

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL
EFECTO VASODILATADOR PRODUCIDO POR LA
HEMATOXILINA OBTENIDA A PARTIR DE LA CORTEZA DE
Haematoxylon brasiletto (PALO DE BRASIL)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

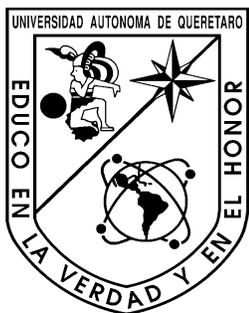
PRESENTA

DAVID MENDOZA ESTRADA

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL
EFECTO VASODILATADOR PRODUCIDO POR LA
HEMATOXILINA OBTENIDA A PARTIR DE LA CORTEZA DE
Haematoxylon brasiletto (PALO DE BRASIL)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DAVID MENDOZA ESTRADA

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL
EFECTO VASODILATADOR PRODUCIDO POR LA
HEMATOXILINA OBTENIDA A PARTIR DE LA CORTEZA DE
Haematoxylon brasiletto (PALO DE BRASIL)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DAVID MENDOZA ESTRADA

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODALES

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
DIRECTOR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA
SINODAL

Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA
SINODAL

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Enfermedades cardiovasculares y su importancia en México	3
II.2 Plantas medicinales y su importancia farmacológica	5
II.3 Generalidades de <i>Haematoxylon brasiletto</i> y la hematoxilina	6
II.4 Sistema vascular y su autorregulación	9
II.4.1 Endotelio vascular y factores endoteliales	11
II.4.2 Músculo liso	12
II.5 Mecanismos de relajación	14
II.5.1 Óxido nítrico y su mecanismo de relajación	14
II.5.2 Prostaciclina y su mecanismos de relajación	16
II.5.3 Factor hiperpolarizante derivado de endotelio	18
II.5.4 Mecanismos de relajación por regulación de Ca ²⁺	20
II.6 Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) y su relación con la vía del NO/GMPc	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	24
IV.1 General	24
IV.2 Específicos	24
V. METODOLOGÍA	25
V.1 Materiales	25
V.1 Animales de experimentación	25
V.2 Métodos	25
V.2.1 Ensayo de aorta aislada de rata	25

V.2.2	Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica	27
V.2.3	Determinación del grado de fosforilación de la proteína VASP	27
VI.	RESULTADOS	29
VI.1	Evaluación del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre la musculatura lisa	29
VI.2	Comparación del efecto vasodilatador de la hematoxilina con el efecto inducido por la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio en segmentos de aorta intacta de rata	30
VI.3	Determinación del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio	31
VI.4	Determinación de la participación de la vía del NO/GMPc en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en segmentos de aorta intacta de rata	32
VI.5	Determinación de la participación de la vía de la PGI ₂ /AMPc en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en segmentos de aorta intacta de rata	35
VI.6	Determinación de la participación de canales de potasio en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en segmentos de aorta de rata, en ausencia y en presencia de endotelio	36
VI.7	Incremento de la fosforilación de la proteína VASP producido por la hematoxilina.	39
VII.	DISCUSIÓN	41
VIII.	CONCLUSIONES	45
IX.	BIBLOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en individuos mayores de 20 años de edad en México	3
2	Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en <i>H. brasiletto</i>	8
3	CE ₅₀ , E _{máx} y potencia del efecto vasodilatador inducido por la hematoxilina, la ACh y el SNP sobre segmentos de aorta intacta de rata	31
4	Valores de CE ₅₀ del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en aorta de rata, en presencia y en ausencia, del endotelio	31
5	Valores de CE ₅₀ del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de atropina, L-NAME y ODQ	34
6	Valores de CE ₅₀ del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de INDO, sobre segmentos de aorta intacta de rata	36
7	Valores de CE ₅₀ del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de TEA o glibenclamida, con y sin endotelio por Phe en segmentos de aorta intacta de rata	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de la hipertensión arterial en México según grupo de edad, tipo de diagnóstico y sexo	4
2	Árbol de <i>Haematoxylon brasiletto</i> (palo de Brasil)	6
3	Estructura de venas y arterias	10
4	Detalles de una fibra de músculo liso	13
5	Mecanismos de la relajación, dependiente de endotelio, del músculo liso vascular	19
6	Regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula del músculo liso por medio del GMPc	21
7	CCR del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre el tono del músculo liso vascular	29
8	Comparación de las CCRs del efecto vasodilatador del SNP, la ACh y la hematoxilina en segmentos de aorta de rata	30
9	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en anillos de aorta de rata, en presencia y en ausencia, del endotelio	32
10	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de atropina	33
11	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de L-NAME	34
12	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de ODQ	35
13	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de INDO	36
14	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre la contracción inducida por Phe en anillos de aorta intacta (control) y en segmentos de aorta con (+E) o sin (-E) endotelio	37

	incubados con TEA	
15	CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre la contracción inducida por Phe en anillos de aorta intacta y en segmentos de aorta con o sin endotelio incubados con glibenclamida	38
16	Incremento de la fosforilación de VASP en la serina 239 producida por la incubación de segmentos de aorta con ACh (2) y hematoxilina: 100 $\mu\text{g/ml}$ (3) y 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (4). (1) Anillos de aorta control.	40

RESUMEN

México cuenta con una gran diversidad de especies vegetales y una extensa tradición en el uso de estas para tratar diversas enfermedades, entre las que se incluyen las enfermedades cardiovasculares que actualmente constituyen la principal causa de muerte en nuestro país. Por ejemplo, *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil) es una planta ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar, entre otras enfermedades, la hipertensión. Para tratar esta enfermedad se recomienda administrar una infusión de la corteza de *H. brasiletto*. Un estudio fitoquímico reciente de la corteza de esta especie vegetal indicó la presencia de diversos metabolitos, entre los que se encuentra el neoflavonoide hematoxilina, la cual resultó ser el compuesto mayoritario. Estudios farmacológicos preliminares indicaron que el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto*, así como la hematoxilina inducen la relajación de la aorta de rata. Mediante el empleo del ensayo de aorta aislada de rata y diferentes agentes moduladores de las principales vías de relajación arterial, en la presente tesis se determinó que la hematoxilina relaja el músculo liso arterial, mediante mecanismos dependientes e independientes de la presencia de endotelio. El efecto vasodilatador producido por este flavonoide involucra principalmente la activación de las vías del NO/GMPc y de la PGI₂/AMPc y la estimulación de canales de potasio. Los resultados derivados de la presente investigación permitieron validar científicamente del uso de *H. brasiletto* en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de la hipertensión arterial y permitieron también proponer a la hematoxilina como un prototipo que podría ser utilizado para desarrollar fármacos alternativos para tratar la hipertensión.

I. INTRODUCCIÓN.

El conocimiento empírico del uso de las plantas medicinales ha existido en cualquier parte del mundo, en donde el ser humano las ha necesitado para curar sus enfermedades. Lamentablemente, solo el siete por ciento de las 260 mil especies se ha estudiado desde un punto de vista científico. No es posible establecer con precisión cuándo y dónde se utilizaron plantas medicinales por primera vez, pero fue a partir de los años setenta del siglo pasado, que en muchos países del mundo se comienza a producir un cambio importante con relación al estudio y al empleo de las plantas medicinales. Sin embargo, en México se reconoció oficialmente el empleo de plantas con fines terapéuticos hasta 1997, a pesar de que nuestro país es considerado como uno de los tres países con mayor biodiversidad vegetal y que cuenta con una extensa tradición en el empleo de plantas medicinales, la cual se remonta a la época prehispánica. Actualmente, se emplea una gran variedad de plantas medicinales para tratar diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, consideradas como la principal causa de muerte en nuestro país. Una de estas plantas es la especie vegetal *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae), conocida como palo de Brasil que se administra en forma de té, preparado a partir de la corteza del árbol, para tratar, entre otras enfermedades la hipertensión arterial. Estudios preliminares indicaron que el extracto metanólico de la corteza del *H. brasiletto* y la hematoxilina, su metabolito mayoritario, relajan la musculatura lisa arterial, lo que por una parte, validó el empleo del *H. brasiletto* en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar la hipertensión y, por otra, permitió la purificación de uno de los compuestos (hematoxilina) responsables del efecto vasodilatador.

En la presente tesis se determinó que la hematoxilina, obtenida de la especie vegetal *H. brasiletto*, relaja la aorta mediante mecanismos dependientes e independientes de la presencia de endotelio. Nuestros resultados indicaron que la principal vía bioquímica involucrada en este efecto fue la activación de la vía del NO/GMPc. Asimismo, la activación de la vía de la prostaciclina/AMPc y la estimulación de canales de potasio también contribuyen al efecto vasodilatador de

la hematoxilina.

La determinación de los mecanismos de acción responsables del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina obtenida de la corteza de *H. brasiletto*, permitió proponer a este compuesto como un prototipo estructural de fármacos, con mecanismos de acción novedosos, útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Enfermedades cardiovasculares y su importancia en México.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) constituyen la principal causa de muerte en el continente americano y son una causa común de discapacidad, muerte prematura y gastos excesivos para su prevención y control. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante los próximos diez años se estima que ocurrirán aproximadamente 20.7 millones de defunciones por enfermedades cardiovasculares en América, de las cuales 2.4 pueden ser atribuidas a la hipertensión arterial. Cada año mueren alrededor de 17 millones de personas en el mundo por enfermedades cardiovasculares y se estima que cada cuatro segundos ocurre un evento coronario y cada cinco segundos un evento vascular cerebral. Aproximadamente entre 1.5 y 5 % de todos los hipertensos mueren cada año por causas directamente relacionadas a la hipertensión arterial sistémica (Córdova y Hernández, 2008). Los diversos estudios realizados en nuestro país muestran de manera consistente un incremento en la prevalencia de la Hipertensión Arterial (HTA), la cual representa uno de los factores desencadenantes de las enfermedades cardiovasculares de mayor prevalencia en nuestro país (Cuadro 1).

Cuadro 1. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en individuos mayores de 20 años de edad en México (Frenk y Ruelas, 2001).

Hipertensión arterial	30.05%	Hipercolesterolemia	9.00%
Diabetes	10.90%	Sedentarismo	55.00%
Obesidad	46.30%	Alcoholismo	66.00%
Tabaquismo	25.00%	Consumo excesivo de sal	75.00%

En la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas de 1993 (ENEC, 1993), la prevalencia de hipertensión (≥ 140 mmHg para la presión sistólica y ≤ 90 mmHg para la presión diastólica) fue de 26.6%.

Los resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000 indicaron que la prevalencia de hipertensión arterial es de 30.05% (Cuadro 1). En la actualidad alrededor de 15.1 millones de mexicanos tienen algún grado de hipertensión arterial (Frenk y Ruelas, 2001).

La prevalencia de HTA se incrementa con la edad, no obstante, a partir de los 60 años: más del 50% de los hombres y casi el 60% de las mujeres presentan hipertensión arterial. La mayor parte de los diagnósticos en mujeres encuestadas ya eran conocidos por ellas, mientras que en la mayoría de hombres el diagnóstico fue conocido durante la realización de dicha encuesta. En comparación con los resultados de 2000, en 2005 se encontró un mejor nivel de conocimiento de la enfermedad en ambos sexos (Figura 1).

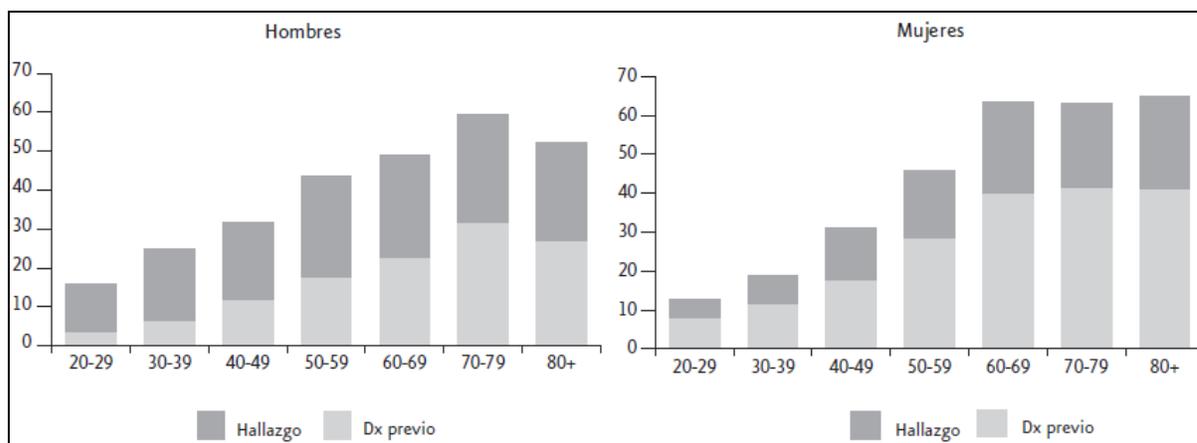


Figura 1. Prevalencia de hipertensión arterial en México según grupo de edad, tipo de diagnóstico y sexo (Córdoba y Hernández, 2008).

Durante 2006 se registro la HTA dentro de las 20 principales causas de morbilidad del país. En ese mismo año, la HTA ocupó el séptimo lugar de la clasificación general con un total de 521,486 casos nuevos y una tasa de 686 casos por cada mil habitantes, 2,188 casos más que en 2005 (Córdoba y Hernández, 2008).

II.2 Plantas medicinales y su importancia farmacológica.

Todos los pueblos del mundo han utilizado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y una gran mayoría, desarrollados y en desarrollo, siguen haciendo uso de ellas actualmente. En los últimos quince años se ha producido un enorme cambio en las estrategias y políticas, tanto de los gobiernos, como en los ministerios y los organismos multilaterales encargados de atender las áreas de la salud. Los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente y se han iniciado el establecimiento de programas y proyectos, para la investigación, aplicación e industrialización de los productos naturales.

En México, las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valiosos de la Medicina Tradicional. Su estudio es un tema recurrente en su historia, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país. Es tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental en lenguas y culturas distintas (Argueta, 1994).

Las plantas medicinales contienen principios activos, que si bien son los responsables de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen, también son de las intoxicaciones y reacciones adversas que pueden aparecer si se emplean en dosis inadecuadas o por periodos prolongados. La falta de información objetiva y actualizada sobre los riesgos y beneficios que puede provocar el uso de plantas medicinales, es una de las causas principales de que la población las use de manera indiscriminada, argumentando que son inocuas y más seguras, por el simple hecho de ser naturales (Pacheco y González, 2006).

Por otra parte los productos naturales constituyen una fuente muy valiosa en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. Un elevado porcentaje de los medicamentos que se utilizan actualmente contienen principios activos de origen natural, principalmente vegetal. Así mismo, un gran número de sustancias naturales han representado prototipos estructurales para la síntesis de fármacos análogos con mayor actividad biológica (Cordell, 2000).

II.3 Generalidades del *Haematoxylon brasiletto* y la hematoxilina.

Haematoxylon brasiletto Karts. (*Leguminosae*) es un árbol que alcanza hasta los 10 m de altura (Figura 2). El tronco es normalmente torcido y acanalado, ramificado desde la base y posee hojas compuestas, alternas, con pecíolos cortos y seis hojuelas en forma de corazón invertido. Las flores son amarillas, con pétalos de 6-8 mm que se agrupan en racimos. Las vainas miden de 2-6 cm de largo. Su distribución natural es desde México a través de América Central hasta Colombia y Venezuela. Esta especie fue objeto de comercialización exhaustiva durante siglos por el colorante extraído de su duramen (Boshier y Cordero, 2010).



Figura 2. Árbol de *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil).

Esta especie vegetal es también conocida como “azulillo”, “Brasil”, “Campeche”, “corteza de Brasil”, “palo de Brasil”, “palo de tinta” y “palo tinto”. Con suma frecuencia se indica el empleo del tallo, ya sea la corteza, la madera o el tronco, en padecimientos del sistema cardiovascular, males renales, malestares estomacales, dolor de dientes y de bazo, y úlceras gástricas (Argueta, 1994).

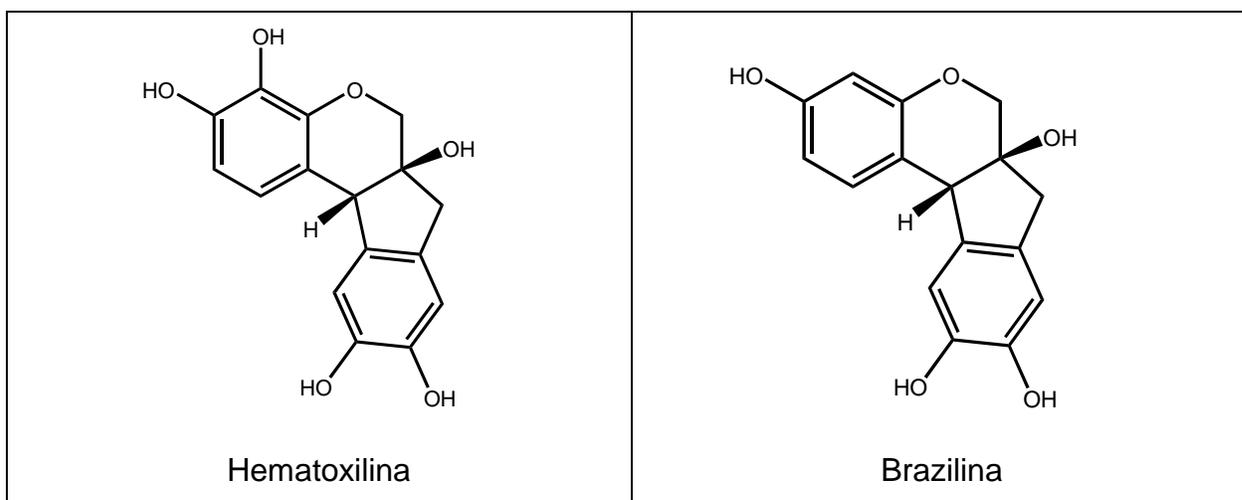
El nombre del árbol deriva de la palabra “baza”, cuyo significado es “rojo ardiente” y no tiene relación con Brasil. Trabajos recientes indican que el extracto etanólico de la corteza del *H. brasiletto* inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC), la producción de veratoxina y la adhesión de *Escherichia coli* O157:H7 a las células HeLa (Heredia y col., 2005). Reportes previos indicaron la presencia de los compuestos hematoxilina y brazilina en *H. brasiletto*, los cuales presentaron actividad antimicrobiana contra *Sallmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella suis* y *Shigella flexneri* (Sanchez-Marroquin y col., 1958; Pratt y col, 1959). Además, otros compuestos aislados del extracto metanólico de *H. brasiletto* presentaron también un importante efecto antimicrobiano (Rivero-Cruz, 2008).

Estudios previos han mostrado que el extracto metanólico de *H. brasiletto* contiene compuestos que relajan la musculatura lisa arterial de una manera dependiente de la concentración [concentración efectiva media (CE₅₀) = 111.5 ± 8.4 µg/ml; efecto máximo (E_{max}) = 98.3 ± 1.7%]. Se ha encontrado que su mecanismo de acción involucra dos vías diferentes: una dependiente de endotelio, en el que se activa la vía del NO/GMPc y otra independiente de endotelio, en el que se activan canales de K⁺ activados por Ca²⁺. Mientras que su efecto farmacológico no es producido mediante la activación de receptores colinérgicos muscarínicos ni a través de la activación de la vía de la PGI₂/AMPc. Por otro lado, la hematoxilina (Peso molecular = 302.29 g/mol), el flavonoide mayoritario del extracto, contribuyó al efecto vasodilatador del extracto de manera importante (Córdoba, 2009).

La especie *Haematoxylon brasiletto*, se obtuvo en el Mercado de Sonora, México, D.F. El extracto metanólico de la corteza molida (1.0 Kg) de *Haematoxylon brasiletto* se preparó mediante una maceración con metanol. El extracto se evaporó

bajo presión reducida, produciendo un residuo (100 g), el cual fue fraccionado con éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo. La fracción F16VIII-10 fue purificada por RP-HPLC semipreparativo, por elución con CH₃CN-H₂O-CH₃COOH (30:70:0.01) a CH₃CN-H₂O-CH₃COOH (70:30:0.001) en 30 min, para obtener los compuestos puros brazilina ($t_R = 8.7$ min) y hematoxilina ($t_R = 6.5$ min) (Cuadro 2) (Rivero y Cruz, 2008). La hematoxilina es el compuesto seleccionado para realizar su evaluación farmacológica en esta tesis.

Cuadro 2. Neoflavonoides aislados e identificados en *H. brasiletto* (Craig y col., 1965).



Adicionalmente, los flavonoides como la hematoxilina se hallan presentes en todas las partes de la planta. Algunos compuestos de este tipo se encuentran más ampliamente distribuidos que otros, siendo más comunes las flavonas y los flavonoles y más restringidos en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas (Lock y col. 2006). Los flavonoides son compuestos fenólicos que protegen al organismo del daño producido por agentes antioxidantes. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos,

y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras patologías (Martínez-Flórez y col., 2002).

II.4 Sistema vascular y su autorregulación.

Los vasos sanguíneos forman un sistema de conductos cerrados que llevan la sangre que bombea el corazón a los tejidos del cuerpo y luego la regresan a este órgano. La pared de las arterias consta de tres capas o túnicas: 1) interna, 2) intermedia y 3) externa. La capa más interna es la túnica íntima, compuesta de un revestimiento de epitelio escamoso simple llamado endotelio, una membrana basal y una lámina elástica interna. El endotelio es una túnica continua de células que reviste la cara interna de todo el sistema cardiovascular (corazón y vasos sanguíneos). La capa intermedia o túnica media por lo regular es la más gruesa y consta de fibras elásticas y de músculo liso, dispuestas circularmente alrededor del vaso sanguíneo. La túnica externa o adventicia se compone principalmente de fibras elásticas y de colágena.

Las venas constan básicamente de las mismas capas que las arterias, aunque el grosor es relativamente distinto, su íntima es más delgada, y la media mucho más fina, con células musculares lisas y elásticas relativamente escasas. Además, muchas venas especialmente las de las extremidades, presentan abundantes válvulas que son pliegues de la túnica interna que forman cúspides y se proyectan hacia el vaso sanguíneo, en dirección al corazón (Figura 3 pág. 10).

El sistema nervioso autónomo inerva por medio de fibras simpáticas el músculo liso vascular. El aumento de la actividad simpática habitualmente estimula la contracción del músculo liso y, con ella, la de la pared vascular e induce un angostamiento del vaso sanguíneo. Esta reducción del diámetro vascular se denomina vasoconstricción. En contraste, al disminuir la estimulación simpática o en presencia de ciertas sustancias (como el óxido nítrico y prostaciclina), se relajan las fibras del músculo liso. Ello hace que se incremente el diámetro de los vasos sanguíneos, fenómeno llamado vasodilatación.

El sistema nervioso regula la presión de la sangre mediante asas de retroalimentación negativa, mediante el empleo dos tipos de reflejos: de

barorreceptores y de quimiorreceptores. Los barorreceptores de las paredes de ciertas arterias y venas detectan la presión sanguínea utilizando los dos sistemas de retroalimentación negativa más importantes: los reflejos aórtico y de los senos carotídeos. Por otro lado, los quimiorreceptores se localizan en los cuerpos carotídeos y aórticos. La regulación del flujo y presión también están moduladas por diversas hormonas o sistemas hormonales tales como el sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAA), la adrenalina y la noradrenalina, la hormona antidiurética (ADH) y el péptido natriúretico auricular (ANP) que producen vasodilatación o vasoconstricción.

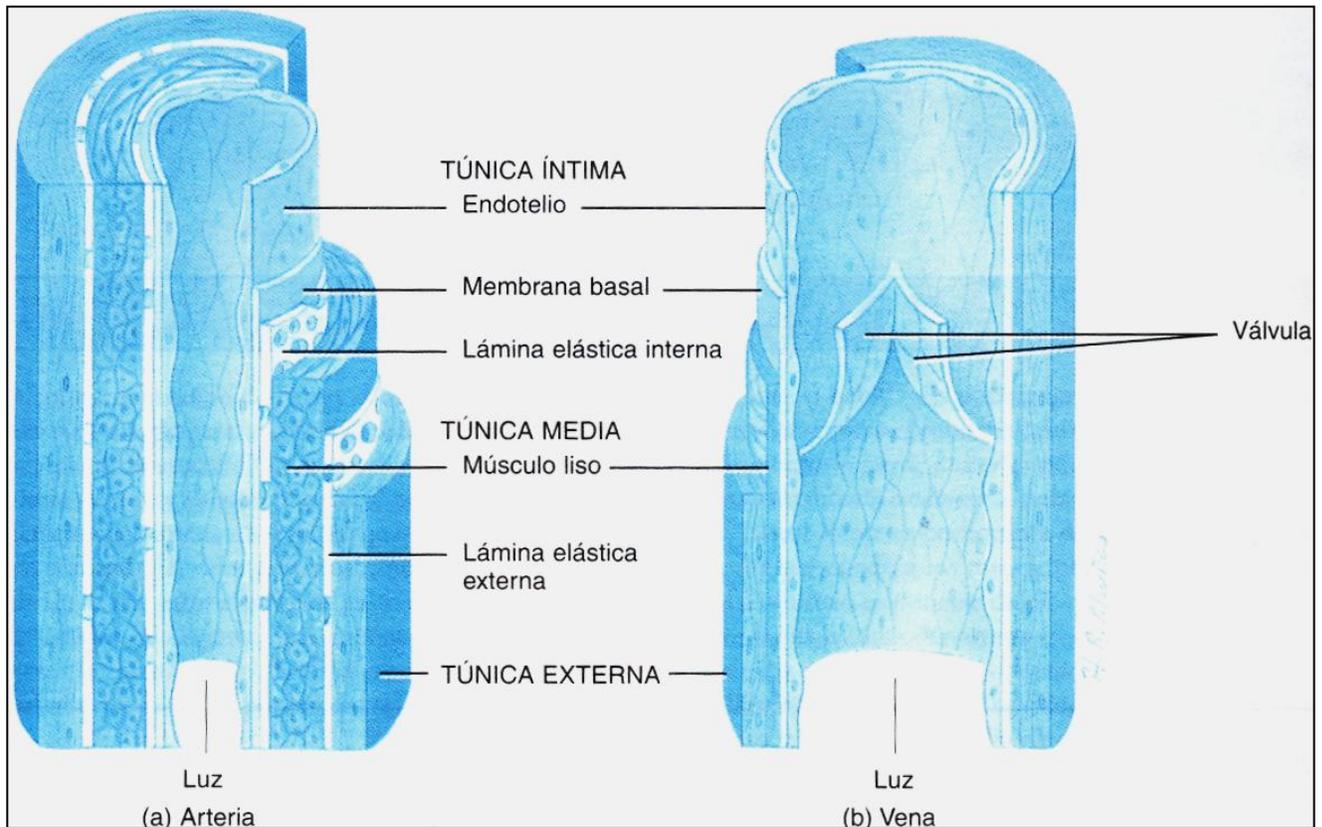


Figura 3. Estructura de venas y arterias (Tortora y Grabowsky, 2006).

Ciertos factores locales influyen en la resistencia vascular de la circulación en general y, por ende, en la presión sanguínea. Esta capacidad de los tejidos para ajustar de manera automática su flujo sanguíneo conforme a las necesidades

metabólicas de oxígeno y nutrimentos, así como las de eliminación de desechos se denomina autorregulación, la cual esta modulada por estímulos físicos como el calor que propicia la vasodilatación, y el frío que induce la vasoconstricción y estímulos químicos los cuales inducen la liberación de una amplia variedad de factores vasoactivos por varios tipos de células, como leucocitos, plaquetas, células musculares lisas y endoteliales, y macrófagos, los cuales modifican el diámetro vascular. Las células endoteliales liberan agentes vasodilatadores, tales como el NO y la prostaciclina. Los traumatismos o la inflamación de los tejidos promueven la liberación de histamina y cininas vasodilatadoras. Entre los compuestos vasoconstrictores, se encuentran ciertos eicosanoides, como el tromboxano A₂ y la prostaglandina F_{2α}, radicales superóxido, serotonina plaquetaria y endotelinas (Tortora y Grabowsky, 2006).

II.4.1 Endotelio vascular y factores endoteliales

El endotelio representa el primer punto de referencia cuando hablamos de enfermedades cardiovasculares, ya que es un órgano vital endocrino y paracrino. Entre las funciones importantes del endotelio están el mantenimiento del tono vascular, la regulación del crecimiento vascular, la regulación de la adhesión leucocitaria y plaquetaria, la regulación de la trombosis, la fibrinólisis y la inflamación. El endotelio normal detecta cambios en distintos factores hemodinámicos (p. ej. presión y fuerzas de rozamiento) y hormonales (p. ej. sustancias vasoactivas, así como mediadores que se producen en las células sanguíneas y plaquetas), y entonces sintetiza y libera sustancias biológicamente activas que mantienen la homeostasis vascular (Verdejo, 2006).

El endotelio controla la respuesta vascular mediante la liberación de varias sustancias, entre los que se incluyen la prostaciclina (PGI₂) (Moncada, 1988), el óxido nítrico (NO) (Moncada, 1988), el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), el ATP y la adenosina (Vanhoutte, 1988), así como de sustancias vasoconstrictoras como el tromboxano A₂ (Moncada, 1988) y las endotelinas (Yangisawa, 1988). La liberación de estos factores por diversos estímulos, desempeña un importante papel en la regulación local del flujo sanguíneo,

interviniendo en la patogénesis de la hipertensión arterial. Asimismo el desbalance entre las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras lleva implícito un daño, que por consecuencia produce una remodelación que induce cambios en la estructura vascular (Ochoa, 2008).

II.4.2 Músculo liso

Existen dos tipos de músculo liso, el más común es el músculo liso visceral (unitario), que se encuentra en las láminas de envoltura que forman parte de las paredes de arterias y venas pequeñas, así como de vísceras huecas. El músculo liso es autorrítmico. Las fibras se conectan unas con otras mediante uniones de abertura (nexos), de modo que el potencial de acción muscular se disemina por toda la red. Cuando un neurotransmisor, hormona o señal autorrítmica estimula a una fibra, el potencial de acción muscular se disemina a las fibras circundantes, que se contraen al unísono, como una unidad. El otro tipo de músculo liso es el multiunitario, que se compone de fibras separadas, cada una con sus propias terminales de motoneuronas y unas cuantas uniones de hendiduras entre fibras adyacentes. La estimulación de una fibra muscular visceral produce contracción de muchas fibras adyacentes, mientras que la de una sola fibra multiunitaria hace que solo se contraiga dicha fibra. El músculo liso multiunitario es parte de las paredes de las grandes arterias, vías respiratorias hasta el nivel de los pulmones, músculos erectores del pelo en los folículos pilosos, músculos del iris y cuerpo ciliar.

Cada fibra (célula) contiene un núcleo de forma ovalada y en ubicación central. El sarcoplasma (citoplasma) de las fibras de músculo liso posee filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina, en proporción de 1:10 y 1:15, distribuidos en el sarcoplasma. Las fibras de músculo liso también contienen filamentos proteicos intermedios. Puesto que los filamentos no se superponen con regularidad, las fibras de músculo liso no poseen estrías, de lo cual se deriva el calificativo de liso. Además carecen de túbulos T y en ellas es escaso el retículo sarcoplásmico para almacenar calcio. En comparación con la de músculo estriado, la contracción en las fibras de músculo liso se inicia con mayor lentitud y dura mucho más tiempo. El modelo aceptado de contracción de las fibras musculares

lisas establece que los filamentos delgados de actina, asociados a filamentos gruesos de miosina, se anclan por un extremo a cuerpos densos adheridos al sarcolema (membrana citoplasmática) y por el otro a filamentos intermedios a través de cuerpos densos citoplasmáticos (Figura 4). Por añadidura, el músculo liso se puede acortar y estirar en mayor grado que los otros tipos de músculo.

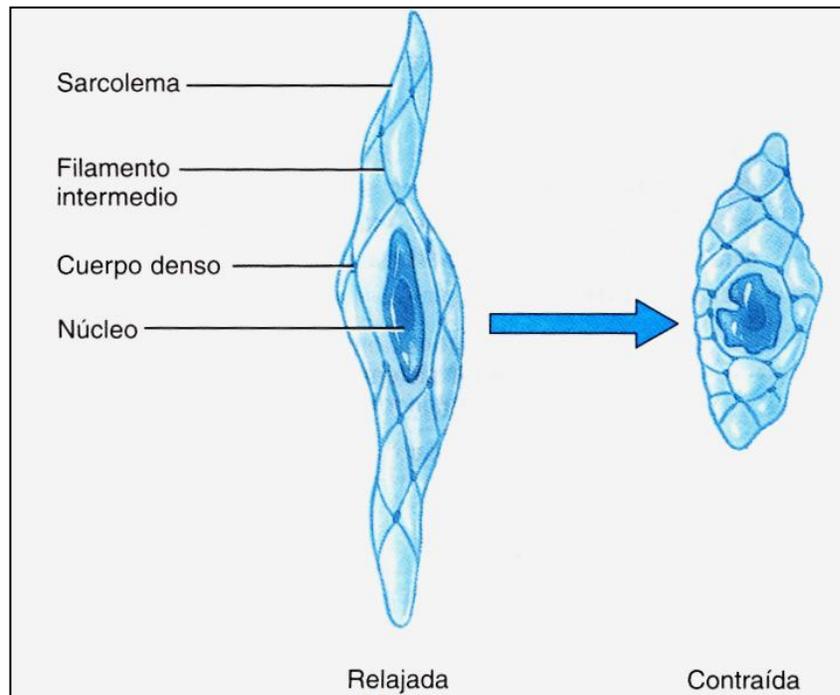


Figura 4. Detalles de una fibra de músculo liso (Tortora y Grabowsky, 2006).

Al aumentar la concentración de Ca^{2+} en el citosol de las fibras de músculo liso, empieza a contraerse. Los iones Ca^{2+} fluyen al citosol desde el líquido extracelular y el retículo sacoplásmico, pero no hay túbulos transversos en las fibras de músculo liso, de modo que se requiere más tiempo para que el Ca^{2+} llegue a los filamentos del centro de la fibra y active el proceso de contracción (Tortora y Grabowsky, 2006).

Es importante mencionar que en las células musculares lisas predominan los receptores muscarínicos M_3 activados primordialmente por acetilcolina y cuya activación muscarínica estimula principalmente proteínas $\text{G}_{q/11}$, las cuales inducen

la movilización de Ca^{2+} , y por consiguiente la contracción muscular. Sin embargo, constituye una excepción el músculo liso vascular porque intervienen mecanismos endoteliales que inducen la vasodilatación (Flórez, 1998).

La relajación del músculo liso vascular es desencadenada por una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos, los cuales interactúan con receptores específicos localizados en la membrana celular de las células del músculo liso vascular, o bien, en el citoplasma, generando así segundos mensajeros intracelulares, los cuales reducen el tono del músculo liso vascular mediante mecanismos que incluyen: (1) la inhibición de la síntesis de un agonista contráctil, (2) el bloqueo de receptores que median la contracción del músculo liso vascular y (3) el cierre de canales de calcio localizados en la membrana plasmática (Carvajal y col., 2000). Se ha visto que los segundos mensajeros intracelulares involucrados en la relajación del músculo vascular son los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), generados por la actividad de las adenilato y las guanilato ciclasas, respectivamente (Soderling y col., 2000; Lucas y col., 2000).

II.5 Mecanismos de relajación.

II.5.1 Óxido nítrico y su mecanismo de relajación.

En los vasos sanguíneos, la liberación del factor de relajación derivado de endotelio (EDRF), producido por acetilcolina (ACh, agonista no específico), es mediada por la activación de diferentes subtipos de receptores muscarínicos. El receptor muscarínico M_3 endotelial esta principalmente involucrado en la regulación de la relajación dependiente de endotelio inducida por ACh (Sohn, 2004). La activación muscarínica activa principalmente proteínas $G_{q/11}$ cuyo sistema efector es una fosfolipasa C (PLC) la cual induce la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) (movilizador de Ca^{2+}) y de diacilglicerol (activador de la proteína quinasa C, PKC) a partir del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) (Flórez, 1998). La estimulación de los receptores muscarínicos en el endotelio en la mayoría de los lechos vasculares produce relajación con la liberación de diversos agentes vasodilatadores entre los que se encuentran: EDRF, identificado como óxido nítrico (NO),

prostaciclina (PGI_2) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) (Parkington, 1993).

El NO, un gas de vida corta, es un radical con un electrón desapareado, que ocupa un orbital π antienlazante y, por lo tanto, es muy inestable. El NO actúa como una hormona paracrina y es inactivado por el anión superóxido y por la hemoglobina. Las acciones fundamentales del NO son la relajación del músculo liso de la capa media de las arterias y las venas. Además, el NO no solamente es liberado hacia el músculo liso, sino también hacia la luz del vaso sanguíneo, por lo que también inhibe la agregación de plaquetas y leucocitos al endotelio. Adicionalmente, el NO inhibe la mitogénesis y la proliferación de las células musculares lisas (Moncada, 1991).

El NO se forma a partir de la L-arginina por la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico (NOS) con la obtención de L-citrulina como co-producto. Se han identificado tres genes diferentes que codifican tres isoformas distintas de la NOS, la NOS I o NOS neuronal (NOS_n), que se aisló primero en el cerebelo; la NOS II o inducible (NOS_i) y la NOS III, presente en las células endoteliales (NOS_e) (Weruaga y col., 2002). Las tres isoformas de NOS pertenecen a la familia de las flavoproteínas y presentan una estructura homodimérica constituida por dos dominios: el dominio oxigenasa, que contiene lugares de unión para la L-arginina, el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina (BH_4); y el dominio reductasa que contiene sitios de unión para el FAD, FMN y NADPH, el cual se une a través de un lugar de reconocimiento para la calmodulina (CaM). La actividad de la NOS_e, al igual que la NOS_n, es dependiente de Ca^{2+} /CaM. La CaM regula un amplio rango de funciones celulares a través de su unión reversible dependiente de Ca^{2+} a proteínas diana, incluyendo la NOS (Xia y col., 2009).

El NO liberado del endotelio activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) en el músculo liso vascular, produciendo un incremento de los niveles de GMPc a partir de GTP. El GMPc, a su vez, activa la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), que disminuye las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, causando la relajación del músculo liso y disminuyendo el tono vascular (Figura 5 en pág. 19). El

NO participa en muchos de los efectos vasoprotectores atribuidos endotelio normal (Verdejo, 2006). Además, la acumulación de GMPc causa relajación del músculo liso por diferentes mecanismos, incluyendo la activación de canales de potasio tales como los canales de potasio sensibles a ATP (K-ATP), los canales de potasio dependientes de calcio (BK_{Ca}) y/o los canales de potasio sensibles a voltaje (K_V). El NO interactúa también con otros canales iónicos del músculo liso, incluyendo canales catiónicos y de cloro e influye en el potencial de membrana de las células del músculo liso indirectamente, de una manera autocrina (Feletou y Vanhoutte, 2006).

La inhibición farmacológica de las NOSs se ha empleado para conocer sus propiedades enzimáticas, aunque todavía con un uso terapéutico incipiente. La actividad catalítica de la NOS se puede inhibir farmacológicamente con análogos del sustrato (L-arginina), los cuales presentan diferentes afinidades para la distintas isoformas de la enzima. Entre los inhibidores más empleados se encuentran la N^ω-metil-L-arginina (L-NMA), la N^ω-nitro-L-arginina (L-NNA) y el éster metílico de N^ω-nitro-L-arginina (L-NAME) (Weruaga y col., 2002).

Sin embargo, el NO puede ser almacenado y liberado independientemente de la activación de la NOS. Dos tipos de reservas han sido descritos. El primero es llamado reserva fotosensible que involucra la liberación de NO por luz ultravioleta. El mecanismo de liberación de NO por esta vía en ausencia de luz ultravioleta aun se desconoce. La respuesta de NO es sensible a los inhibidores de la guanilato ciclasa (como el 1H-[1,2,4] oxidiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona, ODQ), pero no a los inhibidores de la NOS. El segundo reservorio está localizado en la adventicia y se produce generalmente por la formación del complejo hierro no-hemo dinitrosil y proteínas S-nitrosadas, cuando concentraciones elevadas de NO son producidas, particularmente cuando la NOS-II ha sido activada por lipopolisacáridos (Feletou y Vanhoutte, 2006).

II.5.2 Prostaciclina y su mecanismo de relajación.

Los prostanoideos son una familia de mediadores lipídicos bioactivos, formados por la ciclooxigenasa (COX) a partir del el ácido araquidónico (AA),

contenido en la membrana celular de todas las células del cuerpo. Están involucrados en numerosas actividades fisiológicas, incluyendo la agregación plaquetaria, la vasodilatación y la vasoconstricción, la respuesta inflamatoria local y la adhesión celular de leucocitos al endotelio (Morita, 2002; Hinz, 2002).

Recientemente, varios tipos de receptores para PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , PGD_2 , y tromboxano A_2 (p.ej. receptores EP, FP, IP, DP y TP, respectivamente) han sido caracterizados usando enfoques farmacológicos y bioquímicos. Los receptores de prostaglandinas son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que parecen contar con una estructura única que consta de siete regiones transmembranales (Kimura y col., 2009).

La prostaciclina (PGI_2) es el más abundante prostanoide generado por las paredes vasculares y es producido por las células endoteliales a partir del ácido araquidónico, derivado de la prostanglandina H_2 , a través de la acción de la enzima COX- PGI_2 sintetasa. La PGI_2 es descrita como un vasodilatador derivado de endotelio que, por estimulación del receptor PGI_2 (receptor IP) y la activación de la adenilato ciclasa (AC), induce un incremento en la concentración intracelular de AMPc a partir de ATP, provocando la activación de una proteína quinasa específica llamada proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), de manera que produce relajación del músculo liso (Figura 5 en pág. 19) (Xavier y col., 2009). Además, la elevación de los niveles de AMPc produce hiperpolarización, la cual es causada por la abertura de uno o más tipos de canales de potasio. Por lo tanto, la relajación inducida por PGI_2 puede estar asociados con K-ATP, BK_{Ca} , canales de potasio rectificadores de entrada (K_{IR}) y/o K_V (Feletou y Vanhoutte, 2006).

La PGI_2 contrarresta los efectos del tromboxano A_2 (TXA_2) y proporciona un equilibrio importante en la homeostasis cardiovascular. Se reconoce a la PGI_2 como el mayor prostanoide producido por la COX-2. La experiencia clínica sobre los inhibidores selectivos de COX-2 que han tenido inesperados efectos adversos en pacientes con riesgo cardiovascular, ha abierto un debate sobre el papel de los prostanoideos derivados de COX-2 en la fisiopatología vascular (Kawabe y col., 2010). El mecanismo de acción íntimo común a todo el grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), consiste en la inhibición de las enzimas

COXs por inhibidores como la indometacina, inhibidor de COX-1 y COX-2. Por consecuencia, se inhibe la formación de prostaglandinas (particularmente PGE₂ y PGI₂) a partir del AA de membrana de distintos tipos celulares (Vane, 1971).

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de la PGI₂ son la angiotensina II, la acetilcolina (ACh) o la bradiquinina (BK), así como productos liberados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento liberado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) (Navarro- Cid y col., 1999).

II.5.3 Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

El factor hiperpolarizante derivado de endotelio produce vasodilatación mediante un mecanismo de acción independiente del NO y de los prostanoides, y está asociado con la hiperpolarización de células de músculo liso vascular, sin embargo no se ha caracterizado completamente. Evidencia experimental demuestra que la vasodilatación provocada por EDHF, inicia con la activación de los canales de potasio (K_{Ca} y K-ATP) que conduce a la hiperpolarización del músculo liso vascular (Figura 5 en pág. 19). Aunque también la activación de canales de K⁺ en células endoteliales que conduce a su hiperpolarización, pueden conducir a la hiperpolarización y la relajación del músculo liso (Crane y col., 2003).

La hiperpolarización dificulta la apertura de los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes del músculo liso, la cual conduce a una caída de [Ca²⁺]_i (concentración intracelular de calcio) y por última la relajación. Se ha observado que la vasodilatación puede ser producida por una variedad de EDHFs, entre los que se encuentran los ácidos epoxieicosatrienoicos generados por citocromo P450 (ETTs) (metabolitos del AA), productos de la lipoxigenasa, el NO, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el AMPc y, posiblemente, los péptidos natriuréticos. Por otra parte, la contribución de estos posibles EDHFs a la respuesta vasodilatadora, dependientes de endotelio, parece variar considerablemente entre los diferentes lechos vasculares y especies, y es probable que existan varios EDHFs diferentes que pueden actuar por separado o interactuar sinérgicamente (Grgic y col., 2009).

En la mayoría de las arterias, las respuestas mediadas por EDHF involucran la activación de SK_{Ca} y/o IK_{Ca}, pero no de BK_{Ca}, que son canales de K⁺ sensibles a

Ca²⁺ y acoplados a un receptor. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar como la activación de SK_{Ca} y/o IK_{Ca} endotelial conduce a la hiperpolarización de células del músculo liso: 1) la hiperpolarización de células del endotelio transmitidas directamente al músculo liso vascular por medio de gap junctions y 2) la acumulación en la hendidura intracelular de iones K⁺, liberados de de las células endoteliales a través de K_{Ca}, conduciendo a la hiperpolarización del músculo liso por aumento en la conductancia del K⁺ (Feletou y Vanhoutte, 2006).

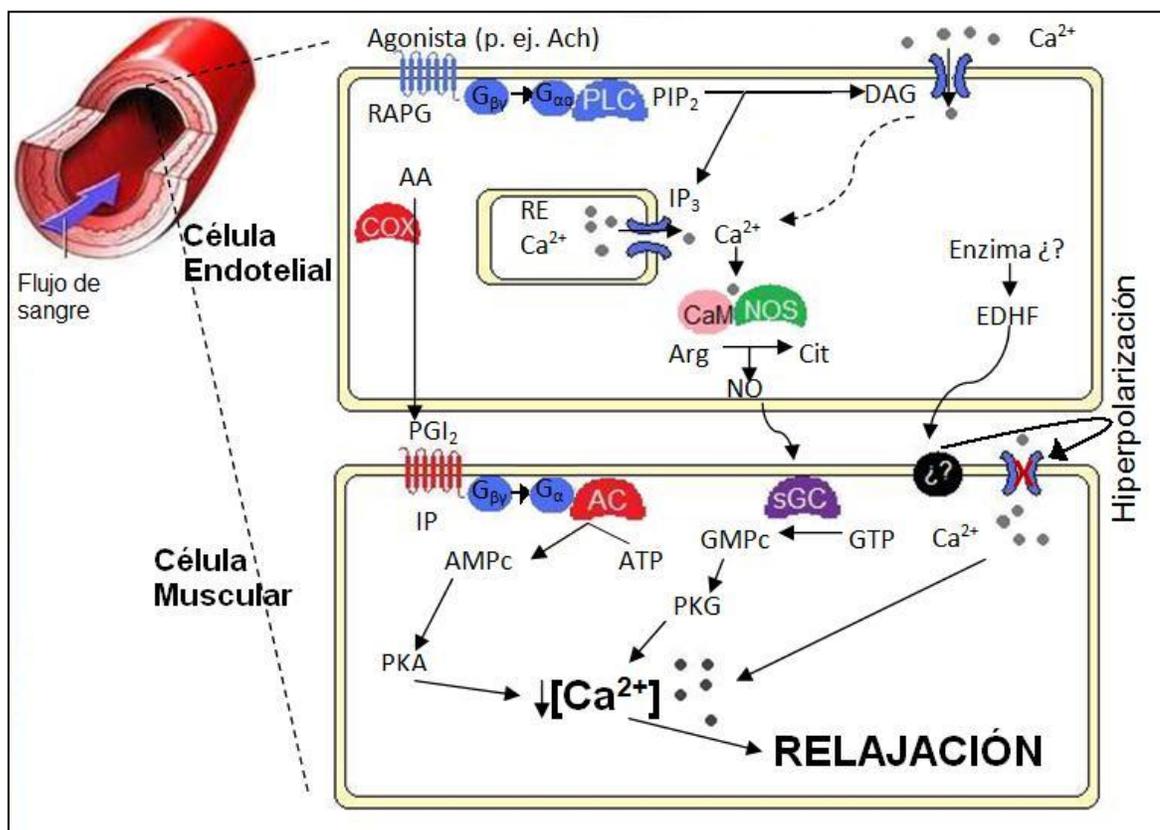


Figura 5. Mecanismos de la relajación, dependiente de endotelio, del músculo liso vascular. Ver detalles en el texto. ACh: Acetilcolina; RAPG: receptores acoplados a proteínas G; AA: ácido araquidónico, COX: ciclooxigenasa; PGI₂: prostaciclina; IP: receptor a prostaciclina; AC: adelinato ciclasa; PLC: fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol difosfato; DAG: diacilglicerol; IP₃: inositol trifosfato; CaM: calmodulina; NOS: óxido nítrico sintetasa; NO: óxido nítrico; GCs: guanilato ciclasa soluble; EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio; AMPc: 3',5'-adenosina-monofosfato cíclico; GMPC: 3',5'-guanosina monofosfato cíclico; PKA: cinasa dependiente de AMPc; PKG: cinasa dependiente de GMPC; GTP: trifosfato de guanosina. Adaptado de Stankevicius y col., 2003.

II.5.4 Mecanismos de relajación por regulación de Ca^{2+} .

El GMPc induce la relajación del músculo liso mediante la reducción de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Varios mecanismos bioquímicos han sido propuestos para explicar la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente del GMPc. Entre los mecanismos propuestos se incluyen: el secuestro y remoción del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por bombeo del catión, la inhibición de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y la interrupción del acoplamiento del receptor a la proteína G en el músculo liso (Isakson, 2007). Adicionalmente, se ha reportado otro mecanismo, el cual involucra la apertura de los canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+} (BK). El incremento en la actividad de los canales BK, hiperpolariza la membrana y reduce la entrada de Ca^{2+} intracelular a través de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L. Como resultado de la activación de los canales BK, ocurre una disminución en el calcio intracelular global, que conduce a la desfosforilación de las cadenas ligeras de la miosina (MLCK), y por consiguiente a la relajación (Regimbald, 2007).

Otro mecanismo importante, en el control de los niveles de Ca^{2+} intracelular por la vía de GMPc es la regulación del receptor de IP_3 en el retículo sarcoplásmico. La fosforilación del receptor IP_3 por la PKG, disminuye la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (De Wit, 2003).

La activación de dos diferentes sistemas de transporte de iones, la ATPasa de la membrana plasmática que bombea Ca^{2+} y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, incrementan la salida de Ca^{2+} del músculo liso vascular. La fuerza impulsora para eliminar al Ca^{2+} de la célula a través de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, depende a su vez de otros dos efectos mediados por el GMPc, el agotamiento del Na^+ intracelular por la vía de activación de la ATPasa Na^+/K^+ y la hiperpolarización de la membrana de la célula a través de la activación de los canales de K^+ . La ATPasa que elimina el Ca^{2+} del músculo liso vascular y la ATPasa Na^+/K^+ se activan por la fosforilación mediante la PKG (Tamaoki y col., 1997).

La fosforilación de los residuos de la serina 19 de las cadenas ligeras de miosina, es necesaria para la activación por la actina de la ATPasa de miosina y la subsiguiente formación cíclica de los puentes cruzados entre las cabezas de miosina y de actina. Existen dos mecanismos importantes que regulan el tono del

musculo liso vascular: la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), una cinasa activada por Ca^{2+} y calmodulina, y la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina, una fosfatasa tipo I de residuos de serina y treonina. El efecto de la fosforilación de la MLCK da como resultado la vasoconstricción y la desfosforilación de la MLCK produce vasodilatación (Li, 2003). En la Figura 6 se muestran los mecanismos de regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la célula muscular lisa inducidos por GMPc.

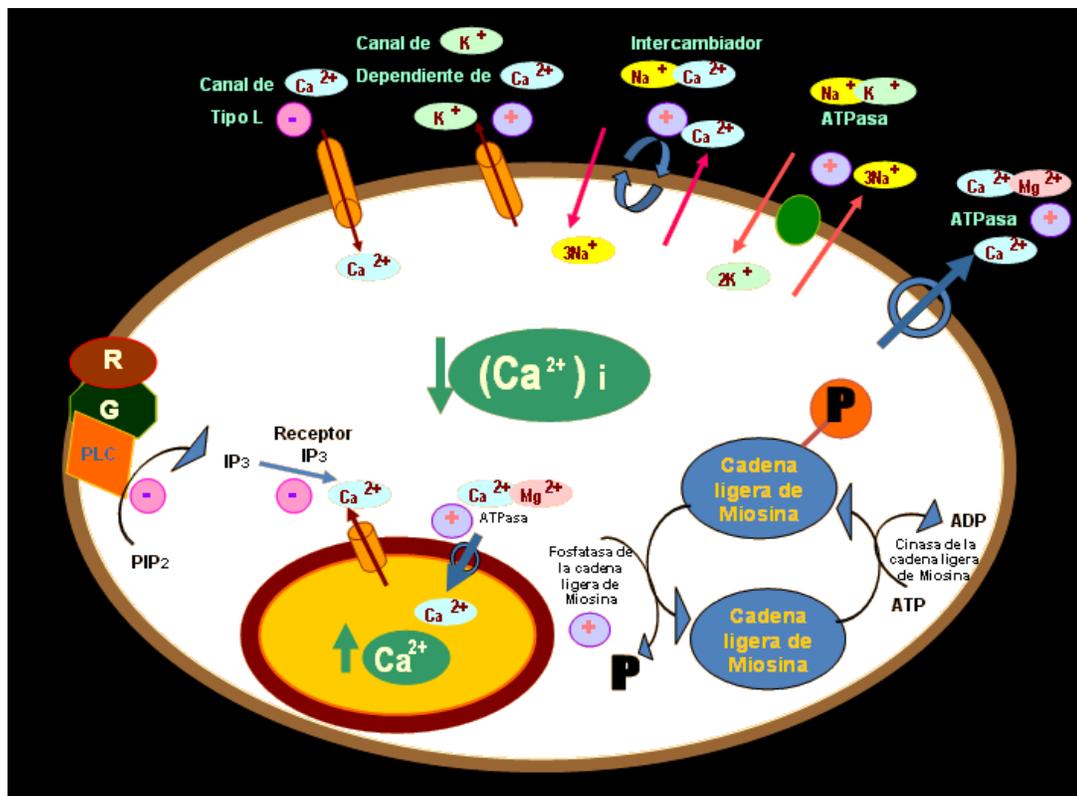


Figura 6. Regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la célula del músculo liso por medio del GMPc. Ver detalles en el texto. R: receptor acoplado a proteínas G; PLC: fosfolipasa C; PIP_2 : fosfatidilinositol difosfato; IP_3 : inositoltrifosfato; ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato. Adaptado de Lucas y col., 2000.

II.6 Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) y su relación con la vía del NO/GMPc.

La proteína VASP (del inglés “vasodilator stimulated phosphoprotein”) se expresa en muchos tipos de células y tejidos de mamíferos, incluyendo plaquetas, células del músculo liso vascular y del endotelio. VASP pertenece a la familia Ena/VASP que está asociada con los microfilamentos de actina, adhesiones focales y contactos célula-célula (Reinhard y col., 2001). Funcionalmente, la VASP está involucrada en la regulación dinámica del citoesqueleto, como la nucleación de los filamentos de actina, el reclutamiento de profilina y G-actina, el desprendimiento y agrupación de filamentos (Defawe y col., 2010). Sin embargo, en vasos sanguíneos intactos la función precisa de VASP aún falta por determinar.

Por otra parte, la activación de PKA o PKG producida por la activación de las vías de la PGI₂/AMPc y del NO/GMPc, respectivamente, resulta en la fosforilación de numerosas proteínas, incluyendo la VASP. En esta proteína se encuentran tres sitios de fosforilación: serina 157 (Ser157), serina 239 (Ser239) y treonina 278 (Thr278). El sitio Ser157 es fosforilado, preferentemente, por PKA, mientras que el sitio Ser239 es fosforilado por la PKG (Blume y col., 2007). La fosforilación de VASP puede ser monitoreada de dos maneras: la fosforilación de Ser157 que altera la movilidad electroforética de la VASP desde 46 a 50 kDa, la cual puede ser usada para cuantificar la fosforilación de este sitio y la fosforilación de la Ser239 que puede ser medida por el anticuerpo monoclonal 16C2, el cual detecta específicamente el estado de fosforilación de este aminoácido. Estudios anteriores han investigado y demostrado que la fosforilación de VASP puede utilizarse como marcador bioquímico del grado de activación de la vía del NO/GMPc (Ibarra-Alvarado y col., 2002).

III. HIPÓTESIS.

La hematoxilina, obtenida del extracto metanólico preparado a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil), relaja el músculo liso vascular mediante la activación de las vías del NO/GMPc y de la PGI₂/AMPc y de los canales de potasio.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General.

- Evaluar el efecto de la hematoxilina, el metabolito secundario mayoritario obtenido a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto*, sobre el tono del músculo liso vascular, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, a fin de determinar si su efecto vasodilatador involucra la participación de las vías del NO/GMPc y de la PGI₂/AMPc y/o de canales de potasio.

IV.2 Específicos.

- Determinar el efecto de la hematoxilina, obtenida del extracto metanólico de la corteza de la planta *Haematoxylon brasiletto*, sobre el tono del músculo liso vascular de la aorta aislada de rata, intacta y sin endotelio.

- Determinar la potencia y la eficacia del efecto farmacológico presentado por la hematoxilina, mediante la comparación de su concentración efectiva media (CE₅₀) y su efecto máximo (E_{max}) con los parámetros presentados por compuestos control (nitroprusiato de sodio y acetilcolina).

- Realizar la caracterización farmacológica preliminar del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina con la finalidad de proponer su posible mecanismo de acción.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

V.1 Animales de experimentación.

Ratas macho (250-350 g) de la cepa Wistar.

V.2 Métodos.

V.2.1 Ensayo de aorta aislada de rata.

Las ratas fueron anestesiadas con cloroformo y sacrificadas por decapitación. Se removió la aorta torácica y ésta se colocó en una solución fría de Krebs- Henseleit (pH 7.4, 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 30 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 5 mM D- glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Feelisch y col., 1999). Los anillos de aorta se montaron en cámaras de incubación de 7 mL conteniendo solución de Krebs-Henseleit a 37°C, las cuáles se burbujearon constantemente con una mezcla de oxígeno-dióxido de carbono 95:5.

Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass modelo FTO3 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8 P.

El tejido se dejó equilibrar realizando tres lavados con solución Krebs-Henseleit a 37°C a intervalos de 10 minutos y sometiéndolo a una tensión de reposo (basal) de 1.5 g. Una vez que el tejido alcance el equilibrio, los segmentos se pre-contrajeron con una solución de KCl 100 mM en la cámara de incubación por aproximadamente 10 minutos. Se realizaron otros tres lavados con solución Krebs- Henseleit a 37°C a intervalos de 6 minutos. Después de la última aplicación se dejó reposar el segmento de aorta hasta alcanzar su tensión basal nuevamente de 1.5 g.

A fin de determinar a qué nivel en el que actúa la hematoxilina para llevar a cabo su efecto vasodilatador, se realizó experimentos en los que, una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con 1 μ M de fenilefrina

(Phe) en la cámara de incubación. Para evaluar si el efecto vasodilatador del extracto es dependiente de endotelio, se eliminó las células endoteliales de la aorta de manera mecánica, utilizando unas pinzas pequeñas, y haciéndolas pasar la superficie interna del segmento de aorta, de manera cuidadosa, para no dañarla. Una vez estabilizado el segmento de aorta en la cámara de incubación, se contrajeron con Phe 1 μ M por 20 minutos, cuando la contracción se estabilizó se agregó acetilcolina (ACh) 1 μ M para verificar que fue removido el endotelio correctamente. Se realizaron tres lavados consecutivos con solución Krebs-Henseleit a 37°C a intervalos de 10 minutos y se continuó el ensayo de manera normal.

La hematoxilina se evaluó en un rango de concentraciones de 3.16 μ M a 3160 μ M. En primer término se preparó una solución concentrada disolviendo primero 30 mg de la hematoxilina en 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agregaron 1750 μ L de agua tridestilada. Se prepararon soluciones con concentraciones diferentes del compuesto de prueba, diluyendo la solución concentrada en agua tridestilada y se adicionaron a las cámaras de tejido aislado, 20 min después de haber inducido la contracción de la aorta con Phe. La respuesta inducida en la aorta por cada una de las soluciones de la hematoxilina se registró durante 10 minutos y los cambios en la tensión producida por las sustancias de prueba se detectaron, mediante transductores de fuerza (FTO3 Grass), acoplados a un polígrafo Grass. La información obtenida fue procesada por el programa PolyView (Grass). Las respuestas se expresaron como el porcentaje de contracción alcanzada al adicionar la Phe (Feelisch y col., 1999).

En los ensayos para determinar el mecanismo de acción involucrado en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, se agregó antes de contraer el segmento de aorta con Phe 1 μ M, indometacina 10 μ M (INDO, un inhibidor de la cicloxigenasa), atropina 10 μ M (ATR, un antagonista no selectivo de los receptores colinérgicos muscarínicos), éster metílico de N^G-nitro-L-arginina 100 μ M (L-NAME, un inhibidor no selectivo de la NO sintetasa), 1H-[1,2,4] oxidiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona 10 μ M (ODQ, un inhibidor específico de la GCs), cloruro de

tetraetilamonio 1 mM (TEA, un inhibidor de los canales de potasio) o glibenclamida 1 μ M (un inhibidor de los canales de potasio dependientes de ATP). Después de 20 minutos, se contrajeron los segmentos de aorta con Phe 1 μ M (20 minutos) y se agregaron de manera acumulativa la hematoxilina.

En otra serie de ensayos, se realizó el ensayo de aorta aislada de rata en ausencia de endotelio, agregando antes de contraer con Phe 1 μ M, tetraetilamonio 1 mM (TEA, un inhibidor de los canales de potasio) o glibenclamida 1 μ M (un inhibidor de los canales de potasio dependientes de ATP). Después de 20 minutos se contrajeron los anillos de aorta con Phe 1 μ M (20 minutos) y se agregaron la hematoxilina de manera acumulativa.

Además, se comparó el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina con el efecto producido por la ACh (activador de la vía del NO/GMPc que depende de endotelio) y el nitroprusiato de sodio (SNP, un activador de la misma vía bioquímica, el cual actúa independientemente de la presencia de endotelio vascular).

V.2.2 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica.

Se realizaron de 3-4 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. En cada caso se calcularon los promedios \pm SEM (del inglés: Standard Error of the Mean; error estándar del promedio). La construcción de las curvas concentración respuesta (CCR), se realizaron mediante un programa de ajuste no lineal (PRISMA 5.0). En algunas CCR, se calcularon la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$). Las diferencias estadísticas entre las CE_{50} fueron analizadas mediante la prueba de t de Student para muestras no pareadas.

V.2.3 Determinación del grado de fosforilación de la proteína VASP.

Anillos de aorta de rata fueron previamente contraídos con Phe, relajados parcialmente con concentraciones de 100 y 1000 μ g/mL de hematoxilina y removidos de incubación. Después fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y homogenizados en un mortero en frío. Las muestras fueron

desnaturalizadas en buffer de Laemmli a 95°C por 10 min, se centrifugaron y se separó el sobrenadante. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas primero fueron bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente (TA) o por toda la noche a 5°C en TBS con 5% de leche en polvo y después se incubaron con el primer anticuerpo (anti-actina o anti-P_{Ser239}-VASP) preparado en PBS que contenga 5% de leche en polvo y 0.1% de tween 20 por 1 h a TA. Después de este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 20 (0.1%) y se incubaron por 1 h con un segundo anticuerpo acoplado a una enzima peroxidasa suspendido en TBS-Tween 20 (0.1%) que contenga 5% de leche en polvo. Entonces, se lavaron nuevamente las membranas con TBS-Tween 20 (0.1%), se incubaron con el sustrato enzimático y se visualizaron las proteínas marcadas por la luminiscencia emitida por el complejo enzima-sustrato (Ibarra-Alvarado y col., 2002). Estas señales quimioluminiscentes fueron detectadas y cuantificadas mediante el sistema de detección de señales CHEMIDOC XRS (Bio-Rad).

VI. RESULTADOS.

VI.1 Evaluación del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre la musculatura lisa vascular.

Un estudio reciente sugirió que la hematoxilina, el neoflavonoide mayoritario del extracto metanólico del *H. brasiletto*, es el responsable de la mayor parte de su efecto vasodilatador (Cordova, 2009), sin embargo, no existen reportes que describan con detalle su mecanismo de acción. Por esta razón, se evaluó la hematoxilina (3.16 - 3160 μM) en ensayos de aorta intacta de rata previamente contraída con Phe y se construyó la curva concentración-respuesta (CCR) (Figura 7), de la que se obtuvieron la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo ($\text{E}_{\text{máx}}$) (Cuadro 3).

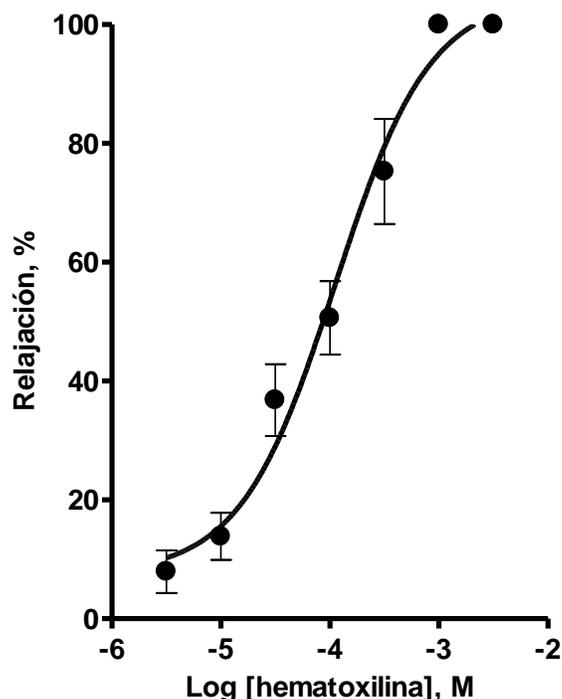


Figura 7. CCR del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre el tono del músculo liso vascular.

VI.2 Comparación del efecto vasodilatador de la hematoxilina con el efecto inducido por la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio en segmentos de aorta intacta de rata.

Los efectos vasodilatadores de la acetilcolina (ACh), un activador de la vía del NO/GMPc que depende de endotelio, y el nitroprusiato de sodio (SNP), un activador de la misma vía, mediante mecanismos independientes de la presencia de endotelio, se compararon con el efecto vasodilatador de la hematoxilina. La potencia del SNP fue mayor que la de la ACh y ésta, a su vez, fue mayor a la hematoxilina. Por otro lado, la eficacia de la hematoxilina fue mayor a la de la ACh y similar a la del SNP (Figura 8). En el Cuadro 3, se muestra la CE_{50} y el $E_{m\acute{a}x}$ de cada compuesto.

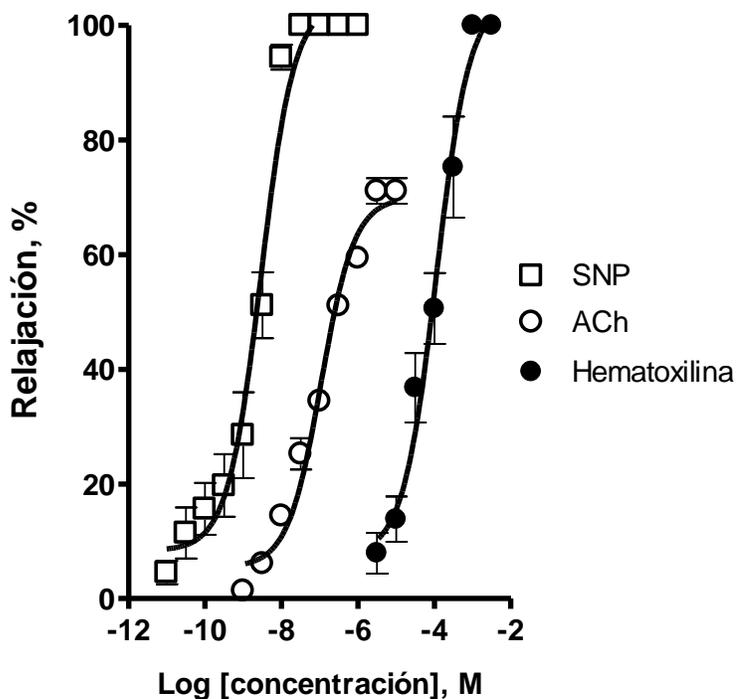


Figura 8. Comparación de las CCRs del efecto vasodilatador del SNP, la ACh y la hematoxilina en segmentos de aorta de rata.

Cuadro 3. CE_{50} , $E_{m\acute{a}x}$ y potencia del efecto vasodilatador inducido por la hematoxilina, la ACh y el SNP sobre segmentos de aorta intacta de rata.

Compuesto	CE_{50}	$E_{m\acute{a}x}$	Potencia
Hematoxilina	0.1 ± 0.02 mM	104.8 ± 9.4%	1
ACh	0.1 ± 0.02 μM	70 ± 3.5%	1,000
SNP	2.90 ± 0.4 nM	104.1 ± 4.9%	38,000

VI.3 Determinación del efecto vasodilatador de la hematoxilina sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio.

La hematoxilina relajó, de una manera dependiente de la concentración y de la presencia de endotelio, segmentos de aorta de rata previamente contraídos con Phe (Figura 9), ya que este compuesto disminuyó de manera significativa su efecto vasodilatador (desplazamiento de la CCR a la derecha, $p < 0.05$) (Cuadro 4). El efecto vasodilatador de la hematoxilina no se eliminó por completo en ausencia de endotelio, lo que indicó que el efecto producido por este flavonoide involucra la participación de mecanismos bioquímicos dependientes e independientes de endotelio.

Cuadro 4. Valores de CE_{50} del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en aorta de rata, en presencia y en ausencia, del endotelio.

Compuesto	CE_{50} (mM)
Hematoxilina con endotelio	0.1 ± 0.02
Hematoxilina sin endotelio	0.6 ± 0.1*

* $p < 0.05$ versus CE_{50} de la hematoxilina con endotelio.

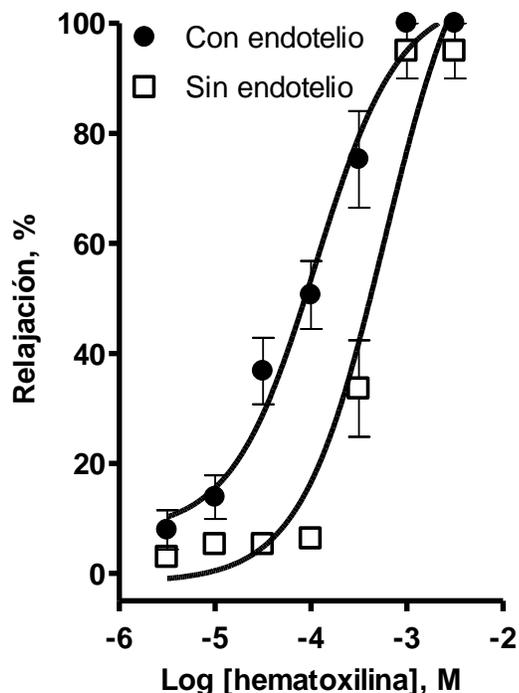


Figura 9. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en anillos de aorta de rata, en presencia y en ausencia, del endotelio.

VI.4 Participación de la activación de la vía del NO/GMPc en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina en segmentos de aorta intacta de rata.

Con el fin de determinar si la activación de la vía del NO/GMPc está involucrada en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, se utilizaron tres inhibidores de tres proteínas importantes que participan en esta vía bioquímica: la atropina, un antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos que se ubican a nivel endotelial, el L-NAME, un inhibidor de la NOS y el ODQ, un inhibidor de la GCs. Los resultados de estos experimentos indicaron que la hematoxilina activa de manera moderada la vía del NO/GMPc, mediante la activación de receptores colinérgicos muscarínicos, localizados en el endotelio (Figura 10). La activación de esta vía bioquímica induce la relajación de las arterias por dos mecanismos principales: 1) disminución de la concentración de calcio intracelular y 2) la disminución de la cadena ligera de la miosina (Stankevicius y col. 2003).

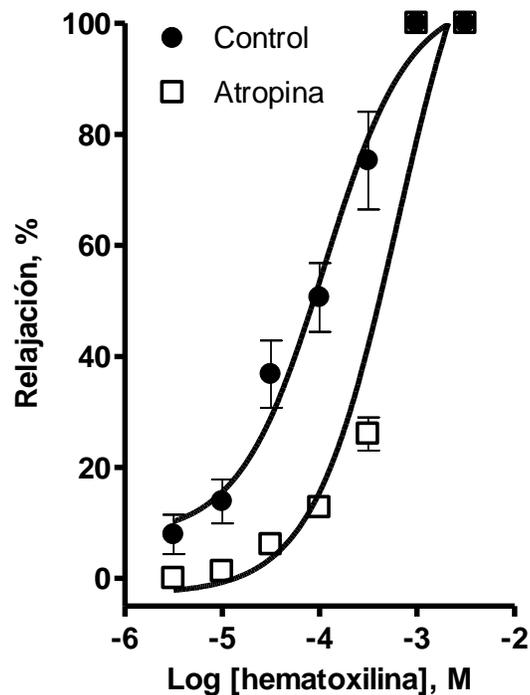


Figura 10. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de atropina.

En los experimentos en los que se utilizaron los inhibidores L-NAME (Figura 11) y ODQ (Figura 12), las CCRs del efecto vasodilatador de la hematoxilina se desplazaron a la derecha (Cuadro 5), lo cual confirmó la participación de la vía del NO/GMPc. La utilización de los inhibidores antes mencionados desplazaron las CCR a la derecha, sin llegar a inhibir completamente el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que el efecto vasodilatador de la hematoxilina, involucra mecanismos dependientes e independientes de endotelio.

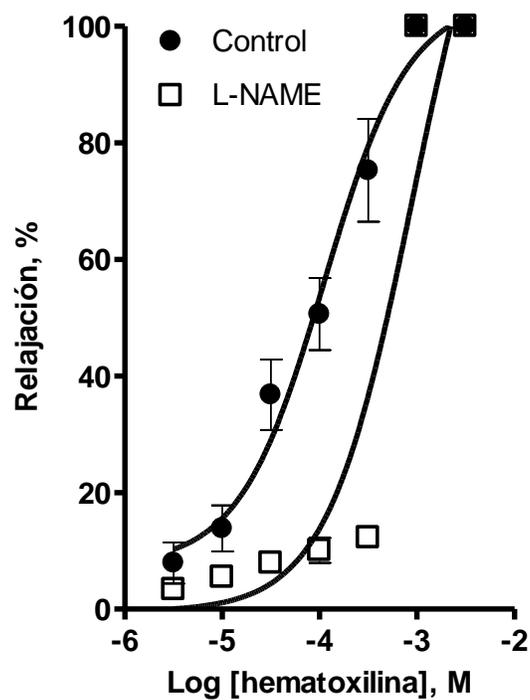


Figura 11. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de L-NAME.

Cuadro 5. Valores de CE_{50} del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de atropina, L-NAME y ODQ.

Compuesto	CE_{50} (mM)
Control	0.1 ± 0.02
Atropina	$0.6 \pm 0.1^*$
L-NAME	$0.9 \pm 0.2^*$
ODQ	$0.9 \pm 0.2^*$

* $p < 0.05$ versus control

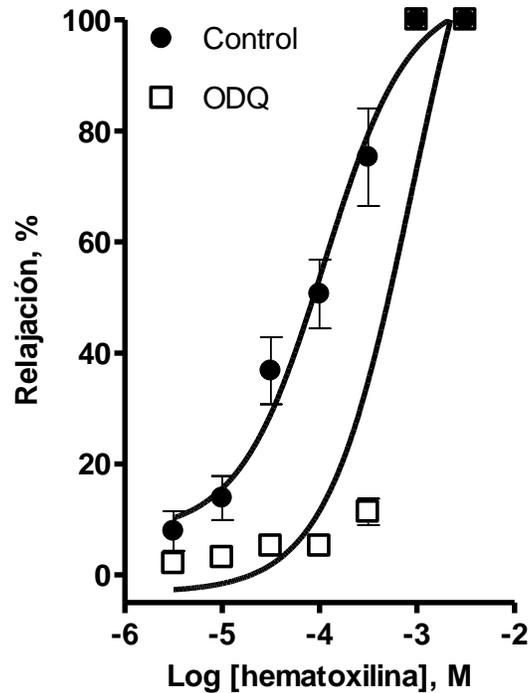


Figura 12. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de ODQ.

VI.5 Determinación de la activación de la vía de la $PGI_2/AMPC$ sobre el efecto vasodilatador de la hematoxilina en segmentos de aorta intacta de rata.

La vía de la $PGI_2/AMPC$ es otra vía importante que regula la vasodilatación del músculo liso vascular. Esta vía involucra la ciclooxygenasa (COX) que sintetiza la PGI_2 , la cual activa sus receptores en la membrana de la célula muscular lisa. La activación de estos receptores promueve la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual da como resultado el incremento en los niveles de AMPc y la consiguiente relajación del músculo liso vascular (Stankevicius y col. 2003). Para determinar la participación de esta vía bioquímica en el efecto vasodilatador de la hematoxilina, se construyó la CCR en presencia de INDO, un inhibidor inespecífico de la COX (Figura 13). Los resultados de estos experimentos sugieren que también la vía de $PGI_2/AMPC$ participa en el efecto vasodilatador de la hematoxilina.

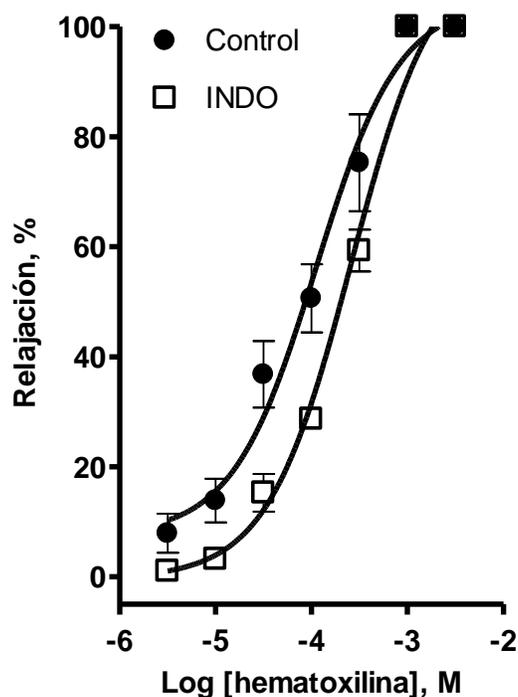


Figura 13. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre anillos de aorta, en presencia y en ausencia, de INDO.

Cuadro 6. Valores de CE_{50} del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de INDO, sobre segmentos de aorta intacta de rata.

Compuesto	CE_{50} (mM)
Control	0.1 ± 0.02
INDO	$0.3 \pm 0.03^*$

* $p < 0.05$ versus control

VI.6 Determinación de la participación de la activación de canales de potasio en el efecto vasodilatador de la hematoxilina en segmentos de aorta de rata, en ausencia y en presencia, de endotelio.

El factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) produce vasodilatación mediante un mecanismo de acción independiente del NO y de los

prostanoides, el cual no se ha caracterizado completamente todavía. Sin embargo, evidencia experimental demuestra que la vasodilatación inicia con la activación de canales de potasio (K_{Ca} y K -ATP), llevando al músculo liso vascular a que se hiperpolarize y, por consiguiente, que se relaje (Stankevicius y col. 2003).

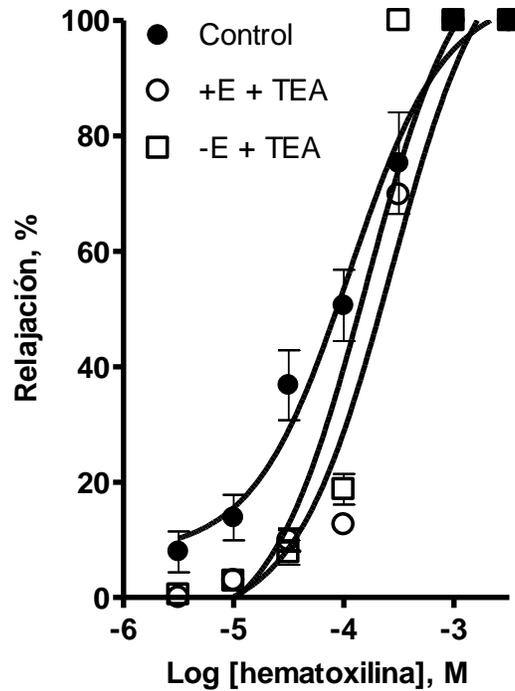


Figura 14. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre la contracción inducida por Phe en anillos de aorta intacta (control) y en segmentos de aorta con (+E) o sin (-E) endotelio incubados con TEA.

Para determinar si la activación de canales de potasio está involucrada en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, se construyeron CCRs en presencia o en ausencia de TEA o glibenclamida, dos inhibidores de los canales de potasio. También se realizaron estos experimentos en ausencia de endotelio, para determinar si el bloqueo de los canales de potasio en la célula endotelial modificaba de manera significativa el efecto vasodilatador de la hematoxilina en presencia de los bloqueadores de canales de potasio.

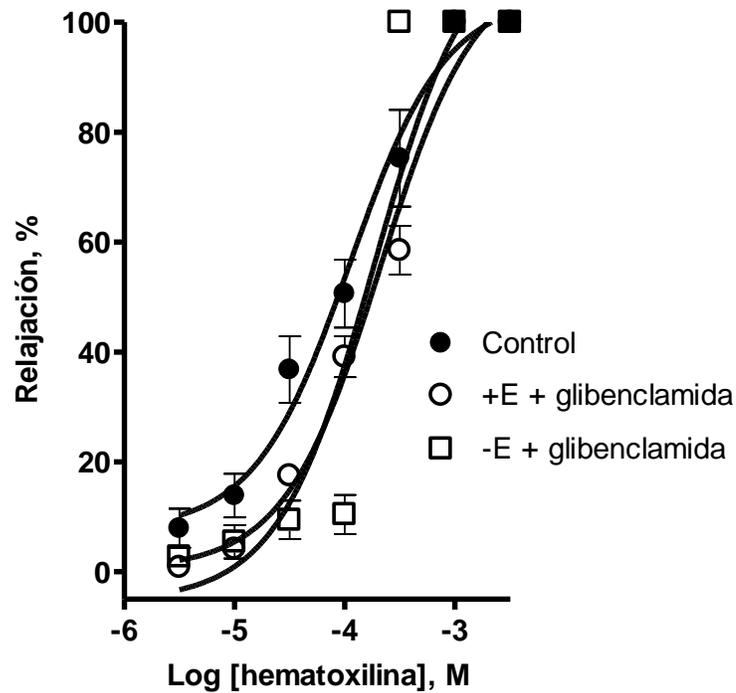


Figura 15. CCR del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sobre la contracción inducida por Phe en anillos de aorta intacta y en segmentos de aorta con o sin endotelio incubados con glibenclamida.

Los resultados de estos experimentos indicaron que el bloqueo de los canales de potasio reducen de manera significativa el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina solamente en aortas intactas, ya que las CCR fueron desplazadas a la derecha, de manera significativa, en presencia de estos bloqueadores. La modulación del efecto vasodilatador de la hematoxilina por los bloqueadores de canales de potasio no cambio notablemente en aortas sin endotelio, lo cual sugirió que otro de los mecanismos vasodilatadores de la hematoxilina es la activación de canales de potasio, posiblemente mediante la liberación del EDHF (Figuras 14 y 15).

Cuadro 7. Valores de CE₅₀ del efecto vasodilatador inducido por hematoxilina en ausencia (control) y presencia de TEA o glibenclamida, con y sin endotelio.

Compuesto	CE₅₀ (mM)
Control	0.1 ± 0.02
TEA sin endotelio	0.16 ± 0.03
Glibenclamida sin endotelio	0.19 ± 0.04
TEA con endotelio	0.27 ± 0.05*
Glibenclamida con endotelio	0.21 ± 0.03*

*p < 0.05 versus control

VI.7 Incremento de la fosforilación de la proteína VASP producido por la hematoxilina.

Para confirmar si la vía del NO/GMPc estaba involucrada en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, se realizó un Western blot, utilizando anticuerpos contra la actina y la VASP fosforilada en la serina 239. Ibarra-Alvarado y col. (2002) propusieron, en un trabajo previo, que la fosforilación de la VASP en este aminoácido podría servir como marcador del estado de activación de la vía del NO/GMPc. La fosforilación de la Ser239, producida por la activación de esta vía, puede ser medida por el anticuerpo monoclonal 16C2 (Ibarra-Alvarado y col., 2002). Nuestros resultados confirmaron que el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina involucra la activación de esta vía bioquímica, ya que segmentos de aorta incubados con hematoxilina (100 y 1,000 mg/ml) indujeron un aumento significativo en los niveles de fosforilación de VASP en la serina 239 (Figura 16).

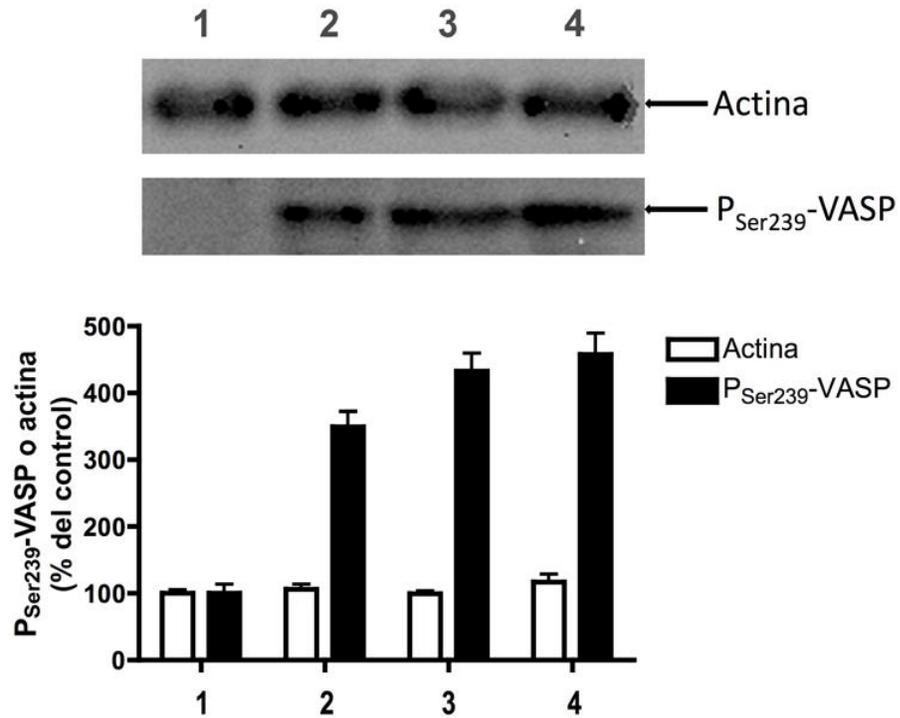


Figura 16. Incremento de la fosforilación de VASP en la serina 239 producida por la incubación de segmentos de aorta con ACh (2) y hematoxilina: 100 μ g/ml (3) y 1,000 μ g/ml (4). (1) Anillos de aorta control.

VII. DISCUSIÓN.

Estudios previos demostraron que el extracto metanólico del *Haematoxylon brasiletto* contiene compuestos que producen vasodilatación, de una manera, dependiente de la concentración, entre los cuales se encuentra la hematoxilina, el flavonoide mayoritario del extracto, el cual contribuye, principalmente, al efecto vasodilatador (Córdova, 2009). Estos resultados concuerdan con otras investigaciones, en donde se reporta que los flavonoides poseen una gran cantidad de actividades biológicas entre las que se encuentran los efectos antioxidante, espasmolítico, antitrombótico y vasodilatador (Harbone y Williams, 2000). En la presente tesis se corroboró el efecto vasodilatador reportado anteriormente de la hematoxilina (Córdova, 2009) y se llevó a cabo la caracterización farmacológica del mecanismo de acción utilizando el ensayo de aorta intacta de rata y diferentes inhibidores.

Los resultados mostraron que hematoxilina relaja la aorta de rata, de una manera dependiente de la concentración (Figura 7). Este flavonoide presentó una potencia menor que los dos controles positivos utilizados (SNP y ACh). Sin embargo, la hematoxilina fue más eficaz que la ACh y presentó una eficacia máxima similar a la del SNP. La ACh es un compuesto vasodilatador dependiente de endotelio, cuyo efecto se basa en la activación de los receptores colinérgicos muscarínicos en la célula endotelial. Su activación desencadena la liberación del NO y la subsecuente elevación de GMPc en la célula muscular, produciendo relajación (Stankevicius y col., 2003), en tanto que el SNP es un activador de la vía del NO/GMPc que actúa independientemente de la presencia de endotelio (Feelisch y col., 1999).

Para iniciar con la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de la hematoxilina, se realizaron experimentos en ausencia de endotelio. El endotelio representa el primer punto de referencia cuando se habla de enfermedades cardiovasculares, ya que es un órgano vital endocrino y paracrino. En el endotelio se sintetizan y liberan sustancias biológicamente activas como la PGI₂, el NO y el EDHF (Moncada, 1988; Vanhoutte, 1988; Verdejo, 2006). La

relajación del músculo liso vascular es desencadenada por una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos que interactúan con receptores específicos localizados en las células musculares lisas vasculares, generando así segundos mensajeros que reducen el tono vascular (Carvajal y col., 2000). En estos experimentos se observó que el endotelio se encuentra involucrado de manera significativa en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, ya que disminuyó, de manera significativa, el efecto vasodilatador de la hematoxilina (Figura 9, Cuadro 4). Sin embargo, la eliminación del endotelio solo desplazó la CCR hacia la derecha, sin que se eliminara por completo el efecto vasodilatador con respecto a la CCR control, lo que sugirió que están involucrados otros mecanismos en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina.

La liberación del NO producido por la ACh es mediada por la activación de diferentes subtipos de receptores muscarínicos, entre los cuales se encuentra el receptor M₃, el cual está principalmente involucrado en la regulación de la relajación dependiente de endotelio, desencadenando una cascada de señalización que resulta en la activación de la vía del NO/GMPc. El NO se forma a partir de la L-arginina por la actividad enzimática de la NOSe (NOS III), presente en las células endoteliales. El NO liberado del endotelio activa la GCs en el músculo liso vascular, produciendo un incremento de los niveles de GMPc que, a su vez, activa la PKG y disminuye las concentraciones de Ca²⁺ citosólico causando vasodilatación (Sohn, 2004; Verdejo, 2006; Weruaga y col., 2002). Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de los receptores colinérgicos muscarínicos con atropina, disminuye significativamente el efecto vasodilatador de la hematoxilina (Figura 10, Cuadro 5). Sin embargo, este compuesto solo desplazó la CCR hacia la derecha sin eliminar por completo el efecto vasodilatador de la hematoxilina. Por otro lado, la inhibición de la NOSe por L-NAME (inhibidor no selectivo de las NOSs) y la inhibición de la GCs por ODQ mostraron resultados similares, ambos disminuyeron significativamente la potencia de la hematoxilina (Figuras 11 y 12, Cuadro 5). Estos resultados sugieren que evidentemente los receptores colinérgicos muscarínicos y la consiguiente activación de la vía del NO/GMPc, están involucrados en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina. Los experimentos de Western blot

confirmaron la participación de esta vía en el efecto producido por la hematoxilina, ya que segmentos incubados con este flavonoide indujeron la elevación de la fosforilación de la VASP en la serina 239 (Figura 16). Sin embargo, el hecho de que la incubación de anillos de aorta con inhibidores de la vía del NO/GMPc (atropina, L-NAME y ODQ) no eliminará por completo el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina sugirió la participación de otras vías bioquímicas en este efecto.

Los prostanoideos son una familia de mediadores lipídicos bioactivos, formados por la COX a partir del AA; el prostanoides más abundante es la PGI₂ y es derivado de la prostanglandina H₂. La PGI₂ es descrita como un vasodilatador derivado de endotelio que, por estimulación de su receptor en la célula muscular lisa, activa a la AC e induce un incremento en la concentración intracelular de AMPc, provocando la activación de PKA, de manera que produce relajación del músculo liso (vía de la PGI₂/AMPc) (Xavier y col., 2009). La inhibición de COX por INDO en nuestros experimentos, mostraron una pequeña disminución en el efecto vasodilatador de la hematoxilina (Cuadro 6). Esta disminución del efecto vasodilatador puede observarse en la CCR en presencia de INDO, en donde se observa un pequeño desplazamiento hacia la derecha con respecto a la CCR control (Figura 13). Con base a estos resultados, se propone que la vía de la PGI₂/AMPc también participa en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina.

Por otra parte, el EDHF produce vasodilatación mediante un mecanismo de acción independiente del NO y de los prostanoideos, y está asociado a la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular, sin embargo, esta vía bioquímica no se ha caracterizado completamente. Estudios previos demuestran que la vasodilatación provocada por EDHF, inicia con la activación de los canales de potasio (K_{Ca} y K-ATP) que conduce a la hiperpolarización del músculo liso vascular y reduce la entrada de Ca²⁺ a la célula (Crane y col., 2003). Se realizaron ensayos con aorta de rata intacta y sin de endotelio, en presencia y en ausencia de inhibidores de canales de potasio: TEA (inhibidor no selectivo de los canales de potasio) y glibenclamida (inhibidor de K-ATP). Los resultados muestran que las CCRs (Figuras 14 y 15) fueron desplazadas significativamente hacia la derecha

solo en presencia de endotelio, lo cual sugirió que la hematoxilina puede inducir la liberación de factores hiperpolarizantes, como el EDHF. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la hematoxilina active directamente otro tipo de canales iónicos de potasio.

La determinación de los mecanismos de acción involucrados en el efecto vasodilatador producido por la hematoxilina, es muy importante, ya que incluye la participación de tres mecanismos que actúan de manera simultánea: la activación de las vías del NO/GMPc y de la PGI₂ y de los canales de potasio, posiblemente mediante la liberación de EDHFs, de manera que se puede proponer a este flavonoide como un excelente prototipo para el desarrollo de fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, las cuales se encuentran entre las primeras causas de muerte de nuestro país.

VIII. CONCLUSIONES.

1. La hematoxilina, el metabolito secundario mayoritario obtenido a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto*, relaja la musculatura lisa arterial, de una manera dependiente de la concentración.
2. El efecto vasodilatador producido por la hematoxilina involucra mecanismos dependientes e independientes del endotelio.
3. La potencia del efecto vasodilatador de la hematoxilina fue menor a las potencias del SNP y de la ACh, compuestos utilizados como controles. Sin embargo, la eficacia del efecto vasodilatador de la hematoxilina es mayor que la de la ACh y similar que la del SNP.
4. El efecto vasodilatador de la hematoxilina involucra tres mecanismos de acción principales: la activación de las vías del NO/GMPc y de la PGI₂ y de los canales de K⁺.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Argueta, A. 1994. www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php

Blume, C., Benz, P., Walter, U., Ha, J., Kemp, B., Renne, T. 2007. AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 282, No. 7: 4601–4612.

Boshier, D., Cordero, J. 2010. www.arbolesdecentroamerica.info

Carvajal, J., Germain, A., Huidobro-Toro, J., Weiner, C. 2000. Molecular mechanism of cGMP-ediated smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 184: 409-420.

Cordell, G. 2000. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. Vol. 55: 463-480.

Córdoba, J., Hernández, M. 2008. Programa de acción específico. Riesgo cardiovascular. Vol. I: 11-18.

Córdova, T. 2009. Estudio farmacológico del extracto metanólico y de la hematoxilina obtenidas a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil). Santiago de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 25-39.

Craig, J. C., Naik, A. R., Pratt, R. y Johnson, E. 1965. Nuclear magnetic spectra and stereochemistry of the antibacterial principle of *Haematoxylon braziletto*. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 30: 1573–1576.

Crane, G., Gallagher, N., Dora, K., Garland, C. 2003. Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Journal of Physiology*. Vol. 553(1): 183–189.

Defawe, O., Kim, S., Chen, L., Huang, D., Kenagy, R., Renné, T., Walter, U., Daum, G., Clowes, A. 2010. VASP Phosphorylation at Serine239 Regulates the Effects of NO on Smooth Muscle Cell Invasion and Contraction of Collagen. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 222, No 1: 230–237.

De Wit, C. Wöifle, S. 2007. EDHF and gap junctions: important regulation of vascular tone within the microcirculation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Vol 8(1): 11-25.

Feletou, M., Vanhoutte, P. 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing Factor Where Are We Now? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. Vol. 26: 1215-1225.

Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. y Schmidt, H. H. 1999. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Molecular Pharmacology*. Vol. 56: 243-253.

Flórez, J. 1998. *Farmacología Humana*. 3ra. Ed. Masson. S.A. España. 218-219.

Frenk, J., Ruelas, E. 2001. Programa de acción. Enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial. Vol. 1: 16-22.

Grgic, I., Kaistha, P., Hoyer, J., Köhler, R. 2009. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 157: 509-526.

Harborne, J. B. y Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. Vol. 55: 481-504.

Heredia, N., Escobar, M., Rodriguez-Padilla, C. y Garcia, S. 2005. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Journal of Food Protection*. Vol. 68: 1346-1351.

Hinz, B., Brune, K. 2002. Cyclooxygenase-2: 10 years later. *The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 300: 367-375.

Ibarra-Alvarado, C., Galle, J., Melichar, V., Mameghani, A., Schmidt, H. 2002. Phosphorylation of Blood Vessel Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Serine 239 as a Functional Biochemical Marker of Endothelial Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling. *Molecular Pharmacology*. Vol. 61, No. 2: 312–319.

- Isakson, B., Ramos, S., Duling, B. 2007.** Ca²⁺ and inositol 1,4,5, trisphosphate mediated signaing across the myoendothelial junction. *Circulation Research*. Vol. 100(2): 246-254.
- Kawabe, J., Ushikubi, F., Hasebe N. 2010.** Prostacyclin in vascular diseases. Recent insights and future perspectives. *Official Journal of the Japanese Circulation Society. Circulation Journal*. Vol. 74(5): 836-43.
- Kimura, M., Okamoto, H., Natsume, H., Ogihara, M. 2009.** IP Receptor Agonist–Induced DNA Synthesis and Proliferation in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes: the Involvement of Endogenous Transforming Growth Factor- α . *Journal of Pharmacological Sciences*. Vol. 109: 618-629.
- Li, N., Sul, J., Haydon, P. 2003.** A calcium induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refillingor calcium stores in astrocytes. *The Journal of Neurosciences*. Vol. 23 (32): 10302-10310.
- Lock, O., Cabello, I., Doroteo, V. 2006.**
www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry
- Lucas, K., Pitari, G., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K., Waldman, S. 2000.** Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*. Vol. 52: 375-414.
- Martinez-Florez, S., Gonzales-Gallego, J., Culebras, J. Tuñon, M. 2002.** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. Vol. 16: 271-278.
- Moncada, S. y Higgs, E. A. 1991.** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*. Vol. 21: 361-374.
- Moncada, S., Radomski, M., Palmer, R. 1988.** Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 37(13): 2495-2501.
- Moreno-Brea, M., Micó, J. 2000.** Inhibidores de la COX-2: mecanismo de acción. Vol. IV: 3-6.
- Morita, I. 2002.** Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Vol. 68/69: 165-175.

- Murad, F. 1996.** Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Journal of the American Medical Association*. Vol. 276: 1189-1192.
- Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., Maeso, R. y Lahera, V. 1999.** Fisiología de la pared vascular, En: Tresguerras, J. A. F., Aguilar, E., Cachofeiro, M. D (Eds.), *Fisiología humana*, McGraw- Hill Interamericana, México: 525,532-539.
- Ochoa, J. 2008.** La contracción isométrica aumenta la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial de forma dependiente del complejo Ca^{2+} /Calmodulina, en la aorta de rata. Distrito Federal. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Farmacología. 19-25.
- Pratt, R. y Yuzuriha, Y. 1959.** Antibacterial activity of the heartwood of *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. Vol. 48: 69-72.
- Pacheco, A., Gonzalez, Y., Viso, F. 2006.** Las reacciones adversas de las plantas medicinales y sus interacciones con medicamentos. *MEDISAN*. Vol. 10: 4-11.
- Parkington, H., Tare, M., Tonta, M., Coleman, H. 1993.** Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine. *Journal of Physiology*. Vol. 465: 459-476.
- Regimbald, D., Arguin, G., Fregean, M. Guillemette, G. 2007.** cAMP-dependent protein kinasa enhances inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in AR4-2J cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 101(3): 609-618.
- Reinhard, M., Jarchau, T., Walter, U. 2001.** Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochemical Sciences*. Vol. 26, No. 4:243–249.
- Rivero-Cruz, F. 2008.** Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 119: 99-103.
- Sanchez-Marroquin, A., Garcia, L. y Mendez, M. 1958.** Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 1: 225–232.
- Soderling, S., Beavo, J. 2000.** Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current Opinion in Cellular Biology*. Vol. 12: 174-179.

- Sohn, J., Ok, S., Kim, J., Moon, S., Shin, W., Lee, H., Chung, Y. 2004.** Inhibitory Effect of Fentanyl on Acetylcholine-induced Relaxation in Rat Aorta. *Anesthesiology*. Vol. 101(1): 89–96.
- Stankevicius, E., Kèvelaitis, E., Vainorius y E., Simonsen, U. 2003.** Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina*. Vol. 39: 333-341.
- Tamaoki, J., Tagaya, E., Nishimura, K., Isoino, K. y Nagai, A. 1997.** Role of Na⁺-K⁺ ATPase in cyclic GMP- mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 122: 112-116.
- Tortora J., Grabowsky R. 2006.** Principios de anatomía y fisiología. 9ª Ed. Oxford University Press. México D.F. págs 297-300; 677-678: 692-693.
- Vane, J. 1971.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*. Vol. 23(1): 232-235.
- Vanhoutte, P. 1988.** Endothelial and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. Vol. 13 (62): 658-67.
- Verdejo, J. 2006.** Función endotelial. *Archivos de cardiología de México*. Vol. 76: 164-169.
- Weruaga, E., Aijón, J., Alonso, J. 2002.** Neurobiología de la nicotina y el óxido nítrico: Una revisión. *Prevención del tabaquismo*. Vol. 4 (2): 95-103.
- Xavier, F., Blanco-Rivero, J., Ferrer, M., Balfagón, G. 2009.** Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP₁ and TP receptors. *British Journal Pharmacology*. Vol. 158(7): 1787-95.
- Xia, C., Misra, I., Iyanagi, T., Kim, J. 2009.** Regulation of Interdomain Interactions by Calmodulin in Inducible Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 284(44): 30708–30717.
- Yangisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. 1988.** A novel peptide vasoconstrictor, endoteilin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *Journal of Hypertension Supplement*. Vol. 6(4): 188-191.