evaluación de la participación del óxido nítrico y prostaciclina en el efecto relajante del compuesto aislado de AnOc

Para evaluar la participación del óxido nítrico (NO) en el mecanismo de vasorelajación del compuesto, se utilizó un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa, L-NAME, a una concentración de 100 μ M. Por otro lado, para evaluar la participación de las prostaciclina (PGI_2), se utilizó un inhibidor la ciclooxigenasa (COX), Indometacina (Indo), a una concentración de 10 μ M. Se siguió el protocolo mostrado en la figura 19. Este ensayo se realizó en anillos con endotelio (E+) y en anillos sin endotelio (E-)

4.6.7 Evaluación de la actividad vasorrelajante del compuesto activo aislado de *AnOc* en presencia de nitroprusiato de sodio (NPS)

La preparación se incubó con la CE_{50} del compuesto por 10 minutos para luego contraer los anillos con FE (3×10^{-7} M) posteriormente se realizó una curva acumulativa C-R con concentraciones de 10^{-10} M a 10^{-7} M de NPS, como se describe en la figura 17. El vehículo control de este experimento consistió en incubar una disolución de DMSO en agua destilada a la misma concentración del compuesto ($\leq 1\%$ de DMSO en el baño). Este ensayo se realizó en anillos con endotelio (E+).

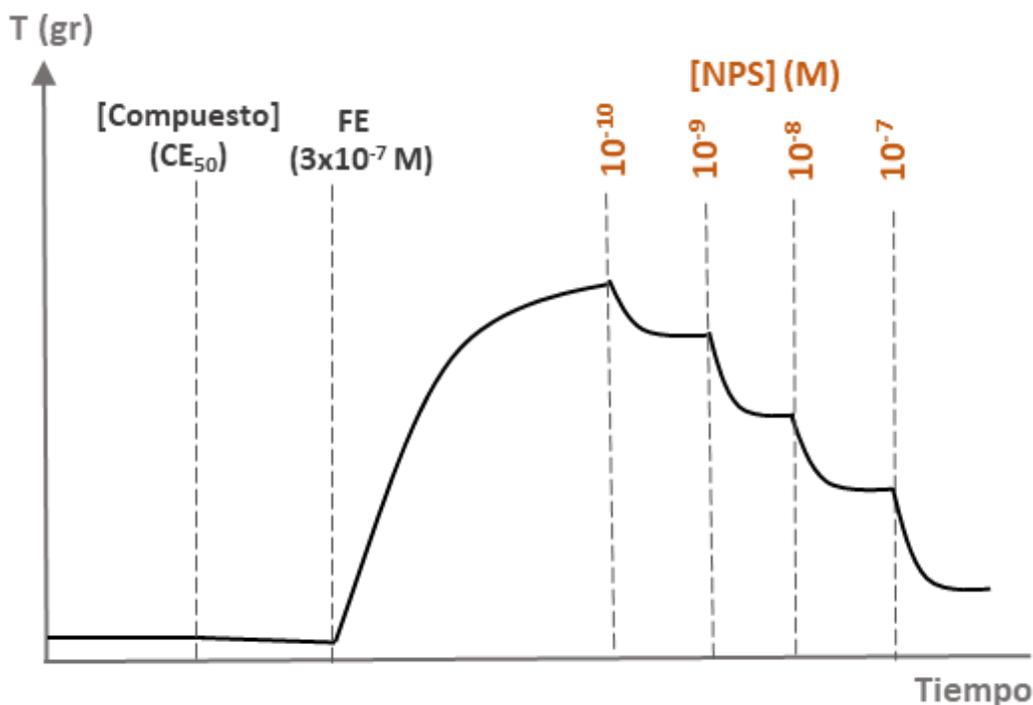


Figura 17 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación del NO en presencia de NPS.

4.6.8 Evaluación de la participación del GMPc en el efecto relajante del compuesto aislado de *AnOc*.

Para la evaluación de la participación del GMPc se incubó con el inhibidor de la enzima Guanilato ciclasa, Azul de metileno ($100 \mu\text{M}$), los anillos con endotelio fueron contraídos con FE (3×10^{-7} M) y se les colocó la CE_{50} del compuesto, Siguiendo el protocolo expuesto en la figura 19. El vehículo de este experimento consistió en

incubar una disolución de DMSO en agua destilada a la misma concentración del compuesto ($\leq 1\%$ de DMSO en el baño).

4.6.9 Evaluación de la participación de los receptores acoplados a proteína G: β -adrenérgicos, muscarínico y purinérgicos en el efecto relajante del compuesto aislado de *AnOc*.

Se siguió el protocolo de la figura 19. Los anillos se incubaron 10 minutos con los inhibidores de los receptores, Propanolol ($10 \mu\text{M}$) para el receptor β -adrenérgicos, Atropina ($10 \mu\text{M}$) para receptores muscarínicos, y Suramina ($10 \mu\text{M}$) para receptores purinérgicos, en experimentos independientes, posteriormente fueron contraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) y al llegar a un plató se colocó la CE_{50} del compuesto. El grupo control para estos experimentos consistió: En incubar el vehículo, una disolución de DMSO en agua destilada a la misma concentración del compuesto ($\leq 1\%$ de DMSO en el baño) Por otro lado para los anillos inhibidos con Atropina se utilizó el antagonista Carbacol ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) y para los anillos inhibidos con Propanolol con el antagonista Isoproterenol ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$).

4.5.1 Evaluación de la participación de los canales de potasio en el efecto relajante del compuesto aislado de *AnOc*.

Para los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) se incubó con el inhibidor Glibenclamida ($10 \mu\text{M}$), para los canales de potasio dependientes de voltaje (K^+_{v}) se incubó con el inhibidor 4-Aminopiridina ($1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$), en experimentos independientes, para luego ser contraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) e incubar la CE_{50} del compuesto (Figura 19.) Para evaluar la participación de los canales de potasio dependientes de calcio ($\text{K}^+_{\text{Ca}+2}$) se siguió el protocolo descrito en la figura 18. En donde se realizaron cuatro tratamientos; (A) contracción con TEA (10 mM) (B) contracción con TEA (10 mM) e inhibición con L-NAME ($10 \mu\text{M}$), (C) Incubar con TEA (1 mM) y contraer con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$), (D)) Incubar con TEA (1 mM), contraer con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$), inhibir con L-NAME ($10 \mu\text{M}$). El vehículo control de este experimento consistió en incubar una disolución de DMSO en agua destilada a la misma concentración del compuesto ($\leq 1\%$ de DMSO en el baño).

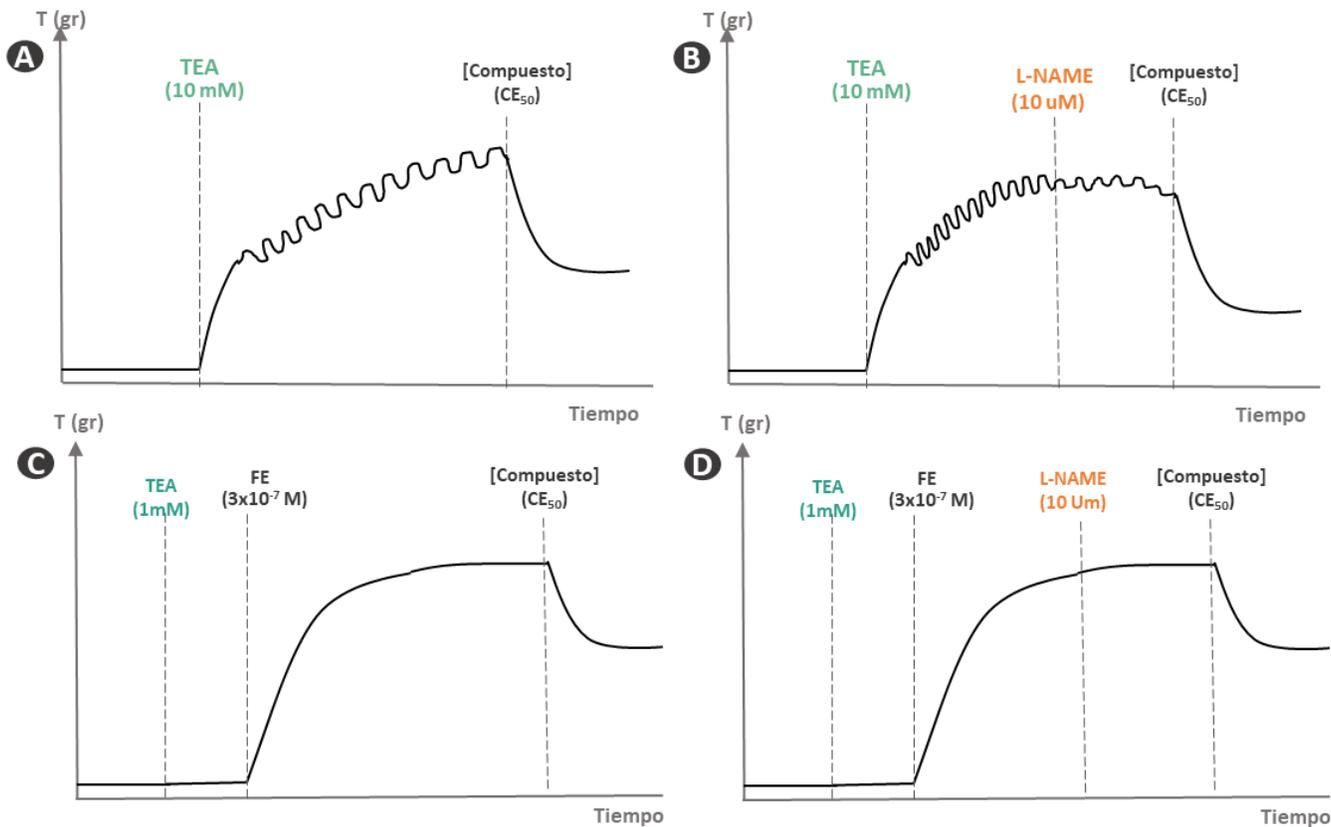


Figura 18 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación de los canales K^+_{Ca2}

4.5.2 Evaluación de la participación de los canales de calcio tipo L, y receptores de rianodina en el efecto vasorrelajante del compuesto aislado de *AnOc*

Para la evaluación de los canales de Ca^{+2} de tipo L se incubó con el inhibidor Nifedipina ($60 \mu\text{M}$) y para los receptores de rianodina se incubó con el inhibidor Tetracaína ($60 \mu\text{M}$) en experimentos independientes, que posteriormente fueron contraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) para luego colocar la CE_{50} del compuesto, Siguiendo el protocolo expuesto en la figura 19. El vehículo de este experimento consistió en incubar una disolución de DMSO en agua destilada a la misma concentración del compuesto ($\leq 1\%$ de DMSO en el baño)

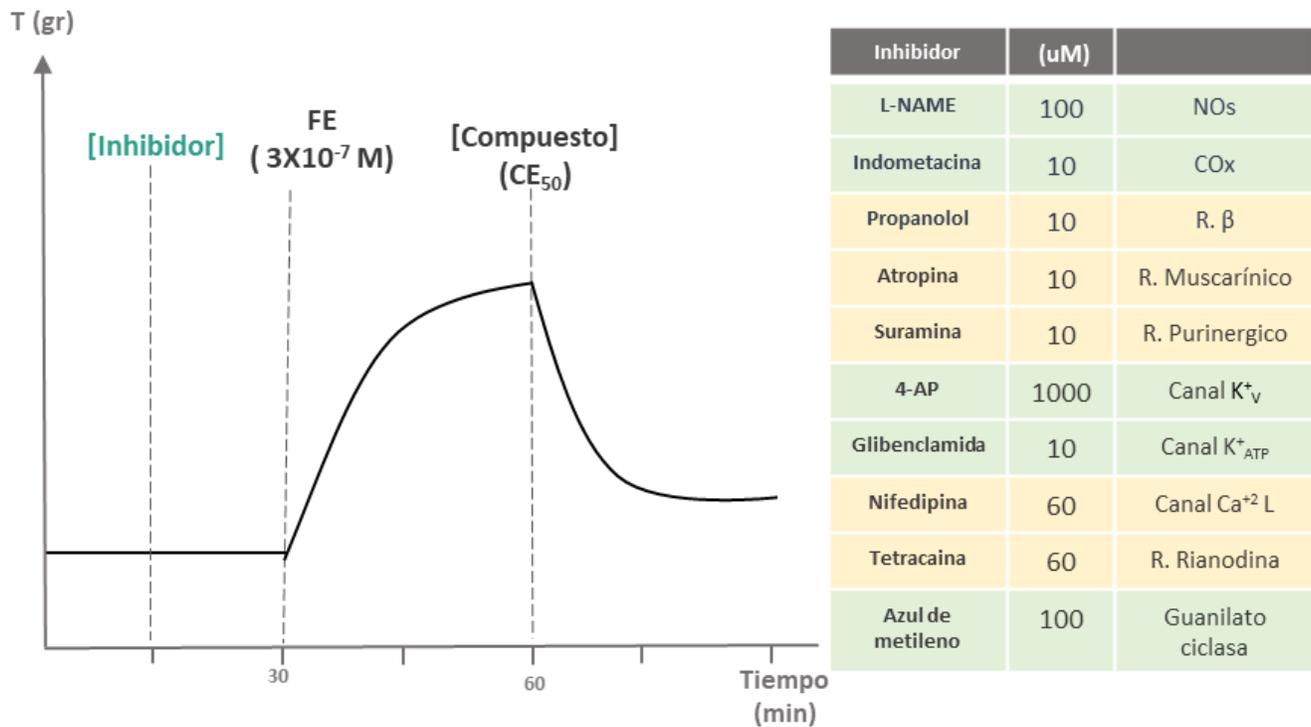


Figura 19 Diagrama del protocolo para la evaluación de la participación de segundos mensajeros, receptores y canales iónicos, con los inhibidores expuestos.

4.6 Análisis de los datos

Los datos fueron reportados como la media (promedio de número de anillos) \pm error estándar (SEM). En base a la relación entre la concentración utilizada y porcentaje de relajación encontrado. Se utiliza como principal herramienta de estadística descriptiva la construcción de curvas concentración- respuesta (% De relajación vs. Log [Concentración]), así como también el uso de gráfico de barras y caja y bigotes, para diferenciar las respuestas entre tratamientos en un experimento.

Análisis estadístico

De este modo, se pudo utilizar dos métodos estadísticos para la comprobación de diferencias o similitud entre las respuestas obtenidas. Dado que el n muestral (número de anillos por rata) mostrado en la tabla II. no cumplió con el supuesto de distribución muestral normal por tener un n muestral bajo, se realizaron comparaciones de medias no paramétricas.

Para muestras dependientes: Kruskall- Wallis que permitió realizar una comparación entre las respuestas dadas a las determinadas concentraciones de las fracciones o subfracciones de los anillos sin endotelio y de los anillos con endotelio, para evaluar la independencia de la respuesta. En donde un $p < 0,05$ indica que la respuesta vasorrelajante es propia de cada fracción o subfracción e independiente de las demás.

Para muestras independientes: U de Mann-Whitney para los ensayos de evaluación del mecanismo de acción en donde se realizó una comparación de media entre los anillos incubados con el inhibidor frente al compuesto y los anillos no incubados con inhibidor frente al compuesto (grupo control). Para esto se estableció como hipótesis nula: $H_0 =$ El efecto vasorrelajante de los anillos inhibidos y el grupo control es igual; Y como hipótesis alternativa: $H_a =$ El efecto de los grupos no es igual. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$.

Concentración efectiva media y Efecto máximo

El cálculo de la concentración efectiva media (CE_{50}) es el valor medio de la concentración del compuesto en donde se alcanza la mitad del efecto máximo encontrado. Este valor se calculó mediante una regresión no lineal a partir de la curva concentración- respuesta de E3III (el compuesto). El cálculo y se realizó mediante el software *Graph Pad Prism 7* en donde se tomó el "best fit value" con un intervalo de confianza del 95%.

El cálculo del Efecto máximo ($E_{máx}$) es el valor de la respuesta única máxima alcanzada por el compuesto, que es reportada en porcentaje de relajación (%). Este cálculo se realizó a partir de la de la curva concentración- respuesta de E3III (el compuesto) mediante el software *Graph Pad Prism 7*.

Competitividad del compuesto

Se ha calculado el pA_2 o logaritmo negativo para la concentración de antagonista en presencia de la cual es necesario duplicar la concentración de agonista para obtener el mismo efecto. Este es un valor característico de cada antagonista para cada tipo de receptor (Camarasa, 1987). Cuanto mayor sea el valor de pA_2 menor es la

cantidad del compuesto requerida para causar inhibición de la respuesta del agonista, indicando mayor competitividad. Este análisis se llevó a cabo mediante el software *Graph Pad Prism 7*.

Adicionalmente se realizó el cálculo de la pendiente del diagrama de Schild que se puede considerar una estimación de la constante de disociación de equilibrio del antagonista para el receptor. En donde valores mayores a 1 sugiere un antagonismo no competitivo. Este análisis se llevó a cabo mediante el software *Graph Pad Prism 7*.

Tabla III n: Número de anillos de aorta utilizado en cada experimento

Experimento	Tratamientos	n (Número de anillos)	
Evaluación del extracto	XO E+	7	
	XO E-	5	
	Control E+	5	
	Control E-	5	
Evaluación de las fracciones	E2 E+	4	
	E3 E-	3	
	E3 E+	5	
	E3 E-	5	
	Control E+	5	
	Control E-	5	
Evaluación de las subfracciones	E3I	4	
	E3II	5	
	E3III	8	
	Control	5	
Evaluación del compuesto	Curva acumulativa FE	3	
	Control	3	
	KCL +Compuesto	4	
	FE + Compuesto	4	
	Control KCL	4	
	Control FE	4	
	Participación de EDRH : Oxido nítrico y prostaciclina	L-NAME+ Compuesto	7
		Indometacina + Compuesto	7
Control E+		4	
Control E-		4	
NPS + E3II		3	
Control NPS		3	
Participación de los receptores Beta adrenérgicos, purinérgicos y muscarínicos	Propranolol + Compuesto	4	
	Suramina + Compuesto	4	
	Atropina + Compuesto	3	
	Control	6	
Participación canales K ⁺	Glibenclamida + Compuesto	3	
	4-Aminopiridina + Compuesto	4	
	Control	6	
	TEA 1mM + Compuesto	5	
	TEA 1 Mm + L-NAME + Compuesto	3	
	TEA 10mM + Compuesto	4	
	TEA 10 Mm + L-NAME + Compuesto	3	
Control	6		
Participación de canales de calcio tipo L y receptores rianodina del retículo endoplasmático	Nifedipina + compuesto	4	
	Tetracaina+ Compuesto	4	
	Control	4	
Participación de GMPC	Azul de metileno + compuesto	4	
	Control	4	

5. RESULTADOS

5.1 Actividad Vasorrelajante del extracto *AnOc*

La actividad vasorrelajante del extracto de *Anacardium occidentale* (XO) a concentraciones crecientes en anillos con endotelio (XO E+) y sin endotelio (XO E-). Se observa en la Fig. 20. En anillos E+ se encontró el mayor efecto vasorrelajante, alcanzando el $50 \pm 3,2$ % de relajación a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ del extracto, exhibiendo un efecto de relajación de manera dependiente de la concentración. La remoción del endotelio causa una pérdida de la actividad vasorrelajante en la preparación alcanzando apenas un $11 \pm 5,2\%$ de relajación a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$.

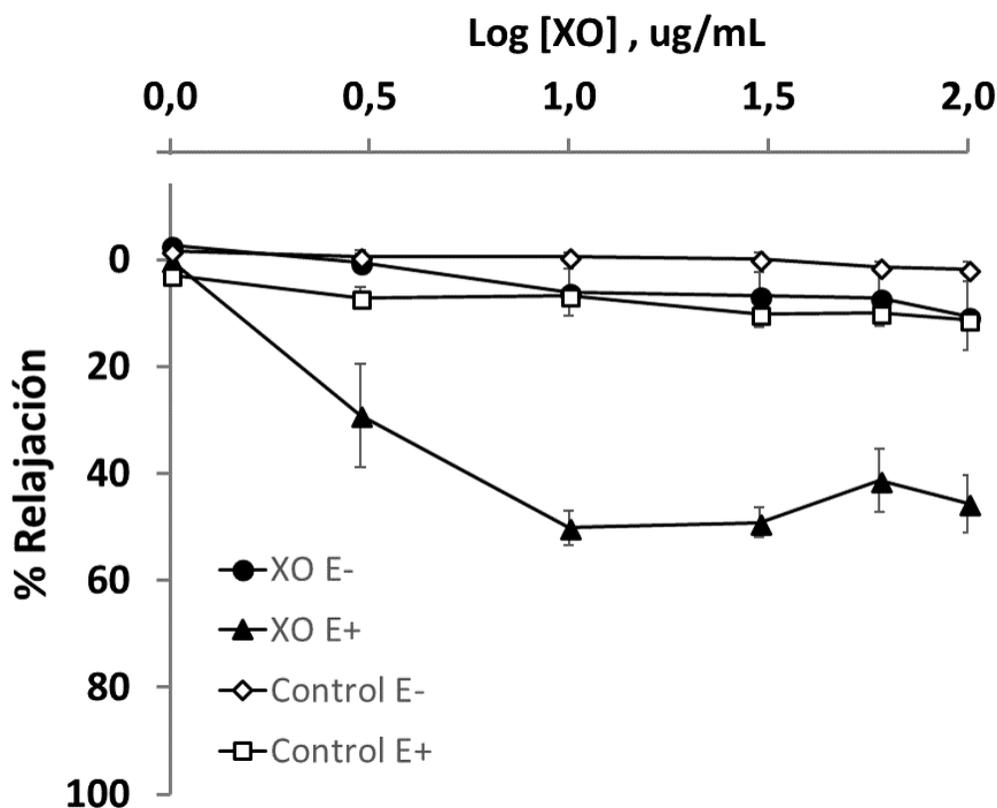


Figura 20 Curva concentración-respuesta del extracto de corteza de *AnOc* en anillos aórticos con endotelio (XO E+) y sin endotelio (XO E-) pre contraídos con FE (3×10^{-7} M). Cada punto representa el Promedio \pm SEM

5.2 Fraccionamiento del extracto etanólico de corteza *AnOc*

Una vez corroborado el efecto vasorrelajante del extracto se prosiguió al fraccionamiento por el método de solubilidad en donde se obtuvieron dos fracciones: E2, y E3. La fracción E2 corresponde a la fracción soluble en acetona con compuestos de mediana y baja polaridad mientras que la fracción E3 es la insoluble con compuestos de alta polaridad (Fig 21). La fracción E2 presento una coloración ámbar brillante mientras que la fracción E3

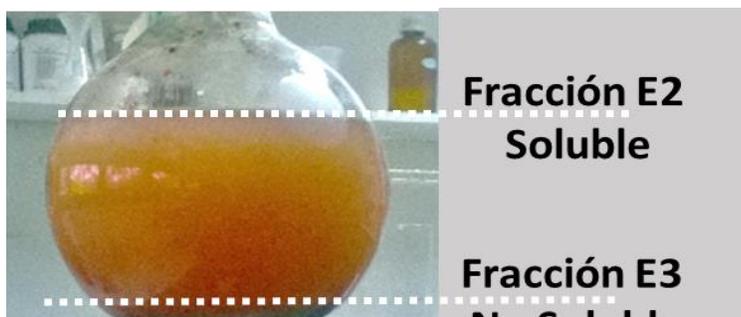


Figura 21. Fracciones E2 Y E3 obtenidas por el método de solubilidad a partir de de 1 gr de Extracto en 200 mL en Acetona.

color marrón brillante.

Las fracciones fueron filtradas y el solvente evaporado, de esta manera se obtuvo el peso en seco y el % de rendimiento del fraccionamiento.

Este procedimiento se llevó a cabo 5 veces (Tabla III), en donde el rendimiento siempre fue mayor al 87%.

Tabla IV Rendimiento del fraccionamiento del extracto de corteza de *AnOc*

Peso en seco (g)			Rendimiento (%)
XO	E2	E3	
1,000	0.380	0,495	87,5
1,000	0.443	0,445	87,6
1,000	0,513	0,410	92,3
1,000	0.422	0,575	99,7
6,936	3,556	3,334	99,3

Al evaluar la composición de cada fracción mediante una cromatografía de capa fina:(FE: RP₁₈ F₂₅₄ FM: CH₃CN:HCO₂HO 0.1% ; 3:7) En el extracto sin revelar observado bajo luz UV 254 nm (Fig. 22 A) Se encontraron 4 bandas fluorescentes, 3 verdes y una naranja, que coinciden en la fracción soluble E2 (Rf₁= 0,07; Rf₂= 0,21; Rf₃= 0,33; Rf₄= 0,49) Mostrando compuestos de baja y mediana polaridad. Esta

fluorescencia evidencia la presencia de flavonoides, mientras que la fracción no soluble E3 no presentó fluorescencia ni bandas aparentes bajo luz UV. Por otro lado, al revelar el cromatograma (Fig 22 B) con sulfato sérico la fracción E3 mostró una coloración marrón “quemada” característica de taninos y una banda ancha Rf₅=

0,52 la de mayor polaridad encontrada, mientras que en la fracción E2 se pueden apreciar mayoritariamente y de manera definida dos bandas de color naranja correspondiendo a las observadas en luz UV. La coloración naranja hace referencia una vez más a la presencia de flavonoides.

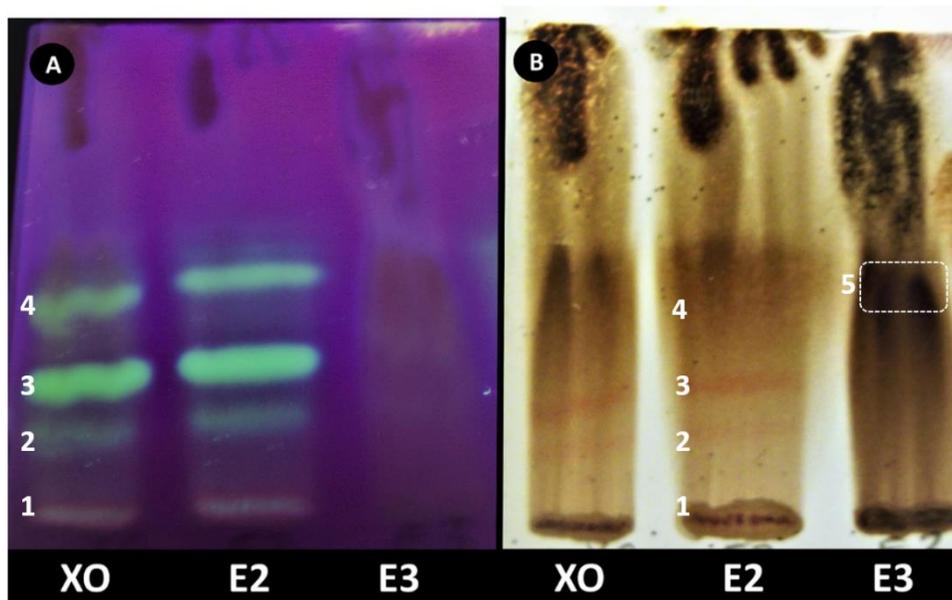


Figura 22. Cromatograma del extracto etanólico de AnOc (XO) y las fracciones obtenidas E2 Y E3. Observado en A) Luz UV 254 nm y B) Revelado con sulfato sérico. Se muestran cuatro (1,2,3,4) bandas coincidentes en XO y E2. Y una banda ancha (5) en E3.

5.3 Actividad vasorrelajante de las fracciones obtenidas a partir del extracto AnOc

Una vez obtenidas las fracciones, se evaluó la actividad vasorrelajante de ambas fracciones por separado. Aunque la respuesta vasorrelajante del extracto resultó ser dependiente de endotelio, estos ensayos se llevaron a cabo tanto en anillos con endotelio como en anillos sin endotelio para no descartar la posibilidad de un efecto vasorrelajante en alguna de las fracciones obtenidas en ausencia de endotelio.

Sin embargo, como se observa en la Fig 23. ambas fracciones resultaron ser activas y la respuesta vasorrelajante es endotelio dependiente. La fracción E2 en anillos sin endotelio no presentó un efecto vasorrelajante, mientras que en anillos con endotelio se observa una relajación concentración-dependiente hasta 30 µg/mL alcanzando el mayor valor de relajación, $54,2 \pm 12,7\%$. A partir de esta concentración se observa

una disminución en el porcentaje de relajación llegando a un $28,9 \pm 12,1\%$ para una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ (Fig 23.A).

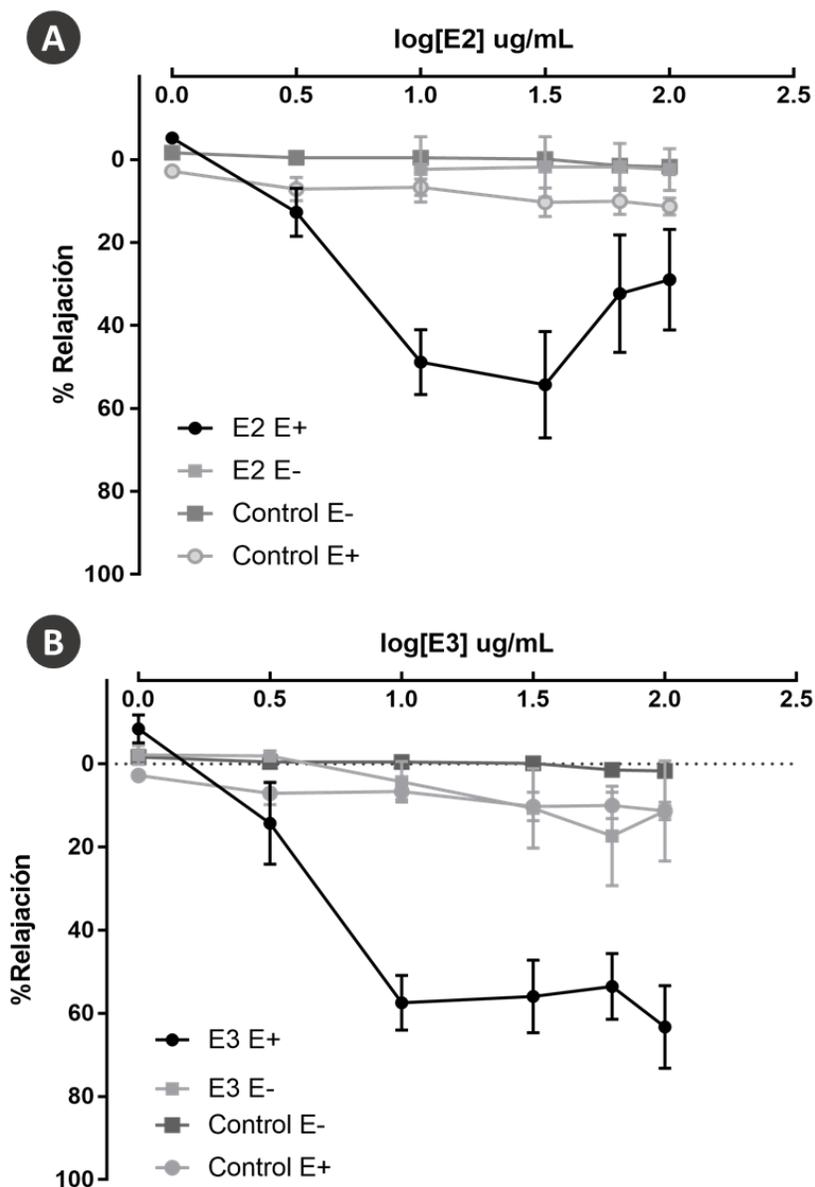


Figura 23. Curva concentración-respuesta de las fracciones E2 (A) y E3 (B) de AnOc en anillos aórticos con E+ y E- pre contraídos con FE (3×10^{-7} M). Cada punto representa el Promedio \pm SEM.

Por otro lado la fracción E3 evaluada en los anillos sin endotelio alcanzó un $17,8 \pm 11,8\%$ de relajación a una concentración de $30 \mu\text{g/mL}$ mientras que los anillos con endotelio la respuesta vasorrelajante es concentración-dependiente alcanzando un $63,26 \pm 9,8\%$ de relajación a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$. (Fig 23.B)

Las medias del porcentaje de relajación de cada fracción son independientes dado un $p= 0,0054$ se rechaza la H_0 por lo que el efecto vasorrelajante es propio de cada fracción.

5.4 Subfraccionamiento de la fracción E3 obtenida a partir del extracto *AnOc*

Continuando con el ensayo biodirigido se escogió la fracción E3 que presentó mayor actividad y potencia, para realizar el subfraccionamiento por cromatografía de columna Sephadex LH-20 de donde se obtuvieron 3 subfracciones; La eluida con metanol, E3I (MeOH), la eluida con agua E3II (H₂O) y por último la eluida con acetona, E3III (Ac). Este procedimiento se llevó a cabo 2 veces (Tabla V). El rendimiento de esta separación fue menor al 50%, pero se considera una buena separación dado que en la columna se observaron bandas definidas y separadas con cada solvente utilizado. La subfracción de menor cantidad fue E3II, se obtuvo un peso en seco total de 0,131 g mientras que la fracción E3III presentó un peso seco total de 0,445 gr.

Tabla V Rendimiento del subfraccionamiento de E3

Peso en seco (g)				Rendimiento (%)
E3	E3I	E3II	E3III	
0,300	0,050	0,011	0,070	43,6
1,800	0.336	0,120	0,375	46,16

Una vez obtenidas las subfracciones se realizaron cromatografías de capa fina en sílica gel en distintos sistemas de elusión los cromatogramas obtenidos son mostrados en la Figura 24. Para el sistema A no se observaron bandas aparentes para E3 y ninguna subfracción. Para el sistema B la subfracción E3I presento una mancha corrida que presentó una coloración marrón clara con un $R_f=0,26$, para la subfracción E3II no se observaron bandas mientras que la subfracción E3III presentó una mancha corrida de color marrón oscuro cuya intensidad da indicio de alta concentración con un $R_f= 0,11$.

El sistema de elusión C. fue el que arrojó un mejor cromatograma dado que se observa en la subfracción E3I una banda ancha con coloración marrón claro con una baja polaridad y un $R_f=0,61$ por otro lado E3III mostro una mancha corrida definida con coloración intensa marrón oscuro, presento una mayor retención (mayor polaridad) que E3I y un $R_f=0,29$. Para E3 y E3II no se observaron bandas.

En el sistema de elusión D. Se observó un resultado similar al sistema C. en donde se observa la misma mancha en E3I con un $R_f=0,79$ y el mismo patrón de mancha para E3III con un $R_f= 0,49$. Para la subfracción E3II Y E3 no se observaron bandas sin embargo el punto de aplicación presenta la coloración marrón.

Los cromatogramas fueron observados bajo luz UV (254 nm), para A y B no se observó fluorescencia mientras que para el cromatograma C Y D la banda presentada por E3I encontrada al ser revelado con sulfato cérico presento fluorescencia verde. Indicando la presencia de un flavonoide mientras que la banda corrida presentada en la subfracción E3III no presento fluorescencia. En la figura 25. Se presenta el resultado obtenido en el cromatograma C.

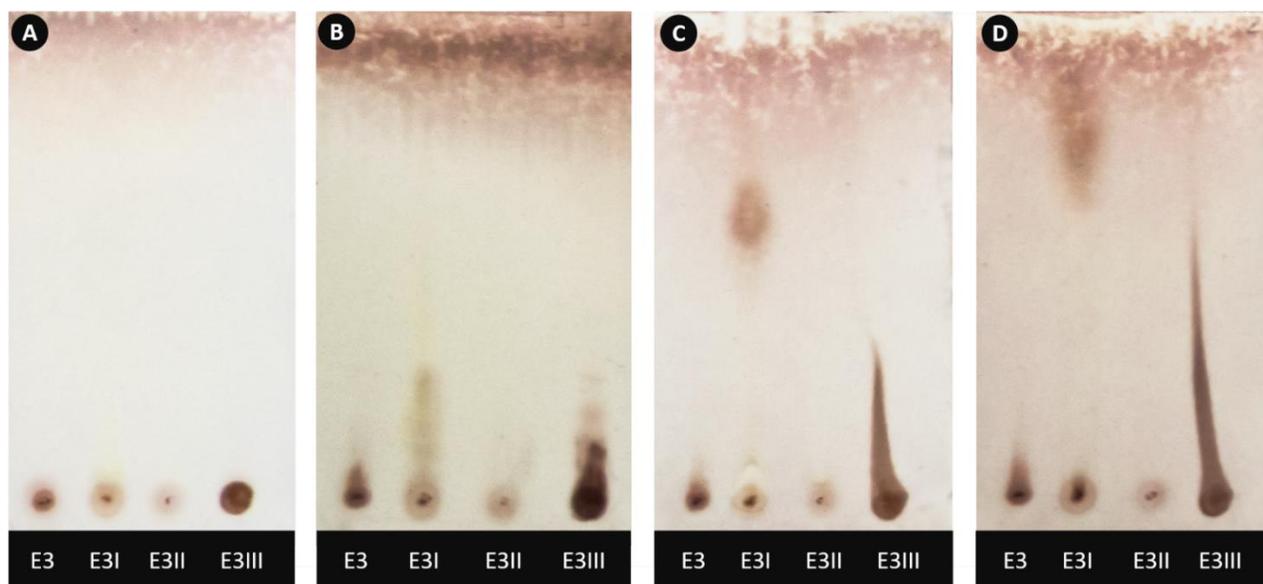


Figura 24. Cromatogramas de las subfracciones de E3: E3I, E3II y E3III. Corrido en el sistema de elusión (A) ACET: AcFo: Agua (100:11:26); (B) ACET: AcFo: AcOH: Agua (100:11:11:27) (C) MeOH: AcFo 0.1% (3:7); (D) AcOH: MeOH: Agua (1:35:65) Revelado con sulfato cérico.

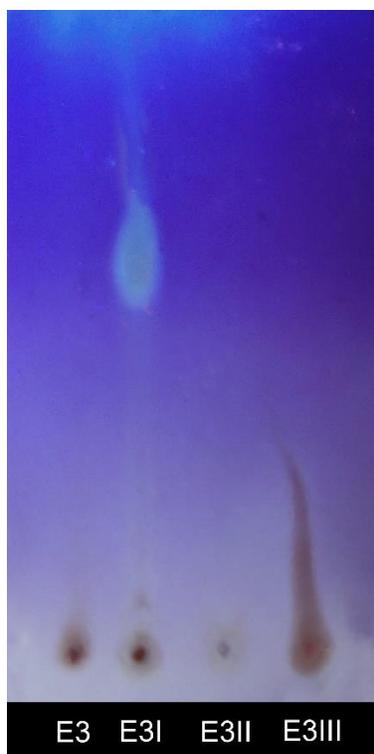


Figura 25. Cromatograma de las subfracciones de E3: E3I, E3II y E3III bajo luz UV (254 nm) corrida en el sistema de elución 3. (MeOH: AcOH, 3:7)

5.5 Actividad vasorrelajante de las subfracciones obtenidas de la fracción E3

Una vez obtenidas las subfracciones de E3, se prosiguió a evaluar la actividad vasorrelajante de las tres subfracciones por separado. Estos experimentos se llevaron a cabo únicamente en anillos con endotelio dado que la respuesta vasorrelajante en la fracción E3 es endotelio dependiente.

Se encontró que las 3 subfracciones mostraron ser activas (Fig. 26) con un efecto vasorrelajante concentración-dependiente. Para E3I la respuesta fue de $27,8 \pm 8,2\%$ vasorrelajación alcanzada a $60 \mu\text{g/mL}$; E3II alcanzó un $35,5 \pm 15,0\%$ a esta misma concentración mientras que con la subfracción E3III se alcanzó la mayor vasorelajación con un $70,2 \pm 3,4 \%$ a una concentración de $30 \mu\text{g/mL}$. Las medias del porcentaje de relajación de cada fracción son independientes dado un $p = 0,0067$ se rechaza la H_0 por lo que el efecto vasorrelajante es propio de cada subfracción.

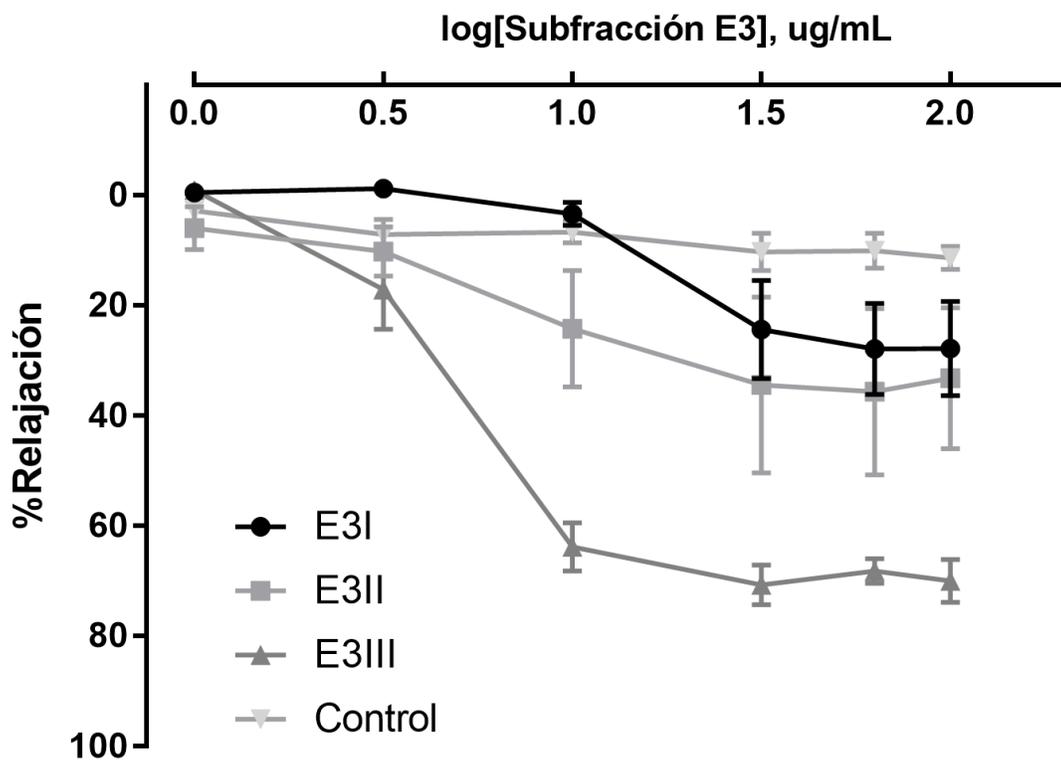


Figura 26 Curva concentración-respuesta de las subfracciones E3I, E3II Y E3III de AnOc en anillos aórticos E+ pre contraídos con FE (3×10^{-7} M). Cada punto representa el Promedio \pm SEM.

5.6 Caracterización del compuesto E3III.

5.6.1 Caracterización cualitativa de E3III por reveladores cromatográficos.

El resultado obtenido en el TLC (Fig. 24 y 25) la subfracción E3III que presenta una mancha ($R_f = 0.29$ e sistema de elución C) se pensó que esta subfracción podría estar constituida por un solo compuesto, y al ser la subfracción con mayor actividad E3III fue analizada frente a distintos reveladores para ser caracterizada cualitativamente. Dando positivo frente al revelador del sulfato cérico con una coloración marrón, que al ser observada bajo luz UV no presentaba fluorescencia, por lo que puede indicar ser un tanino. Por otro lado, frente al reactivo de Dragendorff y ácido fosfomolibdico no evidenciaron ningún tipo de coloración característica positiva para compuestos alcaloides, aminas terciarias secundarias o derivados de ácido graso (Fig. 27)



Figura 27 Caracterización de E3III; Revelado en distintos reactivos (Sulfato cérico, Dragendorff y Ácido fosfomolibdico)

En un análisis por TLC utilizando como fase estacionaria sílica gel RP-18 y como fase móvil: Acetonitrilo: Acido fórmico 0,1% (3:7) Se evidencio que la fracción E3 presentaba una sola mancha que fue comparada con muestras auténticas de catequina(CAT) y ácido gálico (AG) para confirmar o descartar la presencia de estos compuestos en la fracción y se encontró que las bandas de estos compuestos no coincidieron con la presentada por E3 (Fig 28). Los Rf calculados muestran esta diferencia en la polaridad de los compuestos, siendo E3 menos polar que el ácido gálico y la catequina. ($R_{fE3} = 0.47$; $R_{fCAT} = 0,80$; $R_{fAC} = 0,90$)

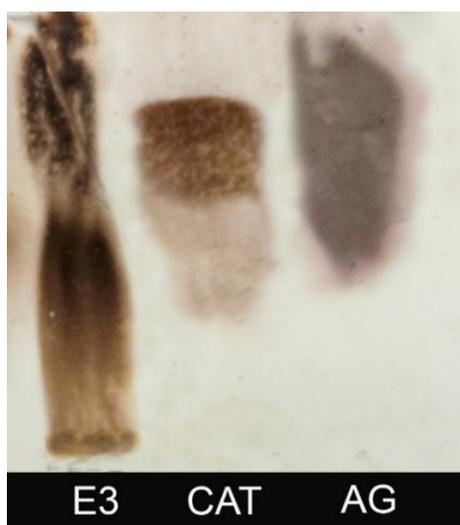


Figura 28 Cromatograma de E3, catequina y acido gálico. (Fase estacionaria: RP-18, Fase Móvil: ACN: AcFo 0.1% proporción 3:7; Revelado con sulfato cérico)

5.6.2 Análisis espectroscópicos de E3III por técnicas espectroscópicas de Infrarrojo, espectrometría de masas y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear H-1.

El espectro de Infrarrojo de E3III (Anexo 3) evidencia la presencia de grupos OH- (ν 3400 cm^{-1}), CH-sp³ (ν 2950-2800 cm^{-1}), -CO aromáticos (ν 1620 cm^{-1}), CO - alifáticos (ν 1200 a 1100 cm^{-1}) y C=C aromáticos (ν 800 a 700 cm^{-1}), lo cual es característico de taninos condensados, se descartó la posibilidad que E3III fuese un tanino del tipo hidrolizable por la ausencia en el espectro de la banda de grupo carbonilo en 1750 cm^{-1} .

El espectro de masas de E3III (Anexo 2), se observa una señal a m/z 1048,77 atribuible al ion molecular (M-Na)- y consistente con la fórmula $\text{C}_{45}\text{H}_{37}\text{O}_{28}\text{Na}$, así como un fragmento en m/z =663,88 corresponden a la pérdida de una unidad de m/z = 384, lo que sugiere la pérdida una unidad de catequina hidroxilada en las posiciones 6,8, 2' y 6'a partir del ion molecular de E3III. Este patrón de fraccionamiento nos hace pensar que el compuesto E3III es un tanino de tipo condensado con tres unidades de catequina polihidroxilado.

El espectro de RMN H⁻¹ de E3III, disuelto en una mezcla DMSO-Deuterado –Agua Deuterada (Anexo 4), muestra en la región aromática entre 6.9 y 7.0 ppm dos singletes en proporción 1 a 2 característicos y asignables a los protones aromáticos de los anillos A y B de las catequinas que conforman el compuesto E3III. Adicionalmente entre 2.5 y 2.7 ppm aparecen dos tripletes que integran para un protón cada uno y tres singletes anchos en 2.3 ppm, 2.6 ppm y 3.25 ppm, las cuales podrían ser atribuibles a los protones de los carbonos 2,3 y 4 de los trímeros del anillo C de las catequinas polihidroxiladas. Por lo descrito anteriormente concluimos que el compuesto E3III se trata de un trímero de un tanino condensado polihidroxilado cuya estructura molecular queda aún confirmar por experimentos 2D de RMN, Sin embargo, se propone la estructura que se muestra en la figura 29.

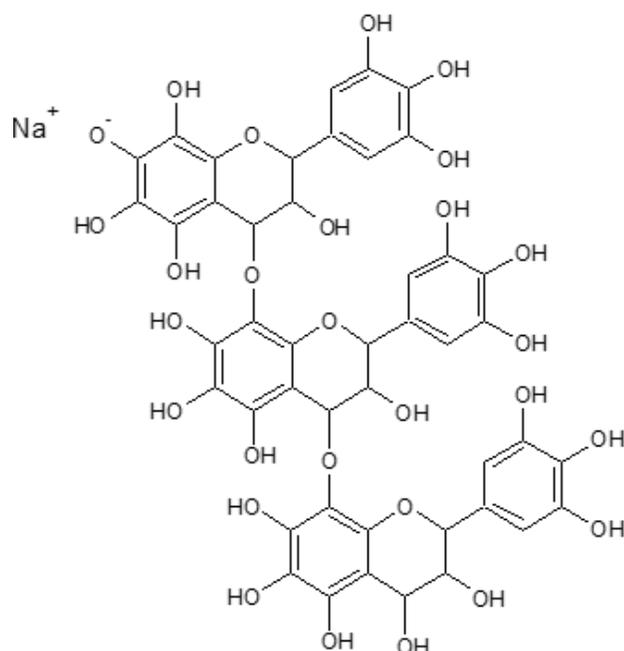


Figura 29 Estructura propuesta para E3III a partir de espectroscopia de masas, infrarrojo y RMN H-1

5.7 Actividad vasorrelajante del compuesto E3III

Una vez caracterizado el compuesto e identificado como el compuesto activo de mayor actividad vasorrelajante aislado a partir del extracto *AnOc* se procedió a realizar en los anillos de aorta de rata los ensayos respectivos que permitan determinar un posible mecanismo de acción de su efecto vasodilatador.

Para esto se empezó por la determinación de la CE_{50} de E3III. Este se realizó a partir de la curva concentración-respuesta de E3III presentada en la figura 26. el valor de la CE_{50} fue de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un intervalo de confianza del 95% de encontrándose en un rango efectivo de 8,9-17,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para fines de cálculo práctico y llevar a cabo los próximos ensayos se escogió como CE_{50} el valor de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la cual se encuentra dentro del intervalo y es cercano al calculado por regresión no lineal, ajustado a los valores más cercanos a la curva. El valor de CE_{50} calculado con el peso molecular determinado para el compuesto es de 10 μM Por otro lado, se calculó la respuesta máxima vasorrelajante alcanzada por el compuesto, $E_{\text{MAX}} = 82,01\%$.

La respuesta vasorrelajante de E3III evaluada en anillos precontraídos con FE (3×10^{-7} M), y con KCl(0,05M) se observa en la fig 30. En donde los anillos precontraídos con KCL, EIII no tuvo un efecto vasorrelajante, arrojando un valor de $-0.8 \pm 2,6\%$, entendiendo que valores negativos se traducen como contracción o como un aumento en la tensión del anillo en vez de relajación. Mientras que en los anillos que fueron precontraídos con FE, E3III mostró respuesta vasorrelajante con una media de $78,6 \pm 12,7 \%$.

El siguiente ensayo realizado fue la evaluación de la competitividad de E3III frente al agonista del adrenergico receptor α_1 , Fenilefrina (FE). E3III incubado a su concentración EC_{50} frente a una curva concentración-respuesta de FE. Se encontró que E3III desplaza hacia la derecha la curva dosis-respuesta de fenilefrina sin alcanzar la respuesta máxima. La contracción máxima alcanzada por FE con E3III incubado a su CE_{50} fue de $66,8 \pm 8.0\%$ equivalente a una disminución del 33% de la contracción máxima alcanzada por la curva control de FE. (Fig. 31) Estos resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa con un $p= 0,038$. La afinidad antagonista estimada para E3III en la aorta de rata fue de $pA_2 = 2,7$ y la pendiente del diagrama de regresión de Schild fue de 2.5.

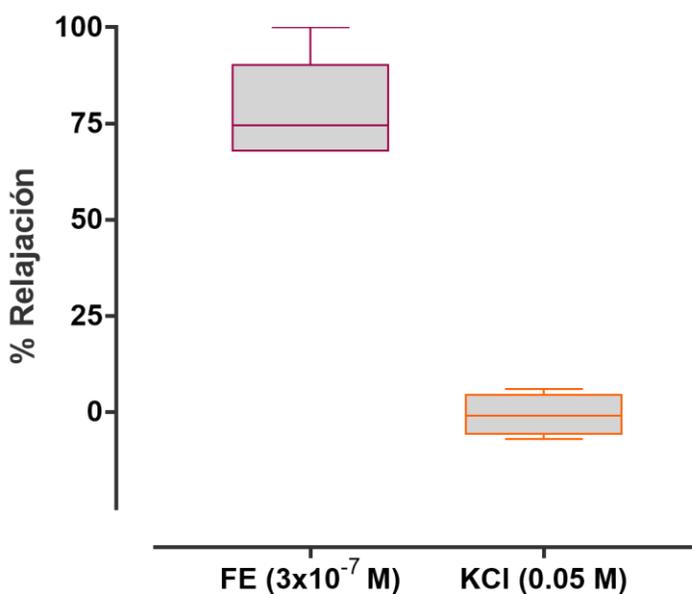


Figura 30 Efecto vasorrelajante de la CE_{50} E3III ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE (3×10^{-7} M) y KCl (0.05 M).

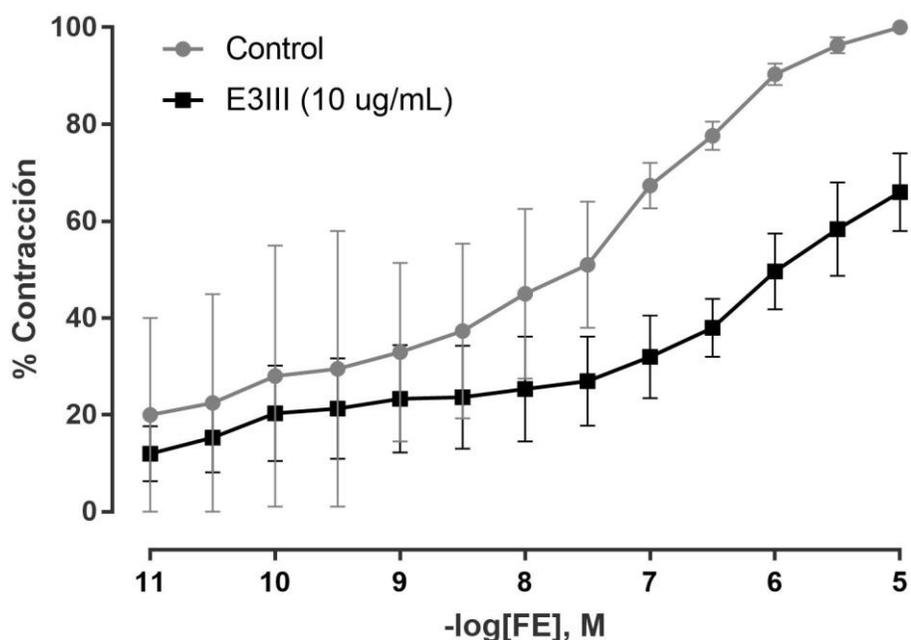


Figura 31 Curva concentración-respuesta para fenilefrina ($10^{-11} - 10^{-5} M$) en anillos aórticos E+ y en presencia del compuesto E3III incubado a su CE_{50} (10 µg/mL). Cada punto representa el Promedio \pm SEM.

Se procedió a evaluar la dependencia de endotelio en el efecto vasorrelajante de E3III, mediante una regresión lineal, en donde se pareo el porcentaje de relajación obtenido por Carbacol ($1 \times 10^{-5} M$) en un anillo precontraído con FE ($3 \times 10^{-7} M$) y posteriormente en el mismo anillo, el porcentaje de relajación obtenido por E3III al ser precontraído con FE a la misma concentración. Se encontró que la dependencia es lineal, y que la relajación es dependiente del endotelio. (Fig. 32)

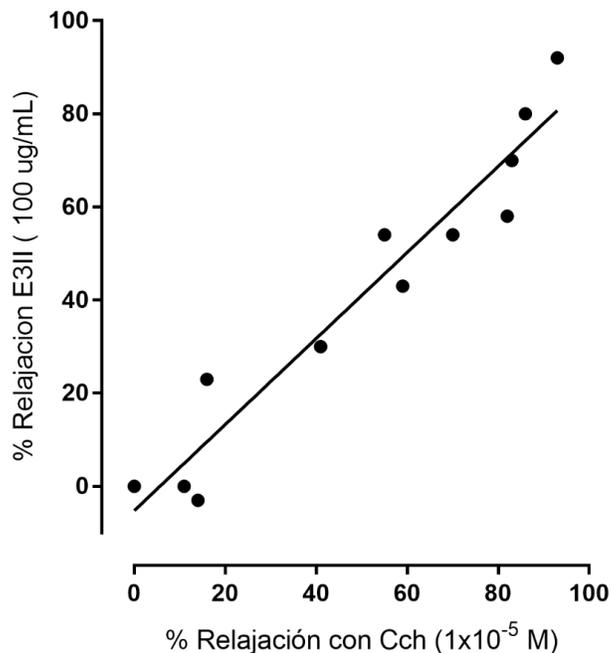


Figura 32 Regresión lineal de la dependencia del endotelio en la relajación de E3III. Se muestra el % de relajación alcanzado por E3III (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en anillos precontraídos con fenilefrina (3×10^{-7} M) vs. El % de relajación alcanzado en el mismo anillo con Carbacol (1×10^{-5} M).

5.8 Mecanismo de acción de la vasorelajación inducida por E3III

5.8.1 Participación de los factores derivados de endotelio

Dado que el efecto vasorrelajante de E3III es endotelio dependiente se evaluó los EDRF como NO y PGI₂.

Como observamos antes en anillos con endotelio E3III alcanza un $70.8 \pm 5,1\%$ de relajación, mientras que en anillos sin endotelio se pierde el efecto vasorrelajante a casi el 100%, dado que solo presenta un $1.6 \pm 0,6\%$ de relajación, una respuesta similar se encontró al inhibir la producción de NO, los anillos incubados con L-NAME mostraron una disminución en la respuesta vasorrelajante, alcanzando un $4\% \pm 3$ de relajación. Por otro lado, la respuesta de los anillos inhibidos con indometacina fue más variable, pero también disminuyó la respuesta vasorrelajante a un $35 \pm 15,87\%$. Estos valores fueron estadísticamente significativos con un $P = 0,0007$.

Por otro lado, al evaluar la respuesta de E3III en presencia NPS, donador de NO (Fig. 34) no se encontraron diferencias significativas ($p=0,8$) entre la curva control y la curva con E3III a la CE_{50}

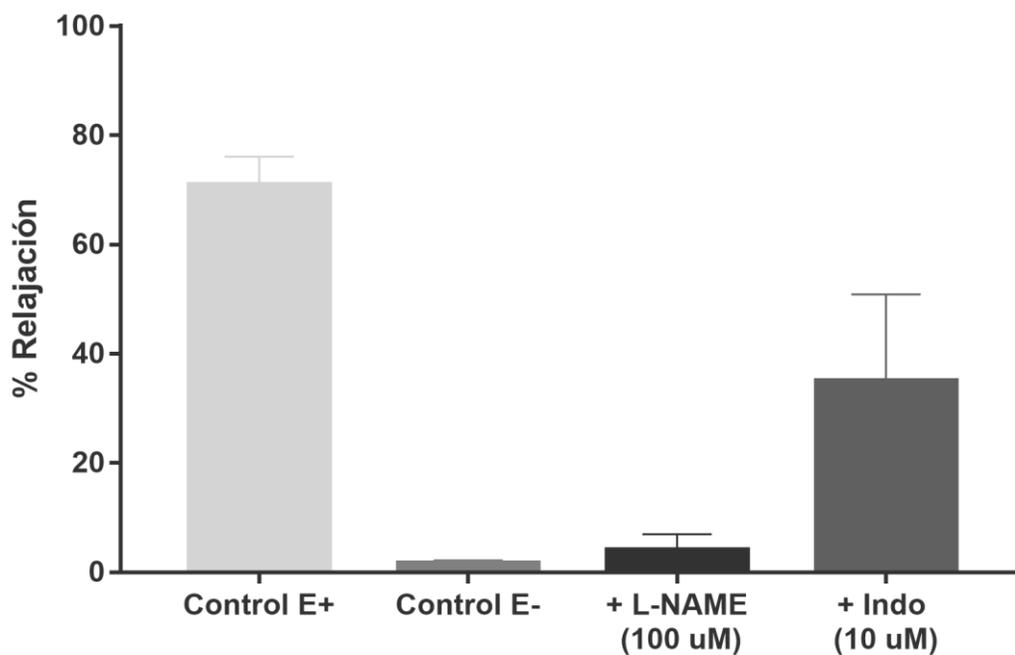


Figura 33 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) frente al inhibidor de NO, L-NAME ($100 \mu\text{M}$) y el inhibidor de las PGI_2 , Indometacina ($10 \mu\text{M}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$). Cada barra representa el promedio \pm SEM.

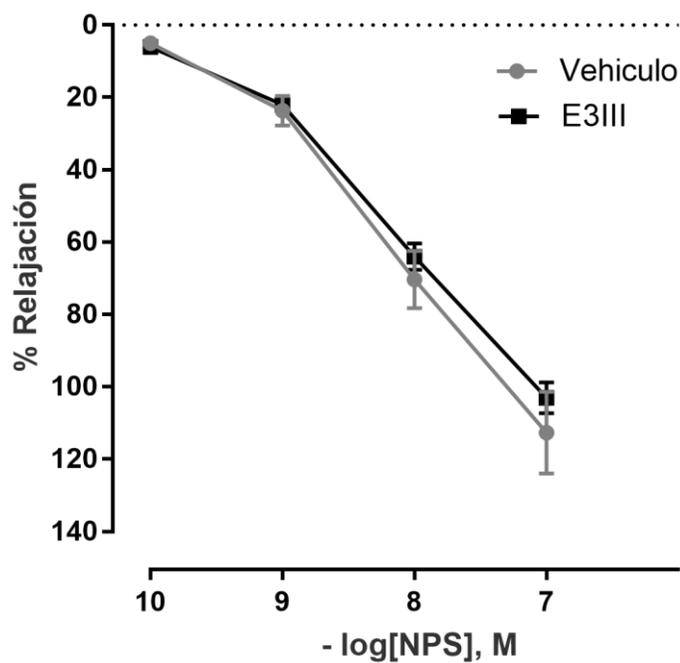


Figura 34 Curva Concentración respuesta de NPS ($10^{-10} - 10^{-7}$) previamente incubado con E3III EC_{50} ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$). Cada punto representa el Promedio \pm SEM.

5.8.2 Participación del GMPc como segundo mensajero

Para evaluar la participación del GMPc los anillos fueron incubados con el inhibidor del guanilato ciclasa, Azul de metileno. Se encontró (Fig. 35) que la respuesta vasorrelajante de E3III frente a los anillos inhibidos se perdió casi a totalidad, los anillos alcanzaron un $4,5 \pm 1,7$ % de relajación, una disminución casi del 100% frente a los anillos no inhibidos control ($70,8 \pm 5,2\%$).

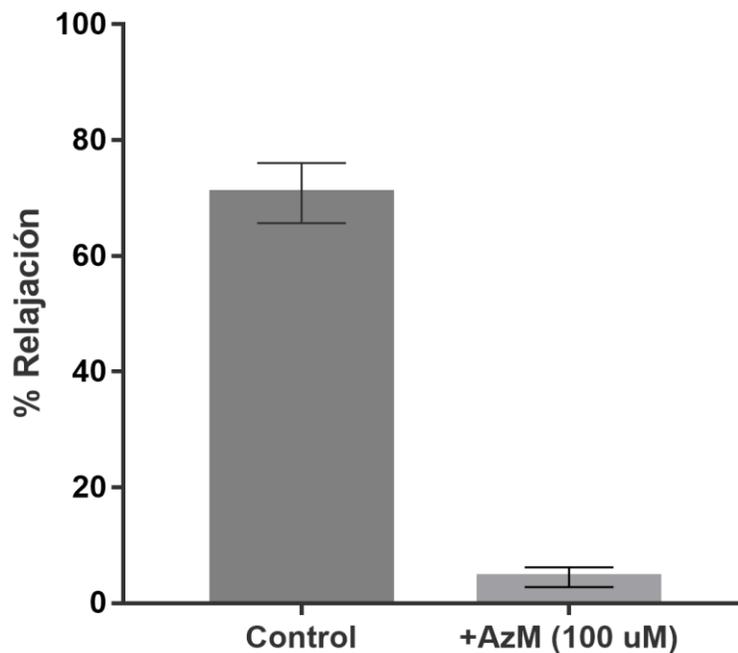


Figura 35 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) frente al inhibidor del guanilato ciclasa, Azul de metileno ($100 \mu\text{M}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE (3×10^{-7} M) Cada barra representa el promedio \pm SEM.

5.8.3 Participación de los receptores muscarínicos, β -adrenérgicos y purinérgico

En la figura 36 se muestran los resultados encontrados para la evaluación de los receptores β -adrenérgicos, muscarínicos y purinérgicos. Los anillos que fueron incubados con propanolol para la inhibición de los β -adrenorreceptores presentaron un $12,5 \pm 7,5$ % de relajación frente al antagonista Isoproterenol (1×10^{-7} M) (Control+ Propanolol) y tuvo una respuesta de relajación al agregar el CE_{50} de E3III de $57,5 \pm 1,5\%$ solo un 13,3% menos de la encontrada en los anillos control no inhibidos estos datos no mostraron una diferencia estadística

significativa ($p=0,1$). Los anillos de aorta que fueron incubados con atropina para la inhibición de los receptores muscarínicos presentaron $4,3 \pm 3,3\%$ de relajación al antagonista Carbacol ($1 \times 10^{-5} M$) (Control+ Atropina) por lo que la inhibición de estos receptores fue casi total. Al agregar el CE_{50} de E3III se encontró una disminución en la respuesta vasorrelajante del $33,2\%$ alcanzando una respuesta de $37.7 \pm 15,9\%$ con respecto a los anillos control no inhibidos ($70,8\%$). Sin embargo, las medias entre los anillos control y los inhibidos con atropina no mostraron una diferencia estadística significativa ($p=0,09$)

Los anillos que fueron incubados con Suramina para la inhibición de los receptores purinérgicos presentaron una relajación de $46,5 \pm 7,5\%$ un 24% menos que los anillos control no inhibidos. A estos anillos no se les realizó un control de inhibición. Sin embargo, la respuesta en los anillos control y los anillos inhibidos con Suramina mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,04$)

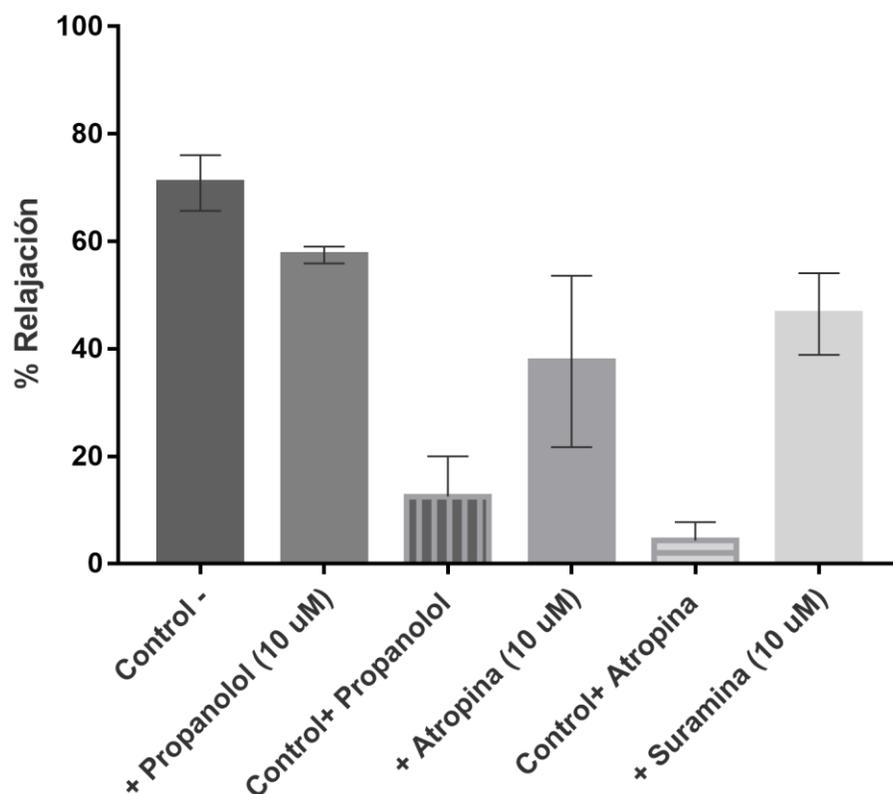


Figura 36 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} ($10 \mu g/mL$) frente a los inhibidores de receptores Muscarínicos (Atropina, $10 \mu M$), β -adrenérgicos (Propanolol, $10 \mu M$) y Purinérgicos (Suramina, $10 \mu M$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE ($3 \times 10^{-7} M$). Cada barra representa el promedio \pm SEM.

5.8.4 Participación de los canales de potasio (K^+_v , K^+_{ATP} , K_{Ca+2})

Al evaluar E3III en anillo de aorta E+ con canales de potasio dependientes de voltaje (K^+_v) inhibidos por 4-Aminopiridina (4-AP) se encontró una relajación de $25,7 \pm 6,4$ % un valor que disminuye al 51% al encontrado en anillos aórticos no inhibidos (control) mientras que al evaluar E3III en anillos de aorta incubados con glibenclamida (inhibidor de canales de potasio dependientes de ATP) estos conservaban su actividad vasorrelajante casi en la misma proporción que los anillos aórticos no inhibidos ya que se encontró una relajación de $72,5 \pm 14,5$ % (Fig. 37)

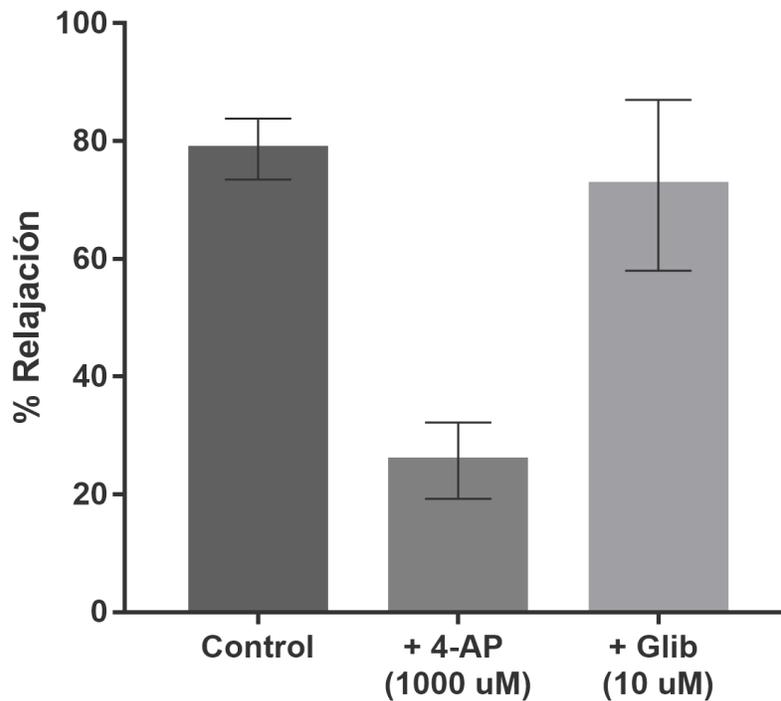


Figura 37 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) frente a los inhibidores de canales de potasio, K^+_v (4-Aminopiridina $1000 \mu\text{M}$) y, K^+_{ATP} (Glibenclamida, $10 \mu\text{M}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$)
Cada barra representa el promedio \pm SEM.

Por otro lado, al evaluar la inhibición de los canales de potasio dependientes de calcio (Fig. 38) cuando los anillos aórticos son incubados con TEA en una concentración baja de 1mM la relajación alcanzada es de $37,2 \pm$

9,1% y en anillos con esta misma concentración, pero inhibidos también por L-NAME (10 μ M) se pierde totalmente el efecto vasorrelajante y se presentan valores negativos de relajación (aumentos en la tensión, contracción) $-4,3 \pm 2,9\%$

En los anillos donde TEA fue incubado con una concentración mayor (10 mM) se vio una pérdida de relajación mayor, alcanzando un $14,25 \pm 12,3\%$ de igual manera al incubarlo con L-NAME (10 μ M) los anillos presentan una relajación casi nula de $4 \pm 5,7 \%$ (Fig. 38)

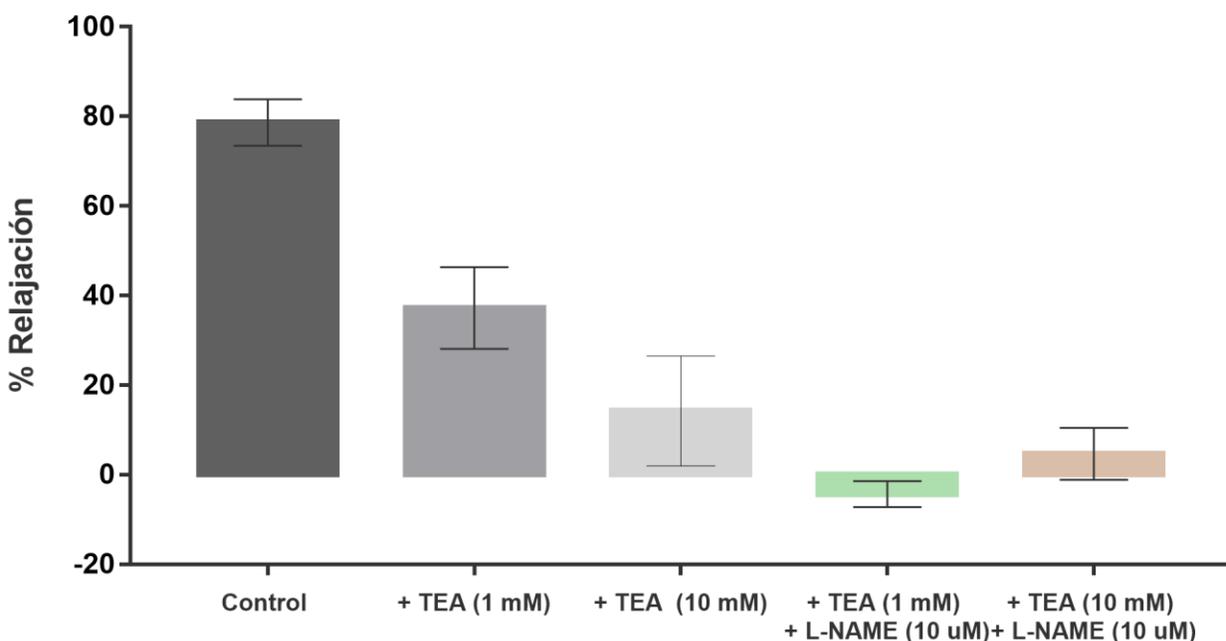


Figura 38 Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} (10 μ g/mL) frente al inhibidor de canales de potasio, K^+_{Ca+2} . Tetraetilamonio a 10 mM, y Tetraetilamonio a 1 mM, en anillos aórticos E+ precontraídos con FE (3×10^{-7} M) Cada barra representa el promedio \pm SEM.

5.8.5 Participación de Canales de calcio tipo L y Receptores rianodina

El efecto vasorrelajante de E3III en anillos incubados con Nifedipina, inhibidor de los canales de calcio tipo L del retículo endoplasmático, no se ve afectado, ya que presentó un $91,25 \pm 5,9 \%$ de relajación mientras que los

anillos incubados con Tetracaina, inhibidor de los receptores rianodina, presentaron una relajación de $22 \pm 14,3\%$ es decir una pérdida de casi el 70% de relajación encontrada en los anillos control no inhibidos. (Fig. 39)

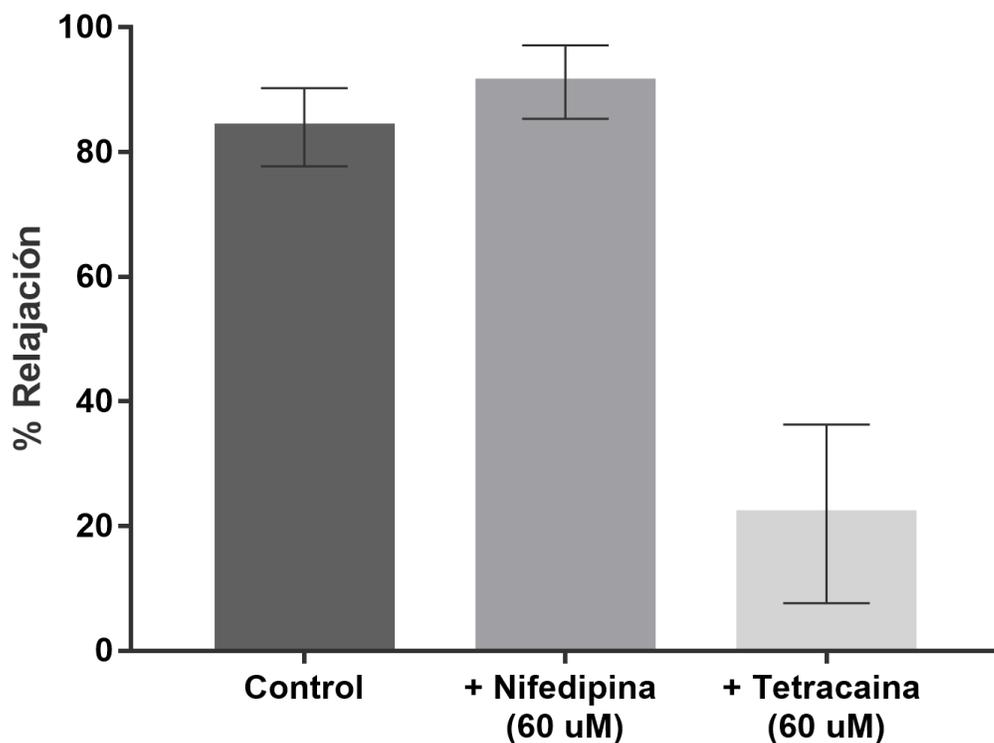


Figura 39. Efecto vasorrelajante de E3III EC_{50} ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) frente al inhibidor de los canales de calcio tipo L, Nifedipina ($60 \mu\text{M}$) y receptores rianodina, Tetracaina ($60 \mu\text{M}$) en anillos aórticos E+ precontraídos con FE ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) Cada barra representa el promedio \pm SEM.

6. DISCUSIÓN

Efecto vasorrelajante endotelio dependiente del extracto, fracciones E2 Y E3 de *A. occidentale*

Los resultados de este estudio demuestran que efectivamente la corteza de *Anacardium occidentale* posee efecto vasorrelajante en las aortas de rata. La evaluación del efecto del extracto a partir de la corteza de *A. occidentale* fue basado en los resultados de su actividad vasorrelajante obtenidos por Runnie (2004). El extracto evaluado alcanzo un 50% de relajación en anillos con endotelio, demostrando la capacidad vasodilatadora en función a la concentración aplicada a los anillos de aorta precontraídos con FE extraídos de las ratas normotensas. Al demostrar este porcentaje de relajación fue de interés continuar con el ensayo biodirigido para localizar el compuesto con dicha actividad e indagar en su posible mecanismo de acción.

Estudios previos han demostrado que muchas de las plantas con efecto vasorrelajante poseen una actividad similar a la ACh y que la remoción del endotelio inhibe el efecto vasorrelajante (Fitzpatrick y col. 1995) como ha sido observado en este estudio. Las fracciones E2 y E3 resultantes del fraccionamiento por solubilidad del extracto demostraron tener un efecto vasorrelajante dependiente de endotelio, la remoción del endotelio causaba más del 80% de perdida de la actividad vasorrelajante en ambas preparaciones de anillos.

Fracción E2. Flavonoides, efecto vasorrelajante y vasoconstrictor dependiente de endotelio.

Es conocido que los flavonoides que bajo luz UV muestran una coloración entre amarilla y verde pertenecen a los 4- hidroxí flavonoles. También esta reportado que usar como fase móvil ácido fórmico- ácido acético- agua proporciona un buen rango de movilidad y separación de las flavonas y los flavonoles glicosilados, donde generalmente el RF incrementa proporcionalmente con el grado de glicosilación de estos. Por lo que las 4 bandas presentes pueden pertenecer a 4 o más flavonoides pertenecientes al grupo de Flavonoles (3-OH) con diferente grado de glicosilación (Bloor, 2001)

La disminución de la vasorelajación y el aumento en la tensión del anillo luego de determinada concentración de esta fracción E2 puede ser explicado por la presencia de 4 o más flavonoides en la fracción donde cada uno puede contener un efecto vasorrelajante independiente o sinérgico correspondiente a lo que se observó y otros

flavonoides pueden tener un efecto vasoconstrictor que a altas concentraciones evoquen una respuesta contráctil en los anillos e inhiban la conseguida por los compuestos que presentan el efecto vasorrelajante. Estudios previos han revelado la presencia de compuestos contráctiles en extractos de plantas, que actúan a nivel de membrana incrementando la entrada de calcio y actuando en los depósitos internos de calcio como el retículo sarcoplasmático (García y col. 1997) pero de ser de esta manera se hubiera observado también una respuesta contráctil en los anillos sin endotelio, pero los anillos sin endotelio tuvieron un comportamiento similar a los anillos control.

Otros estudios reportan la presencia de agentes vasoconstrictores relacionados con flavonoides y tiramina encontrados en extractos de plantas que inducen un incremento en la tensión en anillos con endotelio, mencionan la capacidad de que estos compuestos activos inducen la liberación de sustancias vasoconstrictoras liberadas por el endotelio. (Rodríguez-Cruz y col. 2003).

Fracción E3. Taninos, la fracción con mayor efecto vasorrelajante dependiente de endotelio.

La fracción E3, formada por compuestos de mayor polaridad, con coloración marrón no fluorescente indica que esta fracción está mayoritariamente compuesta por taninos (Marcano y Hasegawa, 2002). En cuanto a los ensayos, la fracción E3 presentó la mayor respuesta vasorrelajante de las dos fracciones siendo esta concentración-dependiente, y dependiente de endotelio. En este punto del ensayo biodirigido se determina que la participación del endotelio es necesaria en el efecto del compuesto activo vasorrelajante.

En estudios anteriores se ha encontrado que los taninos condensados en forma monoméricas producen vasorelajación dependiente de endotelio y que también fracciones enriquecidas con formas diméricas, tri y tetraméricas contienen componentes activos vasorrelajante dependiente de endotelio (Andriambeloson y col. 1998) al igual que taninos oligómeros condensados extraídos de semillas de uva (Freslon y col. 1997) Por otro lado las fracciones que contenían formas de mayor peso molecular de taninos poliméricos condensados perdían su efecto vasorrelajante dependiente de endotelio (Andriambeloson y col. 1998), estos resultados sugerían que el tamaño de los taninos condensados puede jugar un papel clave en las propiedades vasorrelajante. Las actividades

farmacológicas diferenciales de los taninos condensados pueden deberse a la diferencia en la composición química de estos compuestos.

Subfraccionamiento de E3: Efecto vasorrelajante de E3I, E3II y E3III

En fases móviles moderadamente polares como metanol: agua la separación se basa en la relación entre los enlaces de hidrogeno carboxílicos y fenólicos y los enlaces de hidrogeno aceptores en el gel, es por esto que la absorción relativa depende del número de hidrógenos fenólicos por molécula en donde compuestos como los polifenoles poliméricos como taninos condensados son más fuertemente adsorbidos que los fenoles monoméricos. (Singleton, 1988). Esto nos indica que la fracción E3I obtenida con metanol está compuesta por compuestos fenólicos monoméricos de bajo peso molecular y según lo también encontrado en el cromatograma (Fig. 24 y 25) compuestos de baja polaridad.

Se ha reportado con anterioridad que en fracciones metanólicas no se encuentran fenoles poliméricos. Estos son eluidos de la Sephadex LH-20 cuando se usa un solvente como acetona. El oxígeno carbonilo de la acetona sirve como un fuerte aceptor de enlaces de hidrogeno y permite el desplazamiento de los fenoles poliméricos unidos al gel de Sephadex LH-20 (Kantz y Singleton, 1990). Como resultado de esto la subfracción E3III eluida con acetona y lo encontrado en el cromatograma (Fig. 24 y 25) E3III se describe como un tanino por la coloración resultante, como un compuesto fenólico polimérico con alta polaridad por elusión de la columna con acetona. Por otra parte, la subfracción E3II puede estar compuesta por compuestos fenólicos monoméricos de menor tamaño y mayor polaridad que los eluidos en la fracción E3I.

Hasta este punto podemos decir que el efecto vasorrelajante de *AnOc* se debe a la participación de más de un compuesto, no obstante, dado que la subfracción de acetona E3III fue la más potente, se seleccionó para continuar el estudio farmacológico y así determinar su posible mecanismo de acción.

E3III: Efecto vasorrelajante de un tanino condensado

La caracterización del compuesto E3III permitió identificarlo como un tanino condensado, flavonoides poliméricos de alto peso molecular. La estructura mostrada (Fig. 29) es similar a la estructura de las

proantocianidinas que forman parte de este grupo de taninos condensados. A pesar de su complejidad estructural su extracción con agua es factible ya que son compuestos altamente oxigenados. En el té extraído de *Camellia sirtensis* y otras especies del mismo género contienen cantidades variables de L-epicatequina, D,L-catequina y D,L-galocatequina (Fig.40) (Marcano y Hasegawa, 2002). Las proantocianidinas que están formadas por la condensación de unidades monoméricas de galocatequina y epigalocatequina son conocidas como *prodelfinidinas* (Fig. 41) (Marcano y Hasegawa, 2002) coincidente con la estructura mostrada por E3III en su forma dimerica cuando es disociada una de las unidades.

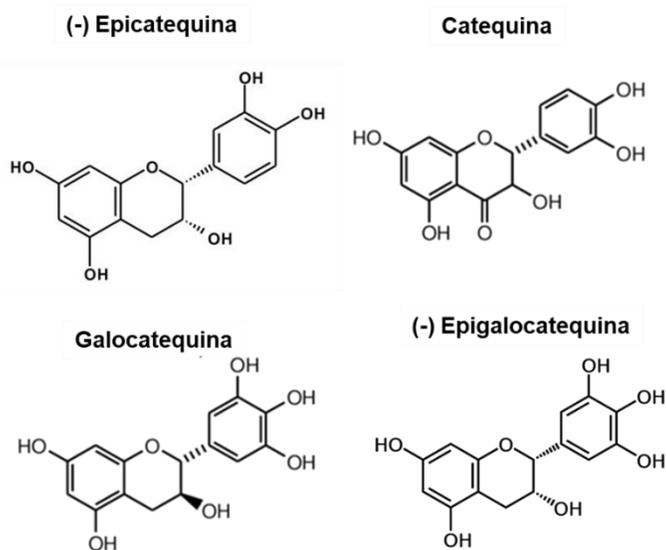


Figura 40. Estructuras de los taninos condensables: Epicatequina, catequina, Galocatequina y epigalocatequina

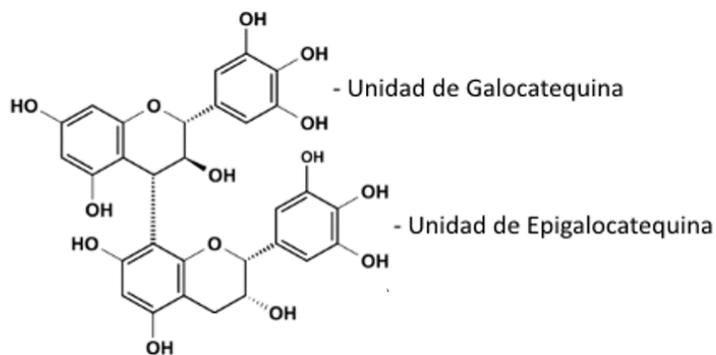


Figura 41. Estructura de las proantocianidinas tipo prodelfinidinas

Estos compuestos han sido estudiados en múltiples ocasiones y han demostrado tener un efecto vasorrelajante, varios mecanismos de acción han sido propuestos para explicar su actividad vasodilatadora. En 1999 Huang y col. Estudiaron la epicatequina en arterias mesentéricas y encontraron que induce una relajación endotelio-dependiente y esta es mediada principalmente vía óxido nítrico, que estaba involucrando la activación de los canales de K⁺. Adicionalmente encontraron una conexión entre el aumento de los niveles de Ca⁺² intracelular y la respuesta vasorrelajante de epicatequina. También fue probada en aorta de ratas y demostró un efecto vasorrelajante EC₅₀ 4.7 μM dependiente de endotelio con un mecanismo de acción enfocado a la vía NO/GMPc (Aggio y col. 2013).

Por otro lado, se ha reportado que la epigallocatequina galate aumenta la producción de prostaciclina en el endotelio de aortas bovinas, específicamente de PGI₂ y PGI₃ (Mizugaki y col. 2000).

Acercándonos a los compuestos con más parecido a la estructura encontrada para E3III Cortes y col (2001) reportaron que para una fracción con alto contenido de proantocianidinas extraída de *Ouratea semitarra* se encontró un efecto vasorrelajante endotelio dependiente con un EC₅₀= 30μg /mL, valor comparable al encontrado en este estudio por el tanino condensado E3III demostrando este tener una mayor potencia. Cortes y col (2001) de manera similar determinaron que la respuesta vasorrelajante encontrada era dependiente de NO, que el efecto no era inhibido por indometacina (inhibidor de COx) ni por el antagonista muscarínico atropina, por lo que las prostaciclina ni los receptores muscarínicos tenían una participación en este mecanismo vasorrelajante.

Respuesta vasorrelajante de E3III frente a diferentes agonistas

Las contracciones evocadas con KCl nos pueden indicar si el compuesto tiene propiedades bloqueantes de los canales de Ca⁺² (Topouzis y col. 1989). En el músculo liso altas concentraciones de potasio extracelular producen contracciones tónicas sostenidas por despolarización de la membrana celular, esto incrementa el flujo de calcio a través de los canales de Ca⁺² voltaje-dependiente tipo L, lo cual a su vez activa la liberación de calcio a partir del retículo sarcoplásmico. (Orallo,1996). Por otro lado las contracciones con FE se producen por la activación de los adrenergicos α. Esta contracción puede verse en dos componentes, una contracción fásica que ocurre de

forma rápida y transitoria producida por la liberación de Ca^{+2} mediada por la activación de receptores específicos de IP_3 y un segundo componente referente a una contracción tónica que se debe a la entrada de Ca^{+2} a través de canales mediados por receptor y otros mecanismos (Serafim y Moura, 2001).

Como se observó la acción vasorrelajante es mayor cuando la contracción es producida por FE que cuando los anillos son precontraídos con KCl donde no se observa ningún efecto vasorrelajante, esta respuesta sugiere que el efecto vasorrelajante de E3III puede estar más vinculado a la movilización de calcio intracelular estimulada de manera indirecta por diferentes mecanismos, que sobre los canales de calcio voltaje dependientes.

Antagonismo no competitivo en los adrenorreceptores α

Después de probar la capacidad relajante de E3III en los anillos pre contraídos con FE, tratamos de probar si este inhibía la contracción inducida por concentraciones acumulativas de FE. E3III ocasiono una disminución de la tensión máxima con FE y se observó un desplazamiento a la derecha de la curva, lo que sugiere que E3II tiene un efecto de tipo antagonista no competitivo de receptores α dado que para conseguir una respuesta equivalente (típicamente el 50% del efecto máximo) son necesarias concentraciones de agonista tanto mayores cuanto mayor es la concentración de antagonista presente. Como este comportamiento se ha mostrado en otros estudios de evaluación de extracto de otras especies (Ramírez, 2007). El valor de pA_2 está dado para antagonista frente a un receptor específico, el experimento que se llevó a cabo no contempla una diferencia entre los subtipos de receptores α_1 antagonizados por E3III. El valor encontrado al ser no competitivo no pudo ser comparable a valores de pA_2 previos publicados para otros antagonistas de adrenorreceptores α_1 (Hussain Y Marshall, 1997).

Por otro lado, el valor de la pendiente del diagrama de Schild encontrado sugiere antagonismo no competitivo. El antagonista puede activar otros receptores a una alta concentración que produce una respuesta fisiológica antagonista a la respuesta del agonista (Kenakin, 1981).

Como la vasorelajación es dependiente de endotelio, hay un tipo de adrenorreceptores que podrían estar interviniendo en esta respuesta, los α_2 adrenorreceptores que se encuentran en el endotelio vascular. Evidencia funcional sugieren que estos receptores tienen un papel importante en la fisiología vascular en arterias coronarias,

renales, y arterias mesentéricas. En 1986 Angus y Cocks, demostraron que en arterias coronarias la noradrenalina causaba relajación inhibida por antagonistas selectivos del adrenorreceptor α_2 y que esta era eliminada mediante la eliminación del endotelio. Luego con el descubrimiento de EDRF y de la participación del NO se demostró que la activación de los adrenorreceptores α_2 en células endoteliales estimulan la liberación de NO, atenuando la vasoconstricción producida por la activación de los adrenorreceptores α_1 vasculares posjuncionales (Vanhoutte y Miller 1989; Serafim y Moura, 2001). Esta respuesta es lo que probablemente esté sucediendo con E3III, siendo este capaz de activar los adrenorreceptores α_2 presentes en el endotelio vascular por lo que el efecto vasoconstrictor de los agonistas del adrenorreceptor α_1 puede ser modulado por factores relajantes derivados del endotelio (EDRF) como NO y PGI₂ (Godfraind, 1985)

Respuesta vasorrelajante endotelio dependiente de E3III.

Como hemos discutido el endotelio juega un papel muy importante en la modulación del tono vascular del músculo liso y la regulación de la presión sanguínea a través de la liberación de una variedad de factores vaso activos (EDRF) como lo es el óxido nítrico (NO) los metabolitos de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico como las prostaciclina (PGI₂) y las prostaglandinas (PGs) y también el factor hiperpolarizante derivado de endotelio EDHF. (Brown y Hu. 2001; Stankevicius y col. 2003).

La ACh estimula el receptor muscarínico que aumenta el Ca⁺² intracelular en las células endoteliales y esto conduce a la síntesis y liberación de NO, el NO se difunde de forma adyacente a las células del músculo liso y activa la producción de GMPc para causar la relajación de las células del músculo liso vascular (Ajay y col. 2003). Estudios previos han demostrado que la remoción del endotelio puede inhibir el efecto vasorrelajante producido por ACh o CCh (Wu y col. 1993) este resultado también es observado en el estudio de diversos extractos metanólicos de plantas tropicales donde la pérdida de endotelio refleja una pérdida de vasorelajación de estos extractos de más del 75% (Runnie, 2004). Coincidente en lo encontrado en este estudio, la relajación conseguida con CCh es linealmente dependiente de la vasorelajación conseguida por E3III por lo que la remoción total del endotelio da

inhibe la relajación tanto para CCh como para E3III, es por ello que este estudio se rigió por la regla que una respuesta de relajación por CCh menor al 10% de relajación eran considerados anillos sin endotelio, mientras que anillos que respondieran con más del 70% de relajación eran considerados anillos con endotelio funcional. Por lo tanto, las respuestas encontradas por E3III serían congruentes con la funcionalidad del endotelio. De manera similar este ensayo es llevado a cabo anteriormente para extracto de *AnOc* (Da costa y col. 2017).

Participación de los EDRF, Óxido nítrico y Prostaciclina

En cuanto a la producción de NO los resultados demuestran que la inhibición de la producción de NO inhibe completamente la capacidad vasorrelajante de E3III. Trabajos anteriores muestran el mismo resultado, donde extractos de *AnOc* son probados bajo inhibidores de eNOS y la vasorelajación es nula (Da costa y col. 2017) o parcialmente atenuada con una actividad residual de 20% por lo que la llaman parcialmente dependiente de endotelio, y sugieren la participación de otros factores no mediados por NO (Runnie 2004)

Por otro lado, PGI₂ es un vasodilatador derivado de endotelio que estimula los receptores PGI₂ activando el adenilato ciclasa, e induciendo un aumento en la concentración de AMPc intracelular, produciendo la relajación del músculo liso (Moncada, 1998). Al inhibir la producción de estos prostanoideos vasodilatadores se redujo significativamente la respuesta vasorrelajante de E3III. Estos resultados fueron coincidentes con estudios anteriores de la evaluación del extracto de *AnOc* frente a este inhibidor en donde la respuesta vasorrelajante disminuye más de un 70% (Da Costa y col. 2017; Runnie 2004) Estos resultados sugieren que los metabolitos de la ciclooxigenasa están involucrados en el efecto provocado por E3III y que probablemente sea PGI₂. Da costa y col. (2017) consideran que PGE₂ desempeñan un papel importante en la vasorelajación, dado que existen ensayos preclínicos con efectos de que *A. occidentale* modula la respuesta inflamatoria por reducción de PGE₂ (Da silva y col. 2018) Inducen que el extracto es capaz de reducir los niveles de PGE₂ y con ello una disminución de la respuesta presora. Sin embargo, esto es necesario más estudios farmacológicos que incluyan la participación directa de PGE₂.

El SNP se descompone espontáneamente para producir óxido nítrico, lo que causa vasodilatación independiente del endotelio por el mismo mecanismo efector que el óxido nítrico liberado del endotelio. Sin embargo, E3III no tiene un efecto sobre la relajación independiente del endotelio por SNP. Esto podría deberse a que E3III actúa por mecanismos similares a los observados con sus efectos vasodilatadores dependientes de endotelio, mejorando la actividad vía NO derivado de endotelio y GMPc-relajante. (Loscher, 1991).

Vasorelajación inducida vía NO/GMPc

Se ha sugerido que la relajación inducida por los nitrovasodilatadores y EDRF pueden ser mediados a través de un mecanismo común en el musculo liso, la formación de GMPc. (Rapoport y Murad, 1983).

Las células endoteliales contienen guanilato ciclasa soluble que forma GMPc. Un número de estímulos que causan la liberación del EDRF NO, como nitrovasodilatadores o el NO exógeno aumentan la acumulación de GMPc en las células endoteliales. Se ha reportado que en los vasos sanguíneos con endotelio la relajación inducida por ACh e histamina se asocian con un aumento en la concentración intracelular en el musculo liso de GMPc y que este precede a la relajación vascular. (Loscher 1991). Se han propuestos varios mecanismos para explicar la relajación vascular inducida por GMPc, como la disminución de calcio intracelular, efectos inhibitorios en el metabolismo de fosfoinositol y proteínas quinasas. Principalmente GMPc mediante la activación de una proteína quinasa, estimula la salida de Ca^{+2} 3', 5'-adenosina- monofosfato dependiente a raves del sarcolema del musculo liso vascular. (Popescu y col. 1985)

En el mecanismo de vasorelajación inducido por E3III se confirmo la vía de relajación NO/GMPc dado que al inhibir la actividad de la guanilato ciclasa soluble, no se observó la vasorelajación inducida por E3III. Es reportado con anterioridad que el azul de metileno, previene la formación de GMPc y revierte la relajación endotelio dependiente con ACh. (Loscher 1991).

Participación de los receptores β -Adrenérgico Muscarínico y Purinérgicos

Para determinar la participación de los distintos receptores acoplados a proteína G en el efecto vasorrelajante de E3III se siguió el protocolo anteriormente explicado que fue usado en Estrada y col (2011).

Estudios recientes sugieren que la estimulación de β -adrenorreceptores está directamente relacionada con la producción de NO, esto ha sido particularmente demostrado en células endoteliales vasculares como las plaquetas (Queen y Ferro, 2006) Los datos indicados en este trabajo indican que el efecto vasorrelajante de E3III no depende en gran parte de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos.

Otro de los importantes receptores evaluados, sería el muscarínico M₃ ubicado en el endotelio vascular. La participación de estos receptores ha mostrado ser relevante, ya que resulta en un incremento de NO que produce la vasodilatación coronaria. (Doods y col. 1989). Como se observa en la fig. 36 la respuesta de relajación de Cch fue completamente bloqueada en los anillos de aorta E+, el bloqueo de los receptores muscarínicos afecto la respuesta vasorrelajante de E3III, atenuándola. Aunque esta diferencia no fue significativa estadísticamente la inhibición puede deberse a que E3III actúa de manera parcial en estos receptores M₃.

En cuando a los receptores purinérgicos, las dos familias de receptores P₂: Acoplados a proteína G (P₂Y) y los acoplados a ATP canales iónicos (P₂X) han sido descritos en tejidos vasculares de diferentes especies (Ralevic y Burnstock, 1998). En endotelios de aortas de rata P₂Y₁ Y P₂Y₂ demostraron mediar la relajación endotelio dependiente (Hansmann y col. 1997) y estar acoplados a la vía NO/GMPc. También se ha reportado que P₂X₄ induce vasodilatación de manera dependiente de NO. En este estudio se sugiere la participación de los receptores P₂Y dado que se ha reportado que Suramina no inhibe a los receptores P₂X₄ (Ralevic and Burnstock 1998)

Una respuesta similar se ha encontrado con el triterpeno ácido pomólico aislado de *L. pittieri* por Estrada y col. (2011) en donde la participación de los receptores P₂Y era evidente y existía una atenuación de la relajación cuando se inhibían los receptores muscarínicos.

Estudios previos también han demostrado que la señal de nucleótidos extracelulares en las células endoteliales actúa vía receptores P₂Y. Estos fosforilan la enzima eNOS por acoplamiento a los receptores P₂Y (Goncalves y col. 2009)

Participación de los Canales de K⁺ y el flujo de Ca⁺² en la respuesta vasorrelajante endotelio-dependiente

Los agonistas acoplados a receptores causan un aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular que sale de las reservas intracelulares (retículo sarcoplásmico) esto conduce a la apertura de canales de K^{+} dependientes de Ca^{+2} ($\text{K}^{+}_{\text{Ca}^{+2}}$) en las células endoteliales. La apertura de $\text{K}^{+}_{\text{Ca}^{+2}}$ aumenta el flujo de salida de K^{+} hiperpolarizando las células endoteliales, esta hiperpolarización proporciona la fuerza motriz para la entrada de Ca^{+2} a las células endoteliales, activando la síntesis y liberación de EDRF como el NO. (Adams y col. 1989)

También se ha sugerido que los vasodilatadores dependientes de endotelio causan este aumento en la liberación de Ca^{+2} mediada por IP_3 desde los depósitos intracelulares, que posteriormente conduce a la apertura de los canales $\text{K}^{+}_{\text{Ca}^{+2}}$. El efecto vasorrelajante dependiente de endotelio de E3III se vio inhibido por el Tetraetilamonio (TEA), un bloqueador del canal K^{+} no selectivo. Este resultado muestra que E3III activa canales de K^{+} sensibles a Tetraetilamonio en células endoteliales lo que presumiblemente conduce a un influjo de Ca^{+2} y a la consecuente activación de eNOS. Para comprobar la participación de estos canales ligada a la producción de NO, los anillos adicionalmente al ser inhibidos con TEA posteriormente fueron incubados con L-NAME, inhibidor de la eNOS. La respuesta frente a este ensayo fue la pérdida total de vasorelajación inducida por E3III, de manera consecuente se vio un aumento en la tensión en los anillos aórticos.

Por otro lado, están las prostaciclina producidas por la vía de la COx, estas pueden relajar el musculo liso vascular mediante la activación de IP_3 lo que lleva a un aumento de la AMPc, estimulando la PKA y activando la Ca^{+2} -ATPasa que es responsable de la captación de Ca^{+2} desde el medio intracelular hasta el retículo sarcoplásmico (Smith, 1986).

El AMPc también induce la activación de los canales K^{+} dependientes de ATP ($\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$) provocando la hiperpolarización de las células esta respuesta es antagonizada por glibenclamida, un bloqueador de los canales $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$. (Ozkor y Quyyumi, 2011).

Al inhibir los anillos de aorta con glibenclamida la respuesta de E3III no perdió su efecto vasorrelajante, por lo que el mecanismo vasorrelajante de E3III no depende de la participación de los canales de $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$.

Un efecto similar fue reportado por Kim y col. (2000) en donde las procianidinas obtenidas a partir de un extracto de *Cratageu* evocaba una vasorelajación endotelio-dependiente vía NO, a través de la activación de canales de K⁺ sensibles a Tetraetilamonio, este efecto vasorrelajante de igual manera no se vio bloqueado por la incubación de glibenclamida, por lo que su mecanismo no involucraba los canales de K⁺_{ATP}

Dalbo y col. (2008) reportan para una fracción rica en proantocianidina obtenida de la corteza de *C. celtidifoliusun* efecto vasorrelajante dependiente de endotelio con un mecanismo de acción que actúa vía NO-GMPc y la hiperpolarización inducida por la activación de los canales K⁺_{Ca²⁺} y que este mecanismo no involucraba los canales de K⁺_{ATP} ni los canales K⁺ voltaje dependiente.

En las células musculares de la arteria lisa a parte de los ya mencionados canales de potasio, se encuentra también el canal de K⁺ dependiente de voltaje (K⁺_v). El bloqueo de estos canales, reduce la despolarización de la membrana de la musculatura lisa, facilitando la entrada de Ca²⁺ y con esto incrementando el tono vascular. (Nelson y Quealey, 1995) En este estudio se encontró que al bloquear estos canales la respuesta vasorrelajante evocada por E3III disminuye en un 51%. Quiere decir que los canales de K⁺_v también tienen un rol importante en el efecto vasorrelajante de E3III.

Se ha reportado que las proantocianidinas tienen un mecanismo de acción vasorrelajante que involucra la apertura de múltiples tipos de canales de potasio como K⁺_v, K⁺_{Ca²⁺} y K_{IR}. Se dice entonces que estos canales causan hiperpolarización en las células del musculo liso vía NO/GMPc (Matsui y col. 2009; Kwan y co. 2005)

Como es conocido las contracciones inducidas por FE en anillos aórtico se da al unirse a sus receptores α adrenérgicos acoplados a la proteína G, la activación estimula la actividad de la fosfolipasa C y produce dos clases de segundos mensajeros el IP₃ y el DAG. (Webb, 2003)

El DAG junto con Ca²⁺ activa la PKC la cual promueve la contracción al fosforilar los canales de Ca²⁺ de tipo L. El efecto final es un cambio en la potencial transmembrana que permite la apertura de estos canales de Ca²⁺ tipo L voltaje dependiente permitiendo la entrada de Ca²⁺ extracelular hacia el citoplasma y desencadenando la

contracción del músculo liso. Soluciones con alto contenido de iones como K^+ producen la contracción del músculo liso por despolarización directa de los canales Ca^{+2} tipo L voltaje dependiente, permitiendo el flujo de entrada de Ca^{+2} sin necesidad de recurrir a segundos mensajeros intracelulares. (Webb, 2003)

En cuanto a la participación de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje tipo L el efecto vasorrelajante de E3III no se ve afectado por inhibición de estos canales, por lo que estos no están involucrados en el mecanismo de acción de E3III al no actuar directamente sobre estos canales de Ca^{+2} tipo L, ni tampoco probablemente este interviniendo en el mecanismo del segundo mensajero DAG. Lo reportado por Kim y col (2000) también indica que el mecanismo de una procianidina con efecto vasorrelajante dependiente de endotelio no involucra los canales de Ca^{+2} sensibles a nifedipina

Por otro lado, durante la liberación de calcio también hay dos receptores que juegan un papel muy importante, el receptor IP_3 y el receptor rianodina. Estos participan tanto en la entrada de calcio del medio extracelular como en la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, pero actúan con diferentes mecanismos. Los receptores IP_3 median la liberación de calcio mediante la activación de estos por IP_3 . Por otro lado, el receptor rianodina amplifica la liberación de calcio en respuesta a una señal de incremento de Ca^{+2} en el retículo sarcoplásmico inducida por la liberación de Ca^{+2} (Calcio saca calcio) (MacMillan y col, 2005). Es conocido que la fosforilación de los receptores IP_3 y receptores rianodina causan la apertura de los canales iónicos y moléculas como NO pueden activar este proceso en la musculatura lisa, la salida de Ca^{+2} del retículo y el posterior aumento de Ca^{+2} intracelular induce la formación del complejo Ca-CAM, pero en células endoteliales un aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular promueve la activación de eNOS y eleva la formación de NO. (Shou y col. 2012)

La vasorelajación inhibida por bloqueo de los receptores rianodina demuestra la participación de los receptores rianodina en el mecanismo vasorrelajante de E3III. Como se comprobó anteriormente la participación de los canales $K^+_{Ca^{+2}}$, estos pueden estar siendo activados por las chispas de Ca^{+2} mediadas por los receptores rianodina del retículo sarcoplásmico de la célula muscular lisa, conduciendo a la hiperpolarización del potencial de membrana y al cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje, la disminución de calcio en la célula muscular

lisa, induce entonces a la vasorelajación. (Rieg y col. 2013). Otra posibilidad es que es probable que los receptores rianodina intervengan en la activación de la eNOS al ser activados y producir el aumento de Ca^{+2} intracelular en las células endoteliales. Sin embargo, son necesarios estudios futuros que caractericen la diferencia en la regulación de las señales en el mecanismo de calcio intracelular y extracelular.

Para finalizar la participación de los EDNR, NO y PGI_2 , de los receptores muscarínicos M_3 y purinérgicos P2Y_1 y P2Y_2 , la participación de los canales $\text{K}^+_{\text{Ca}^{+2}}$ y K^+_{v} , la participación del segundo mensajero GMPC, y receptores rianodina del retículo sarcoplásmico discutidas en el presente trabajo se ve reflejada en la figura 42. De esta manera se propone este posible mecanismo de acción para el efecto vasorrelajante del compuesto E3III aislado del extracto etanólico de corteza de *A. occidentale*.

En conjunto estos resultados indican que *Anacardium occidentale* posee actividad vasorrelajante, presencia de varios compuestos activos y mayoritariamente un tanino condensado con estructura similar a una proantocianidina que ejerce efectos beneficiosos sobre el endotelio en función al disminuir el tono vascular. Basado en los resultados antes encontrados y su uso tradicional etnofarmacológicos se pudo confirmar su efecto y su potente uso para el tratamiento de la hipertensión arterial. Determinar un posible mecanismo de acción para este compuesto activo abre las puertas a futuros estudios para seguir la investigación de la participación de otras posibles rutas involucradas. También son necesarios estudios que involucren la evaluación de su eficacia clínica, efecto del compuesto en animales vivos y toxicidad para una posible aplicación para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

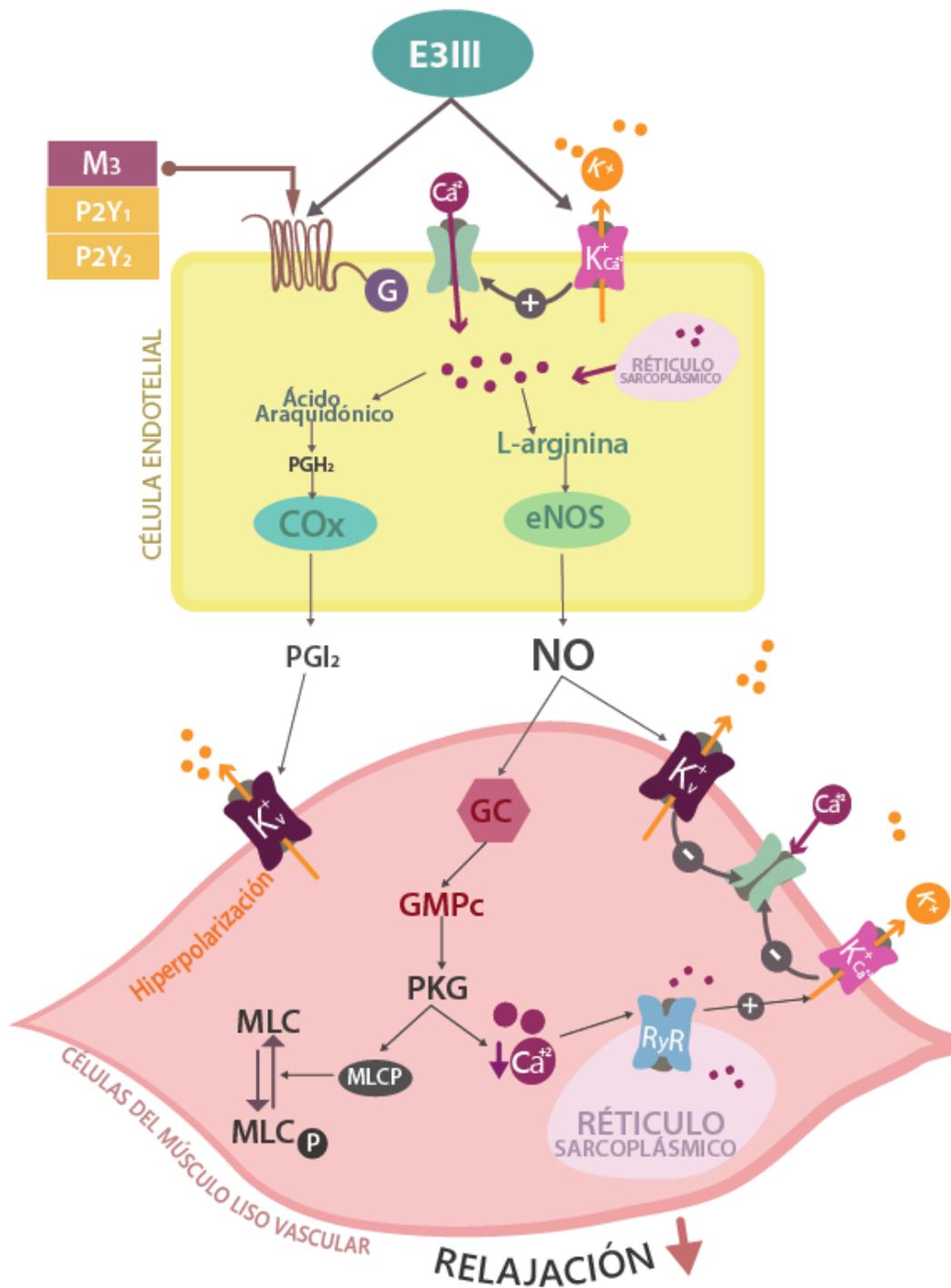


Figura 42. Mecanismo de acción propuesto para el efecto vasorrelajante del compuesto activo E3III aislado de un extracto etanólico de corteza de *A. occidentale*, según lo evaluado en este trabajo.

Abreviaciones: eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial COX: Ciclooxigenasa GC: Guanilato ciclasa MLCP: Fosfatasa de cadena ligera de miosina MLC: Cadena ligera de miosina desfosforilada MLCP: Cadena ligera de miosina fosforilada PGH₂: Prostaglandina H₂ PKG: Proteína quinasa G. RyR: Receptores rianodina.

7. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de corteza de *Anacardium occidentale* posee actividad vasorrelajante endotelio dependiente en anillos de aorta de rata pre contraídos con fenilefrina.
- Las fracciones E2, soluble en acetona y la fracción E3, no soluble en acetona obtenidas a partir del extracto de *A. occidentale* mostraron tener diferente actividad vaso relajante dependiente de endotelio y concentración-dependiente.
- La Fracción E3, compuesta mayoritariamente de taninos tuvo mayor efecto vasorrelajante endotelio dependiente en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina.
- Las subfracciones de E3, E3I, E3II y E3III mostraron tener actividad vasorrelajante endotelio dependiente.
- La subfracción E3III fue la subfracción mayoritaria eluida con acetona, con mayor actividad vasorrelajante en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina.
- E3III es un compuesto único, un tanino condensado polimérico de tipo proantocianidinas, compuesto por un trímero de catequina polihidroxiladas.
- La actividad vasorrelajante de E3III es endotelio-dependiente y mayoritariamente actúa vía NO/GMPc través de la activación de canales de K⁺ dependientes de calcio en las células endoteliales.
- La actividad vasorrelajante de E3III interviene parcialmente en la generación de PGI₂ en las células endoteliales.
- La actividad vasorrelajante de E3III involucra la participación parcial de los receptores acoplados a proteína G: purinérgicos P2Y y muscarínicos M₃ y actúa como antagonista no competitivo de los adrenorreceptores α .
- La actividad vasorrelajante de E3III involucra la participación de los receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico.
- La actividad vasorrelajante de E3III no actúa en el musculo liso bloqueando los canales de Ca⁺² tipo L dependiente de voltajes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams D., Barakeh J., Laskey R., Breemen C. (1989) Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.*; **3**(12):2389-400.
- Ahlquist R. (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* **153**: 586–600
- Aggio, A.; Grassi, D.; Onori, E.; D'Alessandro, A.; Masedu, F.; Valenti, M.; Ferri, C. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur. J. Nutr.* **52**: 263–272.
- Ajay M., Gilani M.A., Mustafaa M.R. (2003) Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences.* **74**: 603 – 612
- Andriambelosen E., Magnier C., Haan-Archipoff G., Lobstein A., Anton R., Beretz A., Stoclet J., Andriantsitohaina R. (1998) Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* **128**(12):2324-2333.
- Angus JA, Cocks TM and Satoh K (1986) The α -adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc* **45**:2355–2359
- Beevers G., Lip G., Brien E., (2005) ABC of hypertension. Editorial Blackwell publishing. 5th ed.
- Bevan J. Osher J. (1972) A Direct Method for Recording Tension Changes in the Wall of Small Blood Vessels in vitro. *Agents and Actions.* **2**: 257-260.
- Bloor Stephen J. (2001) Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids. *Methods in enzymology.* Vol 335
- Bohr D., Goolet A., Taquini J. (1961) ct Tension Recording from Smooth Muscle of Resistance Vessels from Various Organs. *Angiology.* **12**: 478-485

- Camarasa J., Escubedo E., Carles J., Pallas M., Camins A., Sureda F., (1997) La Interacción fármaco receptor. 1 ed. *Ediciones de la universidad de Barcelona*.
- Catret M., Anselmi E., Ivorra M., Elorriaga M, Tur R, D'ocón M. (1998) Alpha-adrenoceptor interaction of tetrandrine and isotetrandrine in the rat: functional and binding assays. *J Pharm Pharmacol*. **50**: 1267-73.
- Corson M., James N., Latta S., Nerem R., Berk B., Harrison D., (1996) Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circulation Research*. **79**: 984-991
- Cortes S., Valadares Y., De Oliveira A., Lemos V., Barbosa M., Braga F. (2002) Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata*. *Planta Med*. **68**(5):412-5.
- Da Costa C., Herculano E., Silva J., Paulino E., Benardino A., Araujo J., Euzebio A., Salvador M., Riberiro E. (2018). Hypotensive, vasorelaxant and antihypertensive activities of the hexane extract of *Anacardium occidentale linn*. *Archives of Biological Sciences*. 6-6. 10.2298/ABS171109006C.
- Dalbó S., Gasnhar E., Costa F., Horst H., Geraldo M., Amadeu G., Ribeiro R., (2008) Mechanisms Underlying the Vasorelaxant Effect Induced by Proanthocyanidin-Rich Fraction From *Croton celtidifolius* in Rat Small Resistance Arteries. *J Pharmacol Sci*. **106**: 234 – 241
- Da Silva DPB, Florentino IF, da Silva Moreira LK, Brito AF, Carvalho VV, Rodrigues MF, Vasconcelos GA, Vaz BG, Pereira-Junior MA, Fernandes KF, Costa EA. (2018) Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale L.*). *J Ethnopharmacol*. **213**:395-402
- Diamond J., Phillips A. (2005) Hypertensive Heart Disease. *Hypertension Research*. **28**, 191–202
- Doods H., Dammgén J., Mayer N., Rinner I. (1989) Muscarinic receptors in the heart and vascular system. *Clin Pharmacol* ;7:47-72.

- Duarte J., Pérez F., Utrilla P., Jiménez J., Tamargo J., Zarzuelo A. (1993) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharm.* **24** (4): 857-862
- Dubyak GR, el-Moatassim C. (1993) Signal transduction via P2-purinergetic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* ;265:C577–606.
- Eglen R., Cornerr C., Whiting R., (1990) Interaction of pF-HHSiD (p-fluoro-hexahydrosila-difenidol) at muscarinic receptors in guinea-pig trAChea. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*; 342: 394-399
- Eglen R. Hegde S., Watson N. (1996) Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function *Pharmacological reviews*. Vol. 48, No. 4
- Estrada O., González M., Salazar M., Fernández A., Cardozoc A., Alvarado C.(2011) Pomolic acid of *Licania pittieri* elicits endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings Omar Estradaa, Juan. *Phytomedicine*: 18: 464–469
- Fitzpatrick D., Hirschfield S., Coffey R. (1993) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*.**265** (2):774-778.
- Freslon, J. L., Mendes, A., Desgranges, C. & Vercauteren, J. (1997) Procyanidin oligomers from grape seed induce NO-dependent relaxation of rat aortic rings via P2Y1 receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* 122: 200P (abs).
- Furchgott F. R. Zawadzki J.V (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acethylcoline. *Nature*. **287**, 373-376
- García X., Cartas-Heredia L-. Loenzana M-, Gijon E. (1997) Vasoconstrictor effect of *cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. *General Pharmacology*. **29**(3):457-462
- García J., Vázquez J. Medina L. (2000) α 1-Adrenoceptors function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 389:1–12
- Gauthier C., Leblais V., Kobzik L., Trochu J.-N., Khandoudi N., Bril A. (1998) The negative inotropic effect of β 3 adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest*; 102: 1377–1384

- Geneser Finn (1991) *Histología*. Editorial medica panamericana. 8va Edición.
- Godfraind, T., Egleme, C., OsAChie, A.I. (1985). Role of endothelium in the contractile response of rat aorta to alpha-adrenoceptor agonists. *Clinical Science* 68, 65s–71s.
- Gonçalves C., Specht A., Wegiel B., Ferran C., Kaczmarek E. (2009) Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells *Circulation*; 119(6): 871–879
- Guerrero M. (2009) Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. *Biomédica*. **29**, 547-57
- Hansmann, G., Bultmann, R., Tuluc, F., Starke, K. (1997). Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*; 356, 641.
- Hernández R. (2014) ¿Son reales los valores de prevalencia de hipertensión y otros factores de riesgo reportados para Venezuela en estudios recientes? *Revista Venezolana de cardiología*. **34**(2), 97-100
- Huang Y., Waj N., Waj C., Qjang X., Leung F., Yu Z. (1999) Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427; 322-328
- Humar R., Resink T., Battegay E. (2005) Vascular Remodeling in Hypertension. *Hypertension: Principles and Practice*. Taylor & Francis Group. 85-96.
- Hussain M., Marshall I. (1997) Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*; 122, 849- 85
- Jespersen, B., Tykocki, N., Watts, S., Cobbett, P. (2015) Measurement of Smooth Muscle Function in the Isolated Tissue Bath-applications to Pharmacology Research. *J. Vis. Exp.* **95**, 2-9
- Kantz K., Singleton V. (1990) Isolation and Determination of Polymeric Polyphenols Using Sephadex LH-20 and Analysis of Grape Tissue Extracts. *Am. J. Enol. Vitic.*; 41 (3) 223:228

- Kim S. Kanga K., Kim K., Kim Nak. (2000) Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*; 67; 121–131
- Ko F., Wu T., Liou M., Huang T., Teng C. (1992) Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. *Eur J Pharmacol* **219** (1):29-34.
- Korner P.I, Bobik A., Angus J.A., Adams MA, Friberg P. (1989) Resistance control in hypertension. *J Hypertens Suppl* 7. **4**,125-134
- Kim S. Kanga K., Kim K., Kim Nak. (2000) Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*; 67; 121–131
- Kwan C., Zhang W., Nishibe S., Seo S. (2005) A novel in vitro endothelium-dependent vascular relaxant effect of *Apocynum venetum* leaf extract. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*;32(9):789-95.
- Lifton, R., Gharavi, A., Geller, D. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104** (4), 545–556.
- Loscher T. (1991) Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *European Heart Journal* (1991) 12 (Supplement E), 2-11
- Lüscher T., Noll G., (1995) The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*. **118**. 81-90
- MacMillan D., Chalmers S., Muir, T., McCarron, J. (2005). IP₃-mediated Ca²⁺ increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce IP₃-mediated Ca²⁺ increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J. Physiol*; 569, 533–544
- Maguire J., Davenport, A. (2005) Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRs. *Trends in Pharmacological Sciences*; 2, 448–454.
- Mancia G., Grassi G., (2005) Definition and Classification of Hypertension. *Hypertension: Principles and Practice*. Taylor & Francis Group 15-22

- Marcano D., Hasegawa M. (2006) Fitoquímica orgánica. *Editorial Torino*. 2da Edición.
- Matsui T., Korematsu S., Byun E., Nishizuka T., Ohshima S., Kanda T.(2009) Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem*;73(10):2246-51.
- Mizugaki M., Ishizawa F., Yamazaki T., Hishinuma T. (2000) Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 62;157–164
- Moncada S, Vane JR. (1998) Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxydes thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev*;30(3):293-331.
- Mota M. Thomas G., Barbosa J. (1985) Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol*. **13**(3):289-300.
- Nelson M., Quayle J. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*; 268(4):799-822.
- Newman D., Cragg G. (2012) Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311–335.
- Orallo F. (1996) Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol therapeut*; 69,606-718.
- Ozkor, M, Quyyumi, A. (2011) Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol Res Pract.*; 2011: 156146.
- Paulino U. (2001). Etnofarmacología The Use of Medicinal Plants by the Cultural Descendants of African People in Brazil. *Acta Farm. Bonaerense*. **20** (2): 139-44
- Polster P., Christophe B., Van Damme M., Houlliche A., Chatelain P. (1990) A novel calcium entry blocker. I. In vitro isolated tissue studies. *J Pharmacol Exp Ther*. **255**, 593-9.

- Popescu L., Panoiu C., Hinescu M., Nutu O. (1985) The mechanism of GMPc-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1985; 107: 393-4
- Queen L. Ferro A. (2006) β -Adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Life Sci*; 63: 1070–1083
- Ralevic, V., Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* Vol. 50, 413.
- Raman M., Cobb M.H., (2006) TGF- β Regulation by Emilin1: New Links in the Etiology of Hypertension. *Cell* **124** (5), 893-895
- Ramirez J., Palacios M., Gutierrez M. (2007) Implementación de la técnica en órgano aislado vascular como herramienta para la validación de plantas medicinales: Estudio del efecto vasodilatador de la *Salvia scutellarioide*. *Colomb Med.* **38**, 28-33.
- Rapoport R., Murad F. (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through GMP. *Circ. Res.* 52, 352
- Rieg A., Rossaint, R., Verjans E., Maihöfer N., Uhlig S., Martin C. (2013). Levosimendan Relaxes Pulmonary Arteries and Veins in Precision-Cut Lung Slices - The Role of K-ATP-Channels, cAMP and cGMP. *PloS one.* 8: e66195
- Rodriguez-Cruz A., Perez A., Serrato A., Juarez B., Mascher C., Paredes C. (2003) Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology* 86. 213–218
- Runnie I., Salleh M., Mohamed S., Head R., Abeywardena M. (2004). Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. *J Ethnopharmacol.* **92**(2-3):311-316.
- Sainani S.G., Maru V.G. (2004) Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension. *J Assoc phisycians indian.* **52**,966-969

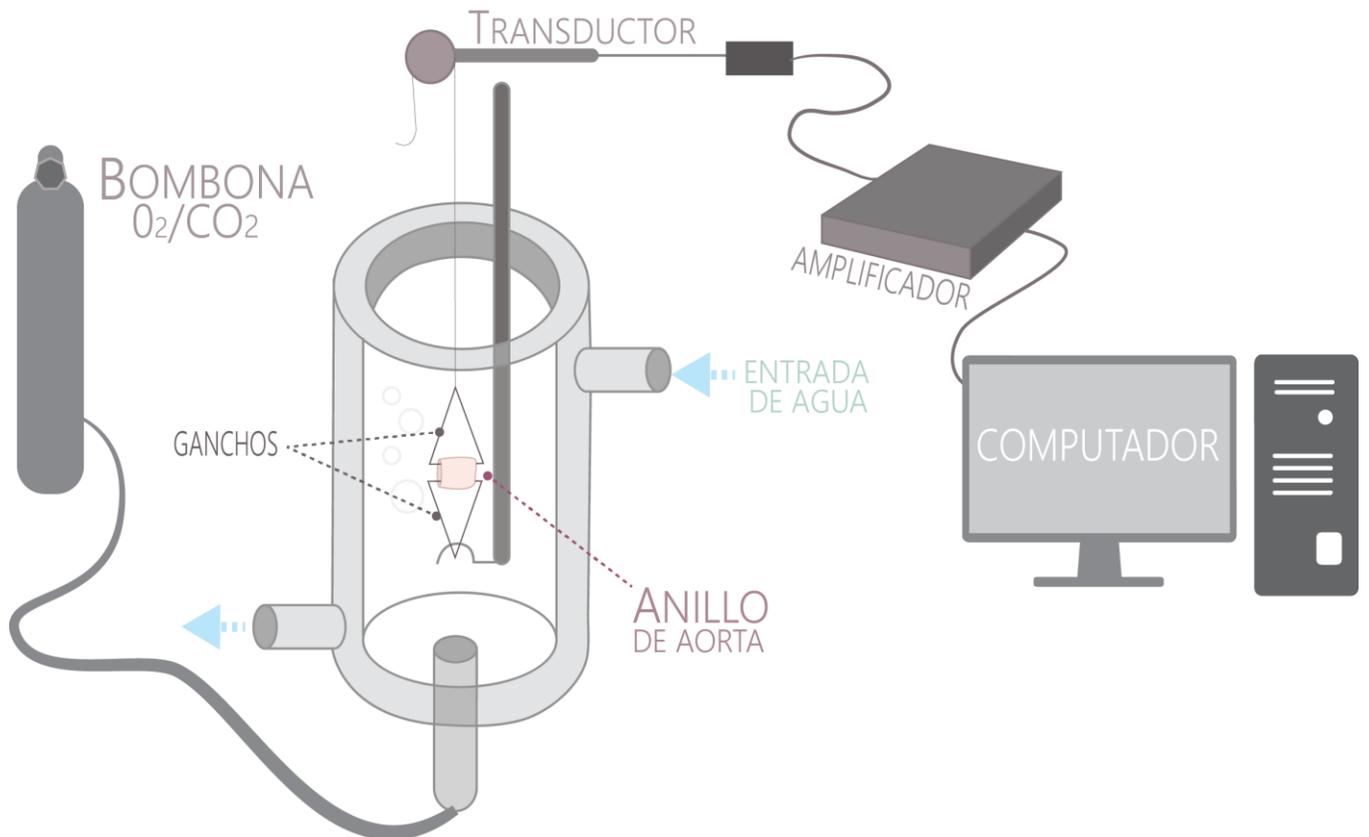
- Safar M. (2005) Hemodynamics, Circulation, and the Vascular Tree in Hypertension. *Hypertension: Principles and Practice*. Taylor & Francis Group. 67-83
- Sarker S., Latif Z., Gray A. (2006) Natural products isolation. *Humana Press*. 2nd ed.
- Serafim G., Moura D. (2001) Vascular Adrenoceptors: An Update. *907217 Pharmacol Rev* 53:319–356.
- Shou, Q., Pan, Y., Xu, X., Xu, J., Wang, D., Ling, Y., & Chen, M. (2012). Salvianolic acid B possesses vasodilation potential through NO and its related signals in rabbit thoracic aortic rings. *European journal of pharmacology*, 697 1-3, 81-7.
- Sidoni M., Hidalgo P., Méndez J. (2009) El merey (*Anacardium occidentale* L.): La especie frutal de las sabanas Orientales de Venezuela. *UDO Agrícola* 9 (1): 1-8.
- Singleton, V. L. (1988) Wine phenols. In: *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 6, Wine Analysis. Eds. H. F. Linskens and J. F. Jackson; 173-218.
- Smith WL. (1986) Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol*;48:251–262
- Sobey C.G. (2000) Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*(21) 28-38
- Somlyo A.P. Somlyo A. V (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* (372) 231-236
- Somlyo A.P. (1997). Rhomantic interludes raise blood pressure. *Nature* (389) 908-911
- Spieker L., Noll G., Ruschitzka F.T., Maier W., Lu T.F. (2000) Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *Journal of Human Hypertension* (14) 617–630
- Spieker L., Lüscher T. (2005). Vascular Function in Hypertension: Role of Endothelium-Derived Factors. . *Hypertension: Principles and Practice*. Taylor & Francis Group . 99-119.

- Spokas E., Folco G., Quilley J., Chander P., McGiff J. (1983). Endothelial mechanism in the vascular action of hydralazine. *Hypertension*. (5):107-11.
- Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. (2003) Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina*;39(4):333-41.
- Tchikaya F., Bantsielé G., Kouakou-Siransy G., Yao Datté J., Angoue P., Zirihi N., Offoumou M. (2011) *Anacardium Occidentale* Linn. (Anacardiaceae) Stem Bark Extract Induces Hypotensive And Cardio-Inhibitory Effects In Experimental Animal Models. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. **8**(4):452-461
- Thrall G., Lip G., Lane D. (2004) Compliance with pharmacological therapy in hypertension: can we do better, and how? *J Hum Hypertens* (18):595-7.
- Topouzis S, Pelton J.T, Miller R.C. (1989) Effects of calcium entry blockers on contractions evoked by endothelin-1, in rat isolated aorta. *Br J pharmacol*;98, 669-677
- Touyz R.M. (2003) The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. (2):155-64.
- Tsuchihashi H., Aono J., Nagatomo T., Kawada T., Ohta H., Imai S. (1987) Effects of bunitrolol on adrenergic and serotonergic receptors. *Jpn J Pharmacol* (45):349- 56.
- Vanhoutte P., Rubanyi G., Miller V., Houston D. (1986) Modulation Of Vascular Smooth Muscle Contraction By The Endothelium. *Ann. Rev. Physiol*(48) 307-20.
- Vanhoutte P., Miller V. (1989) Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med* 87:1S-5
- Vázquez F., Alvarado C., Molina A., Rojas I., Zavala M. (2013) Review Vasodilator Compounds Derived from Plants and Their Mechanisms of Action. *Molecules*; 18; 5814-5857
- Vit, P. (2003) *Anacardium occidentale* L. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 6 Merey. Rev Fac Far. **45** (1) 77-79

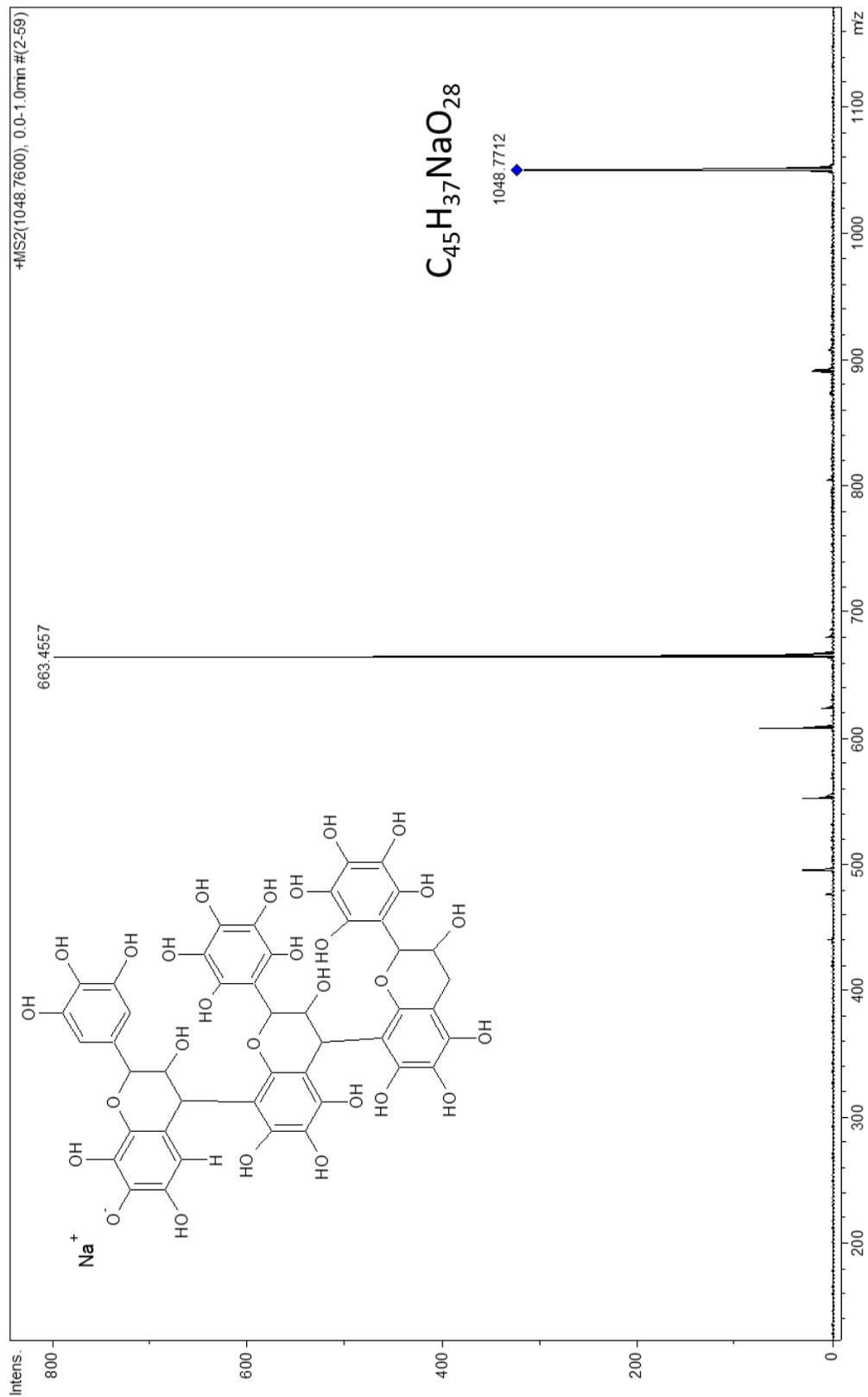
- Wagner H. Bladt S. (1996) *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Editorial. 2d Edition.
- Wang L., Karlsson L., Moses S., Hultgardh-Nilsson A., Andersson M., Borna C., Gudbjartsson T., Jern S., Erlinge D. (2002) P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* ;40:841–853.
- Webb C. R. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation *Adv Physiol Educ* **27**: 201–206.
- Wu, C.C., Chen, S.J., Yen, M.H. (1993). Different responses to acetylcholine in the presence of nitric oxide inhibitor in rat aortae and mesenteric arteries. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 20, 405–412.
- Yu S., Kuo S. (1995) Vasorelaxant effect of isoliquiritigenin, a novel soluble guanylate cyclase activator, in rat aorta. *Br J Pharmacol*.(114):587-94.

9. ANEXOS

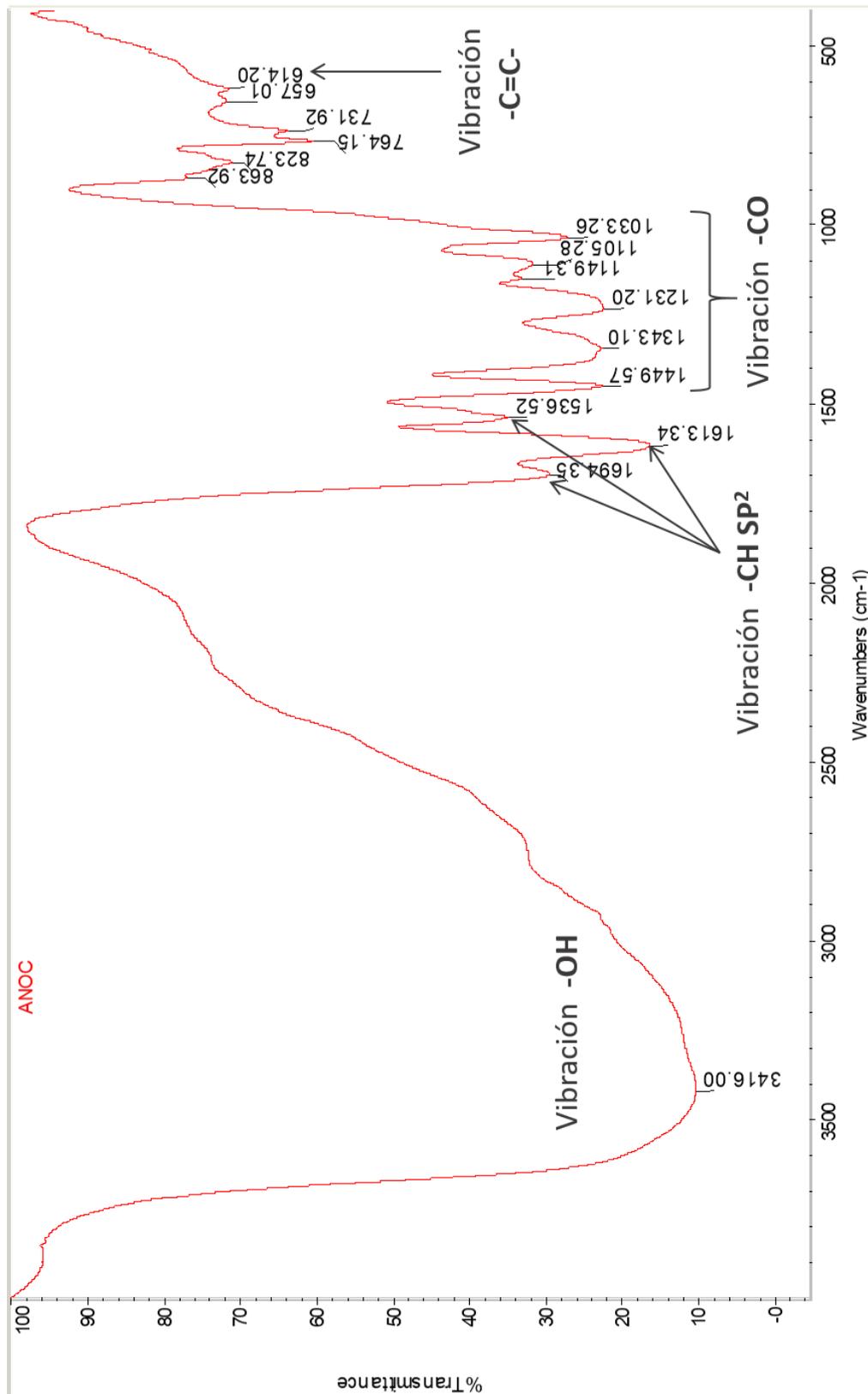
Anexo 1. Diagrama Componentes implicados en la técnica de órgano aislado



Anexo 2. Espectro de masas para el compuesto activo E3III extraído de *AnOc*



Anexo 3. Espectro de Infrarrojo para el compuesto activo E3III extraído de *AnOc*



Anexo 4. Espectro RMN ¹H para el compuesto activo E3III extraído de *AnOc*

