



“Determinación del efecto vasorrelajante de
Prosthechea livida en un modelo *ex vivo* de
aorta de rata”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A

GOMEZ PINEDA DEYRA LUCERO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

ASESOR:

DRA. ANGÈLICA FLORES FLORES

CUERNAVACA, MORELOS

2021

Fecha: 09 de agosto de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0091/2021

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis "**Determinación del efecto vasorrelajante de Prosthechea livida en un modelo ex vivo de aorta de rata**" presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia, **C. Deyra Lucero Gómez Pineda, (20141004027)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado	Firma
Dr. Germán Bernal Fernández	_____
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa	_____
Dr. Jesús Rivera Islas	_____
Dra. Irene Perea Arango	_____
Dra. Priscila Sinaí Rendón Vallejo	_____



**ATENTAMENTE
"POR UNA HUMANIDAD CULTA"**

**M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaría de Docencia**

Cp. Archivo
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMÉRICA SERRANO LOPEZ | Fecha: 2021-08-09 21:16:15 | Firmarse
PpVZnJcCvVMeSgyIhdP0SKL0suloQKKMfQnzdHb0iSHNDRCsAKTta1KMU8+yyqizeel10u8n96cKnRfC0dnDveJyWwbcFth8de21xkn5/4-PhchWC2FAN7jobYIPsYg8yN
Xp00Rw8SRuuDGTBPNTUtsu6JAVG4p1050UqG3VTU5Gaan5x1ev0b2YDQ70d0YaurVAYgVU8ajmKduba7Wky5zrFEtBMBIGC07vJ7VCJ9eP+DwqRwBdeawVWw11sb3z1.P1
z1A9Aj1h3qns2vxx1H-HuHovofereXy37U8A9curV4K8GB74D0uJ2W20/7bqD3e0GULf0---

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4RpD8

<https://efirma.uaem.mx/nc/Repudio/KayUpkIeyBnc2RIU0GkyF9ouS6wajpn>



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PRISCILA SINAI RENDON VALLEJO | Fecha: 2021-08-11 12:33:47 | Firmante
CVChRluKfO1WICT6P9nRM4eXezhRYuu18ZJ4K9KE7ciZ2rBy2cEILwGgReDzX1GAlIABZwYnnjMx9tBwer1yZQ6TL-sVPIQEQ0b8nj7-6bTG3+eZD4L6750vthe-fc4xcl6Fh7d9
TuRjaUxQeKvB3x2dEIHm2kyWn3ns4k0mWfMf x7eY8hJDa5L2UVEoZGoSIAVVGMC50th7dJoP4LJX3N2UIMpml67xfYEX3Cim5hc2M7NE7GT3G-gmguxGR5cN3Z1DX45
/s47xq19G0kShAnkap3Hm64fbxymjM51aWUO7UyY66NQNB1JpGsbG4f8KmgZGJ49Jw==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha: 2021-08-11 13:27:35 | Firmante
YDiiH7mmNqdc6x2Jkq6bhcAAIemgydaAZHRokgg6s7wY5Jx-jRuJXmVwIBRQd1yqXqE5+HG11GethAGcSGjMvoGt1MqWu4S2jbdKJbIacB9dnEG+gqKpejiaB8krI24V0VC
UK+D9Aundetk1elpk4pXSvbtV6Zkqu+m94F80MqycUa4X34E3E154r+6VhJRHgSseRuzTDsOfIX5xMPcPjbbAZYexZkZD4JwqBY8nsn8J+um4XogWQ5y3Cs3NAvCzS4U
80IOFXS45zr6ckTYSUS5UgP9hmdgikw2NGhpVvefUBwBNuwJXDf27-kJbWbcw==

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha: 2021-08-11 13:56:03 | Firmante
DkqA4ZcF52msAUxBemgdyHJwxX3MIKIE6WVC+36JTK60zwn1plVL DcRi7NDPqPMdSNPmHE JNc1HJE2ifdd6jpyuEaDhSf71WcxHYKUdbJVTaR33JYaR1mi+Ww+4Qa
AGbernzXzmMzNP4C-IvP6oJnlZd0fyk-yAg9dBBKa86LFBMBaUzZoyE-jK9nuzdpeimMzC7cSHx0ZdoRafKqjlaalEkdmdDeR3Q02LK/R2mTFJVL5T-KAPJZOJZH5f8hUJCupsS
AqjJA7iCrEmmm5eb008hjKfd3Ws5zF6T7xrv33vFGkQB3kuGcgkOqFcy6uKZJOW==

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha: 2021-08-11 15:34:19 | Firmante
KjNBmC3tsM+5+UQKU7PuPxVf+GNZxvUAWCV1qP34cqdTT/plgQF9pYaldy5yFmcnrl1bJYeUJRzFwCsQEX0KqMYCidqKK5-Ky3POHJ0hHQcGU1L8weMFAhOC4JLXX2Hb
GH57I-7YhOdi+OgprUJee6DIUPV8vZQzckG1kZQl0XvWYHT3S12BARURTCr5355g-OclHEtr1kvsU4+pToggL7UeNU7uxElzwPBIYzrQ76ZhvYVTrshLITveeMoFoKdcZJEWo
CiwMS15Z2E/XJopM9arMze5yr2iIQ6ABz4UgouxYVQjd6ofCY33mGVNcVeb3jsWRZ-Bg==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha: 2021-08-11 15:51:29 | Firmante
aChR42gRq7JORUZmkuPmMslAVTYQPZsv2YHg4K08QlczQc8mqvkvqprCUgMybLInKmbYoFh3HmshD9cdPDC4XUFJuaRLXnzHWUD7E QpCr7uW22F0MUFn8JE TPHTO2
141usbcmSzSSbvVUXZpRM19a0U1GZGpDqyPo1VmwHmPEky1dCgXh5kpyfht2hZGcGNBDCOMD6heLJE3M5NTc12y0cuLrIzDudrIQg3rcvdRF2MylzE0OesutwepP6jBU
uGyl2Gjcz3BRuJHeCV4+tvGcJPu7Bp2daBVz4Re9j4Q4FOJ+RM4NTTz2XwmW5sKvCra0K4rxQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



V8uMoB

<https://efirma.uaem.mx/hoRepufoIdVMp3I2mY7QMOfmDwZ7wEJvoEPWK>



Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado Morelos a través de la **Facultad de Farmacia** por la facilidad de usar sus instalaciones durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A **los miembros del jurado** asignado, Dr. Germán Bernal Fernández, Dr. Alexandre Cardoso Taketa, Dr. Jesús Rivera Islas, Dra. Irene Perea Arango, Dra. Priscila Sinaí Rendón Vallejo, y al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por sus aportaciones, comentarios y cuestionamientos.

Al **Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**, por dirigir este proyecto de investigación, por sus enseñanzas, orientación, dedicación y paciencia, que permitieron la culminación del presente proyecto.

A la **Dra. Angélica Flores Flores**, por sus enseñanzas, asesorías técnicas y académicas, empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 10.

Dedicatorias

A Dios por permitirme lograr una de mis metas y por todas las cosas buenas que me has dado.

A mi madre Praxedes Pineda por ayudarme a cumplir cada una de mis metas, te amo mamá, se que siempre podre contar contigo y tú conmigo.

A mi abuelita gracias por ser tan linda conmigo y estar ahí en todo momento, fue un privilegio compartir agradables momentos contigo te amo y le mando un gran abrazo hasta el cielo.

A mi hermana Kenia gracias por todos los momentos compartidos conmigo, te amo hermanita.

A Ma de la Luz y familia gracias por todo el apoyo brindado, por preocuparse por mí y estar ahí en todo momento.

A mi pequeño Scooby gracias por tu amor incondicional pequeñín.

Dr. Samuel gracias por haber sido mi director y por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, es un honor haber colaborado con usted, gracias por todo el apoyo.

Dra. Angie gracias por asesorarme en este proyecto, por compartir conmigo sus conocimientos, así también le agradezco por la paciencia y dedicación que tuvo conmigo. Gracias por ser una gran asesora y amiga, te quiero mucho Angie.

A mis amigos :Ruby, Gyo, Amau, Abraham, Angie, Walfred, Eli y a todos lo que me han faltado, gracias por compartir conmigo agradables momentos y por su apoyo incondicional.

Al equipo de trabajo del L-10 gracias porque siempre conté con su compañerismo y apoyo.

Y gracias a todos aquellos que de alguna manera me ayudaron son muchos no terminaría de ponerlos a todos.

Índice general

Abreviaturas.....	X
Índice.....	VII
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas.....	XII
Lista de gráficas.....	XII

Contenido

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes.....	7
3.1 Sistema Vascolar.....	7
3.1.1 Estructura y función de los vasos sanguíneos.....	8
3.1.2. Células-endoteliales.....	9
3.1.3 Síntesis y liberación del óxido nítrico.....	10
3.1.4 Sustancias vasoconstrictores y vasodilatadores.....	11
3.1.5 Músculo liso vascular.....	11
3.2 Definición de hipertensión arterial.....	12
3.2.1 Clasificación.....	12
3.2.2 Regulación de la presión arterial.....	13
3.2.3 Tratamiento no farmacológico.....	13
3.2.4 Tratamiento farmacológico.....	14
3.2.5 Epidemiología de la Hipertensión.....	17
3.3 Importancia de los productos naturales.....	18

3.3.1	Uso de las plantas en México.....	18
3.3.2	Plantas medicinales como posibles fármacos.....	18
3.4	Antecedentes del género <i>Orchidaceae</i>	19
3.4.1	Antecedentes botánicos.....	19
3.4.2	Antecedentes fitoquímicos.....	20
3.4.3	Antecedentes farmacológicos.....	20
3.5	Antecedentes de la especie <i>Prosthechea livida</i>	21
3.5.1	Antecedentes botánicos.....	21
3.5.2	Identificación preliminar de <i>Prosthechea livida</i>	21
4.	Justificación.....	23
5.	Hipótesis.....	25
6.	Objetivos.....	27
6.1.	Objetivo General.....	27
6.2.	Objetivos Particulares.....	27
7.	Metodología.....	29
7.1	Recolección del material vegetal.....	29
7.2	Obtención de los extractos.....	29
7.3	Evaluaciones farmacológicas.....	29
7.3.1	Animales.....	29
7.3.2	Reactivos.....	30
7.4	Obtención de la aorta torácica de rata.....	30
7.5	Sistema de registro.....	31
7.6	Determinación del mecanismo de acción.....	32.

7.7 Análisis estadístico.....	32
8.Resultados y discusión.....	34
8.1 Obtención de los extractos y rendimientos.....	34
8.2 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de <i>Prosthechea livida</i>	35
8.3 Determinación del efecto vasorrelajante de los extractos de <i>Prosthechea livida</i>	36
8.4 Determinación del efecto vasorrelajante del extracto metanólico de <i>Prosthechea livida</i> (EMBPL) dependiente o independiente de la presencia de endotelio.....	36
8.5 Participación de los receptores adrenérgicos y serotoninérgicos.....	38
8.6 Participación de canales iónicos.....	40
8.7 Participación de la vía NO/GMPc.....	42
8.8 Participación de canales de potasio.....	43
9.Conclusión.....	46
10. Perspectivas.....	48
11.Referencias bibliográficas.....	50

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
Ca ²⁺	Calcio
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
DMSO	Dimetilsulfóxido
Emáx	Efecto máximo
EMBPL	Extracto metanólico de bulbo de <i>Prosthechea livida</i>
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HTA	Hipertensión arterial
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto nacional de estadística geografía e informática
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
L-name	Nitro-arginina-metil-éster
mg	Miligramos
MLV	Músculo Liso Vascular
mM	Milimolar

mmHg	Milímetros de mercurio
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
ODQ	1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-ona
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PGL ₂	Prostaciclina
RS	Retículo sarcoplásmico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TEA	Tetraetilamonio
μM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1 Estructura de los vasos sanguíneos.....	9
Figura 2 Relajación del endotelio provocada por el óxido nítrico.....	10
Figura 3 Prevalencia de la hipertensión en hombres y mujeres.....	17
Figura 4. <i>Prosthechea livida</i>	21
Figura 5 Material vegetal seco de <i>Prosthechea livida</i>	29
Figura 6 Esquema de obtención de la aorta torácica.....	30
Figura 7 Evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata.....	31
Figura 8 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de <i>Prosthechea livida</i>	35

Lista de tablas

Tabla 1 Funciones endoteliales en la salud y la enfermedad.....	10
Tabla 2 Sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras.....	11
Tabla 3 Clasificación de la hipertensión arterial sistémica.....	13
Tabla 4 Clasificación de fármacos antihipertensivos por su sitio de acción.....	15
Tabla 5 Pesos y rendimientos de los extractos orgánicos de <i>Prosthechea livida</i> ...	34

Lista de gráficas

Gráfica 1 Porcentaje de relajación de los extractos de las distintas partes de <i>Prosthechea livida</i> (100 µg /mL).....	36
Gráfica 2 Efecto vasorrelajante del extracto metanólico de <i>Prosthechea livida</i> en anillo de aorta aislada de rata con y sin endotelio.....	37
Gráfica 3 Efecto del extracto metanólico de bulbo (EMBPL) en la contracción inducida por NA (0.00001 µM a 10 µM) en anillos de aorta sin endotelio.....	39
Gráfica 4 Efecto del extracto metanólico de bulbo (EMBPL) en la contracción inducida por serotonina en anillos de aorta sin endotelio.....	40

Gráfica 5. Efecto del EMBPL en la contracción inducida por KCL 80 mM en anillos de aorta aislada sin endotelio.....	41
Gráfica 6. Efecto del EMBPL en la contracción inducida por CaCl ₂ en anillos de aorta sin endotelio.....	42
Gráfica 7. Efecto vasorrelajante del EMBPL E- en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ en anillos de aorta aislada sin endotelio.....	43
Gráfica 8. Efecto vasorrelajante del EMBPL en presencia de TEA en anillos de aorta aislada de rata en presencia de endotelio.....	44

1.RESUMEN

Prosthechea livida, es una orquídea que se localiza en México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela y Ecuador (Conabio 2009), pertenece a la familia de las *Orchidaceae*, encontrándose en árboles o rocas, así como en lugares soleados y bosques húmedos estacionalmente secos.

Este trabajo, estuvo enfocado en determinar la actividad vasorrelajante de *Prosthechea livida* en un modelo *ex vivo* de aorta de rata, así como elucidar el mecanismo de acción del extracto más activo, con el objetivo de establecerla como una fuente potencial de fármacos antihipertensivos. En este sentido, se realizó la obtención de los extractos orgánicos de *Prosthechea livida*, posteriormente, se determinó el efecto vasorrelajante en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata, realizándose curvas de concentración-respuesta, para establecer cual era el extracto más activo, siendo el extracto metanólico de bulbo de *Prosthechea livida* (EMBPL) el que mostró mayor efecto vasorrelajante. En este sentido, se procedió a determinar el mecanismo de acción, explorando diferentes vías de señalización involucradas en la contracción y relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos. Se utilizaron anillos de aorta de rata Wistar con y sin endotelio, precontraídos con noradrenalina (NA) 0.1 μM , KCl 80 μM y curvas desplazamiento a NA (0.00001 a 10 μM), 5-HT, TEA, CaCl_2 (9.10 a 3000 $\mu\text{g/ml}$), ODQ y L-NAME (10 μM), respectivamente. El EMBPL provocó un efecto vasorrelajante dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio con un $E_{\text{máx}}$ de 81% (E+) y 75% (E-), respectivamente. En la determinación del mecanismo de acción, EMBPL mostró un efecto antagonista funcional sobre las contracciones inducidas por NA y 5-HT, y en la contracción inducida con CaCl_2 fue significativamente disminuida la potencia y eficacia en presencia del extracto. Finalmente, la pre- incubación con TEA, ODQ y L-NAME no mostraron cambios en el efecto relajante, indicando que la apertura de canales de K^+ y el aumento de segundos mensajeros como GMPc y/o NO no están involucrados.

En conclusión, EMBPL mostró un efecto vasorrelajante significativo dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio, con

un mecanismo de acción relacionado con el bloqueo de canales Ca^{2+} en las células del músculo liso vascular, sugiriendo al EMBPL para la obtención de compuestos bioactivos que coadyuven en el tratamiento de la hipertensión arterial.

2.INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA), es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por un aumento de la presión en el interior de los vasos sanguíneos, siendo de las principales causas de muerte en México y en el mundo (OMS, 2017).

Es importante señalar que hay diversos factores que provocan HTA; como lo son: obesidad, alcoholismo, tabaquismo, falta de ejercicio, una mala alimentación y estrés (Parra Carillo et al., 2004)._Es por esto, que se le sugiere al paciente con HTA modificar su estilo de vida, acompañado de un tratamiento farmacológico de por vida, para el control de esta enfermedad. En la actualidad, existen diferentes medicamentos antihipertensivos, y a pesar de que son efectivos, muchos de estos presentan efectos secundarios, provocados por un mal diagnóstico y un esquema de tratamiento erróneo, así como la falta de apego al tratamiento por parte de los pacientes que puede generar tolerancia a dichos fármacos e ineficacia para el control de la enfermedad. En este sentido, la población ha recurrido a la medicina tradicional, siendo las plantas medicinales la principal alternativa terapéutica; las plantas medicinales desde el punto de vista químico y farmacológico han sido una parte importante en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Entre las diversas familias de plantas medicinales que se utilizan en la medicina tradicional, están las orquídeas, las cuales se utilizan como coadyuvantes en el tratamiento de diversos padecimientos (Hossain, 2011)-, por lo que se han hecho estudios científicos para corroborar su uso, así también, saber que compuestos son los responsables de la actividad que se les atribuye, entre los compuestos encontrados son los estilbenoides, a quienes se les ha encontrado efecto vasorrelajante, antihipertensivo , antitumoral , antifúngico, antiviral, citotóxico entre otros (Kovac et al.,2008) . Sin embargo, los estudios sólo se han realizado en algunas especies de orquídeas, es por esto, que en éste proyecto se planteó estudiar el efecto vasorrelajante de *Prosthechea livida*, debido a que esta especie ha sido poco investigada y carece de estudios científicos que demuestren tal efecto.

3.ANTECEDENTES

3.1 Sistema Vascular

El sistema vascular, también se conoce como sistema circulatorio, contribuye al equilibrio en los aparatos y sistemas en el organismo, se encarga de transportar sangre a los tejidos del cuerpo, por lo que realiza el suministro de oxígeno, nutrientes y contribuye a la eliminación de desechos de los tejidos (Guyton, 2016) .

Lo constituyen:

- ❖ **Sangre:** Es un tejido conectivo líquido, que está formado por células sanguíneas.
- ❖ **Corazón:** Es la bomba muscular que proporciona la energía necesaria para mover la sangre a través de los vasos sanguíneos.
- ❖ **Vasos sanguíneos:** Transportan la sangre desde el corazón a los tejidos y desde los tejidos al corazón (Derrickson, 2006).

Sangre

La sangre es un tejido conectivo líquido, compuesto por una matriz extracelular llamada plasma.y sus funciones son:

- ❖ **Transporte.** Transporta oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo y dióxido de carbono (un producto de desecho de la respiración celular) desde las células hacia los pulmones. También se encarga de transportar nutrientes desde el tubo digestivo hacia las células de los tejidos y hormonas desde las glándulas endocrinas hacia otras células del cuerpo.
- ❖ **Regulación.** La sangre circulante ayuda a mantener el pH de los líquidos corporales. Las propiedades refrigerantes y absorbentes del calor que tiene el agua presente en el plasma y la velocidad de flujo a través de la piel, ajusta la temperatura corporal. La presión osmótica de la sangre también influye en el contenido de agua celular.
- ❖ **Protección.** La sangre puede coagularse, lo cual previene su pérdida excesiva del aparato circulatorio tras una lesión. Más aún, sus

glóbulos blancos protegen de las enfermedades llevando a cabo la fagocitosis. Diversas proteínas sanguíneas, incluyendo anticuerpos, interferones y los factores del sistema del complemento contribuyen a protegernos contra las enfermedades en diferentes formas (Derrickson, 2006).

Corazón

El corazón es el órgano que bombea la sangre rica en oxígeno y nutrientes a los tejidos del cuerpo a través de los vasos sanguíneos. Es el encargado de mantener la sangre en movimiento en el cuerpo de forma unidireccional (circuito cerrado), está compuesto por las aurículas que se encargan de recibir la sangre que vuelve al corazón y los ventrículos que bombean la sangre del corazón hacia fuera. (Hall, 2016).

3.1.1 Estructura y función de los vasos sanguíneos

En cuanto al sistema vascular, los principales vasos sanguíneos son las arteriolas, los capilares, las vénulas y las venas. Las **arterias** conducen la sangre desde el corazón hacia otros órganos. Las grandes arterias elásticas, abandonan el corazón y se dividen en arterias musculares de mediano calibre que se van a distribuir en el organismo. Las arterias de mediano calibre de manera semejante, se dividen para formar arterias aún más pequeñas llamadas **arteriolas**. Finalmente, cuando las arteriolas entran en un tejido, se ramifican en vasos diminutos llamados **capilares** (Guyton,2016).

El tono de las arteriolas musculares regula la presión arterial y el flujo a través de diversos lechos arteriales. Las arterias más pequeñas tienen una túnica media relativamente más gruesa en relación a la adventicia. Las arterias de tamaño mediano contienen una túnica media. Las arterias elásticas de mayor tamaño tienen una túnica media mucho más estructurada que consta de músculo liso como se muestra en la figura 1 (Derrickson, 2006).

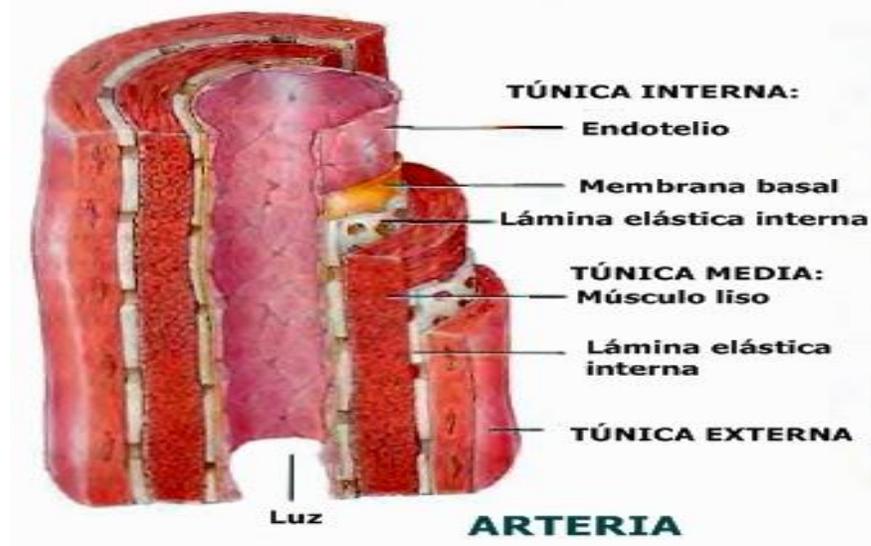


Figura 1 Anatomía de los vasos sanguíneos. Tomado de (Anatomía humana general).

3 1.2 Células endoteliales

Las células endoteliales forman el endotelio vascular, que es un epitelio plano que recubre el interior de los vasos sanguíneos y el corazón. Desempeñan múltiples funciones en la homeóstasis dentro de las que destacan las siguientes:

- ❖ Regulan la entrada de moléculas y células de tejidos de forma selectiva.
- ❖ Producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular y regulan la agregación plaquetaria.
- ❖ Forman la interfaz entre los tejidos y el comportamiento sanguíneo.

Las células endoteliales producen de forma endógena, sustancias con acción vasodilatadora como: prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado de endotelio, óxido nítrico, y el peróxido de hidrógeno (Dennis, 2012). Sin embargo; cuando el endotelio está dañado hay un deterioro en la liberación de los factores de relajación derivados del endotelio (tabla 1) como el óxido nítrico o el factor hiperpolarizante que deriva del endotelio, así como un aumento de la liberación de los factores derivados del endotelio con acciones constrictoras, pro-inflamatorias, protrombóticas y de crecimiento (Robert, 2013).

Tabla 1.Funciones endoteliales en homeostasis y en desequilibrio (Robert, 2013).

Fenotipo homeostático	Fenotipo disfuncional
Vasodilatación.	Alteraciones en la dilatación, vasoconstricción.
Antiinflamatorio.	Protrombótico, antifibrinolítico.
Antitrombótico.	Proinflamatorio
Antiproliferativo.	Proproliferativo
Antioxidante.	Prooxidante
Selectividad a la permeabilidad.	Función de barrera alterada.

3.1.3 Síntesis y liberación del óxido nítrico

El NO es un gas descrito como neurotransmisor que es sintetizado en el núcleo de las células endoteliales por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), a partir de L-arginina, ante diversos estímulos químicos y físicos, entre los que se encuentran la acetilcolina, bradiquinina, endotelina, trombina y serotonina (Segarra,2006).

Los estímulos que provocan la liberación del NO pueden ser mecánicos, metabólicos o mediados por receptores (figura 2) (Segarra, 2006).

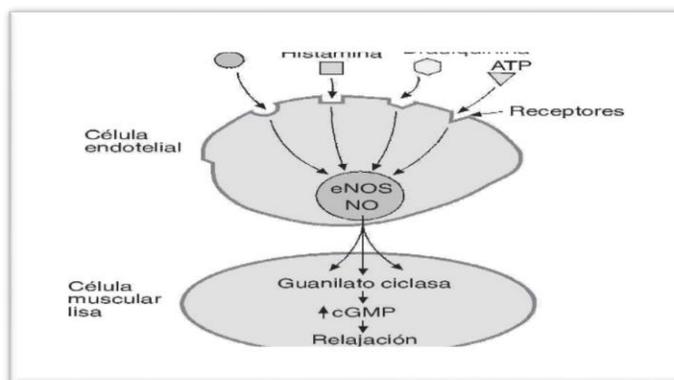


Figura 1 Relajación del endotelio provocada por el óxido nítrico (NO).Tomado de (<http://www.elsevier.es/es-revista-revista-andaluza-medicina-del-deporte-284-articulo-funcion-endotelial-ejercicio-fisico-13139222>)).

3.1.4 Sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras

Las células endoteliales (CE) regulan el tono vascular liberando sustancias tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras y algunas de sus funciones se describen en la tabla 2 (Derrickson, 2006).

Tabla 2. Sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras (Derrickson, 2006).

SUSTANCIAS VASOCONSTRICTORAS		FUNCIÓN
Noradrenalina y adrenalina		Noradrenalina es una hormona vasoconstrictora especialmente potente; la adrenalina es menos potente, que en algunos tejidos provoca una vasodilatación leve.
Angiotensina II		El efecto de angiotensina es contraer potentemente las pequeñas arteriolas, teniendo un papel fundamental en la regulación de la presión arterial.
Vasopresina		Hormona antidiurética es aún más potente que la angiotensina II.
SUSTANCIAS VASODILATADORAS		FUNCIÓN
Bradicinina		La bradicinina provoca una dilatación arterial potente y aumenta la permeabilidad capilar.
Histamina		La histamina tiene un efecto vasodilatador potente sobre las arteriolas, se libera esencialmente en los tejidos cuando sufre daños o se inflama, o cuando hay algún evento alérgico.

3.1.5 Músculo liso Vascular

Las células del músculo liso vascular (MLV) forman la capa celular de la túnica media, llevan a cabo la vasoconstricción y vasodilatación de los vasos sanguíneos, manteniendo así el tono vascular. A diferencia del músculo esquelético y el cardíaco, el músculo liso tiene un retículo sarcoplásmico menos desarrollado para el almacenamiento de calcio intracelular, por lo que la despolarización va a

depender del calcio extracelular. El control del tono del músculo liso vascular es llevado a cabo por el sistema nervioso simpático mediante la apertura y cierre de los conductos del calcio que son activados por receptores α (excitatorios) y β (inhibitorios) adrenérgico (Carol, 2011).

3.2 Definición de hipertensión arterial

La hipertensión, es una enfermedad crónico degenerativa multifactorial, caracterizada por una elevación en las cifras de presión arterial sistólica y diastólica superior a 140/90 mmHg, de acuerdo con la norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009.

La HTA es un problema de salud pública, asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Se estima que existen más de mil millones de personas que se ven afectadas por HTA. En México de 30 millones de personas que acuden al IMSS, 6 millones de éstas ,acuden a medicina familiar para el control de esta enfermedad (ENSANUT, 2016).

3.2.1 Clasificación

La HTA puede dividirse a menudo como primaria y secundaria. La HTA primaria, es la elevación crónica de la presión arterial, que ocurre sin la evidencia de otros trastornos, puede ser causada por diversos factores como alteraciones en el sistema nervioso simpático, el volumen sanguíneo, gasto cardíaco, las resistencias arteriolas periféricas, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la sensibilidad al sodio y resistencia a la insulina , ésta representa el 90 % de los casos de hipertensión. En la HTA secundaria, el aumento de la presión es el resultado de algún trastorno como enfermedad renal (Carol, 2011).

Actualmente, la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología 2017 clasifican a la HTA como presión arterial elevada si ésta se encuentra por encima de 120/80 mm Hg (tabla 3) (Richard, 2016).

Tabla 3. Clasificación de la hipertensión arterial sistémica publicada por la asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología 2017.

Categoría	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Normal	< 120	< 80
Elevado	120-129	80
Grado 1	130-139	80-89
Grado 2	140	90
Crisis hipertensiva	180	120

3.2.2 Regulación de la presión arterial

La presión arterial es regulada por la resistencia vascular a nivel de arteriolas por estímulos neuronales y hormonales. Por otro lado, el gasto cardiaco está relacionado con la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico, influido por la volemia. Este, a su vez, está regulado principalmente por la excreción y reabsorción de sodio renal. La renina es un regulador de la presión arterial, secretada por los riñones. Además, escinde el angiotensinógeno, para transformarlo en angiotensina II, la cuál va a regular la presión arterial, aumentando el tono de las células de músculo liso vascular e intensificando la secreción de aldosterona y en consecuencia la reabsorción de sodio (Contran, 2015).

3.2.3 Tratamiento no farmacológico

La hipertensión arterial es la patología cardiovascular con alta incidencia y prevalencia, siendo uno de los principales factores de riesgo cardiovascular; por lo que se debe de tener un control adecuado de esta enfermedad con un tratamiento farmacológico y no farmacológico.

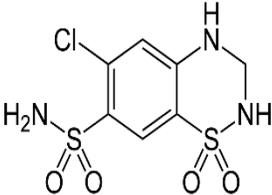
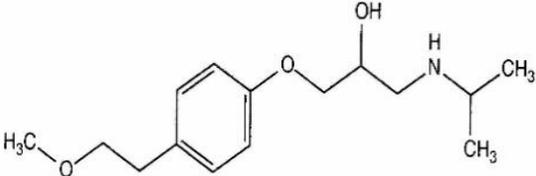
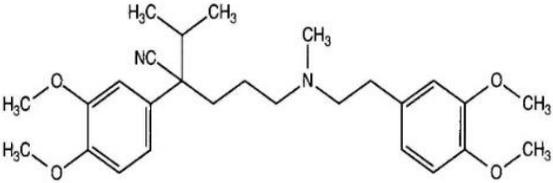
El control no farmacológico incluye medidas en las que se modifica el estilo de vida del paciente: hábitos alimenticios, ejercicio, presencia de adicciones,

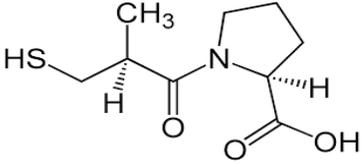
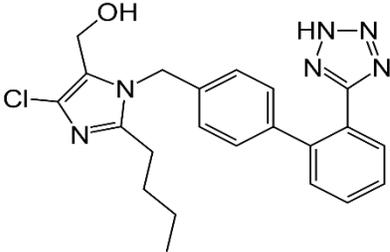
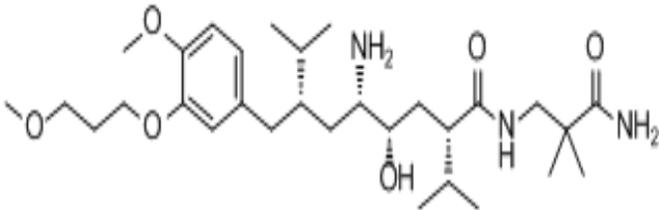
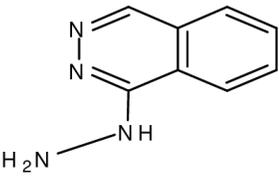
monitoreo de las cifras de presión arterial y una reducción en la ingesta de sodio (Castaño-Guerra, 2011).

3.2.4 Tratamiento farmacológico

El objetivo principal del tratamiento de la hipertensión es prevenir complicaciones, contribuir a que el paciente tenga una mejor calidad de vida y reducir la tasa de mortalidad, por lo que se hacen cambios en el estilo de vida del paciente con HTA. Sin embargo, estas medidas no logran disminuir en la totalidad las complicaciones cardiovasculares en hipertensos, por lo que se debe iniciar con un tratamiento farmacológico, de acuerdo a las características de cada paciente con HTA. A continuación, se enlistan los fármacos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad de acuerdo a su sitio de acción (tabla 4) (Laurencel.Brunton, 2015).

Tabla 4 Clasificación de fármacos antihipertensivos por su sitio de acción (Laurencel.Brunton, 2015)

	Fármacos
<p>Diuréticos</p>  <p>Hydroclorotiazida</p>	<p>Tiazidas (hidroclorotiazida, clorotiazida, clortalidona, indapamida, metilclotiazida, metolazona).</p> <p>Diuréticos de asa (furosemida, bumetanida, tosemeida, ácido etacrínico).</p> <p>Diuréticos ahorradores de k*(amilorida, triamtereno, espironolactona).</p>
<p>Simpaticolíticos</p>  <p>Metoprolol</p>	<p>Antagonistas adrenérgicos β (metoprolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, esmolol, nadolol, nebivolol, penbutolol, pindolol, propanol, timolol).</p> <p>Antagonistas adrenérgicos α (prazosina, terazosina, doxazosina, fenoxibenzamona, fentolamina).</p> <p>Antagonistas adrenérgicos mixtos α y β (labetalol, carvedilol).</p> <p>Fármacos de acción central (metildopa, clonidina, guanfacina).</p> <p>Bloqueadores neuronales adrenérgicos (guanadrel, reserpina).</p>
<p>Bloqueadores de canales de Ca²⁺</p>  <p>Amlodipino</p>	<p>Verapamilo, diltiazem, nisoldipina, felodipino, nicardipina, isradipina, amlodipino, clevidipina, nifedipina.</p>

<p>Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina</p>  <p>Captopril</p>	<p>Captopril, enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril, benazepril, fosinopril, moexipril, perindopril,trandolapril.</p>
<p>Antagonistas de los receptores de angiotensina II</p>  <p>Losartán</p>	<p>Losartán, candesartán, irbersartán, valsartán, temilsartán, eprosartán , olmersartán.</p>
<p>Inhibidor directo de la renina angiotensina</p>  <p>Aliskirén</p>	<p>Aliskirén</p>
<p>Vasodilatadores</p>  <p>Hidralazina</p>	<p>Arteriales (hidralazina, minoxidilo, diazoxida, feneldopam). Arteriales y venosos (nitroprusiato).</p>

3.2.5 Epidemiología de la hipertensión

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Nutrición (ENSANUT), en México, el 25.5% de los adultos son hipertensos (25.1% en mujeres y 24.9% en hombres), observándose una tendencia en la prevalencia de HTA a medida que aumenta la edad, en personas de 30 años y más. En la figura 3 se observa la HTA en hombres y mujeres (nacional, rural y urbano) en el año 2012 y 2016, en diferentes grupos poblacionales (ENSANUT, 2016).

En las pasadas dos décadas, la HTA se ha mantenido entre las primeras nueve causas de muerte en México, y en los pasados seis años, la tasa de mortalidad por esta causa ha incrementado 29.9%. Por lo que se ubicó a la HTA, en el año 2015, como la enfermedad crónica responsable del 18.1% del total de muertes y el principal factor de riesgo de muertes prevenibles (ENSANUT, 2016).

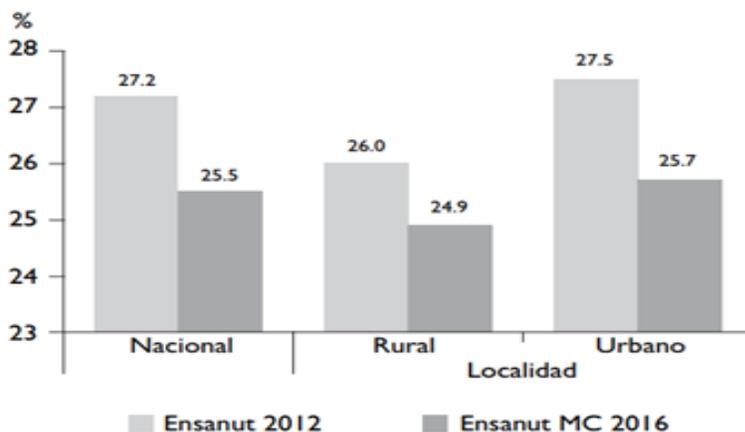


Figura 2. Prevalencia de hipertensión en hombres y mujeres. Tomado de (ENSANUT, 2016).

Entre las principales causas de muerte a nivel nacional son por enfermedades del corazón (218 885, 20.2%), COVID-19 (201 163, 18.5%) y por diabetes mellitus (151 214, 13.9%). (INEGI, 2021)

Las defunciones por enfermedades del corazón ocupan el primer lugar entre las principales causas de muerte, las isquémicas (reducción del flujo sanguíneo al

corazón por bloqueo parcial o total de las arterias) representaron el 76.3% con 166 965 casos, seguidas por las hipertensivas con 15.6% (34244 casos) y las relacionadas con la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón con 7.8% (17 091 casos). A la fiebre reumática aguda y enfermedades cardíacas reumáticas crónicas les correspondió en conjunto, el 0.3% (585 casos).(INEGI, 2021).

3.3 Importancia de los productos naturales

Los productos naturales son importantes al ser útiles como agentes terapéuticos, materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial, así como para obtener estructuras privilegiadas usando el concepto de polifarmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas dianas terapéuticas y realizan acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutierrez-Angel, 2009).

3.3.1 Uso de las plantas medicinales en México

México tiene una rica tradición en el uso de plantas medicinales por los diferentes efectos que se les atribuye. Se calcula que, en la flora medicinal mexicana, hay entre 3000 y 5000 plantas que presentan actividad terapéutica, de las cuales 3000 especies han sido compiladas en un atlas de plantas medicinales, empleadas por diversos grupos étnicos. Sin embargo; se calcula que sólo el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades farmacológicas. Por lo que, es importante realizar una mayor investigación científica y etnobotánica, en virtud de elucidar los posibles beneficios medicinales de las plantas (Esquivel-Gutiérrez, 2012).

3.3.2 Plantas medicinales como posibles fármacos

En la actualidad, se tiene conocimiento de muchos compuestos, los cuales son derivados de plantas, con actividad farmacológica importante, que se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario, es por esto que sus compuestos son llamados metabolitos secundarios. Estos mismos, de forma individual o en diferentes combinaciones,

poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el humano, o son utilizados como materias primas de la industria farmacéutica, alimentaria, textil, agroquímica, perfumería y cosmetología (Esquivel-Gutiérrez, 2012)

3.4 Antecedentes del género *Orchidaceae*

3.4.1 Antecedentes botánicos

Las orquídeas pertenecen a la familia de las *Orchidaceae*, una de las familias más extensas del reino vegetal, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). Estas plantas se distribuyen en casi todas la diversidad de especies se localiza en las regiones tropicales. México cuenta con una gran variedad de orquídeas de las cuales se tienen registradas alrededor de 1,260 especies y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007).

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes, monocotiledóneas que se caracterizan por tener flores llamativas (kovacs *et al.*,2008).Estas tienen seis partes: tres sépalos iguales entre sí, ubicados en la parte trasera de la flor y tres pétalos que están enfrente, de los cuales dos son iguales y uno diferente y se le da el nombre de labelo; este último se ubica en el centro de la flor. También cuentan con la estructura llamada columna en donde se encuentran los órganos reproductores (Menchaca, 2011).

Desde épocas prehispánicas, a las orquídeas se les han dado distintos usos (medicinal, artesanal, comestible, narcótico, saborizante, aromatizante, veneno, adhesivo, ceremonial, en talismanes y afrodisiacos) (Téllez-Velasco, 2001), sin embargo, en México son muy poco conocidas en la medicina tradicional. Por el contrario, la mayor parte de las orquídeas en América y Europa se distinguen por su valor ornamental y en Asia tienen una larga historia en la medicina.

3.4.2 Antecedentes fitoquímicos

Los estudios fitoquímicos en orquídeas se hicieron a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, en la década de los 60 se aislaron alcaloides del tipo dendrobina a partir de *Dendrobium nobile* lo cual incitó al estudio de diferentes especies de orquídeas (Estrada Soto, 2000).

Se han aislado metabolitos secundarios de estas especies, entre los cuales se pueden encontrar compuestos de tipo alcaloides (picrotoxano, pirrolizidínicos y fenilalquilaminas), triterpenos del grupo cicloartano y lanostano, esteroides, cumarinas, flavonoides, compuestos aromáticos simples y estilbenoides. Finalmente, se han encontrado reportes que demuestran la actividad biológica de algunos compuestos aislados de orquídeas, dentro de ellos se destacan las actividades vasorrelajante y espasmolítico que presentan algunos metabolitos secundarios como los estilbenoides (Rendón, 2011).

3.4.3 Antecedentes farmacológicos

Los estudios farmacológicos que hasta ahora se han realizado del género *Orchidaceae* son diversos alrededor del mundo. La especie *Maxillaria densa*, ha presentado actividad espasmolítica por el contenido en fenantrenos (Estrada *et al.*, 2004); *Habenaria repens*, tiene una actividad antioxidante causada por el haberaniol (Johnson *et al.*, 1999); *Epidendrum rigidum*, posee actividad citotóxica producida por bibencil derivados (Hernández-Romero *et al.*, 2005) y *Laelia autumnalis*, ha presentado actividad vasorrelajante en anillos de aorta aislada de rata (Vergara *et al.*, 2008), entre otros.

3.5 Antecedentes de la especie *Prosthechea livida*

3.5.1 Antecedentes botánicos

Prosthechea es un taxón centroamericano, que tiene alrededor de 90 especies, en México se tiene un registro de 46. Son plantas epífitas, eventualmente terrestres. Es extraño que forme un rizoma evidente, consta de pseudobulbos, llegan a tener de 1 a 4 hojas en el ápice del pseudobulbo. Presenta inflorescencia apical, racemosa, de escasas flores, ocasionalmente vistosas, consta de sépalos y pétalos similares (Sánchez, 2003).



REINO: *Plantae*
FAMILIA: *Orchidaceae*
SUBFAMILIA: *Epidendroide*
GÉNERO: *Prosthechea*
ESPECIE: *P. Livida*
TRIBU: Epidendreae (Conabio, 2009)

Figura 4 *Prosthechea Livida*. Tomado de (<https://www.naturalista.mx/photos/2723110hea>)

3.5.2 Identificación preliminar de *Prosthechea livida*

Con el propósito de saber que componentes estaban presentes en la orquídea en el 2017, se realizó un estudio preliminar por Díaz Avilés y colaboradores en el Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el laboratorio de química de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias UV-Tuxpan. Un revelamiento fitoquímico permitió encontrar algunos metabolitos como cumarinas, flavonoides, saponinas y triterpenos, que se detectaron principalmente en pseudobulbo y rizoma.

4.JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas van en aumento, entre ellas la hipertensión arterial. Actualmente, existen diferentes medicamentos antihipertensivos que son muy efectivos para controlar la hipertensión, sin embargo, muchos de estos presentan efectos secundarios y el paciente no tiene un apego al tratamiento, lo que genera tolerancia a los mismos haciéndolos menos eficaces. Por esta razón, para este proyecto se consideró importante continuar con la búsqueda de nuevas o conocidas entidades químicas bioactivas con nuevos o conocidos mecanismos de acción que permitan un tratamiento seguro y eficaz en la hipertensión, así como en enfermedades relacionadas.

En este sentido, el presente trabajo está enfocado en determinar la actividad vasorrelajante de *Prosthechea livida*, profundizando más acerca de su potencial terapéutico antihipertensivo utilizando un modelo de órgano aislado, lo que podrá establecer en un futuro una fuente potencial de compuestos bioactivos antihipertensivos.

5.HIPÓTESIS

Prosthechea livida tendrá efecto vasorrelajante, en un modelo *ex vivo* de anillo de aorta aislada de rata, en presencia y ausencia de endotelio vascular, por lo que los extractos poseerán un potencial efecto antihipertensivo.

6.OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto vasorrelajante de los extractos obtenidos de *Prosthechea livida*.

6.2 Objetivos Particulares

1. Obtener los extractos hexánico, diclorometánico y metánolico de las diferentes partes que componen a *Prosthechea livida*.

2. Evaluar el efecto vasorrelajante de *Prosthechea livida* en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata.

3. Determinar el mecanismo de acción del extracto que presente mayor efecto vasorrelajante en el modelo *ex vivo* de aorta aislada de rata.

7.METODOLOGÍA

7.1 Recolección del material vegetal

La recolección del material vegetal, se llevó a cabo por el MBT Oswaldo Javier Enciso Díaz y el Dr. José Luis Méndez en el estado de Veracruz, en el mes de junio del 2017 (figura 5), con número de voucher OE-009. Posteriormente, se sometió a un proceso de limpieza y desecación a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez seco, el material vegetal se fragmentó en un molino manual.



Figura 3.Material vegetal seco de *Prosthechea livida* .Imagen propia junio del 2017.

7.2 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos orgánicos se tomaron 30 g de hoja, 230 g de bulbo y 53 g de raíz de *Prosthechea livida*, previamente seco y molido. Posteriormente, se sometió a un proceso de maceración exhaustiva con disolventes en orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y metanol) durante 72 horas por triplicado. Los extractos se llevaron a sequedad a presión reducida utilizando un rota vapor Buchi R-200.

7.3 Evaluaciones farmacológicas

7.3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g, alimentadas con Rodent Labs Chow® y libre acceso a agua en condiciones de bioterio. -El estudio se llevó a cabo bajo la Norma de especificaciones NOM-062-ZOO-1999.

7.3.2 Reactivos

Para la realización del proyecto se ocuparon los siguientes reactivos: cloruro de carbacol, noradrenalina (NA), L-Nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), nifedipina, serotonina (5-HT), tetraetilamonio (TEA), cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de potasio (KCl) que fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Así como los extractos obtenidos bajo la metodología descrita previamente en el número 7.2.

7.4 Obtención de la aorta torácica de rata

Para la obtención de los segmentos de aorta, los animales fueron sacrificados en una cámara de éter etílico, posteriormente, se realizó la disección abdominal para extraer la aorta torácica, la cuál se limpió de manera cuidadosa de tejido conectivo, con la finalidad de evitar daño al tejido muscular y endotelial, una vez limpia la aorta fue cortada en segmentos de 3-5 mm de longitud. Por otro lado, para los segmentos de aorta libre de endotelio fueron retirados de manera mecánica (figura 6).

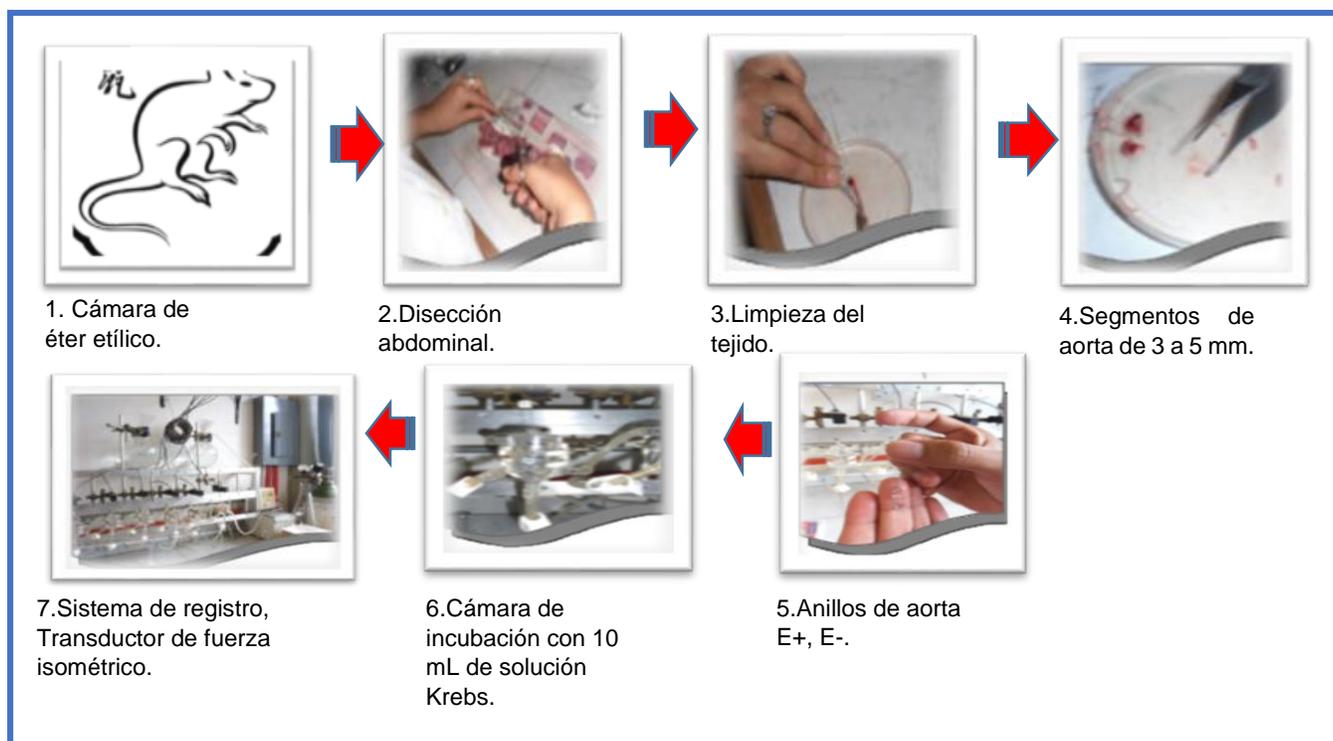


Figura 6. Esquema de obtención de la aorta torácica (Modificado de Flores 2019)

7.5 Sistema de registro

Para determinar el efecto vasorrelajante, los anillos previamente cortados y limpios se colocaron en solución fisiológica de Ringer-Krebs. Cada anillo se colocó en la cámara de incubación, unida por un lado con ayuda de un gancho al extremo de la cámara y, por otro lado, a un transductor de fuerza Grass modelo FT 03, el cual emite los registros, y los envía a un polígrafo BIOPAC.

Posteriormente, el tejido fue sensibilizado durante 15 minutos con NA 0.1 μM a intervalos de 15 minutos (por triplicado). Después de cada estimulación, el tejido fue lavado con solución de Krebs, para recuperar el nivel basal de la tensión. Por otro lado, para los tejidos que requirieron la presencia y ausencia de endotelio, se verificó mediante la adición de carbacol 1 μM , antes del último lavado en la tercera contracción.

El tejido previamente sensibilizado con y sin endotelio según el caso, fue puesto en contacto con las diferentes concentraciones de los extractos de forma acumulativa [3 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en 1/2 de logaritmo (figura 7).

Se construyeron curvas concentración-respuesta. Se utilizó como control positivo en presencia de endotelio carbacol (agonista muscarínico que activa al receptor de acetilcolina del sistema nervioso parasimpático) y para la ausencia de endotelio se empleó nifedipina (bloqueador de canales de calcio). El vehículo para las muestras de prueba fue dimetilsulfóxido (DMSO) diluido en agua.

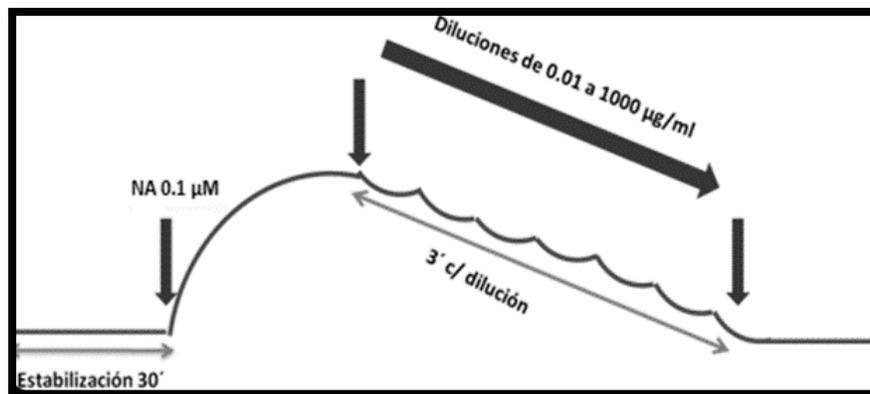


Figura 4. Evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata (Flores, 2019)

7.6 Determinación del mecanismo de acción

La determinación del mecanismo de acción se realizó con el extracto metanólico de bulbo de *Prosthechea livida*, que fue el extracto que presentó mayor actividad vasorrelajante.

Se realizaron experimentos, donde los anillos de aorta sin endotelio fueron puesto en contacto durante 15 minutos con L-NAME (10 μ M), (inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintasa), serotonina (5-HT), CaCl_2 (9.10 a 3000 μ g/ml), ODQ (10 μ M inhibidor de la guanilato ciclasa soluble) y TEA (5 μ M) .

Posteriormente, el tejido se contrajo con NA (0.1 μ M) y se agregaron las concentraciones de prueba del extracto metanólico de bulbo de *Prosthechea livida*.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del efecto vasorrelajante y del mecanismo de acción son expresados como la media de 5 animales \pm el error estándar de la media. Las curvas concentración-respuesta fueron realizadas en el programa Origin 8.0. El análisis estadístico fue realizado en el programa de GraphPad Prism 5, estableciendo una diferencia significativa de las medias de $p < 0.05$, 0.001 mediante una t- student, un análisis de dos vías (ANOVA) seguida de una prueba post hoc de Bonferroni y Tukey.

8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Obtención de los extractos y rendimientos

La importancia de los productos naturales radica en que ofrece grandes posibilidades de ser útiles como agentes terapéuticos, modelos para la preparación de sustancias bioactivas, materia prima en la síntesis de sustancias de interés farmacológico/ o interés industrial como estructuras privilegiadas (Gutierrez-Angel, 2009).

Este trabajo está enfocado en el estudio científico de *Prosthechea livida*, utilizando para su selección un criterio etnomédico, que está fundamentado en el uso medicinal que la población le atribuye como alternativa para el control de la presión arterial. En este sentido, se llevó a cabo la maceración de *Prosthechea livida* (raíz, hoja y bulbo) lo que permitió obtener los diferentes extractos con pesos y rendimientos de cada extracto orgánico variados (tabla 5), siendo el extracto metanólico el de mayor rendimiento, con un 8.35 %.

Tabla 4. Pesos y rendimientos de los extractos orgánicos de *Prosthechea livida*.

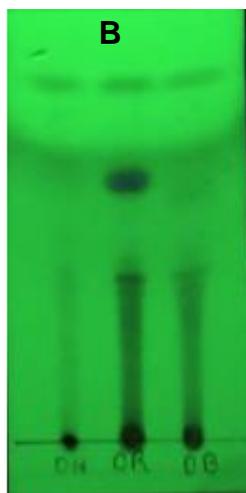
Extracto Hoja	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico (EHPLH)	0.66	2.22 %
Diclorometánico(EDPLH)	0.70	2.36%
Metanólico (EMPLH)	2.49	8.35%
Extracto Raíz	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico (EHPLR)	1.18	2.22 %
Diclorometánico(EDPLR)	0.91	1.70%
Metanólico (EMPLR)	2.82	5.20%
Extracto Bulbo	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico (EHPLB)	5.03	2.12 %
Diclorometánico(EDPLB)	6.79	2.86%
Metanólico (EMPLB)	11.52	4.8%

8.2 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de *Prosthechea livida*.

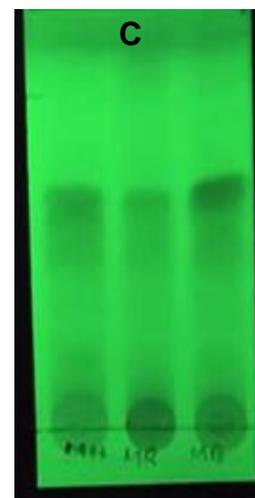
Con la finalidad de comparar el contenido metabólico de *Prosthechea livida*, se llevó a cabo un estudio preliminar por medio de cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de la planta (hoja, raíz y bulbo) que se muestran en la figura **A**, **B** y **C**. Derivado de esta cromatografía se obtuvieron los siguientes resultados: **A** se puede observar una similitud en los metabolitos de los extractos hexánicos, en la placa **B**, el contenido metabólico de los extractos diclorometánicos es muy similar en raíz y bulbo, pero en hoja es diferente, mientras tanto en la placa **C** se muestra una similitud en los metabolitos de los extractos metanólicos. Sin embargo en los perfiles cromatográficos **A**, **B** y **C** el contenido metabólico es distinto en cada una de las placas cromatográficas.



A) Cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *Prosthechea livida* que fueron colocados en el siguiente orden: hoja, raíz y bulbo con un sistema de elución 50:45:5, diclorometano:hexano:metanol. Luz UV banda corta.



B) Cromatografía en capa fina de los extractos diclorometánicos de *Prosthechea livida*, que fueron colocados en el siguiente orden: hoja, raíz y bulbo con un sistema de elución 45:90:10, diclorometano:metanol. Luz UV banda corta.

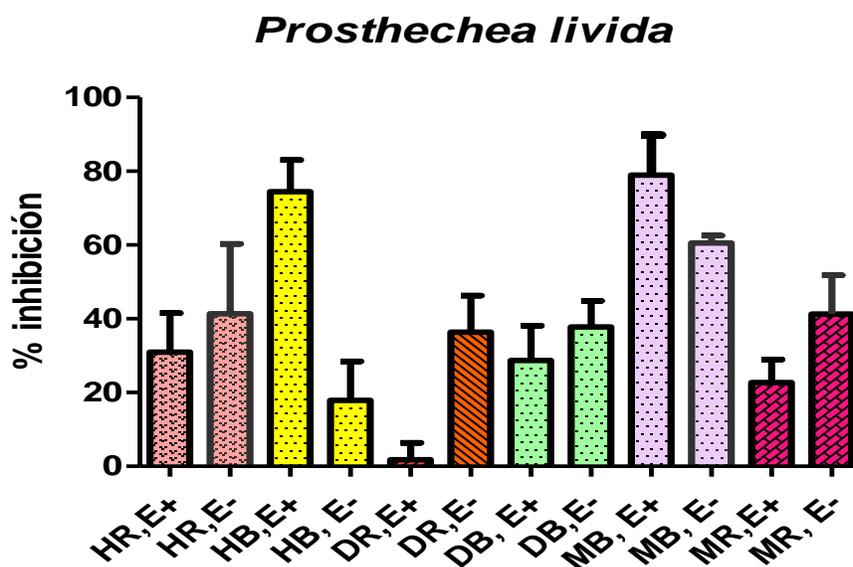


C) Cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de *Prosthechea livida*, que fueron colocados en el siguiente orden: hoja, raíz y bulbo con un sistema de elución 45:45:10, hexano:diclorometano:metanol. Luz UV banda corta.

Figura 8. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de *Prosthechea livida*

8.3 Determinación del efecto vasorrelajante de los extractos de *Prosthechea livida*.

Para determinar el efecto vasorrelajante de *Prosthechea livida*, este se evaluó en un modelo *ex vivo* de aorta aislada de rata, utilizando una concentración de 100 µg/mL, en presencia (E+) y ausencia de endotelio (E-), con la finalidad de evaluar diferentes extractos orgánicos y así saber cuál presentaba el mayor efecto vasorrelajante. En la gráfica 1 se observa que el extracto metanólico de bulbo (EMBPL) presentó mayor efecto vasorrelajante, con un $E_{m\acute{a}x}$ de 78.94 ± 10.87 % en presencia de endotelio y un 60.54 ± 1.97 % sin endotelio.

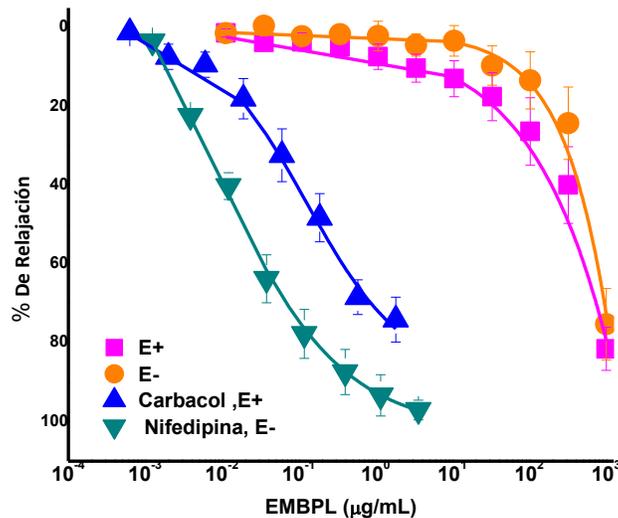


Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de los extractos de las distintas partes de *Prosthechea livida* (100 µg /mL).

8.4 Determinación del efecto vasorrelajante del extracto metanólico de *Prosthechea livida* (EMBPL) dependiente o independiente de la presencia de endotelio.

Una vez que se determinó que el extracto metanólico era el más activo, se procedió a evaluar si el efecto relajante del EMBPL es dependiente o independiente de la presencia de endotelio. El propósito de utilizar anillos de aorta con y sin endotelio, se debe al papel importante que desempeña en la modulación del tono

vascular, la liberación NO derivado del endotelio para inducir la vasorrelajación del músculo liso (Contran, 2015). En la gráfica 2, se observa que el EMBPL tiene un efecto vasorrelajante con un $E_{m\acute{a}x}$ de $81.5 \pm 5.46 \%$ y una CE_{50} de $204.62 \pm 5.46 \mu\text{g/mL}$ en presencia de endotelio, y en ausencia de endotelio se determinó un $E_{m\acute{a}x}$ de $75.22 \pm 9.06 \%$ y una CE_{50} de $401.25 \pm 9.06 \mu\text{g/mL}$, resultados que nos indican que no existe una diferencia significativa en los efectos relajantes en ambos ensayos. Estos resultados indican, que el efecto vasorrelajante mostrado es independiente de la presencia de endotelio; sugiriendo que los componentes presentes en el EMBPL, se encuentran actuando directamente sobre la musculatura lisa vascular, en donde los sistemas nervioso simpático y parásimpático se ven implicados, mediante la apertura y cierre de los conductos del calcio activados por receptores α y β adrenérgicos (Carol, 2011).



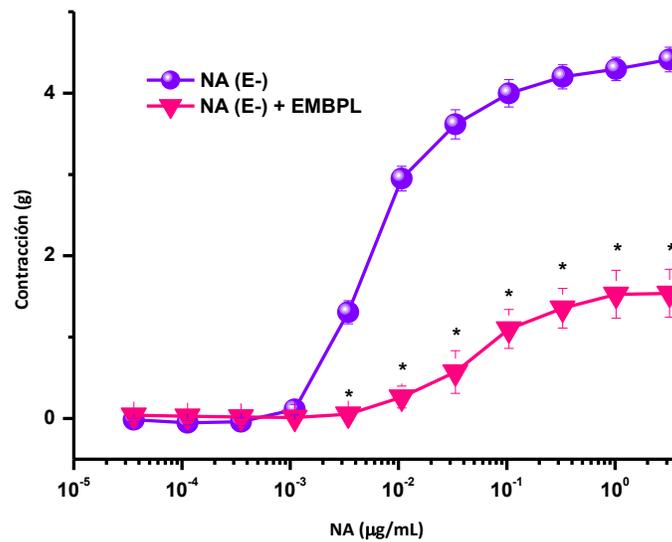
Gráfica 2. Efecto vasorrelajante del extracto metanólico de *Prosthechea Livida* en anillo de aorta aislada de rata con y sin endotelio. Los datos son expresados como la media \pm EEM, $n=6$, (sin cambios).

8.5 Participación de receptores adrenérgicos y serotoninérgicos

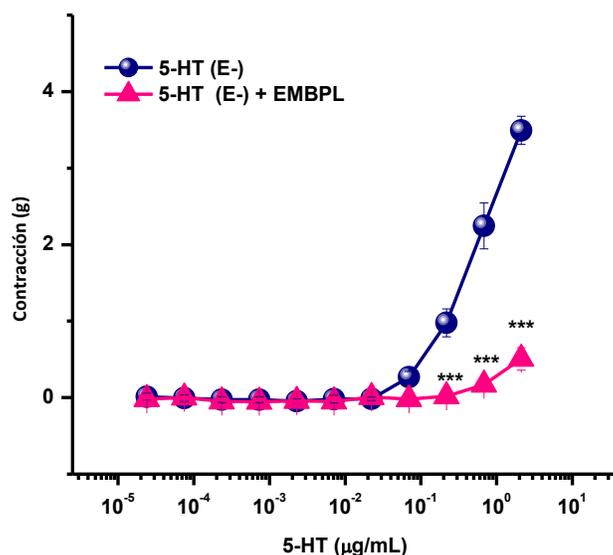
La noradrenalina (NA), es un neurotransmisor agonista de los receptores adrenérgicos, que se dividen en 2 clases: α y β adrenérgicos, que a su vez están asociados a la proteína G, que estimula la fosfolipasa C, produciendo segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) y el inosito trifosfato (IP_3). La cual se une con receptores que están en el retículo sarcoplásmico permitiendo la liberación de calcio hacia el citosol formando el complejo calcio-calmodulina. Para que ésta se produzca, debe fosforilar la cadena ligera de miosina la cual esta regulada por una proteína denominada calmodulina, donde el calcio se une a la calmodulina permitiendo así la unión de la calmodulina a la miosinquinasa de cadena ligera de miosina (MLCK). El complejo calmodulina-miosinquinasa fosforila la miosina, determinando la interacción entre la actina y la miosina provocando la contracción y la defosforilación de miosina por una fosfatasa; que promueve la relajación (Torales-Ibañez,2009) (Guzman-Silva,2018). Por lo tanto, se evaluó el efecto del extracto metanólico de bulbo de *Prosthechea livida* sobre los receptores adrenérgicos. Para esto se construyó una curva de contracción con NA (0. 00001 μ M a 10 μ M) para así determinar el mecanismo si tiene un efecto antagonista sobre los receptores adrenérgicos. En la gráfica 3, se observa que el extracto metanólico de bulbo de *Prosthechea livida* (EMBP) se opone a la contracción de NA disminuyendo significativamente la eficacia (disminuye el efecto máximo) y la potencia (desplazamiento de la curva a la derecha), indicando un antagonismo no competitivo del extracto a la acción de la NA. Esto puede deberse a la acción alostérica de alguno de los componentes del extracto ó a una intervención río abajo en la señalización promovida por la activación del receptor adrenérgico.

Para corroborar o descartar modos de acción, se hizo un ensayo con serotonina (5-HT), neurotransmisor que al unirse a su receptor (acoplado a proteína G) provoca la contracción del tejido vascular. En la gráfica 4 se observa que el EMBPL presentó un efecto inhibitorio a la contracción inducida por serotonina al igual que NA, en la que se puede ver un desplazamiento de la curva a la derecha y

una disminución del efecto máximo de manera significativa. Por lo tanto, es posible que el efecto no sea específico del antagonismo de receptores adrenérgicos o serotoninérgicos y estén implicados otros factores comunes en la contracción de ambos neurotransmisores como el bloqueo de canales de calcio y/o apertura de canales de potasio, o la despolarización de la membrana celular o la inducción intracelular de segundos mensajeros (Moreno, 2005).



Gráfica 3. Efecto del extracto metanólico de bulbo (EMBPL) en la contracción inducida por NA (0.00001 µM a 10 µM) en anillos de aorta sin endotelio. Los datos son expresados como la media ± EEM, n=6 (*P<0.05).



Gráfica 4. Efecto del extracto metanólico de bulbo (EMBPL) en la contracción inducida por serotonina en anillos de aorta sin endotelio. Los datos son expresados como la media \pm EEM, n=6 (**P<0.001).

7.6 Participación de canales iónicos

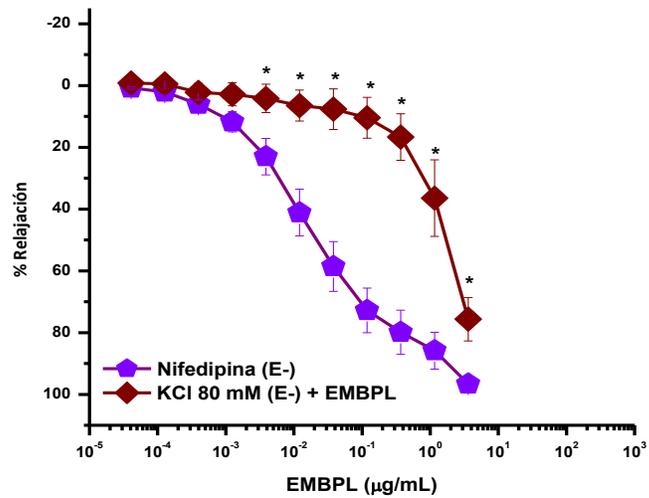
Al realizarse la contracción inducida por KCl 80 mM se muestran diferentes efectos como:

- ❖ Una despolarización de la membrana del músculo liso, lo que va a ocasionar la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje.
- ❖ Aumento en la afluencia de Ca^{2+} hacia el interior de la célula.
- ❖ Liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico.

Por lo que se produce un aumento de calcio intracelular lo cual genera una contracción (Rendón, 2011).

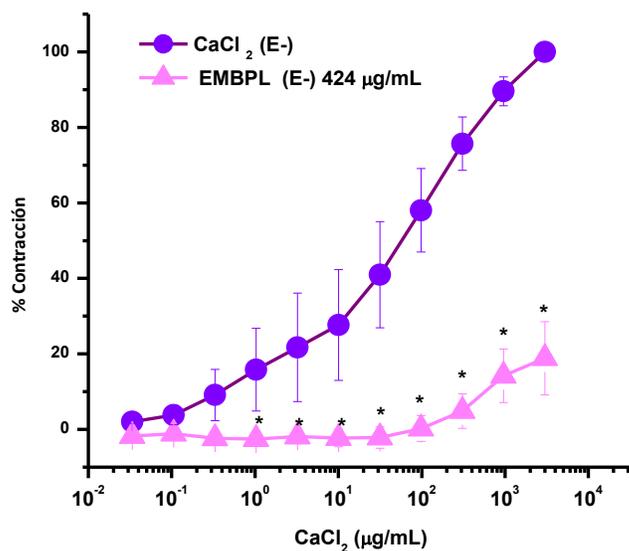
Para ver cómo está implicado el EMBPL sobre el bloqueo de canales de calcio, al realizar la contracción con KCl 80 mM se observa, en la gráfica 5, que el extracto induce un efecto relajante significativo dependiente de la concentración, siendo menos potente al efecto inducido por el control positivo. Este resultado nos sugiere, que el mecanismo de acción puede estar relacionado con el bloqueo de canales de

Ca²⁺ de membrana de larga conductancia tipo L, que son los que se abren ante la contracción inducida por el potasio a altas concentraciones (Hipolito et al.,_2011) .



Gráfica 5. Efecto del EMBPL en la contracción inducida por KCl 80 mM en anillos de aorta aislada sin endotelio. Los datos son expresados como la media ± EEM, n=6 (*P<0.05).

Con la finalidad de confirmar el mecanismo de acción que sigue el EMBPL, como potencial bloqueador de canales de calcio, se construyeron curvas concentración respuesta con CaCl₂ en una solución de Krebs libre de calcio, observándose que el EMBPL, se opone a la contracción de las diferentes diluciones de CaCl₂, confirmando que el extracto se ve relacionado con el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje (Martínez 2004) (gráfica 6).

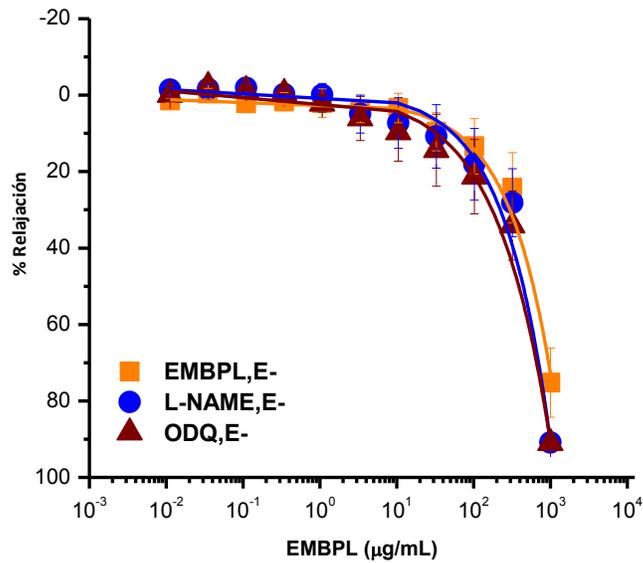


Gráfica 6. Efecto del EMBPL en la contracción inducida por CaCl₂ en anillos de aorta sin endotelio. Los datos son expresados como la media ± EEM, n=6 (*P<0.05).

7.7 Participación de la vía NO/GMP_c

Con el interés de explorar otros mecanismos, se decidió observar si el efecto es dependiente de factores derivados de endotelio, debido que el endotelio desempeña un papel importante en la modulación del tono vascular por medio de la liberación de NO, que se difunde a las células para producir relajación, mediado por el músculo liso en respuesta a la guanilato ciclasa.

Para ver si el efecto vasodilatador está relacionado a un efecto de los segundos mensajeros, los anillos de aorta fueron precontraídos con NA, preincubando L-NAME (inhibidor del óxido nítrico sintasa) y ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa). Como se muestra en la gráfica 7, el efecto vasodilatador inducido por el extracto no se ve modificado, lo que nos permite descartar el aumento de segundos mensajeros como GMP_c y/o NO como mediadores del efecto vasorrelajante del EMBPL (Suarez,2000).

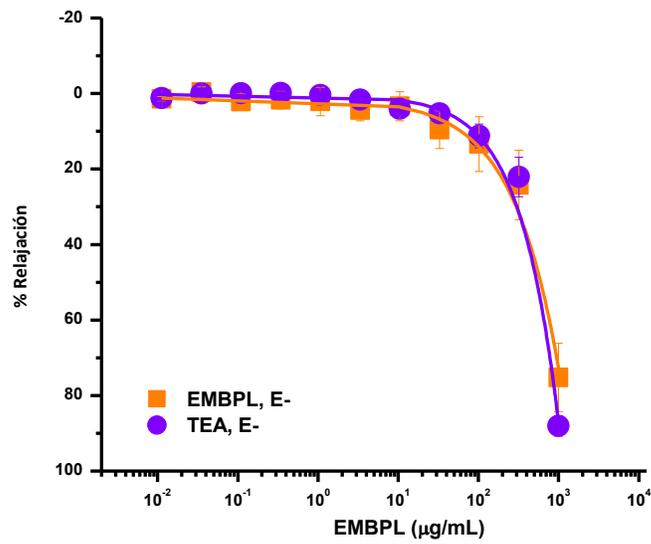


Gráfica 7. Efecto vasorrelajante del EMBPL E- en presencia y ausencia de L-NAME y ODQ en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. Los datos son expresados como la media \pm EEM, n=6 (Sin cambios).

7.8 Participación de canales de potasio

Los canales iónicos de K^+ tienen un papel importante en la regulación del estado contráctil de las CMLV. Cuando hay una activación de estos canales, se produce una hiperpolarización de la membrana celular (relajación vascular). Sin embargo, una inhibición despolariza la misma, desencadena la contracción vascular (Millesi, 2003).

Por otro lado, con el objetivo de ver la participación de canales de potasio, fueron pre-incubados los tejidos con un bloqueador inespecífico de canales de potasio (TEA; 5mM). Como podemos observar en la gráfica 8, no se ve implicada la participación de canales de potasio. Por lo tanto se corrobora que el mecanismo de acción se debe a un bloqueo de canales de calcio.



Gráfica 8. Efecto vasorrelajante del EMBPL en presencia de TEA en anillos de aorta aislada de rata en presencia de endotelio. Los datos son expresados como la media \pm EEM, n=6 (Sin cambios).

9.CONCLUSIÓN

Los estudios funcionales del EMBP indican que tiene un efecto vasorrelajante significativo dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio, con un mecanismo de acción relacionado con el bloqueo de canales de Ca^{2+} en las células del músculo liso vascular, mientras tanto el EMBPL mostró un efecto antagonista funcional sobre las contracciones inducidas con NA y 5-HT. Finalmente, la pre-Incubación con TEA, ODQ y L-NAME no mostraron cambios en el efecto relajante, indicando que la apertura de K^+ y el aumento de segundos mensajeros como GMPc y/o NO están involucrados.

Los resultados derivados de la presente investigación, aportan la evidencia que el EMBPL representa una fuente de obtención de compuestos bioactivos que puedan servir para el diseño de nuevos antihipertensivos.

10.PERSPECTIVAS

- 1.-Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del EMBPL para poder separar los metabolitos bioactivos del extracto metanólico de *Prosthechea livida*.
- 2.- Corroborar mediante bloqueadores específicos de canales de calcio si el mecanismo es dirigido a bloqueo de canales de calcio tipo L.
- 3.-Evaluar el efecto antihipertensivo, en un modelo *in vivo* no invasivo en ratas SHR.

11.REFERENCIAS

American Heart Association . (2016), “American Heart Association y el American College of Cardiology”. Última fecha de consulta: 10 de febrero de 2018. Disponible en <https://www.ahajournals.org/toc/circ/134/24>.

Ángel G. (2009), “Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos”. Revista Académica de Mexicana de Ciencias Exactas, 2009, Pag. 4-11.

Braunwald Cardiología; Robert O. (2013), “Tratado de Cardiología” Edición :9^a Editorial Elsevier, Barcelona España.

Castaño G. (2013) “ Guía de práctica clínica en hipertensión arterial ” Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Pag. 315-32.

Chase, M. W., J. V. Freudenstein, K. M. Cameron Y R. L. Barrett. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pag: 69 -89 en: Cervantes Reyes, M. 2008. Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), especie de potencial agronómico (Maestría) Instituto Politécnico Nacional.

Ensanut. (2016), “Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento”. Última fecha de consulta: 10 de enero de 2019.- Disponible en <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/viewFile/8813/11502>.

Esquivel G, Ruth N, Miguel A. (2012), “Plantas utilizadas en la medicina tradicional con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas”. Biológicas, 2012, Pag 4-8.

Estrada Soto S. (2000), “Estibenoides espasmolíticos de *Scaphyglotis livida* y *Maxililaria densa*. Efecto del 3,4- didihidroxi-3,5 dimetoxibencilo sobre el sistema óxido nítrico / GMPcíclico”. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

García J, Sánchez L, Jiménez R. (2003), “Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes”. CONABIO 2009. Catálogo taxonómico de especies de México, Pag. 108.

Gerardo S. (2010), "Orquídeas". Departamento de Botánica, 2010, Pag. 1-18.

Guyton Arthur C; Hall John E. (2010), "Tratado de fisiología médica" Edición 11^a Editorial Elsevier, Barcelona España.

Guzmán S. (2018), "Receptores acoplados a proteína G y sus múltiples facetas" Departamento de biología celular UNAM, Pag. 120-128.

Hágsater E., M.A. Soto-Arenas, G.A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M.A. López-Rosas & R.L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México.

Harrison; Dennis L, Kaper. (2012), "Principios de Medicina Interna" Edición :19^a Editorial McGRAW-Hm , Madrid España.

Hipólito Ulises V., Rocha Juliana T., Palazzin N., Rodríguez Gerson J., Crestani Carlos C., Corrêa F.M., Bonaventura D., Ambrosio R., Bendhanck Lusiane M., Tirapelli C. (2011), "The semi-synthetic kaurane" Journal of pharmacology. -Brasil, Vol.660- Pag .402-410.

Hossain Mohammad Musharof (2011). Therapeutic orchid; traditional uses and recent advances. Departamento de Botánica. Universidad de Chittagong 4331, Bangladesh. Fitoterapia, 82, Pag.102-140.

INEGI (2021) "Características de las defunciones registradas en México durante 2020 preliminar " Última fecha de consulta 01 de Octubre de 2021. Disponible en https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pre_07.pdf,

Kovács M, et al. (2008) Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains: relevance for flor formation. FEMS Yeast .Pag:1115-26.

Laurencel B; Randa H. (2015), "Goodman and Gilman Manual de Farmacología y terapéutica". Edición: Editorial McGA. de Raw-Hill, Interamericana.

Martínez Martín. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. Última fecha de consulta Enero 2019. Disponible en <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=962>.

Menchaca, R. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. México

Moreno Herman. (2005). Transmisión sináptica de calcio y neurotransmisores. Última fecha de consulta Abril 2019. Disponible en www.scielo.org.co/pdf/recis/v3n1/v3n1a6.pdf.

Porth Patología; Carol M. (2015), "Fundamentos de Fisiopatología" Edición: 3^a Editorial Wolters Kluwe, España.

Robbins, Cotran, Kumar V., Abul K. Abbas, N. (2015), "Patología estructural y funcional" Edición 9^a Editorial Elsevier, Barcelona España.

Segarra Fisiología; Edgar S. (2006), "Fisiología de los Aparatos y Sistemas" Edición: 1^a Editorial Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas.

Sinaí Rendón Vallejo. (2011). "Estudio del efecto vasodilador de fenantrenos y triterpenos aislados de orquídeas. Efecto vasorrelajante de 2,7-dihidroxi-3,4,9-trimetoxifenantreno a través del bloqueo de canales de calcio"

Suarez Pablo. (2000). Liberación del óxido nítrico inducida por el flujo sanguíneo novedades y perspectivas de investigación. Disponible en <https://www.medigraphic.com/pdfs/archi/ac-2000/ac002k.pdf>

Tortora GJ, Derrickson B. (2013), "Principios de Anatomía y Fisiología" Edición: 13^a Editorial Panamericana, Madrid España.

Vergara Galicia J, Ortiz Andrade R, Castillo España P, Ibarra Barajas M, Gallardo Ortiz I, Villalobos Molina R, Estrada Soto S. (2008), "Antihypertensive and vasorelaxant activities of Laelia autumnails are mainly through calcium channel blockade. Vascular Pharmacology", Pag. 26-31.