

Caracterización de la respuesta vasodilatadora
y mecanismo de acción de una infusión de
Baccharis trimera (Less.) DC. " Carqueja" en
anillos de aorta de rata.

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Ciencias Fisiológicas
Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas
(PEDECIBA).

Lic. María Angélica Gómez.

Orientador: Dr. Eduardo Migliaro.

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular, Facultad de
Medicina, UdelaR.

XI 2016

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todos quienes colaboraron para que pudiese llevar a cabo este trabajo, en particular:

Al Dr. Eduardo Migliaro por haberme abierto las puertas del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular transmitiéndome el interés por la investigación científica y por su apoyo constante durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Paola Contreras porque su permanente estímulo hacia mi persona y absoluta disposición para revisar este trabajo fueron el motor para que pudiese finalizarlo.

A la Dra. María Caggiani, porque su colaboración y trabajo arduo hicieron posible la realización de estos experimentos y acompañaron con alegría y entusiasmo largas y muchas veces frustrantes jornadas de experimentación.

Al Dr. Horacio Heinzen cuya idea original y generosidad dieron origen a esta tesis de maestría.

A Ximena Arias con quien tuvimos una excelente relación de complementariedad entre los equipos de trabajo de Farmacognosia y Fisiología Cardiovascular.

A la Dra. Elisa Montes de Oca por su inmediata disposición a realizar los cortes y la tinción de los preparados histológicos.

Al Dr. Gustavo Brum por haber aceptado evaluar este trabajo.

A Elbio Agote, que con cuya admirable capacidad y habilidad construyó el equipo de vasorrelajación con el que comenzamos a trabajar.

A Edith Moraes quien constantemente estuvo dispuesta a colaborar mientras realizaba los experimentos.

A Fabiana Blanco , Victoria Brando y Geraldine Rimsky, mis amigas "científicas" que siempre escucharon, animaron y propusieron ideas muy valiosas.

Y muy especialmente a mi familia, por el amor que nos une y la paciencia infinita que me tuvieron mientras redactaba esta tesis.

INDICE GENERAL.

	pág.
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	7
LISTADO DE ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	13
1. Aspectos generales de la estructura y función arteriales.	13
2. El endotelio vascular.	14
2.1. Óxido Nítrico: propiedades y síntesis.	16
2.2. Óxido Nítrico y vasodilatación.	18
3. El músculo liso vascular.	21
3.1. Estructura subcelular del MLV.	21
3.2. Contracción del MLV	22
3.2.1. Características de la maquinaria contráctil	23
3.2.3. Regulación de los ciclos de puentes cruzados actina-miosina.	24
3.2.4. Vías de incremento de la $[Ca^{++}]_i$ en el MLV.	27
3.3. Relajación del MLV.	30
4. Hipertensión arterial (HTA): definición, prevalencia y tratamiento.	33
5. Algunas consideraciones sobre las plantas medicinales y sus usos.	35

	pág.
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Preparación del extracto acuoso de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	41
Análisis del extracto por HPLC.	41
Ensayos de vasodilatación en anillos de aorta de rata	42
Disección de la arteria aorta	42
Registro de tensión vascular isométrica	43
Remoción del endotelio	44
Protocolo experimental	46
Construcción de curvas dosis-respuesta.	46
Ensayos utilizando L-NAME.	47
Ensayos utilizando Tetraetilamonio (TEA)	48
Análisis estadístico	48
 RESULTADOS	 49
A. Estudio del efecto vasodilatador de la IBT sobre anillos de aorta de rata.	49
A.1. Perfil fitoquímico de la IBT.	49
A.2. Ensayos de vasorrelajación en anillos con endotelio intacto.	49

	pág.
A.3. Construcción de curva dosis-respuesta en anillos con endotelio	52
B. Estudio del mecanismo de acción vasodilatadora de la IBT sobre anillos de aorta de rata	54
B.1. Exploración de los mecanismos vinculados al endotelio vascular	54
B.1.1. Rol del endotelio	54
B.1.2. Rol del NO en la VD endotelio-dependiente	59
B.2. Exploración de los mecanismos de acción de la IBT no vinculados al endotelio vascular	61
B.2.1. Rol de los canales de K ⁺ en la VD inducida por la IBT	61
 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	 63
BIBLIOGRAFÍA	67
APÉNDICE	
Vasorelaxant Effect of a <i>Baccharis trimera</i> Infusion on Precontracted Rat Aortic Rings.	

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

	pág.
Figura 1. Vías de activación de la eNOS	19
Figura 2. Señalización por el NO en el músculo liso vascular	20
Figura 3. Composición de los filamentos contráctiles en el músculo liso vascular	24
Figura 4. Regulación de la contracción del músculo liso vascular	26
Figura 5. Plantas de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	37
Figura 6. Modelo del baño para órgano aislado utilizado en este trabajo	45
Figura 7. La VD de los anillos se calcula como el porcentaje de disminución de la contracción máxima evocada con NA	47
Figura 8. La IBT contiene principalmente polifenoles y flavonoides	50
Figura 9. La IBT produce una caída de la tensión en los anillos de aorta con endotelio intacto pre-contraídos con NA	51
Figura 10. La IBT produce una VD significativa en los anillos con endotelio intacto	52
Figura 11. La VD de los anillos con endotelio intacto es dosis-dependiente	53

	pág.
Figura 12. La Ach produce VD en anillos de aorta con endotelio intacto	55
Figura 13. La Ach no produce VD en los anillos con remoción mecánica del endotelio	56
Figura 14. Cortes histológicos de anillos de arteria aorta de rata donde se evidencia la correcta remoción de la capa endotelial	57
Figura 15. La VD en respuesta a la IBT en los anillos de aorta sin endotelio es dosis-dependiente	58
Figura 16. La VD en respuesta a la IBT disminuye al remover el endotelio a las concentraciones de IBT intermedias y bajas	59
Figura 17. El tratamiento de los anillos con endotelio con L-NAME produce una VD en respuesta a la IBT equivalente a la obtenida con la remoción mecánica del endotelio	60
Figura 18. Respuesta de los anillos de aorta sin endotelio a la pre-incubación con TEA	62
Tabla 1. Porcentajes de VD obtenidos en respuesta a la IBT en anillos con endotelio intacto	53

pág.

Tabla 2. Porcentajes de VD obtenidos en respuesta
a la IBT en anillos de aorta sin endotelio

56

LISTADO DE ABREVIATURAS.

Ach: Acetilcolina.

Akt: Proteína kinasa B.

4-AP: 4- Aminopiridina.

ARAll: Antagonista de los receptores de angiotensina II.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BH₄: Tetrahidrobiopterina.

BKca: Canales de K⁺ activados por Ca⁺⁺.

CaM: Calmodulina.

CICR: Liberación de Ca⁺⁺ inducida por Ca⁺⁺.

[Ca⁺⁺]_i: Concentración de Ca⁺⁺ intracelular.

DAG: Diacilglicerol.

ECC: Entrada capacitiva de calcio.

ECVs: Enfermedades cardiovasculares.

EDHFs: Factores Hiperpolarizantes Derivados del Endotelio.

EDRF: Factor Relajante Derivado del Endotelio.

eNOS: Sintasa endotelial del óxido nítrico.

ET-1: Endotelina -1.

FAD: Flavina adenina dinucleótido.

FMN: Flavina adenina mononucleótido.

GCs: Guanilato Ciclasa soluble.

GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.

GPCR: Receptor acoplado a proteína G.

GTP: Trifosfato de guanosina.

HPLC: Cromatografía de Líquidos a alta presión.

Hsp 90: Proteína de shock térmico 90.

HTA: Hipertensión arterial.

IBT: Infusión de *Baccharis trimera* (Less.)DC..

IECA: Inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I en angiotensina II.

IICR: Liberación de calcio inducida por IP₃.

iNOS: Sintasa inducible del óxido nítrico.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R: Receptor de inositol 1,4,5- trifosfato.

K-H: Krebs-Henseleit.

L-NAME: N-nitro-L-arginina metiléster.

MLC: Cadena ligera regulatoria de la miosina.

MLCK: Quinasa de la cadena ligera de la miosina.

MLCP: Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina.

MLV: Músculo liso vascular.

NA: Noradrenalina.

nNOS: Sintasa neuronal del óxido nítrico.

NO: Óxido Nítrico.

NOS: Sintasa del NO.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: Presión arterial.

PGH₂: Prostaglandina H₂.

PGI₂: Prostaciclina.

PIP₂: Fosfoinositol 4,5-bifosfato.

PKA: Proteína kinasa A.

PKG: Proteína kinasa G.

PLC: Fosfolipasa C.

PMCA: Ca⁺⁺-ATPasa de la membrana plasmática.

ROC: Canales operados por receptor.

RS: Retículo sarcoplásmico.

RVP: Resistencia vascular periférica.

RyR: Receptor de ryanodina.

SERCA: Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ ATPasa del retículo sarcoplásmico/retículo endoplásmico.

SOC: Canales operados por depósito.

STOCs : Corrientes transitorias espontáneas salientes .

TEA: Tetraetilamonio.

TXA₂: Tromboxano A₂.

VC: Vasoconstricción.

VD: Vasodilatación.

VDCC: Canales de Ca⁺⁺ activados por voltaje.

INTRODUCCIÓN.

1. Aspectos generales de la estructura y función arteriales.

El sistema cardiovascular está compuesto por el corazón y una red de vasos sanguíneos que permiten que la sangre bombeada se distribuya a todos los tejidos del organismo. Las grandes arterias que se originan en el corazón se ramifican continuamente en vasos cada vez más pequeños hasta formar los capilares sanguíneos. Estos tienen características ideales para el intercambio de oxígeno y nutrientes entre la sangre y los tejidos y paulatinamente se reúnen en venas para conducir la sangre de nuevo hacia el corazón.

La pared arterial normal es una estructura trilaminar, compuesta por tunicas o capas que se denominan íntima, media y adventicia. Las tres capas tienen funciones específicas y varían considerablemente en su extensión dependiendo de la rama del árbol arterial considerada[1].

La túnica íntima es la capa más interna de la pared arterial y está en contacto con la sangre. Consiste en una monocapa de células endoteliales, una capa subendotelial de tejido conectivo que contiene células musculares y una lámina elástica interna. El endotelio está compuesto por células escamosas, poligonales y elongadas cuyo eje mayor está en la dirección del flujo sanguíneo. Las células endoteliales están conectadas por uniones ocluyentes y uniones gap que junto con su lámina basal ayudan a regular el intercambio bidireccional de moléculas. La siguiente capa dentro de la túnica íntima es el espacio subendotelial compuesto por colágeno, laminina, fibronectina y otras moléculas de la matriz extracelular. Este tejido también contiene fibroblastos y otras células con características estructurales similares a las células musculares lisas denominadas células mioíntimas. La túnica íntima está separada de la túnica media por la lámina elástica interna, una estructura fenestrada compuesta por elastina[2].

La túnica media consiste en múltiples capas de músculo liso con disposición helicoidal y tejido conectivo. Está separada de la túnica adventicia por la lámina elástica externa. La composición de la media difiere dependiendo de la localización y el tamaño del vaso. En función de las características de esta capa las arterias se clasifican en elásticas o musculares. Las arterias elásticas tienen una media que contiene una alta densidad de láminas elásticas intercaladas en el músculo liso. La presencia de estas láminas es necesaria para amortiguar la pulsatilidad producida por la sístole cardíaca y mantener el flujo sanguíneo. A ésta categoría pertenecen las arterias aorta y pulmonar[2].

Las arterias musculares tienen una media con un alto predominio de fibras musculares lisas y menor cantidad de láminas elásticas. Típicamente pueden contener hasta 40 capas de fibras musculares lisas[2]. Son arterias de tamaño mediano que perfunden órganos, por lo cual el alto contenido de músculo liso les permite ajustar su calibre para regular el flujo sanguíneo hacia el tejido[3].

La túnica adventicia consiste en tejido conjuntivo, fibroblastos, fibras de colágeno, elastina y otras proteínas de la matriz extracelular que aseguran su adherencia a los tejidos circundantes[1]. También contiene tejido adiposo perivascular, terminaciones nerviosas e irrigación sanguínea[4]. Esta última la proveen los *vasa vasorum* o "vasos de los vasos" que permiten la nutrición de la adventicia y algunas capas de la media, mientras que la túnica íntima y sus capas más adyacentes se nutren por difusión desde el lumen arterial[2].

2. El endotelio vascular.

Por muchos años el endotelio vascular fue considerado como una simple barrera entre la sangre y los tejidos. El descubrimiento en 1980 del Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF)[5] que pocos años más tarde fuera identificado como el Óxido Nítrico (NO)[6], determinó que la célula endotelial pasase a tener un rol protagónico en la regulación del tono y la

homeostasis vascular. En la actualidad se sabe que el endotelio es un tejido sumamente activo, con una función clave en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

Las funciones más destacadas del endotelio vascular son su acción como barrera permeable selectiva entre los compartimientos intra y extravascular, proveer al sistema cardiovascular de una superficie homeostática anti-trombogénica y pro-fibrinolítica[1, 7] y actuar como un órgano secretorio que permite la modulación de la contractilidad vascular [1]. Cabe destacar que a pesar de su aparente simplicidad morfológica y relativa homogeneidad estas funciones presentan variaciones de acuerdo a la zona del árbol vascular considerada[7].

Como barrera, el endotelio es capaz de modular el flujo transmural de fluidos y macromoléculas entre el lumen vascular y el músculo liso y esta capacidad está dinámicamente regulada[1, 7]. Varios estímulos fisiológicos o fisiopatológicos son capaces de inducir en forma aguda o crónica cambios en la permeabilidad endotelial. Por ejemplo, mediadores de inflamación aguda como la trombina o la histamina actúan sobre el endotelio produciendo apertura de sus uniones intercelulares aumentando así el transporte para- celular de sustancias[7].

Las células endoteliales elaboran sustancias anticoagulantes, moléculas de adhesión celular y autacoides que permiten complejas interacciones con factores de la coagulación sanguínea, plaquetas y leucocitos para mantener la interfase vascular como una superficie anti-trombogénica[1, 7].

Por último, el endotelio juega un rol fundamental en la regulación del tono vascular. Sus células sintetizan sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras en respuesta a estímulos como cambios hemodinámicos (tensión de cizallamiento o shear stress), hormonales o estimulación farmacológica[1].

Los vasodilatadores secretados por el endotelio son el Óxido Nítrico (NO), la Prostaciclina (PGI₂) y una serie de sustancias que actúan por hiperpolarización del músculo liso subyacente denominadas Factores Hiperpolarizantes Derivados del Endotelio (EDHFs)[7]. Las principales

sustancias vasoconstrictoras son Endotelina -1 (ET-1), Prostaglandina H₂ (PGH₂) y Tromboxano A₂ (TXA₂)[7, 8]. Los vasodilatadores NO y PGI₂ y el vasoconstrictor ET-1 no solo son importantes en la regulación del tono vascular, sino que también inhiben y estimulan, respectivamente, la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular. Adicionalmente el NO y la PGI₂ son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria[7].

El rol del endotelio es crítico en el mantenimiento de un correcto balance en la vasculatura. Un endotelio sano posee un estricto equilibrio de sustancias vasoconstrictoras y vasorrelajadoras, anti y pro-trombóticas, y anti y pro-inflamatorias. Cuando este equilibrio se rompe el endotelio se vuelve disfuncional lo que conduce al desarrollo de enfermedad cardiovascular [7, 8].

2.1. Óxido Nítrico: propiedades y síntesis.

De las moléculas producidas por el endotelio vascular el NO es la de mayor relevancia fisiológica y fisiopatológica, con un amplio espectro de acciones importantes para el mantenimiento de la salud vascular. Adicionalmente a causar vasodilatación, tiene actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria que inhiben la aterogénesis. Factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes se asocian con una disminución de la producción de NO en la pared arterial. De hecho el término disfunción endotelial se ha convertido en sinónimo de actividad biológica reducida del NO y muchas terapias están enfocadas en aumentar su producción[7].

Las propiedades fisico-químicas del NO le confieren una capacidad única para entablar una comunicación célula-célula. De esta manera recluta las funciones de varios tipos celulares para dar una respuesta fisiológica o fisiopatológica concertada, como por ejemplo el aumento del flujo sanguíneo local hacia un tejido dañado [9].

El origen vascular del NO es propicio para su liberación local e inmediata directamente en el músculo liso. Su tamaño pequeño y naturaleza lipofílica le permiten difundir rápidamente a través de las membranas celulares hacia sus células blanco. Su labilidad, dada por la naturaleza radicalar, le permite una verdadera acción local[9].

La producción de NO es llevada a cabo por la Sintasa del NO (NOS). Esta enzima utiliza como sustrato la L-arginina, produciendo NO y cantidades estequiométricas de L-citrulina. Su actividad requiere la presencia de varios cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH4), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina adenina mononucleótido (FMN), calmodulina (CaM) y hierro protoporfirina IX (grupo hemo)[4, 7].

La NOS es sintetizada como monómero y necesita formar dímeros para unirse al cofactor BH4 y a la L-arginina y catalizar la formación de NO. Los monómeros generan O_2^- en lugar de NO desde el domino oxigenasa de la enzima, una condición conocida como desacoplamiento de la NOS[4].

Existen tres genes que codifican para tres isoenzimas de la NOS que se expresan en distintos tejidos y de forma constitutiva o inducible; NOS neuronal (nNOS o NOS-1), NOS inducible por citoquinas (iNOS o NOS-2) y NOS endotelial (eNOS o NOS-3). Si bien las tres isoformas están presentes en la vasculatura, la producción de NO a ese nivel viene dada principalmente por la eNOS[4].

La eNOS se encuentra localizada en la membrana plasmática de la célula endotelial asociada a la proteína caveolina-1. Luego de sensar un estímulo adecuado, es activada liberándose al citoplasma donde se asocia con la proteína de shock térmico 90 (hsp 90) la cual promueve su dimerización y la protege de la degradación proteosomal[8].

La actividad de la eNOS puede iniciarse o incrementarse por variados estímulos como son el shear stress o sustancias como la acetilcolina, bradikina, histamina y 17 b-estradiol. La activación puede ser Ca^{++} - CaM dependiente o independiente[4, 7, 8].

Los agonistas como la acetilcolina, bradikina o histamina actúan sobre receptores específicos en la membrana de la célula endotelial

produciendo un incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular. El Ca^{++} se une a la proteína citosólica CaM, lo que conlleva a la activación del dominio de unión a la CaM de la eNOS. Esto facilita el flujo de electrones desde el dominio reductasa de la enzima hacia el dominio oxigenasa y la consiguiente producción de NO (figura 1)[4].

Otra vía de regulación de la eNOS es la fosforilación en residuos aminoacídicos específicos y ocurre independientemente de la concentración de Ca^{++} intracelular. Dependiendo del sitio fosforilado puede producirse activación o inhibición de la enzima. Por ejemplo, la fosforilación en la serina 1177 produce activación mientras que en la treonina 495 produce inhibición. La proteína kinasa A (PKA) y la proteína kinasa B (Akt) activan a la eNOS por fosforilación en la serina 1177 en respuesta a estímulos como el shear stress y el 17 b-estradiol. Particularmente el shear stress induce la fosforilación de la eNOS en la serina 1177 y en la serina 635 en forma PKA dependiente[4](figura 1).

Algunos productos naturales con acción hipotensora actúan activando a la eNOS por fosforilación. Es el caso por ejemplo del aurantio - obtusin, principal compuesto bioactivo aislado de las semillas maduras de la planta ***Cassia obtusifolia L***, utilizada en medicina tradicional China. Se ha visto que esta sustancia produce vasodilatación arterial en forma Akt-eNOS dependiente[10].

2.2. Óxido Nítrico y vasodilatación.

El NO derivado del endotelio es un potente vasodilatador. Dadas sus mencionadas propiedades fisico-químicas el NO difunde desde la célula endotelial hacia el citosol de la célula del músculo liso vascular (MLV). Una vez allí estimula a la enzima Guanilato Ciclasa soluble (GCs). Ésta es una metaloproteína que contiene un grupo prostético hemo capaz de actuar como sitio aceptor de electrones del NO. Luego de la unión del NO al hemo su actividad catalítica que consiste en la conversión de trifosfato de

guanosina (GTP) a monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), se incrementa unas 200 veces. El GMPc activa a la proteína kinasa G (PKG). Esta enzima actúa fosforilando distintos blancos intracelulares para disminuir la concentración de Ca^{++} intracelular. Activa a la Ca^{++} - Mg^{++} ATPasa del retículo sarcoplásmico/retículo endoplásmico (SERCA) lo cual promueve la recaptación de Ca^{++} hacia el retículo sarcoplásmico. Induce la apertura de canales de elevada conductancia al K^{+} activados por Ca^{++} (BK_{Ca})[4, 11] produciendo hiperpolarización de la membrana plasmática y el consiguiente cierre de canales de Ca^{++} activados por voltaje (VDCC). Inhibe la liberación de Ca^{++} por el Receptor de inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3R)[4].

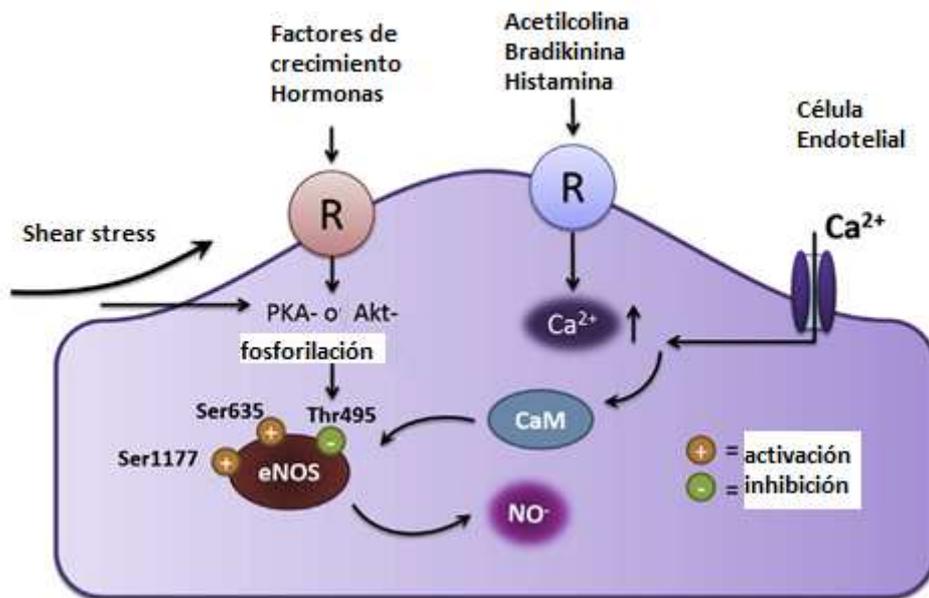


Figura 1. Vías de activación de la eNOS . Distintos estímulos pueden activar a la eNOS y dicha activación puede ser Ca^{++} -CaM dependiente como ocurre en respuesta a acetilcolina, bradikinina o histamina, o Ca^{++} -CaM independiente por fosforilación en residuos aminoacídicos específicos como ocurre en respuesta al shear stress, hormonas y factores de crecimiento. Adaptado de[4].

La disminución en la concentración de Ca^{++} citosólico inactiva a la maquinaria contráctil y conduce a la relajación del MLV[4] (Figura 2). Este tema se trata en detalle en la sección 3.

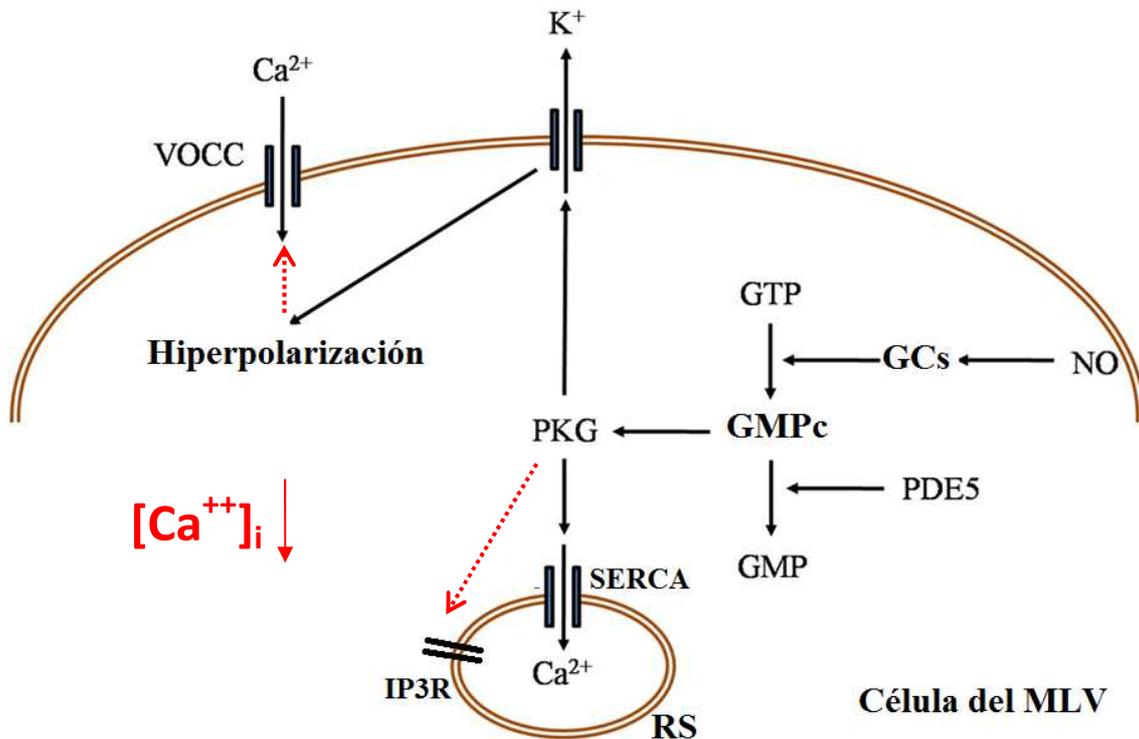


Figura 2: Señalización por el NO en el músculo liso vascular. El NO en el MLV activa a la enzima GCs que produce GMPc. El GMPc activa a la PKG cuya acción disminuye la concentración de Ca^{++} intracelular y conduce a la relajación del MLV. —————> señal activadora,> señal inhibitoria. —————> disminución. Adaptado de[12].

Más allá de la producción de NO inducida por diferentes estímulos vasodilatadores endotelio dependientes, existe una producción endógena basal y continua de NO, que varía considerablemente de un tipo de vaso sanguíneo a otro e incluso en diferentes sectores del mismo vaso. Esta producción basal de NO es importante en la regulación permanente del tono vascular y de la adhesión y agregación plaquetarias[9].

3. El músculo liso vascular.

3.1. Estructura subcelular del MLV.

Los miocitos vasculares diferenciados son células elongadas, con forma de huso que forman capas interdigitantes en la pared vascular. Poseen uniones célula-célula de tipo ocluyentes y desmosomas lo que permite que la fuerza generada en una fibra muscular se transmita a la siguiente. Adicionalmente, las membranas celulares están unidas por muchas uniones de baja resistencia eléctrica (uniones gap o conexones)[1, 13]. Estas uniones están compuestas por proteínas especializadas que forman poros intercelulares que permiten el libre pasaje de iones y pequeñas moléculas. Por ésta razón el músculo liso vascular es considerado un sincitio funcional en el cual la despolarización se extiende de una célula a otra[1].

Una característica del MLV, en comparación con los músculos cardíaco o esquelético, es la ausencia de una estructura altamente organizada de filamentos contráctiles. Por esta razón el MLV carece del patrón de bandeado estriado característico de dichos músculos[1, 14]. A pesar de ello, todos los músculos vasculares diferenciados poseen estructuras comunes. Existen filamentos que se distribuyen en forma paralela al eje longitudinal de la célula. Los filamentos finos están compuestos por actina, tropomiosina y otras dos proteínas asociadas (cadesmona y calponina). Los filamentos gruesos están formados por miosina. Intercalados en el citoplasma están los filamentos intermedios, compuestos por las proteínas desmina y /o vimentina. La relación filamentos gruesos/ filamentos finos es de aproximadamente 20:1, mucho mayor que en el músculo estriado en el cual esta relación es de 6:1[1].

Los filamentos finos se insertan en dos estructuras. En el citoplasma, se unen a los cuerpos densos. Éstos son las estructuras análogas a las líneas Z del músculo estriado y contienen muchas de sus mismas proteínas como

por ej. α -actinina. En la membrana celular se insertan en las placas de membrana las cuales tienden a estar concentradas en los extremos de la célula. Estas son similares en estructura a los cuerpos densos pero contienen otras proteínas como la vinculina[1].

La membrana plasmática de la célula muscular lisa denominada sarcolema contiene pequeñas invaginaciones llamadas caveolas. Estas estructuras están involucradas en el acoplamiento excitación-contracción pero además se cree que tienen un rol como sitios de anclaje de los filamentos contráctiles[1].

La célula muscular lisa posee un sistema membranoso de sacos y túbulos anastomosados denominado retículo sarcoplásmico (RS) que ocupa aproximadamente del 1,5 al 7,5 % del volumen celular [15]. Éste es el principal sitio de almacenamiento de Ca^{++} en la célula. Algunas zonas del RS se localizan muy próximas al sarcolema circundando las caveolas (RS periférico o superficial). Otras se adentran en el citoplasma formando hojas que corren a lo largo del eje longitudinal de la célula (RS central o profundo). Las caveolas y el RS periférico constituyen microdominios que actúan como una unidad funcional en lo que refiere a la señalización por el Ca^{++} . El RS central se cree que estaría más involucrado en la contracción muscular proveyendo de Ca^{++} a los filamentos contráctiles[16].

3.2. Contracción del MLV.

El Ca^{++} es un segundo mensajero fundamental en la célula muscular lisa. Para que se produzca la activación de la maquinaria contráctil y por tanto la contracción, debe producirse un incremento en la concentración global de este ion en el citoplasma[17, 18]. Dicho aumento se produce en respuesta a estímulos que causan despolarización de la membrana plasmática, por estiramiento mecánico lo cual activa canales mecanosensibles o por acción de agonistas como la noradrenalina (NA), angiotensina II o endotelina sobre receptores específicos[18].

3.2.1. Características de la maquinaria contráctil.

En el músculo liso los filamentos gruesos están compuestos por miosina II. Las moléculas de miosina II son hexámeros que consisten en dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras de 20000 dalton o cadenas regulatorias y dos cadenas ligeras de 17000 dalton o cadenas esenciales[14].

Las cadenas pesadas poseen tres regiones, una cola, una visagra y una cabeza globular. Las regiones de la cola son α -hélices a través de las cuales se entrelazan ambas cadenas. En la región visagra la molécula se abre para formar las cabezas globulares que poseen un sitio de unión a la actina y un sitio de unión e hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Cada cabeza de miosina forma un complejo con una cadena regulatoria y una esencial. Como su nombre lo indica la cadena regulatoria cumple la función de regular la actividad ATPasa de la miosina. La cadena esencial tiene la función de estabilizar la región de la cabeza globular[14](figura 3).

Los filamentos finos están formados por actina, tropomiosina y proteínas específicas que se unen a dichos filamentos. La actina es una proteína globular con un peso molecular de 40000 que polimeriza formando largas cadenas helicoidales. El MLV contiene una isoforma única de α - actina[1].

La tropomiosina es una molécula elongada con un peso molecular de 36000 y forma dímeros que se ubican en las hendiduras de las hélices de actina[1].

Las proteínas que se unen a los filamentos finos incluyen la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), cadesmona y calponina. Las dos últimas actúan como moduladores negativos inhibiendo la contracción muscular. Su fosforilación, por ejemplo en respuesta a la acción de sustancias vasoconstrictoras, incrementa la fuerza contráctil del MLV[1].

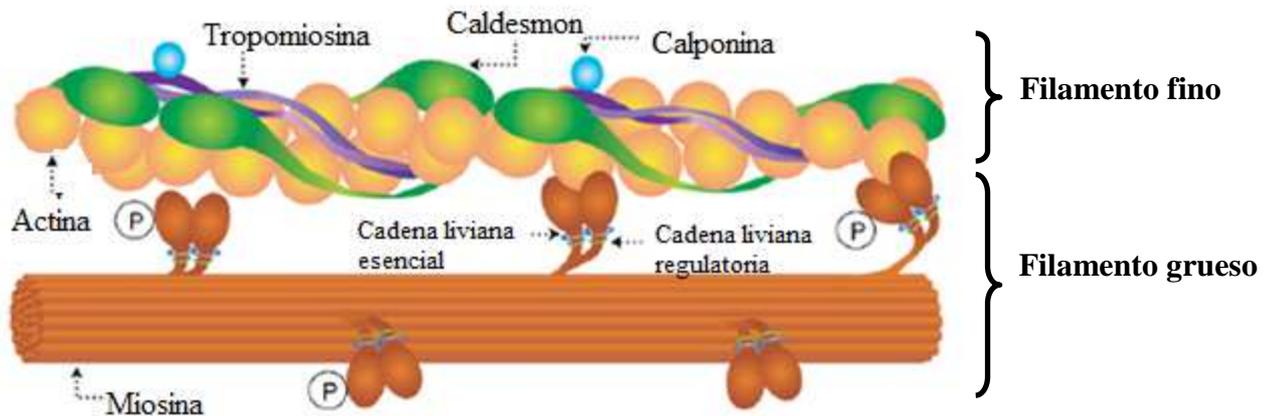


Figura 3: Composición de los filamentos contráctiles en el músculo liso vascular. El filamento grueso está compuesto por moléculas de miosina II. Cada molécula es un hexámero consistente en dos cadenas pesadas y cuatro cadenas livianas, dos esenciales y dos regulatorias. Cada cadena pesada se asocia con una cadena esencial y una regulatoria. El filamento fino está compuesto por actina, tropomiosina, caldesmona y calponina. La fosforilación (P) de las cabezas de miosina permite su movimiento por el filamento de actina por ciclos de formación de puentes cruzados. Adaptado de[19].

3.2.2. Regulación de los ciclos de puentes cruzados actina-miosina.

El aumento en la $[Ca^{++}]_i$ es el disparador de una cascada de eventos que termina incrementando la actividad ATPasa de la miosina[14]. El primer paso es la unión del Ca^{++} a la proteína citoplásmica CaM. A continuación el complejo Ca^{++} - CaM se une a la MLCK produciendo su activación. Esta quinasa activada fosforila las cadenas livianas regulatorias de la miosina transfiriendo un fosfato del ATP al residuo de serina 19[1]. La fosforilación de las cadenas livianas regulatorias altera la conformación de las cabezas de miosina incrementando su actividad ATPasa[14]. Esto permite el movimiento de las cabezas de miosina sobre el filamento de actina

mediante ciclos de formación de puentes cruzados que generan tensión o producen el acortamiento del músculo(figura 3)[1].

Mientras las cabezas de miosina permanecen fosforiladas continúan los ciclos repetitivos de puentes cruzados y por tanto la contracción. La actividad contráctil del MLV está determinada primordialmente por el estado de fosforilación de la cadena liviana regulatoria de la miosina y éste es un proceso altamente regulado[17].

El MLV contiene otra proteína denominada fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MLCP). Esta enzima es capaz de remover el grupo fosfato de las cadenas livianas regulatorias y restaurar el estado relajado. La MLCP está sujeta a regulación por una pequeña proteína de unión a GTP denominada RhoA. Esta es activada por la unión del GTP y activa a otra proteína denominada Rho quinasa. La Rho quinasa fosforila e inactiva a la MLCP. Esta última inactiva no puede remover el fosfato de las cadenas regulatorias de la miosina, lo cual promueve la ocurrencia de los ciclos de puentes cruzados y por tanto la contracción del MLV. A la inversa, la inhibición de la Rho quinasa por el compuesto de bajo peso molecular Y-27632 aumenta la actividad de la MLCP lo cual conduce a la relajación. Cuando el MLV es estimulado por agonistas neurohumorales, se moviliza el Ca^{++} para encender la actividad de la MLCK y se activa la vía de la RhoA para inhibir a la MLCP y mantener así el estado contráctil (figura 4)[1].

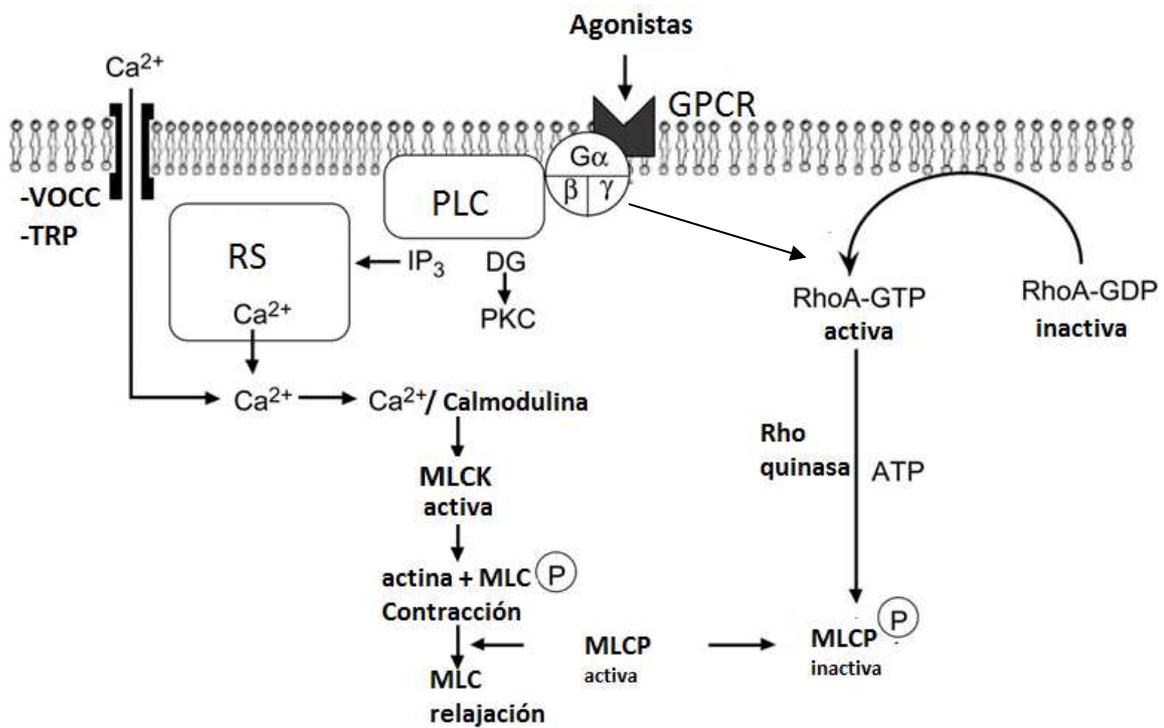


Figura 4: Regulación de la contracción del músculo liso vascular. El incremento en la concentración de $[Ca^{++}]_i$ es el estímulo para la activación de la maquinaria contráctil. Las vías de aumento son por entrada desde el espacio extracelular a través de VDCC o por liberación desde reservorios intracelulares sumada a entrada de calcio por canales TRP como ocurre en respuesta a agonistas (neurotransmisores, hormonas, etc). El Ca^{++} en el citoplasma se une a la CaM y el complejo activa a la MLCK. Esta fosforila (P) la cadena ligera reguladora de la miosina (MLC) lo que conlleva a la formación de ciclos de puentes cruzados actina-miosina y a la contracción. La acción de los agonistas sobre los Receptores Acoplados a Proteína G (GPCR) también estimula la vía de la RhoA/Rho quinasa que inhibe a la MLCP para mantener la contracción. Adaptado de[17].

3.2.3. Vías de incremento de la $[Ca^{++}]_i$ en el MLV.

El incremento en la $[Ca^{++}]_i$ global que dispara la contracción del MLV puede producirse por dos vías: **1)** entrada desde el espacio extracelular, **2)** liberación desde reservorios intracelulares.

1) Entrada de Ca^{++} desde el espacio extracelular.

El influjo de Ca^{++} desde el exterior celular es mediado por distintos tipos de canales iónicos en la membrana plasmática. La vía mejor caracterizada de entrada de Ca^{++} a la célula utiliza canales operados por voltaje (VDCC). Estos se activan por despolarización del potencial de membrana y son altamente selectivos al Ca^{++} [20].

Existen dos tipos de VDCC en la vasculatura. Los de tipo L, sensibles a las dihidropiridinas (un grupo de fármacos utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial), y los de tipo T o insensibles a las dihidropiridinas[18, 21]. En MLV la entrada de Ca^{++} se da principalmente por los canales de tipo L y en menor medida por los de tipo T[1]. El tipo de acoplamiento exito-contráctil producido por la despolarización de la membrana plasmática con la consecuente apertura de los VDCC se denomina acoplamiento electro-mecánico[20].

Otra vía de entrada de Ca^{++} a la célula utiliza canales catiónicos no selectivos. Estos canales a diferencia de los VDCC son insensibles al potencial de membrana y no son selectivos al Ca^{++} ya que típicamente también permiten el influjo de Na^+ y otros cationes mono y divalentes. A este grupo pertenecen los canales operados por receptor (ROC) y canales operados por depósito (SOC) de los cuales hoy se sabe que las entidades moleculares que los componen son los canales TRP (Transient Receptor Potential) [22].

Los TRP pertenecen a una superfamilia de canales catiónicos con más de 10 isoformas detectadas en el músculo liso vascular. Se clasifican en varias subfamilias de acuerdo al estímulo que los activa y a la presencia de dominios regulatorios citosólicos. El TRP canónico (TRPC) se expresa ampliamente en la vasculatura y tiene un rol importante en la regulación

del tono vascular. Miembros de esta subfamilia como TRPC1 se asocian a la entrada de Ca^{++} en respuesta al vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{++} (típicamente el RS) producida por agonistas. Este influjo de Ca^{++} mediado por SOC en respuesta al vaciamiento del RS por agonistas se denomina entrada capacitiva de calcio (ECC)[22].

El tipo de acoplamiento exito-contráctil producido por el incremento del Ca^{++} por entrada vía canales TRP sumado a la liberación desde depósitos intracelulares se denomina acoplamiento fármaco-mecánico, ya que ocurre independientemente de cambios en el potencial de membrana o activación de VDCC[20]. Este tipo de acoplamiento se produce en respuesta a vasoconstrictores como la NA y está ligado a la hidrólisis mediada por receptor del fosfatidilinositol[1].

2) Liberación de Ca^{++} desde reservorios intracelulares.

El Ca^{++} almacenado en organelos intracelulares provee de otra vía para el incremento de la $[\text{Ca}^{++}]_i$. El principal sitio de almacenamiento y liberación de este ion en la célula muscular lisa es el RS [15, 18, 21].

La liberación de Ca^{++} desde el RS se produce a través de dos proteínas canales localizadas en su membrana; el canal de Ca^{++} sensible a la ryanodina, denominado receptor de ryanodina (RyR), y el canal de Ca^{++} activado por Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) denominado Receptor de IP_3 (IP_3R)[15, 21].

En el músculo liso existen tres genes que codifican para tres isoformas del RyR (RyR 1-3) siendo RyR2 y RyR3 las isoformas predominantes[15]. Los RyR son grandes complejos homotetraméricos que atraviesan la membrana del RS y poseen una gran región amino terminal que mira al citosol y contiene el sitio de unión al Ca^{++} y un pequeño extremo carboxi-terminal en el lumen del RS[21].

El activador del RyR es el Ca^{++} y su actividad se inicia cuando la $[\text{Ca}^{++}]_i$ circundante se incrementa suficientemente por influjo desde el espacio extracelular vía VDCC de tipo L. La activación del RyR es un fenómeno conocido como liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} (CICR)[15].

Cuando la CICR se produce en el RS central puede inducir la actividad contráctil por propagación de un tipo de señales de Ca^{++} denominadas Olas de Calcio (Ca^{++} waves)[15]. Estas se definen como incrementos en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ que se propagan a través de toda la fibra muscular lisa desde su sitio inicial de producción en el IP_3R [21]. Sin embargo, cuando la CICR se activa en el RS periférico puede inducir la relajación del MLV, como se verá con más detalle en la sección 3.3.

Los IP_3R son grandes complejos heterotetraméricos que atraviesan la membranas del RS con una gran porción amino-terminal citosólica que posee el sitio de unión a IP_3 y un pequeño extremo carboxi-terminal también citosólico[21]. Los IP_3R típicamente son activados por vasoconstrictores neurohumorales. El mecanismo consiste en la unión de estos vasoconstrictores a GPCR en la membrana plasmática de la célula muscular. Específicamente a aquellos acoplados a Gq o G_{11} . La unión del agonista a estos receptores estimula a la enzima fosfolipasa C (PLC) la cual produce los segundos mensajeros IP_3 y diacilglicerol (DAG) a partir de la hidrólisis del fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) asociado a la membrana plasmática. El IP_3 generado por esta vía difunde hacia el citoplasma para unirse al IP_3R en la membrana del RS e inducir la apertura del canal y la liberación de Ca^{++} hacia el citosol [15, 18, 21]. La liberación de calcio vía IP_3 se denomina liberación de calcio inducida por IP_3 o IICR[15]. El DAG estimula a la proteína quinasa C (PKC) la cual produce inhibición de canales de K^+ contribuyendo a la despolarización de la membrana plasmática[11].

La IICR contribuye al aumento de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ global para iniciar la actividad contráctil, pero también puede resultar en incrementos espacialmente muy localizados de Ca^{++} denominados puffs. La respuesta a los puffs de Ca^{++} puede ser la iniciación de olas de calcio que, como se explicó anteriormente, son propagadas por la CICR promoviendo la actividad contráctil o bien pueden aumentar la conductancia al K^+ promoviendo la relajación [15].

3.3. Relajación del MLV.

En líneas generales para que la relajación del músculo liso tenga lugar debe producirse una disminución en la $[Ca^{++}]_i$ global. Existen distintas vías de remoción del $[Ca^{++}]_i$ que involucran proteínas ubicadas en el sarcolema y en el RS.

Un mecanismo importante de remoción del Ca^{++} citosólico es la Ca^{++} - ATPasa de la membrana plasmática (PMCA). Esta proteína bombea Ca^{++} hacia el espacio extracelular intercambiándolo por dos protones, manteniendo así la electroneutralidad. La PMCA posee un dominio autoinhibitorio capaz de unirse a la CaM lo cual la libera de la inhibición e incrementa su afinidad por el Ca^{++} y la velocidad de transporte de este ion hacia el espacio extracelular[17, 18]. También está sujeta a regulación por PKA y PKG las cuales reducen su autoinhibición[18].

Otro mecanismo de extrusión de Ca^{++} mediado por el sarcolema viene dado por el intercambiador Na^+ / Ca^{++} . La salida del ion por esta vía utiliza la energía del gradiente electroquímico del Na^+ y transporta un ion Ca^{++} hacia el exterior a la vez que ingresa 3 iones Na^+ a la célula[18].

La recaptación de Ca^{++} por el RS es otro mecanismo importante para disminuir la $[Ca^{++}]_i$. Este ion es transportado hacia el interior del RS por la acción de SERCA [15, 21]. Existen 3 isoformas de SERCA codificadas por tres genes diferentes. En el músculo liso la isoforma predominante se denomina SERCA2b [15].

La actividad de SERCA está regulada negativamente por una pequeña proteína presente en la membrana del RS denominada fosfolamban, la cual a su vez es blanco de la PKA y la PKG[21]. La fosforilación de fosfolamban libera de la inhibición a SERCA incrementando su actividad ATPasa con el resultado del incremento en la captación de Ca^{++} por el RS. Dentro del RS el Ca^{++} se une a proteínas como la calsecuestrina y la calreticulina formando un complejo que puede disociarse rápidamente cuando se requiere su liberación[15]. La unión a estas proteínas reduce el gradiente de concentración de Ca^{++} libre facilitando su captación continua desde el citoplasma[21].

La inhibición de los canales de Ca^{++} del sarcolema también conduce a la relajación de la célula muscular. La repolarización de la membrana plasmática produce el cierre de los VDCC y el consecuente bloqueo de la entrada de Ca^{++} . El restablecimiento del potencial de membrana está determinado por incrementos en la permeabilidad al K^+ [1, 11]. Otro tanto sucede cuando el potencial de membrana disminuye más allá del potencial de reposo (hiperpolarización).

El MLV contiene varios tipos de canales de K^+ entre los que se encuentran:

- Canales de K^+ dependientes de voltaje (K^+_{v}): estos canales se abren como consecuencia de la despolarización del potencial de membrana de las células del MLV y el subsiguiente eflujo de K^+ conduce a la repolarización. El bloqueo de estos canales puede producirse por el compuesto 4-Aminopiridina (4-AP) en un rango de concentración de entre 0.3 - 1.1 mM[11].
- Canales de K^+ sensibles al ATP (K^+_{ATP}): estos canales subrayan el nexo funcional entre el metabolismo celular y la excitabilidad de la membrana. Su bloqueo resulta en la despolarización y contracción del MLV. Su activación se asocia con ciertas respuestas fisiopatológicas como por ejemplo la dilatación arterial sistémica en respuesta a la hipoxia. Su inhibición se produce en respuesta a sulfonilureas como la glibenclamida y la tolbutamida. La glibenclamida es el inhibidor usado con más frecuencia en estudios con músculo liso arterial, en un rango de concentraciones entre 20-200 nM. Se ha reportado que la 4-AP a las concentraciones indicadas para bloquear los K^+_{v} puede inhibir las corrientes por estos canales. También concentraciones elevadas de TEA, en el entorno de 7 mM pueden tener efecto inhibitorio sobre estos canales. Por último, vasoconstrictores como la NA, endotelina, serotonina y vasopresina producen la inhibición de estos canales por activación de la PKC[11].
- Canales rectificadores entrantes (Kir): estos canales se expresan en el MLV de arterias de pequeño diámetro y contribuyen al

mantenimiento del potencial de membrana en reposo y del tono basal. Su bloqueante selectivo es el Ba^{2+} a concentraciones inferiores a $50 \mu M$ [11].

- Canales BK_{Ca} : son canales activados por incrementos altamente localizados en la $[Ca^{++}]_i$ denominados chispas de Ca^{++} [1, 11] y también por despolarización del potencial de membrana[11]. Estos canales pueden ser bloqueados por TEA, Iberiotoxina y caribdotoxina, siendo la iberiotoxina el bloqueante más selectivo con un valor de inhibición media de $10 nM$ [11].

Una chispa de Ca^{++} es un tipo de señal de calcio rápida, transitoria y altamente localizada que ocurre debido a la apertura de un grupo de canales RyR en el RS[23]. Típicamente cada una representa la apertura simultánea de entre 4 a 6 canales RyR[21].

Debido a sus propiedades transitorias y localizadas, una sola chispa de Ca^{++} es capaz de producir un incremento local muy elevado de la concentración de Ca^{++} sin contribuir al incremento de la concentración global del ion en el citoplasma. Por esta razón tienen la capacidad de modular aquellos procesos Ca^{++} - dependientes que no responden a incrementos en la concentración global[23].

En el músculo liso arterial las chispas de Ca^{++} se producen en las regiones del RS periférico y activan *clusters* de canales BK_{Ca} lo que produce corrientes transitorias salientes de K^+ denominadas STOCs (Spontaneously Transient Outward Currents). Éstas producen una hiperpolarización de la membrana plasmática con el consecuente cierre de los VDCC lo que conduce a la vasodilatación arterial. Este es un mecanismo importante para dilatar arterias y fue descrito por primera vez por Nelson y cols. en arterias cerebrales presurizadas de rata[24].

La relajación arterial inducida por chispas de Ca^{++} es un mecanismo vasodilatador importante en vasos de resistencia pero parece tener menor relevancia en vasos de conducción[25].

Por último, la relajación del MLV también puede producirse en respuesta a estímulos que aumenten la actividad de la MLCP[17].

4. Hipertensión arterial (HTA): definición, prevalencia y tratamiento.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos entre los que se incluyen la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas y las trombosis venosas profundas, entre otras.

Dentro del grupo de las enfermedades crónicas no transmisibles, las ECVs constituyen la principal causa de defunciones a nivel mundial. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. A este dato se suma el hecho que más de las tres cuartas partes de las defunciones se producen en los países de ingresos medios y bajos. Esto se debe a una mayor exposición a factores de riesgo, además de un menor acceso a programas preventivos y de diagnóstico precoz, en comparación con los países de mayores ingresos [26].

La presión arterial (PA) elevada o HTA es un trastorno hemodinámico en el que los vasos sanguíneos están sometidos a una presión persistentemente elevada y es el principal factor de riesgo modificable de ECV[27]. En líneas generales se definen como hipertensos aquellos sujetos que presentan valores de presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y/o presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg[26]. Aproximadamente dos tercios de los accidentes cerebrovasculares y la mitad de los casos de cardiopatía isquémica son atribuibles a la HTA[28]. La atención clínica de estas enfermedades implica una pesada carga económica para los sistemas de salud, ya que la terapia es costosa y prolongada.

La prevalencia mundial de HTA se situó en un 22% en 2012 en adultos de 18 años o más. En 2013 los países miembros de la OMS acordaron un plan de acción para el control de las enfermedades no transmisibles entre cuyas metas se encuentra reducir la prevalencia de HTA en un 25% para el año 2020[26].

En Uruguay la HTA también constituye un serio problema de salud pública ya que el 33% de la población adulta la padece y solo entre un 12-14% conoce su condición y tiene su PA controlada[29, 30]. Una vez realizado el diagnóstico de HTA se indican al paciente medidas higiénico-dietéticas que implican cambios en su estilo de vida, con práctica de ejercicio aeróbico, reducción en la ingesta de sal, incremento del consumo de frutas y verduras, cesación del tabaquismo, consumo moderado de alcohol, etc. Dependiendo del caso estas medidas iniciales pueden ser suficientes para normalizar las cifras de PA. El inicio de la terapia farmacológica depende del grado de HTA y del riesgo asociado de cada paciente[31].

Existen varias familias de fármacos antihipertensivos entre los que se incluyen diuréticos, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I en angiotensina II (IECA), antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARAII), antagonistas de los canales de calcio, bloqueantes de los receptores adrenérgicos α y antagonistas de la renina[31]. Su utilización puede ser a modo de monoterapia o en terapia combinada, dependiendo de cada caso. En la mayoría de los pacientes el control de la PA se logra con los fármacos disponibles. De todos modos solo un pequeño número de pacientes permanece con PA controlada a lo largo del tiempo, entre otros factores por el costo de la terapia que en muchos casos es motivo de no adherencia al tratamiento[32].

Otro problema con los fármacos disponibles es la existencia de efectos adversos, que en muchos casos pueden ser importantes. Por citar algunos ejemplos, los diuréticos como las tiazidas tienen como eventuales efectos adversos el desarrollo de hipopotasemia a la vez que pueden causar gota y aumentar el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Los calcioantagonistas pueden causar edema de miembros inferiores, que en algunos casos puede llegar a ser significativo y molesto. Entre los principales efectos adversos de los IECA se citan la tos, que puede obligar a suspender el tratamiento en un 7% de los casos, y el angiodema que es una complicación rara pero potencialmente letal [31].

5. Algunas consideraciones sobre las plantas medicinales y sus usos.

Históricamente, los medicamentos herbarios han tenido un papel hegemónico en la terapéutica y los productos de origen natural han sido las fuentes más exitosas de nuevas medicinas. En una revisión acerca del origen de drogas introducidas en el período 1981-2002, Newman y cols. encontraron que alrededor de la mitad eran productos naturales o derivados sintéticos de éstos. Este dato es especialmente relevante en lo que refiere a drogas antihipertensivas donde, de las 74 drogas introducidas en el período, 48 son atribuidas a productos naturales o sus derivados sintéticos[33]. Sin ir más lejos, los IECA, los bloqueantes del receptor beta y los ARAll, aunque obtenidos por síntesis, son ejemplos de fármacos que deben buena parte de su descubrimiento a un farmacóforo de origen natural[34].

En las últimas dos décadas se ha evidenciado un resurgimiento del interés por las plantas medicinales. En países desarrollados se ha visto un notable incremento en el uso de suplementos y productos vinculados a la medicina complementaria o alternativa. De hecho la OMS ha reconocido a la medicina tradicional como un gran bloque de conocimiento para la atención primaria en salud, indicando que entre el 60-80 % de la población mundial utiliza la medicina alternativa basada principalmente en el uso de extractos vegetales[35].

Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica [36].

En la práctica el consumo de plantas medicinales constituye un segmento no controlado de la terapia farmacológica. A pesar de una larga tradición de uso solo una cantidad relativamente pequeña de especies se ha estudiado para posibles aplicaciones médicas. En general se dispone de

muy escasa información científica sobre su seguridad y eficacia. Debido a esta realidad en la mayoría de los casos los médicos no pueden prescribirlas y los pacientes las emplean automedicándose.

El Uruguay tiene tradición de consumo de hierbas medicinales siendo ésta una práctica que abarca todos los niveles sociales. Esto se debe en parte a que se trata de plantas fácilmente accesibles ya que algunas pueden obtenerse por recolección propia o bien adquirirse libremente en el mercado a muy bajo costo. También a la falsa creencia de que por ser productos naturales no son perjudiciales para la salud.

Ciertas plantas nativas son consideradas panaceas, lo que implica que se estiman una solución para casi cualquier tipo de dolencia. Un caso típico es la Carqueja. Con este nombre vernáculo se conocen varias especies del género *Baccharis* L.[37-39], perteneciente a la familia *Asteraceae*, la cual representa aproximadamente el 10 % de la flora mundial[37].

Una variedad de carqueja, *Baccharis trimera* (Less.) DC. se encuentra distribuida en el sur de Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y el noreste argentino[39] y es ampliamente reconocida en nuestro país por su empleo en la medicina popular. Desde el punto de vista anatómico *Baccharis trimera* (Less.) DC. se describe como un subarbusto ramificado desde la base, de unos 40-50 cm de altura, con tallo trialado e inflorescencias en forma de capítulo[39, 40] (figura 5).

Entre sus usos etnobotánicos, se hace referencia a su acción hipoglucemiante, hepatoprotectora, digestiva, antiinflamatoria, antimicrobiana, antihelmíntica, antioxidante, afrodisíaca, hipotensora, entre otras propiedades [40-42]. Algunas de estas propiedades han sido estudiadas y en algunos casos validadas científicamente. Por ejemplo, su efecto hipoglucemiante[43-45], sus propiedades hepatoprotectoras [46], digestivas[47], antiinflamatorias[48-51] y antioxidantes[52]. En cuanto a su efecto hipotensor existen algunos trabajos en la literatura que vinculan su acción a territorios vasculares; efecto dilatador en vena porta de rata[42] y efecto dilatador sobre el cuerpo cavernoso en cobayo[41] lo cual estaría en acuerdo con su denominación como "viagra criollo". A la fecha, no se han encontrado trabajos científicos que estudien su acción

sobre vasos arteriales. Puesto que las variables que determinan la presión arterial son el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica (RVP), es necesario examinar sobre cual de ellos actúa una sustancia antihipertensiva. Dado que el evento fisiopatológico central en la HTA esencial es el incremento sostenido en la RVP, es importante identificar si una sustancia afecta primariamente esta variable ya que esto significaría que sus efectos están más dirigidos hacia el centro fisiopatológico del trastorno[34]. Por tanto, una posible acción vasodilatadora arterial podría ser, al menos en parte, responsable de su presunto efecto hipotensor.

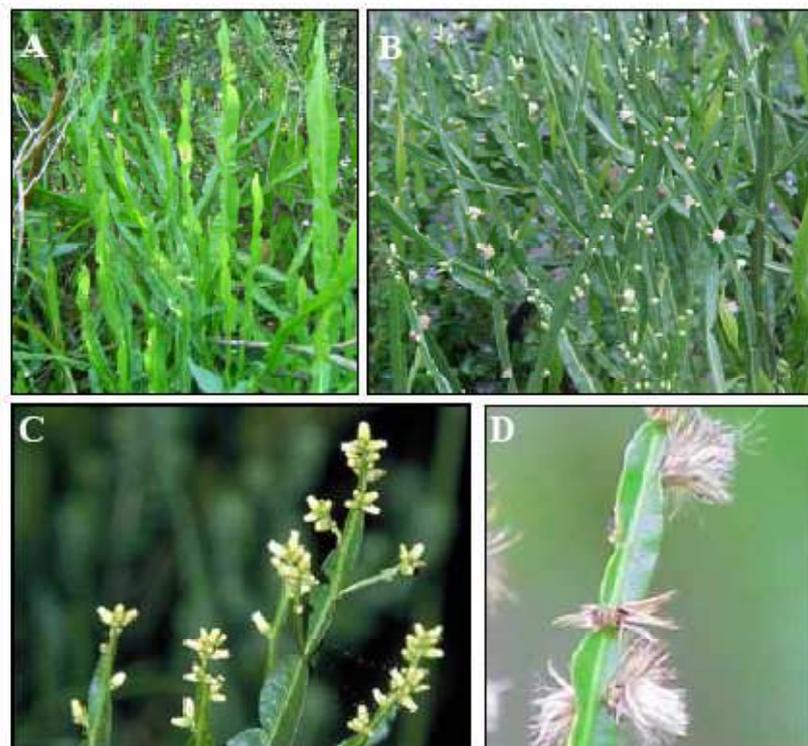


Figura 5: Plantas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. A- estadio vegetativo, B- estadio reproductivo, C y D- inflorescencias. Tomado de[40].

El análisis de la composición química de *Baccharis trimera* (Less.) DC. varía de acuerdo a la región de la planta considerada. En la parte aérea, los constituyentes son principalmente flavonoides (hispidulina, rutina, eupatorina, luteolina, nepetina, apigenina, kaempferol, cirsimarina, cirsiol, eriodictiol, 5-hidroxi-3', 4',6,7-tetrametoxiflavona, quercetina, 3-*o*-metilquercetina, genkwanina e 7,4'-*di-o*-metilapigenina), diterpenos (bacrispina, 1-desoxibacrispina, ácido hautriwaico), lactonas diterpénicas de tipo trans-clerodano, estigmasterol, aceite esencial compuesto por α -pineno, canfeno, limoneno, acetato de carquejilo, carquejol, α -ocimeno, ledol y una saponina derivada del ácido quinocístico. Por otro lado en el sistema radicular se encuentran diésteres terpénicos relacionados con el carquejol[40].

Los flavonoides están entre los metabolitos secundarios encontrados en mayor cantidad y son los que presentan la mayor actividad terapéutica[40]. Sus efectos protectores sobre el sistema cardiovascular han sido extensamente estudiados. Por citar algunos ejemplos, el efecto vasodilatador arterial de la quercetina ha sido probado en varios trabajos[53-59]. Otros flavonoides presentes en *Baccharis trimera* (Less.) DC. como rutina[60], luteolina [59] y apigenina[59, 61] también presentan efecto dilatador arterial.

HIPÓTESIS.

Dadas las presuntas propiedades hipotensoras de la *Baccharis trimera* (Less.) DC, se elaboró la hipótesis de que esta especie podría tener un efecto vasodilatador arterial. Con base en la literatura consultada y de acuerdo a los componentes químicos que se han hallado en esta especie (principalmente los flavonoides) el mecanismo más probable que podría explicar la vasodilatación sería un aumento en la producción de NO desde el endotelio vascular. Aunque, *a priori*, no podrían descartarse acciones directas sobre las células del músculo liso vascular.

OBJETIVO GENERAL.

Aportar evidencia científica que avale el uso de una infusión de *Baccharis trimera*(Less.) DC. para tratamientos antihipertensivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

A) Investigar la posible acción vasodilatadora de una Infusión de *Baccharis trimera* (Less.) DC utilizando un preparado *in vitro* de anillo de aorta de rata.

B) En caso de observarse respuesta vasodilatadora de la Infusión de *Baccharis trimera* (Less.) DC sobre anillos de aorta de rata, caracterizar dicha respuesta construyendo una curva dosis-respuesta.

C) Estudiar el mecanismo de acción de la Infusión de *Baccharis trimera* (Less.) DC utilizando el mismo preparado *in vitro* .

MATERIALES Y MÉTODOS.

Preparación del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

El material vegetal fue comprado en una herboristería de plaza y su autenticidad fue corroborada por el Profesor Eduardo Alonso Paz del Herbario Arechavaleta. Un ejemplar de muestra fue depositado en dicho herbario con el número MVFQ4359.

La obtención del extracto acuoso (infusión) de *Baccharis trimera* (Less.)DC. (desde ahora IBT) fue realizada en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química, Universidad de la República por las bachilleres Ximena Arias y María José Laprovitera.

Se procedió agregando 1000 ml de agua destilada en ebullición a 100 gramos del material vegetal previamente macerado. La suspensión obtenida fue agitada durante 30 minutos, filtrada y posteriormente liofilizada.

Análisis del extracto por HPLC.

El análisis de los componentes de la IBT fue realizado en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química, Universidad de la República por el Dr. Horacio Heinzen y las bachilleres Ximena Arias y María José Laprovitera. La técnica utilizada fue la Cromatografía de Líquidos a alta presión (HPLC). Se utilizó un equipo Hewlett Packard 1050HPLC/DAD equipado con un METAPHOR® ODS-3 (150 x 4,6) mm con un tamaño de partícula de 5µm. Se llevó a cabo un gradiente de elución. El perfil de elución se registró a longitudes de onda de 280, 325, 354 y 370 nm. Los solventes empleados fueron, solvente A:

Agua/Ácido acético (97,5:2,5 v/v) y solvente B: Metanol/Ácido Acético (97,5:2,5 v/v) a un flujo de 1,2 mL/min. Para el análisis de la IBT se utilizó un gradiente escalonado. La relación de solventes A/B fue 80:20 los primeros 20 minutos, 50:50 durante 20 a 35 minutos, luego 40:60 de 35 a 39 minutos y por último 80:20 hasta los 45 minutos. Los compuestos eluyentes fueron identificados por sus tiempos de retención y por la coincidencia de sus espectros UV con los contenidos en una biblioteca de polifenoles realizada en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales.

Ensayos de vasodilatación en anillos de aorta de rata.

La elección de un preparado *in vitro* como el anillo aislado de aorta se debió a que posee como ventajas el requerir pequeñas cantidades de sustancias, estar libre de los ajustes homeostáticos sistémicos, permitir el fraccionamiento de un extracto basado en la actividad biológica (fraccionamiento bioguiado) y determinar posibles efectos sinérgicos. Una objeción que se hace a esta preparación es la de que corresponde a un vaso de conductancia, habida cuenta de que las alteraciones que conducen a la HTA tienen lugar en vasos de resistencia. No obstante, hay que considerar que la túnica media de la aorta de la rata está compuesta fundamentalmente por músculo liso, a diferencia de la túnica media de la aorta del humano, que contiene mucha cantidad de fibras elásticas. Esta característica le permite a esta preparación responder eficazmente a los agentes que actúan sobre el músculo liso vascular[62].

Diseción de la arteria aorta.

Ratas macho derivadas de la cepa Wistar de entre 250-300 g de peso fueron heparinizadas (50 UI/100 g i.p) y anestesiadas con pentobarbital

sódico (40mg/Kg i.p.). La elección del sexo de los animales se debió a las reportadas influencias de los estrógenos sobre la producción de óxido nítrico (NO) desde el endotelio vascular [63] y a la importancia que este compuesto tiene en el proceso de vasodilatación[7].

Una vez anestesiados los animales se les realizó una toracotomía medial. Se disecó la arteria aorta descendente torácica y se colocó en una placa de Petri con solución Krebs-Henseleit (K-H) oxigenada. Se procedió a retirar la adventicia y el tejido adiposo peri-vascular y se cortó la arteria en anillos de 3 mm de espesor aproximadamente.

Los animales utilizados en este estudio fueron tratados de acuerdo a las normas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y el protocolo de trabajo fue aprobado por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) (nº 071140-000646-10).

Registro de tensión vascular isométrica.

Cada anillo se colocó en un baño para órgano aislado (figura 6) consistente en:

a- una cámara de vidrio en la cual la temperatura se mantiene constante a 37 ° C por medio de un sistema de doble camisa por la que circula agua caliente.

b-un soporte de vidrio en el cual se inserta un fino alambre de acero cuya función es sujetar al anillo por la parte inferior.

c- un soporte de alambre de acero en forma de gancho que sostiene al anillo por la parte superior y lo conecta con el transductor de tensión.

d-un transductor de tensión isométrica (modelos Radnoti o Grass FT03).

e- un amplificador (modelos Radnoti o Grass PT11). Ambos modelos de amplificadores y transductores de tensión fueron calibrados para dar la misma respuesta frente a los cambios de tensión de los anillos.

El equipo cuenta con seis módulos individuales que permitieron el registro de seis anillos en forma simultánea.

La solución fisiológica utilizada fue un buffer K-H con la siguiente composición en mM: NaHCO₃ 20, NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, NaH₂PO₄ 1,2, CaCl₂, 1,2, glucosa 5.6. La misma se mantuvo burbujeada con una mezcla de 95 % de O₂ y 5% de CO₂ (carbógeno) para mantener la oxigenación del preparado y el pH de la solución en 7,42.

Los anillos se colocaron en cada cámara individual con 30 ml de solución K-H. Se utilizaron los soportes descritos anteriormente e indicados en la figura 6 como b y c. El soporte superior se conectó al transductor de tensión isométrica y este último a un amplificador. El transductor es un dispositivo que transforma la fuerza generada por los anillos en una señal eléctrica, la cual se digitalizó mediante un conversor A/D para su posterior visualización en un PC utilizando un software de adquisición de datos desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Cardiovascular.

Una vez montados en el baño los anillos fueron sometidos a una tensión pasiva equivalente a 2 gramos para lograr una óptima detección de los cambios de tensión activa. Posteriormente se dejó estabilizar el preparado durante un período de 60 minutos.

Remoción del endotelio.

En los ensayos que requirieron la remoción del endotelio, la misma se realizó en forma mecánica. Para ello, el segmento de aorta se extrajo de la manera descrita, luego se introdujo en su interior un tubo capilar de vidrio rugoso de calibre ligeramente inferior al calibre arterial. El mismo se rotó repetidamente en el lumen arterial, teniendo cuidado de no lesionar la capa muscular subyacente. La efectividad de la maniobra se confirmó desafiando a los anillos precontraídos con Noradrenalina (NA) con un bolo de Acetilcolina (ACh) 1×10^{-6} M. Una respuesta vasodilatadora inferior al

5% se consideró como evidencia de la remoción de la mayor parte de la capa endotelial [5].

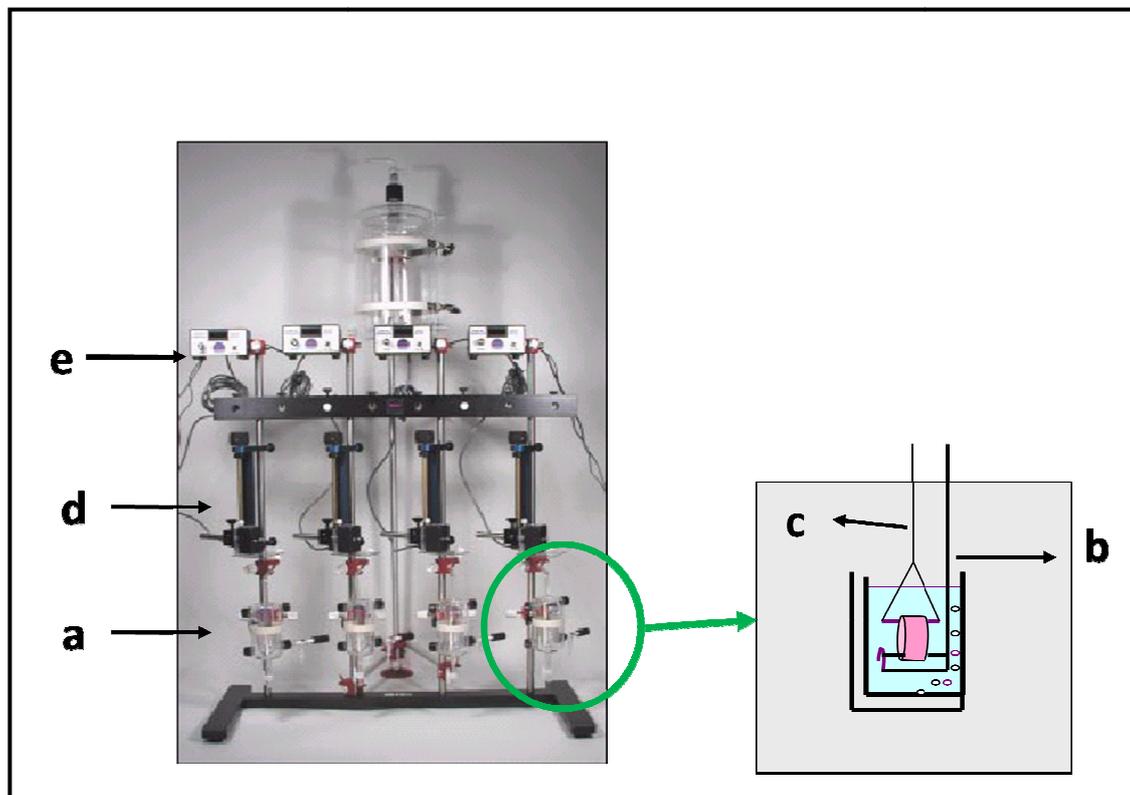


Figura 6. Modelo del baño para órgano aislado utilizado en este trabajo. a- cámara de vidrio con camisa de agua, **b-** soporte de vidrio para sujeción del anillo, **c-** gancho de alambre para sujeción del anillo, **d-** transductor de tensión isométrica, **e-** amplificador.

También se realizaron cortes histológicos de los anillos a fin de corroborar la remoción del endotelio y la integridad del músculo liso subyacente. Dichos cortes fueron realizados en la Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina de la UdelaR por la Dra. Elisa Montes de Oca.

Protocolo experimental.

Los anillos de aorta se pre contrajeron agregando al baño un bolo de 10 μ l de NA, lo cual correspondió a una concentración final en baño de 2 μ M. Esta concentración produjo una vasoconstricción (VC). Una vez que la respuesta constrictora alcanzó la fase de meseta se agregaron al baño 1000 μ l de IBT resuspendida en solución K-H. El extracto se disolvió en la solución K-H inmediatamente antes de su colocación en el baño.

Los anillos de control fueron pre-contraídos con NA del mismo modo descrito en el párrafo anterior, pero en lugar de un bolo de la infusión, se les colocó un bolo de igual volumen de solución K-H.

La vasodilatación (VD) de cada anillo de aorta en respuesta a la IBT fue calculada como porcentaje de disminución de la tensión medida en gramos, con respecto a la contracción máxima evocada por NA 2 μ M (figura 7). El porcentaje de VD fue calculado, en todos los casos, a los 100 minutos del agregado de la IBT al baño.

Construcción de curvas dosis-respuesta.

Se realizaron curvas dosis-respuesta en anillos con endotelio intacto y anillos a los cuales se les removió la capa endotelial.

Dado que no se hallaron en la literatura referencias respecto de la dosis de IBT a utilizar en este preparado, se decidió comenzar el estudio utilizando una concentración de la infusión que correspondería en forma aproximada a una taza de té (2g del extracto en 200 ml de solvente), intentando así reproducir el uso etnobotánico de ésta planta[64]. Luego, se utilizaron 4 dosis de IBT que fueron de $3,6 \times 10^{-6}$ a $3,2 \times 10^{-4}$ g/ml. Cada dosis de la IBT se probó en un grupo diferente de anillos (dosis no

acumulativas), los cuales fueron obtenidos de diferentes animales, asegurando así una mayor variabilidad biológica.

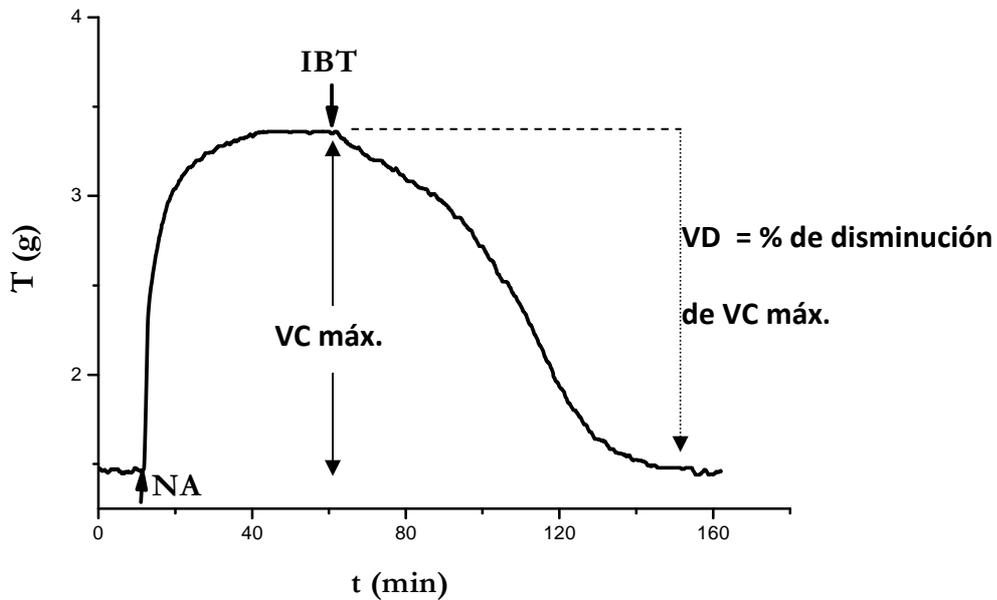


Figura 7. La VD de los anillos se calcula como el porcentaje de disminución de la contracción máxima evocada con NA. Curso temporal en minutos de la tensión (T) medida en gramos desarrollada por un anillo de aorta de rata en respuesta a NA 2 μ M y posterior agregado de IBT. VC máx.: Vasoconstricción máxima, VD: Vasodilatación. La VD se calculó como porcentaje de disminución de VCmáx.

Ensayos utilizando L-NAME.

Para explorar la participación del NO en el mecanismo de acción vasodilatador de la IBT, los anillos con endotelio intacto fueron pre incubados por 20 minutos con el inhibidor no selectivo de la Sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), N-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME).

Se utilizó una concentración de L-NAME de 100 μM . Luego los anillos se pre contrajeron con NA y en la meseta de la respuesta vasoconstrictora se desafiaron con la IBT en una concentración de $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml.

Ensayos utilizando Tetraetilamonio (TEA).

El posible rol de los canales de K^+ de la membrana plasmática en la vasodilatación inducida por IBT se exploró utilizando el inhibidor de canales de K^+ TEA [11, 65]. Para ello, anillos sin endotelio fueron pre incubados con el inhibidor en una concentración de 10 mM durante 20 minutos. Luego, se pre contrajeron con NA y en la meseta de la respuesta vasoconstrictora se colocó la IBT en una concentración de $1,6 \times 10^{-4}$ g/ml.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media de la vasodilatación de cada grupo de anillos \pm el desvío estándar (DS). En cada caso se estudió si los datos cumplían con los supuestos básicos de la estadística paramétrica. La distribución normal de la variable objeto de estudio (% de VD) entre los grupos se puso a prueba mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de varianzas entre las muestras se comprobó mediante el test de Levene. Dado que en todos los casos los datos cumplieron con los supuestos, las comparaciones entre dos muestras se realizaron mediante un test paramétrico (Test de t). Las comparaciones entre más de dos muestras se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, con test a *posteriori* de Tuckey para saber entre qué muestras existían diferencias significativas. Los valores de p inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. El programa utilizado para realizar los análisis fue PAST versión 2.17c [66].

RESULTADOS.

A. Estudio del efecto vasodilatador de la IBT sobre anillos de aorta de rata.

A.1. Perfil fitoquímico de la IBT.

Los principales componentes identificados en la IBT fueron polifenoles pertenecientes a la familia del ácido clorogénico, glicósidos de quercetina, quercetina libre, flavonoides de la metil quercetina como la 3-O-metilquercetina, isorhamentina y rutina. La identificación de estos componentes se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de estándares puros y sus espectros UV con los de los compuestos eluyentes. En la figura 8 se muestra un perfil típico de HPLC.

A.2. Ensayos de vasorrelajación en anillos con endotelio intacto.

El tratamiento de los anillos de aorta con NA 2 μ M produjo una VC promedio de 2 g, la cual estuvo dentro de lo esperado y reportado en la literatura [5]. La VC alcanzó la fase de meseta aproximadamente a los 30 minutos del agregado de esta sustancia al baño. En la figura 9a se muestra un registro típico de un anillo control pre-contraído con NA y luego tratado con solución K-H, en el cual no se observa VD en respuesta al agregado de un bolo de solución K-H. En la figura 9b se muestra un registro típico de un anillo de aorta con endotelio intacto pre-contraído con NA y posteriormente tratado con IBT en el que se observa una VD

completa aproximadamente a los 100 minutos de agregada la IBT en el baño del anillo. El porcentaje de VD promedio fue de $100,5 \pm 2,4$ en los anillos tratados con la IBT ($n=7$) y de $17,2 \pm 8,0$ ($n=5$) en los anillos control no tratados (figura 10). Cuando se compararon ambos grupos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

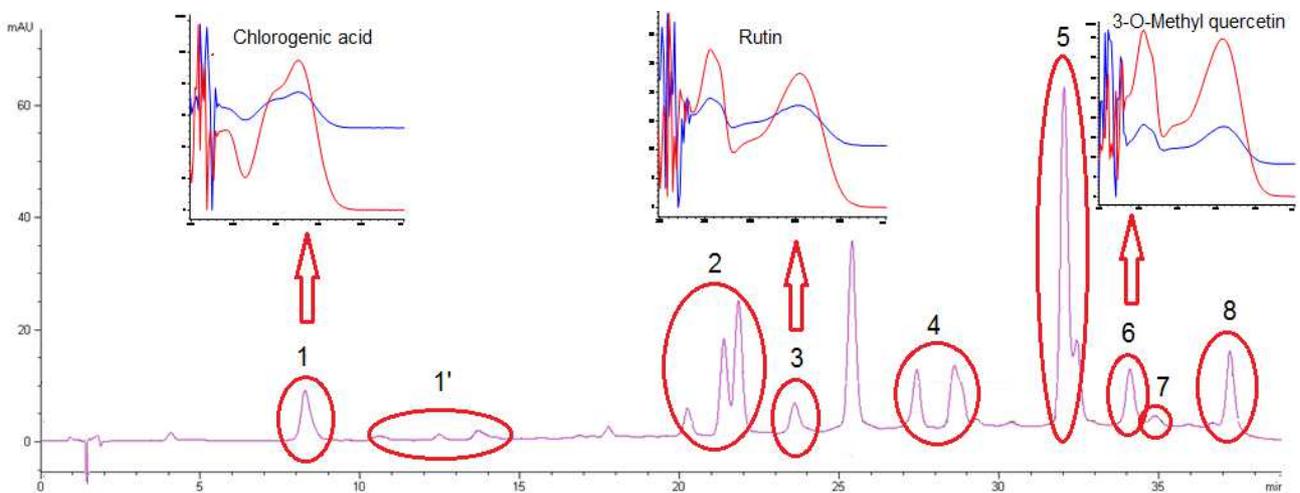


Figura 8. La IBT contiene principalmente polifenoles y flavonoides. Cromatograma de HPLC-DAD de la IBT registrado a 358 nm y asignación de picos de la corrida. 1 - Ácido clorogénico, 1'- derivados de ácido clorogénico, 2 - flavonoides derivados de la quercetina, 3-rutina, 4- 3-O-glicósidos de quercetina, 5-Metil quercetina, 6-3-O-Metil quercetina, 7- Isorhamentina, 8-3-O-Metil Isorhamentina.

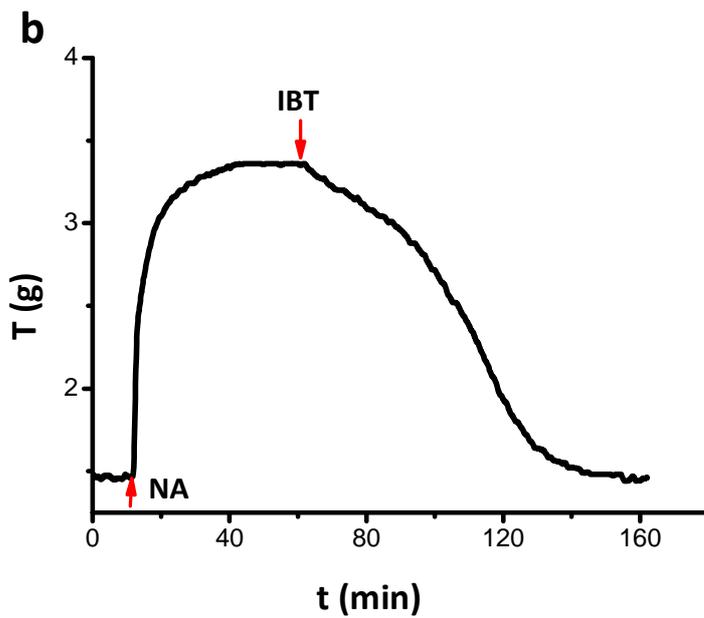
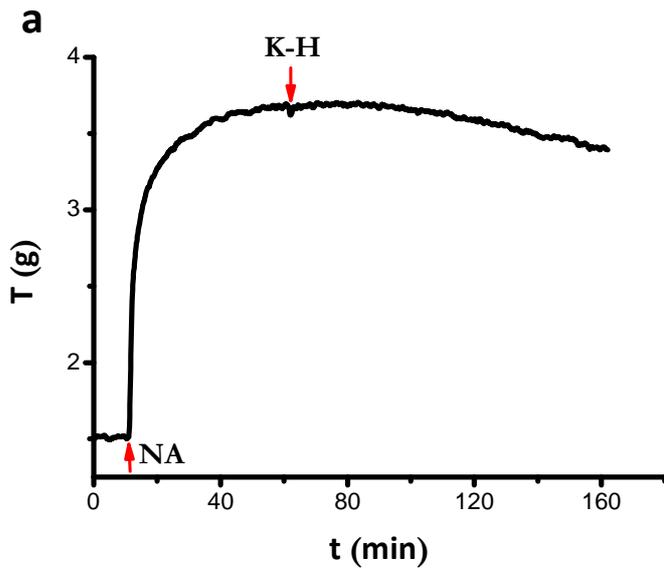


Figura 9. La IBT produce una caída de la tensión en los anillos de aorta con endotelio intacto pre-contráidos con NA. **a-** Curso temporal de la respuesta de un anillo control al cual se le agregó un bolo de solución K-H del mismo volumen que el bolo de IBT. **b-** Curso temporal de la respuesta de un anillo de aorta con endotelio intacto pre- contraído con NA al agregado de la IBT $3,2 \times 10^{-4}$ g/ml.

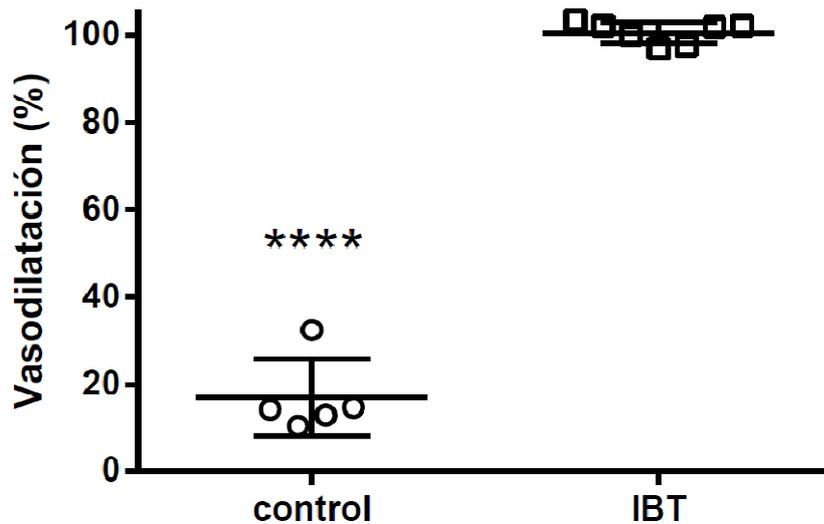


Figura 10. La IBT produce una VD significativa en los anillos con endotelio intacto. Los anillos tratados con IBT $3,2 \times 10^{-4}$ g/ml (n=7) tuvieron una VD promedio de $100,5 \pm 2,4$ %, mientras que en los anillos control no tratados (n=5) la VD fue $17,0 \pm 8,0$ %. Los datos se expresaron como media \pm DS. **** Diferencias significativas respecto al control ($p < 0.005$).

A.3. Construcción de curva dosis-respuesta en anillos con endotelio.

Con base en la vasodilatación observada en respuesta a la IBT $3,2 \times 10^{-4}$ g/ml, la cual estuvo en el entorno del 100%, se decidió realizar la curva dosis respuesta con concentraciones decrecientes. Cada dosis de la IBT se ensayó en un grupo de anillos diferente (dosis no acumulativas). La figura 11 muestra los resultados obtenidos. El porcentaje de VD disminuye al disminuir la concentración de la IBT. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 1.

[IBT] (g/ml)	% VD \pm DS	N
$3,2 \times 10^{-4}$	$100,6 \pm 2,4$	7
$1,6 \times 10^{-4}$	$95,2 \pm 8,0$	5
$3,2 \times 10^{-5}$	$83,7 \pm 18,6$	6
$1,6 \times 10^{-5}$	$87,3 \pm 6,1$	5
$3,2 \times 10^{-6}$	$16,7 \pm 3,4$	6

Tabla 1. Porcentajes de VD obtenidos en respuesta a la IBT en anillos con endotelio intacto.

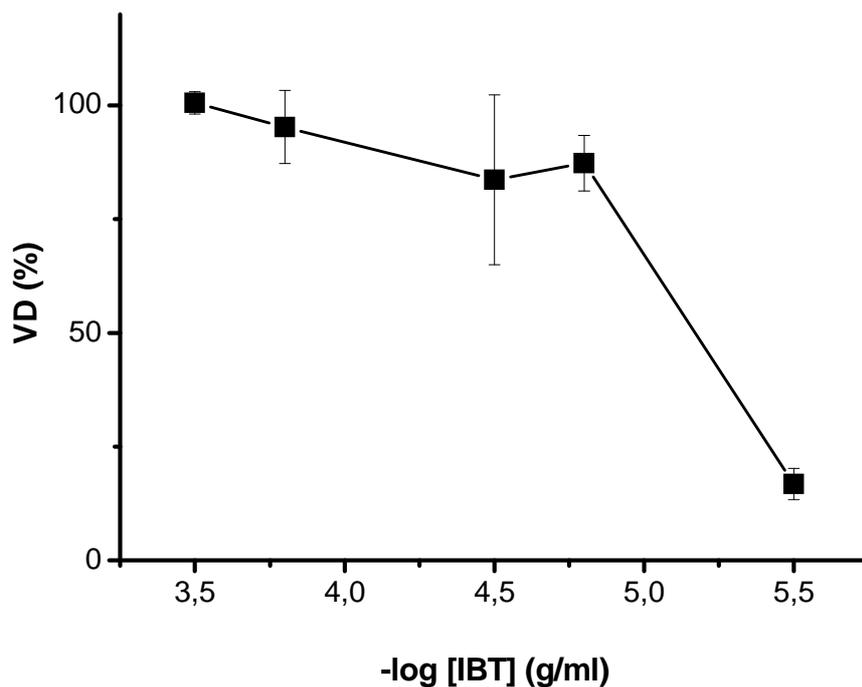


Figura 11. La VD de los anillos con endotelio intacto es dosis-dependiente. Se muestra el % de VD obtenido en distintos grupos de anillos con endotelio intacto, en función del - log de la concentración de IBT. Los datos representan la media de los valores \pm DS. Ver tabla 1.

B. Estudio del mecanismo de acción vasodilatadora de la IBT sobre anillos de aorta de rata.

B.1 Exploración de los mecanismos vinculados al endotelio vascular.

B.1.1. Rol del endotelio.

Para investigar la participación del endotelio en el mecanismo de acción de la IBT se procedió a remover mecánicamente la capa endotelial. Posteriormente se validó la maniobra de remoción desafiando a los anillos con Ach, dado que el mecanismo de acción vasodilatadora de esta sustancia es endotelio dependiente[5].

En la figura 12 se observa la respuesta de un anillo de aorta con endotelio intacto pre-contraído con NA y sometido luego a dosis acumulativas de Ach de 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} y 1×10^{-5} M. Se puede ver como disminuye la tensión desarrollada por el anillo a medida que se aumenta la concentración de Ach. En la figura 13 se muestra un registro de tensión típico de un anillo de aorta con remoción mecánica del endotelio en el cual se observa ausencia de VD en respuesta a una concentración de Ach 1×10^{-6} M.

Otra evidencia de una correcta remoción de la capa endotelial se obtuvo mediante la realización de cortes histológicos. En la figura 14 se observan las imágenes de distintos cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

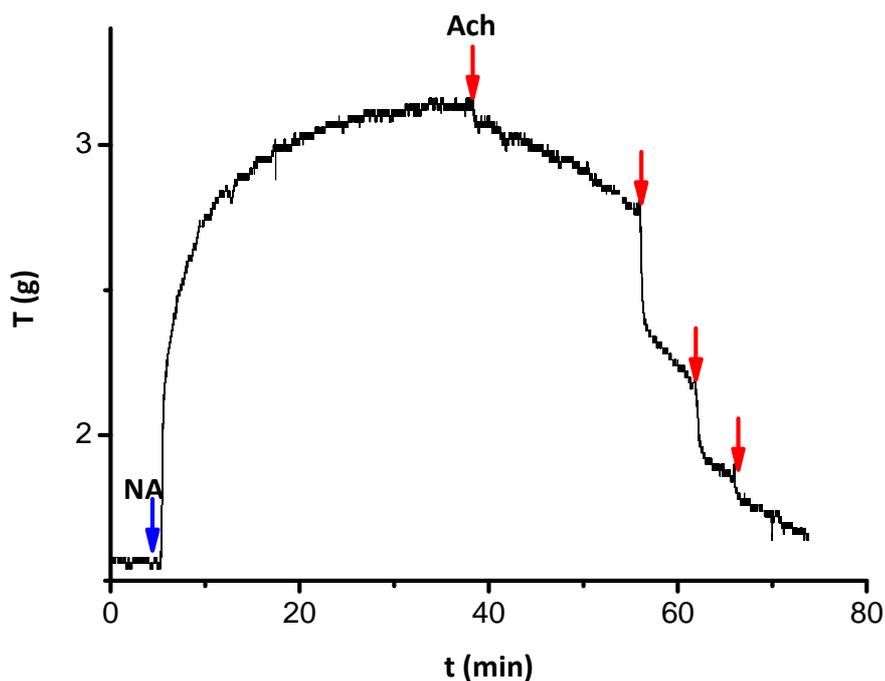


Figura 12. La Ach produce VD en anillos de aorta con endotelio intacto.

Se muestra el curso temporal de la tensión expresada en gramos de un anillo de aorta con endotelio en respuesta a la infusión de NA 2 μM (flecha azul) y luego sometido a dosis acumulativas de Ach desde 1×10^{-8} hasta 1×10^{-5} M (flechas rojas).

Distintos grupos de anillos sin endotelio fueron tratados con las mismas concentraciones de IBT ensayadas en la curva de la figura 11. Se observó que la vasodilatación es dosis-dependiente al igual que en los anillos con endotelio intacto. El % de VD disminuye a medida que disminuye la concentración de IBT (figura 15). En la tabla 2 se muestran los % de VD calculados para cada dosis de IBT.

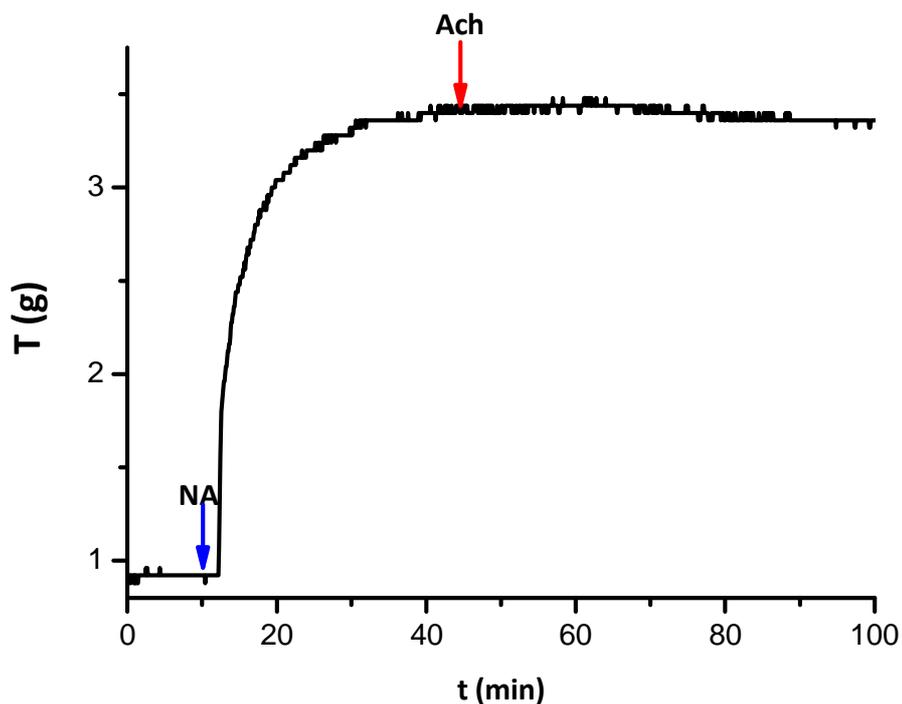


Figura 13. La Ach no produce VD en los anillos con remoción mecánica del endotelio. Se muestra el curso temporal de la tensión expresada en gramos de un anillo de aorta sin endotelio en respuesta a la infusión de NA 2 μ M (flecha azul) y luego Ach 1 $\times 10^{-6}$ M (flecha roja).

[IBT] (g/ml)	% VD \pm DS	N
3.2×10^{-4}	100,5 \pm 3,6	5
1.6×10^{-4}	90,2 \pm 6,4	4
3.2×10^{-5}	19,5 \pm 5,1	5
1.6×10^{-5}	20,8 \pm 4,9	3
$3,2 \times 10^{-6}$	8,8 \pm 3,2	4

Tabla 2. Porcentajes de VD obtenidos en respuesta a la IBT en anillos de aorta sin endotelio.

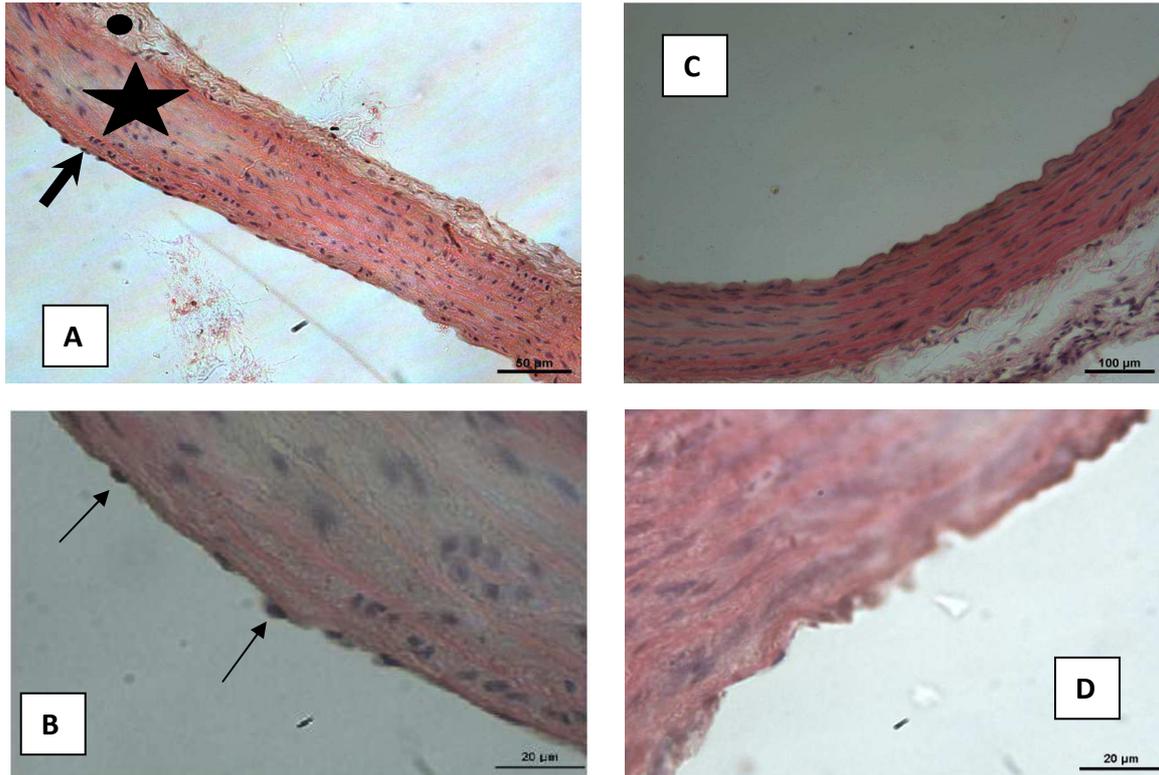


Figura 14. Cortes histológicos de anillos de arteria aorta de rata donde se evidencia la correcta remoción de la capa endotelial. **A-** Corte transversal de arteria aorta de rata (vaso control) en cuyas paredes se puede diferenciar desde la luz (a la izquierda de la imagen) la capa endotelial caracterizada por un epitelio plano simple (flecha), por encima de esta la túnica media constituida por fibras musculares lisas y fibras elásticas de disposición concéntrica (estrella). En esta capa es posible observar una lámina eosinófila y continua, festoneada que corresponde a la limitante interna. Por último recubriendo la superficie externa se observa la túnica adventicia constituida por tejido conectivo laxo (círculo). **B-** Vaso descrito en A en mayor aumento, donde se diferencian los núcleos de las células endoteliales (flechas). **C-** Corte transversal de arteria aorta de rata al cual se realizó la maniobra de remoción mecánica del endotelio. El mismo comparte iguales características histológicas en sus paredes a las del vaso control descrito en A, a excepción de la capa íntima en la cual en la mayor extensión de la luz ha desaparecido el endotelio, identificándose algún núcleo aislado en toda la superficie, sin configurar

una monocapa continua de células. **D-** El corte descrito en C a mayor aumento.

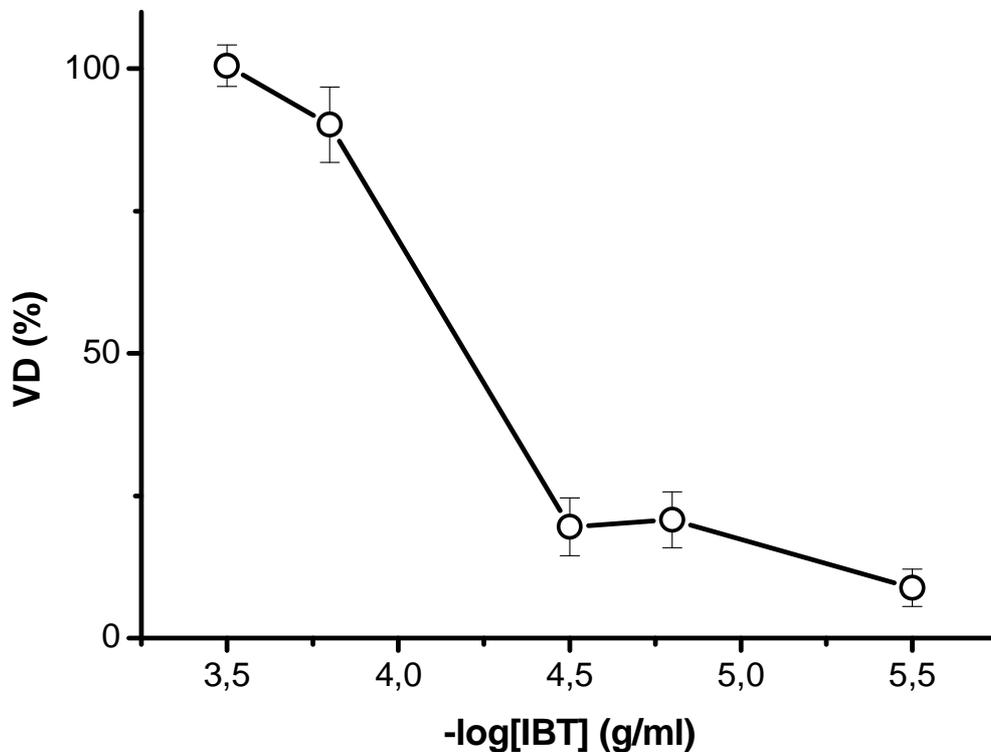


Figura 15. La VD en respuesta a la IBT en los anillos de aorta sin endotelio es dosis-dependiente. Porcentaje de VD obtenido en distintos grupos de anillos a los cuales se les removió mecánicamente el endotelio en función del - log de la concentración de IBT. Los datos representan valores medios \pm DS.

Al comparar las curvas dosis- respuesta en anillos con y sin endotelio (figuras 11 y 15, respectivamente) se observó que a las concentraciones de IBT de $3,2 \times 10^{-5}$ y $1,6 \times 10^{-5}$ g/ml se produce una notoria caída del porcentaje de VD al remover el endotelio. Las diferencias entre los grupos de anillos a estas concentraciones fueron estadísticamente significativas, así como también a una concentración de $3,2 \times 10^{-6}$ g/ml (figura 16).

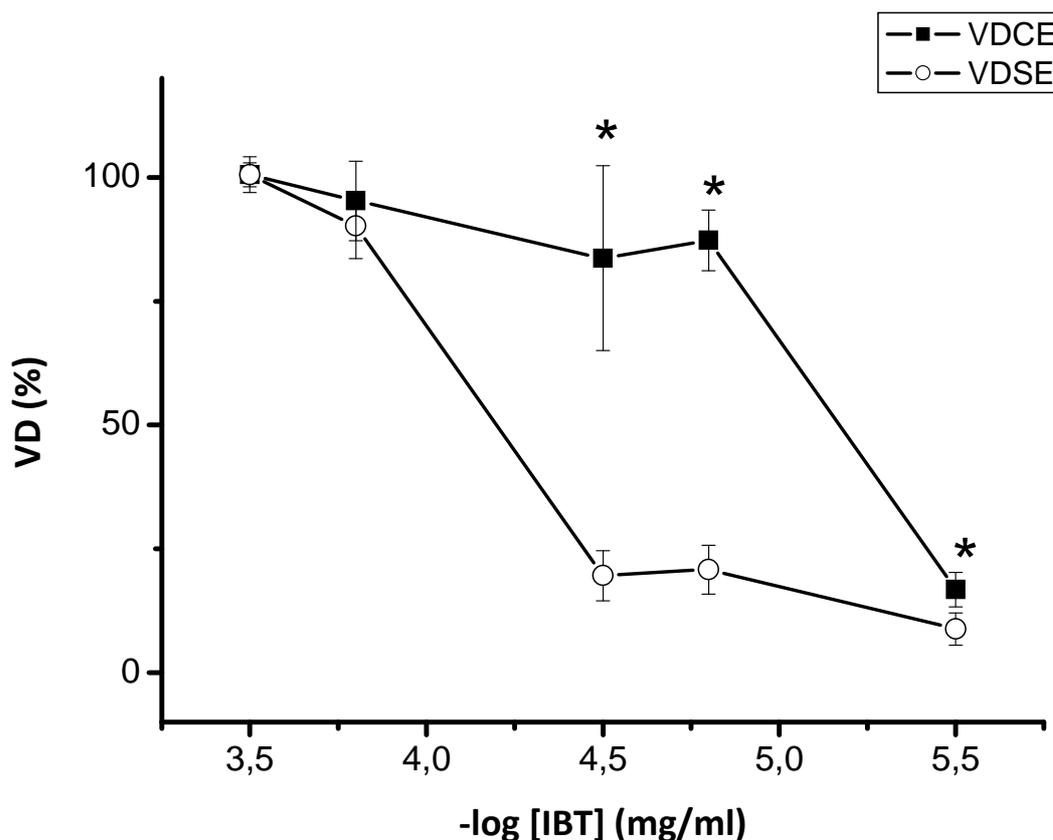


Figura 16. La VD en respuesta a la IBT disminuye al remover el endotelio a las concentraciones de IBT intermedias y bajas. Curva dosis respuesta a distintas concentraciones IBT en anillos con endotelio intacto (■ VDCE) y en anillos con remoción mecánica del endotelio (○, VDSE). Los datos son medias \pm DS. * diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de anillos con y sin endotelio (Test de T, $p < 0.05$).

B.1.2. Rol del NO en la VD endotelio-dependiente.

El NO derivado del endotelio vascular se ha reportado extensamente en la literatura como mediador responsable del mecanismo de acción vasodilatadora endotelio-dependiente de diversos productos de origen natural [58, 59, 67-71]. Por esta razón se exploró su participación

utilizando el inhibidor no selectivo de la eNOS, L-NAME. Se observó que en los anillos con endotelio intacto pre-incubados con L-NAME y luego sometidos a la dosis de NA ya descrita para lograr la contracción previa, se produjo una VD promedio en respuesta a la IBT $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml de $19,3 \pm 6$ %. Esta VD fue similar a la obtenida en los anillos con remoción mecánica del endotelio, en los cuales el valor obtenido fue $19,5 \pm 5,1$ % (figura 17). Estos ensayos se realizaron con una concentración de IBT de $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml dado que a esta concentración se produjo la mayor caída en la VD en los anillos sin endotelio en comparación con los anillos con endotelio (figura 16).

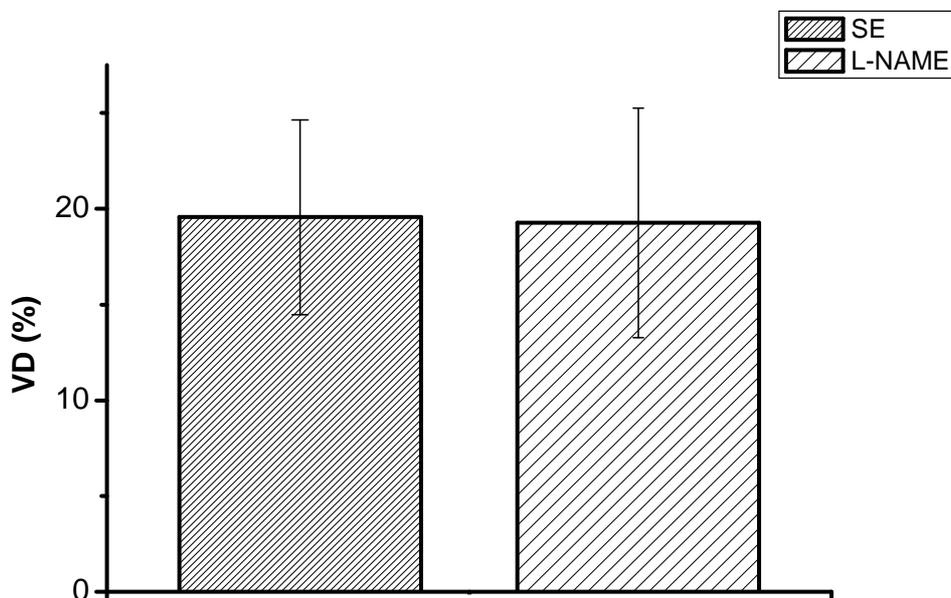


Figura 17. El tratamiento de los anillos con endotelio con L-NAME produce una VD en respuesta a la IBT equivalente a la obtenida con la remoción mecánica del endotelio. Porcentaje de VD obtenido al tratar anillos sin endotelio (SE) (n=5) y anillos con endotelio intacto pre incubados con L-NAME (n=7) con IBT $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml . Los datos son valores medios \pm DS. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

B.2. Exploración de los mecanismos de acción de la IBT no vinculados al endotelio vascular.

B.2.1 Rol de los canales de K⁺ en la VD inducida por la IBT.

En este estudio se observó que el efecto vasodilatador de la IBT sigue estando presente en los anillos sin endotelio a las concentraciones más elevadas de la IBT (figura 16). Esto sugiere que componentes de la infusión podrían tener un efecto directo sobre las células del MLV.

La existencia de un mecanismo vasodilatador de la IBT vinculado a la hiperpolarización de la membrana plasmática por activación de canales de K⁺ se exploró pre-incubando anillos sin endotelio con TEA 10 mM [11, 65, 67]. El porcentaje de VD fue $77,2 \pm 9,4$, menor que en los anillos control sin endotelio no pre-incubados con TEA, en los cuales la VD fue $90,2 \pm 6,4$ % (figura 18). Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

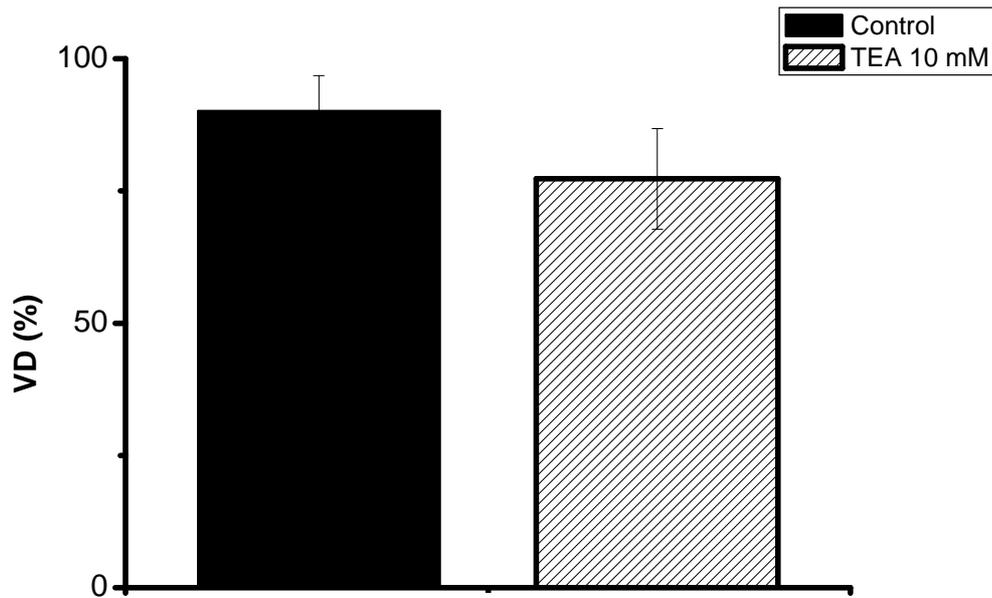


Figura 18. Respuesta de los anillos de aorta sin endotelio a la pre-incubación con TEA. Porcentaje de VD en respuesta a $1,6 \times 10^{-4}$ g/ml de IBT obtenido en anillos sin endotelio pre incubados con TEA 10 mM (n=7), en comparación con anillos control sin endotelio no pre-incubados con TEA (n=5).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este estudio se comprobó que la IBT produjo la VD de los anillos de aorta de rata intactos precontraídos con NA, siendo esta respuesta dosis-dependiente (figura 11). Con la dosis más elevada de la infusión ($3,2 \times 10^{-4}$ g/ml), se alcanzó una VD de un 100 % en un lapso de 100 minutos (tabla 1). En los anillos sometidos a remoción mecánica de la capa endotelial se observó una marcada disminución en el porcentaje de VD en respuesta al tratamiento con las dosis intermedias de la IBT ($3,2 \times 10^{-5}$ y $1,6 \times 10^{-5}$ g/ml) (figuras 15 y 16), constatándose que las diferencias con respecto a los anillos con endotelio intacto eran estadísticamente significativas. Este resultado sugiere fuertemente que el mecanismo de acción de la IBT en dicho rango de concentraciones es dependiente de la presencia del endotelio vascular. A la dosis más baja de IBT ($3,2 \times 10^{-6}$ g/ml) si bien los porcentajes de VD en anillos con y sin endotelio son similares (tablas 1 y 2), el análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre ambos grupos lo cual indica que a esta dosis el mecanismo vasodilatador de la IBT también es endotelio-dependiente (figura 16).

Cuando los anillos de aorta con endotelio intacto fueron preincubados con el inhibidor competitivo de la eNOS L-NAME, precontraídos con NA y posteriormente tratados con una dosis de IBT de $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml, la respuesta vasodilatadora fue similar a la que tuvieron los anillos de aorta con remoción mecánica del endotelio no preincubados con L-NAME. El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre estos grupos de anillos (figura 17). Este resultado indica que, a esta dosis, el mecanismo de acción vasodilatadora de la IBT involucra acciones dependientes del endotelio vascular mediadas por el NO.

La observación de que a las dosis más elevadas de la IBT el efecto vasodilatador en los anillos sin endotelio continuó presente, no observándose diferencias significativas con el grupo de anillos con endotelio intacto (figura 16), sugiere la existencia de un mecanismo de acción directo sobre las células del MLV.

La relajación del MLV endotelio-independiente puede implicar varios mecanismos cuyo objetivo final es la disminución de la $[Ca^{++}]_i$. La activación de distintos tipos de canales de K^+ del sarcolema (BK_{Ca} , K^+_{ATP} , K^+_v , Kir) produce una hiperpolarización de la membrana plasmática lo cual es un mecanismo que conduce a la VD arterial. Cuando los anillos de aorta sin endotelio fueron preincubados con el inhibidor no selectivo de canales de K^+ TEA 10 mM[65], precontraídos con NA y luego tratados con la IBT ($1,6 \times 10^{-4}$ g/ml) se obtuvo una disminución en el porcentaje de VD con respecto a los anillos control sin endotelio no preincubados con TEA, sin embargo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas (figura 18). A la concentración de TEA utilizada de acuerdo con la literatura consultada se produciría mayoritariamente la inhibición de los canales BK_{Ca} y en alguna medida la de los canales K^+_{ATP} [11, 67] (ver sección 3.3). Este resultado, en principio, alejaría la hipótesis de que el efecto vasodilatador de la IBT a esta concentración se deba a una activación de canales de K^+ inducida por componentes de la IBT. De todos modos, se destaca que al utilizar TEA hubo una disminución del efecto vasodilatador. Aunque los resultados no sean estadísticamente significativos para descartar o confirmar esta hipótesis sería necesaria la realización de un mayor número de experimentos y la utilización de bloqueantes selectivos de los distintos tipos de canales de K^+ como 4-AP, glibenclamida, Iberiotoxina y Ba^{+2} .

La VD endotelio-independiente también podría explicarse por otros mecanismos que inhiban el influjo de Ca^{++} extracelular como un efecto antagónico sobre canales de Ca^{++} de tipo L, inhibición de la liberación de Ca^{++} desde el RS o acciones de componentes de la IBT sobre el estado de fosforilación de la MLCP. Estos mecanismos no fueron explorados en este trabajo.

El perfil fitoquímico de la IBT consiste principalmente en polifenoles pertenecientes a la familia del ácido clorogénico y derivados, glicósidos de quercetina, quercetina libre, flavonoides de la metil quercetina como la 3-O-metilquercetina, isorhamentina y rutina (figura 8). Estos hallazgos son coincidentes en parte con la literatura ya que otros autores además de estos componentes también hallaron terpenos[40, 42] y saponinas[48].

Estas diferencias en la composición fitoquímica podrían explicarse por distintas metodologías de análisis, por la región de la planta utilizada en la extracción (parte aérea o raíces)[40] y también porque pueden existir variaciones de los componentes dependiendo de la estación del año en la cual se cosechó la planta[72].

Como se mencionó anteriormente, los flavonoides además de ser los constituyentes más abundantes en *Baccharis trimera* (Less.) DC. poseen probadas propiedades protectoras cardiovasculares. Algunos de los encontrados en este trabajo tienen un efecto vasodilatador arterial comprobado como la quercetina[53-59] y la rutina[60]. Los mecanismos por los cuales estos y otros flavonoides producen su efecto vasodilatador involucran tanto acciones endotelio-dependientes mediadas por NO [58, 73] como endotelio independientes[54] y en varios casos ha sido descrita la coexistencia de mecanismos[55, 69, 74].

Ciertos flavonoides pueden actuar como activadores de canales BK_{Ca} [65, 69] existiendo requerimientos estructurales como la presencia de grupos hidroxilo en posiciones específicas de la molécula para lograr la activación del canal[65]. También se ha reportado su posible acción sobre canales K^+_{ATP} [65, 69]. Varios autores también subrayan la existencia de una relación entre la estructura química del flavonoide y su potencia vasodilatadora[59, 73, 75].

Otros componentes encontrados en la IBT con reporte como vasodilatadores son los ácidos clorogénicos[76] y metabolitos de éstos como el ácido ferúlico [77, 78]. Estos compuestos también podrían ser responsables de los efectos vasodilatadores observados en este trabajo.

Cabe destacar que tratándose de extractos vegetales, es esperable la existencia de una variedad de posibles principios bioactivos e incluso la existencia de acciones sinérgicas entre ellos[34].

Por último la observación de un mecanismo de acción vasodilatadora que varía con la dosis, como se observó en este trabajo, se ha visto con flavonoides como la pinocembrina, aislada del propóleo[67].

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis indican que la IBT posee un marcado efecto vasodilatador en anillos de aorta de rata precontraídos con NA, siendo la VD observada dosis-dependiente. El mecanismo de acción vasodilatadora a concentraciones entre $3,2 \times 10^{-6}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ g/ml de la infusión es endotelio-dependiente e involucraría la vía del NO. A concentraciones más elevadas ($1,6 \times 10^{-4}$ g/ml y superiores) el mecanismo de acción es endotelio-independiente e implicaría acciones directas sobre el MLV.

Por lo expuesto el extracto acuoso de *Baccharis trimera* (Less.) DC. presenta interés para continuar su estudio con miras al desarrollo de un posible fitoterápico con acción antihipertensiva. El fraccionamiento bioguiado del extracto será fundamental para la identificación y aislamiento de el o los constituyentes bioactivos.

BIBLIOGRAFÍA.

[1] Sturek M. Molecular and Cellular Physiology of Differentiated Vascular Smooth Muscle. In: Willerson JT, editor. Cardiovascular Medicine. Third ed. London: Springer; 2007. p. 1511-22.

[2] Burris A. Basic Coronary Artery Anatomy and Histology. In: Abbas AE, editor. Interventional Cardiology Imaging An Essential Guide. London: Springer-Verlag; 2015. p. 1-13.

[3] Gal B. Sistema Circulatorio. In: Gal B, editor. Bases de la Fisiología. Second ed: Tebar; 2007. p. 145-209.

[4] Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. J Pharmacol Sci. 2015;129:83-94.

[5] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288:373-6.

[6] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res. 1987;61:866-79.

[7] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis. 2016;248:97-109.

[8] Ceballos G GG, Meaney E. The vascular endothelium: a review series. I. Basic aspects of the vascular endothelium. Revista Mexicana de Cardiología. 2015;26:95-100.

[9] Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J Physiol Pharmacol. 2002;53:503-14.

[10] Li S, et. al. Aurantio-obtusin relaxes systemic arteries through endothelial PI3K/AKT/eNOS-dependent signaling pathway in rats. Journal of Pharmacological Sciences. 2015;128:108-15.

- [11] Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44:65-81.
- [12] Rameshrad M, Babaei H, Azarmi Y, Fouladia DF. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. *Life Sci.* 2016;145:190-204.
- [13] Guyton A. Hall J. *Vascular Distensibility and Functions of the Arterial and Venous Systems. A text book of Medical Physiology.* 11 ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 171-80.
- [14] Moczydlowski E. Cellular Physiology of Skeletal Cardiac and Smooth muscle. In: Boron W, editor. *Medical Physiology.* Second ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 237-64.
- [15] Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 2004;56:439-513.
- [16] Wray S, Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev.* 2010;90:113-78.
- [17] Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27:201-6.
- [18] Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol.* 2001;91:1438-49.
- [19] Le'guillette R, Lauzon A-M. Molecular Mechanics of Smooth Muscle Contractile Proteins in Airway Hyperresponsiveness and Asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5:40-6.
- [20] McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2002;135:1-13.
- [21] Hill-Eubanks DC, Werner ME, Heppner TJ, Nelson MT. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a004549.

- [22] Firth AL, Remillard CV, Yuan JX. TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:895-906.
- [23] Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C235-56.
- [24] Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*. 1995;270:633-7.
- [25] Mokolke EA, Dietz NJ, Eckman DM, Nelson MT, Sturek M. Diabetic dyslipidemia and exercise affect coronary tone and differential regulation of conduit and microvessel K⁺ current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1233-41.
- [26] Enfermedades Cardiovasculares. Nota Descriptiva. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. p. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
- [27] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens*. 2004;22:11-9.
- [28] Lawes C, Hoorn S, Vandera L, Malcolm R, Elliott P, MacMahon S, et al. Blood pressure and the global burden of disease 2000. *Journal of Hypertension*. 2006;24:413-22.
- [29] Hipertensión arterial. Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular; 2016. p. <http://www.cardiosalud.org/corazon-y-salud/factores-de-riesgo/hipertension-arterial>.
- [30] Sandoya E, Puppo T, Vázquez H, Portos A, Castro M, Fort Z. Evolución de la hipertensión arterial en Uruguay: 1948-2011. *Revista Uruguaya de Cardiología*. 2012;27:377-86.
- [31] Layerle B, Vignolo W. Hipertensión arterial: hechos esenciales. *Revista Uruguaya de Cardiología*. 2012;27:352-76.

[32] Rivas J, Gutiérrez C, Rivas J. Tratamiento y costos farmacológicos de la hipertensión arterial no complicada. Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna 2007; vol 20 (4). 2007;20:139-44.

[33] Newman D, Cragg G, Snader K. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003 66:1022-37.

[34] Guerrero MF. Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. Biomédica. 2009;29:547-57.

[35] Mueen Ahmeda KK, Yaseen Khanb M, Shivanandaa BG. Cardiovascular Diseases and Role of Medicinal Plants as a Re-Emerging Health Aid. Phcog Rev 2009;3:8-14.

[36] Dellacasa E, Moyna P, Nieto A. Antecedentes generales sobre el sector de las plantas medicinales y aromáticas y su potencial en el marco de una integración productiva en el mercosur. Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en Uruguay. Montevideo: Fundaquim. ProPymes.URU.TEC. Fundasol. Cooperación Técnica Alemana.; 2004.

[37] Díaz Cúneo C. *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. especies de carquejas utilizadas con fines medicinales, caracterización y análisis genéticos de poblaciones en Lavalleja, Uruguay.: Facultad de Agronomía-UDELAR; 2012.

[38] Rodríguez M, Gattuso S, Gattuso M. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y Nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica. Latin American Journal of Pharmacy. 2008;27 387-97.

[39] Cortadi A, Di Sapio O, Mc Cargo J, Scandizzi A, Gattuso S, Gattuso M. Anatomical studies of *Baccharis articulata*, *Baccharis crispa* and *Baccharis trimera* "Carquejas" used in folk medicine. Pharmaceutical Biology 1999;37:357-65.

[40] Karam TK, Dalposso LM, Casa DM, De Freitas GBL. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. Rev Bras Pl 2013.;15:280-6.

- [41] Hnatyszyn O, Moscatelli V, Garcia J, Rondina R, Costa M, Arranz C, et al. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. *Phytomedicine*. 2003;10:669-74.
- [42] Torres LM, Gamberini MT, Roque NF, Lima-Landman MT, Souccar C, Lapa AJ. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*. 2000;55:617-9.
- [43] Oliveira AC, Endringer DC, Amorim LA, das Gracas LBM, Coelho MM. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *J Ethnopharmacol*. 2005;102:465-9.
- [44] Xavier AA, Peckolt OL, Canali J. [Effect of an extract of *Baccharis genistelloides* Person on the glucose level of the blood]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1967;161:972-4.
- [45] Dickel M, Rates S, Ritter M. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109:60-71.
- [46] Soicke H, Leng-Peschlow E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica*. 1987;53:37-9.
- [47] Biondo TM, Tanae MM, Coletta ED, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. *J Ethnopharmacol*. 2011;136:368-73.
- [48] Gené RM, Marin E, Adzet T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Medica*. 1992;58:565-6.
- [49] Nogueira NPA, Reis PA, Laranja GAT, Pinto AC, Aiub CAF, Felzenszwalb I, et al. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;138 513– 22.

- [50] Paul EL, Lunardelli A, Caberlon E, de Oliveira CB, Santos RC, Biolchi V, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation*. 2009;32:419-25.
- [51] De Oliveira C, Comunello L, Lunardelli A, Amaral R, Pires M, Lucas da Silva G, et al. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules* 2012;17:1113-23.
- [52] Dias L, Melo E, Hernandez L, Bacchi E. Antiulcerogenic and antioxidant activities of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009;19:309-14.
- [53] Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2001;133:117-24.
- [54] Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Moreno L, et al. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:66-72.
- [55] Nishida S, Satoh H. Vasorelaxation Mechanisms of Quercetin in Rat Arteries. *Journal of US-China Medical Science*. 2009;6:54-62.
- [56] Saponara S, Sgaragli G, Fusi F. Quercetin antagonism of Bay K 8644 effects on rat tail artery L-type Ca²⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*. 2008;598:75-80.
- [57] Fusi F, Saponara S, Pessina F, Gorelli B, Sgaragli G. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur J Nutr*. 2003;42:10-7.
- [58] Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, et al. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:339-47.
- [59] Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*. 1993;24:857-62.

- [60] Xia M, Zhou X, Yao H, Jiang H, Bruce I, Wei E, et al. Rutin-induced Endothelium-dependent Vasorelaxation in Rat Aortic Rings and the Underlying Mechanism. Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference. 2005.
- [61] Zhang YH, Park YS, Kim TJ, Fang LH, Ahn HY, Hong JT, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen Pharmacol.* 2000;35:341-7.
- [62] Guerrero MF. Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. *Biomédica.* 2009;29:547-57.
- [63] Kauser K, Rubanyi GM. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. *Am J Physiol.* 1994;267:H2311-7.
- [64] Gomez MA, Miguez I, Caggiana M, Arias X, Laprovitera M, Blanco F, et al. Vasorelaxant Effect of a Baccharis trimera Infusion on Precontracted Rat Aortic Rings. *Nat Prod Commun.* 2016;11:283-6.
- [65] Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, et al. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;370:290-8.
- [66] Hammer OH, DATR, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica.* 2001;4:1-9.
- [67] Zhu XM, Fang LH, Li YJ, Du GH. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol.* 2007;46:160-5.
- [68] Dongmo AB, Azebaze AG, Donfack FM, Dimo T, Nkeng-Efouet PA, Devkota KP, et al. Pentacyclic triterpenoids and ceramide mediate the vasorelaxant activity of *Vitex cincinnensis* via involvement of NO/cGMP pathway in isolated rat aortic rings. *J Ethnopharmacol.* 2011;133:204-12.

- [69] Leeya Y, Mulvany MJ, Queiroz EF, Marston A, Hostettmann K, Jansakul C. Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. *Eur J Pharmacol.* 2010;649:301-13.
- [70] Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;74:603-12.
- [71] Carrón R, Sanz E, Puebla P, Martín M, San Román L, Guerrero M. Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from wistar rats. *Colombia Médica.* 2010;41:10-6.
- [72] Borella JC, Duarte DP, Novaretti AA, Menezes AJ, França SC, Rufato CB, et al. Seasonal variability in the content of saponins from *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) and isolation of flavone. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16 (4) Joao Pessoa: Sociedade Brasileira de Farmacognosia. 2006;16:557-61.
- [73] Chan EC, Pannangpetch P, Woodman OL. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:326-33.
- [74] Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol.* 1996;27:363-6.
- [75] Ahjay M, Hassan Gilani A, Mustafa M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences.* 2003;74:603-12.
- [76] Zhao Y, Wang J, Ballevre O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res.* 2012;35:370-4.
- [77] Choi. S, Kim. H, Park. SH, Lee. MJ, Jun. JY, Kim. HL, et al. Endothelium-dependent vasodilation by ferulic acid in aorta from chronic renal hypertensive rats. *Kidney Res Clin Pract.* 2012;31:227–33.
- [78] Suzuki. A, Yamamoto. M, Jokura. H, Fujii. A, Tokimitsu. I, Hase. T, et al. Ferulic Acid Restores Endothelium-Dependent Vasodilation in Aortas of Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension.* 2007 20:508-13.

