



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Estudios *ex vivo* e *in vivo* para el análisis del  
potencial antihipertensivo del extracto  
diclorometánico obtenido de las flores de  
*Achillea millefolium*”

Tesis profesional

Que para obtener el título de:

Licenciada en Farmacia

Presenta:

Julia Miroslava Solano Chopin

Director de tesis:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Cuernavaca, Morelos 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 16 de noviembre de 2021  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/0154/2021

**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 **“Estudios *ex vivo* e *in vivo* para el análisis del potencial antihipertensivo del extracto diclorometánico obtenido de las flores de *Achillea millefolium*”** presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Julia Miroslava Solano Chopin, (20171012257)**, 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. Julio César Almanza Pérez

\_\_\_\_\_

Dra. María Crystal Columba Palomares

\_\_\_\_\_

M. en C. Martha Hernández Labra

\_\_\_\_\_

Dr. Rafael Villalobos Molina

\_\_\_\_\_



**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**M.P.D. Reyna América Serrano López**  
**Secretaria 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 AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2021-11-16 17:52:50 | Firmante

veunOZ4nofdJOLjknh5V/61jI0dPSwOMlendTzq7vLesamUd9mJnX1uCPG1O97jLG/HZOHQFEPHk7nj5qguzY2gxiGEZtbMEbPkAUAnupVN9PyRC8Qllx/Wy2GWuDGAtJnsnQbkaLkIYYva0FOXBT9NQ7Y/Pw2zCF+TpXJRd7TIXc5PAHZxL9bXjo0Acvo9eH1RqQdEsvK4L6c/PfCbK0JR5yrqITTcjndwZnr7C1P76ffaEn5Tf4ffxg9D/dkXeoUC68WlZr+yBMbg9rbajM WfelA5SZPX9RVhTb5zhhogvP3piTzTjLjrLB5tTGNG11G9jh7we8ywl/96nht4cQ==

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



[c5OdUxYFA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vUp9bi2LyivA56DzeJiDriPKT9dD9gYC>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

**MARTHA HERNANDEZ LABRA | Fecha:2021-11-18 21:18:44 | Firmante**

aAABZwiH2bUBDLH67VTPYwyGPKpcQP2NsJgoqAWOPwfS9EsAfrZ8t5xqGcwaYxhR84VX2N1kXatLkPE7HnERe+kv6/eCqpNcy07rz1vHVafszUaFLhK271632VXiQOwImJFdADpO1EvuP5E8Tgfj89OCjYji2E+Hr69x+91/M2s4WBZu+od+NUiINOqY29jZ9Tt5k6tJd0Zdc21qPad0YikA1f/Lu/WxiHQLroez7/8TZe4x9uZW3FgSBa9uy0S5KG+z4w6NzCJIGxGvuxYFi/32Yi/dkPIFOcluFYUU+Hr4CTEQvgVKVZq/kPhYJJSsSganYpw9IBbYbNjG854gdA==

**JULIO CESAR ALMANZA PEREZ | Fecha:2021-11-18 23:49:53 | Firmante**

DMkuq5SLiHke1sa100XphocA6dw58wBXpRvvsjXZy7eze/iwlQG5UaoywmwmzCcD26CvUNI66XRH9d1+N65Gxj+EaqlnGva1TVV31YV2Uld4n4PQOeef9CnsLDirUrmUNqKEfVCAtQbb+LZMAYuFmPNXPKY2vov9uGQ3bNXcbRKeqgbCD6wohsYzMzQUtBmzYXLRsX8i7T+1dAEuRTPIUDA7kZsuN8RARD99lnp2+4GAJq7Q+ON05QdkwPE90i3FTF+2ERSsLsCcOum3r4bUUv06Wrzwpz5TGO4HmC8ZLwjdulru/bMu2NOuZ8inC53BXjoicGTUxWRDji540Czcq==

**MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2021-11-19 12:59:16 | Firmante**

Ba44soOQOhfzkKbwP7KfbMEW0Aw/3Pct/W7dMy3lPH+ueli8bl71OdE866KKz8FQmZJL6HTv2vqCle9NHJY6zBHKzERv2yRnlU0m5rGQeMOF8Lzs5Fd9Dpj+sur/6NksQMjuM6rW/Dslb/kF1L2iKglw1uuqZhlOLsc8+YumgnRQDZC3kTwHyfwf4DMqkgiJ/Zltg4jiWFSqEmW9RITs+ciWmxK0alna8K2FL/FlavWXV/JeB+uCiOrXaTJgAK6A1B3sfw640xGVHDVrLgslZ7bcRNsMohpi93Xvcgf5OYntSKcFJcLOndVVydbCGypOIPMPP71XzFH9Zoj+ZA==

**GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2021-11-20 00:02:47 | Firmante**

PChQfm4mU/ir+IQYIWeEMkSIVlcc4ZxBCgvNla4ts0/Sk7jO0kBBdQ8Qv1rzW5qfGxAJe2E3DXV54ldzz0smcsy0dxZXeMtrnE5LONU+IgdJozwggNa7ouhQH+UHOa5Igj0A+aLNFwSHQT2kIDXnFNIBTKWitWiVqQpTBkIPteo5arJW26zT3EJQ0Xm6DxjNp4jCFZWlBzOOJma45DS3ZkM0yT81F0ivqR3ZHw8nPAQYn+4Jzv1DKvDpc1OFL+ifX1XfDU3LjduCfA0t/vvcNwYmguPwxc/W40s0KBRy6pt9IQMfx0XLjVx0Bif0kRy05jwgA70BquM/IHDb3Q==

**RAFAEL VILLALOBOS MOLINA | Fecha:2021-11-21 10:15:24 | Firmante**

TH5jsrZlWVKja+BRWJt3Pc1PWFZb54uA3CsnKJ0zOB5SLyv3M84S26r/ZPwN88hBK7yKOVaqBkVbz8V8viS0RodXWuzYJ4hYeHv6aNSVJpjTekCyssgir3LXZzO/NFDImfg3ENr/MOc+p1ZwQGnxvw13w+PRvjCwTarBOBmzilAxoeZc0vPQd0QjSAG4rD6IECjY+4hnxxQSj174+XJ7+4F7kUm2MxyxlBDR+n4Oln8P714RZ1smmdPbyWOSegpd+4+zfaWEx8jQR/KiHDaLFC12hZnCN5igJKrBCbHxiVX5p2obOGWU2P/121JEgnGPc2xhi2TTFzHbGWIAWfew==

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



Oauzn41r6

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gT9jP5s85jYk8C5O9kRYWasz0FliaZfY>





## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	4
LISTA DE GRÁFICAS .....	4
LISTA DE TABLAS .....	5
ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	9
INTRODUCCIÓN .....	13
ANTECEDENTES .....	15
I. Sistema Cardiovascular.....	15
I.I Vasos sanguíneos.....	15
I.II Músculo liso (ML) .....	18
I.II.I Contracción y relajación .....	18
I.III Presión Arterial.....	20
I.III.I Mecanismos de regulación de la presión sanguínea .....	20
I.IV Endotelio vascular .....	21
I.IV.I Óxido nítrico .....	22
II. Hipertensión arterial sistémica (HAS).....	23
II.I Clasificación de la HAS .....	23
II.II Epidemiología .....	24
II.III Terapéutica de la Hipertensión Arterial .....	25
III. <i>Achillea millefolium</i> .....	26
III.II Botánica.....	26
III.III Origen y Agroecología.....	26
III.IV Usos etnomédicos .....	27
III.V Fitoquímica .....	27
III.VI Efectos terapéuticos descritos .....	30
JUSTIFICACIÓN .....	33
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
METODOLOGÍA.....	39
1. Identificación y recolección del material vegetal .....	39

2. Obtención de los extractos.....	39
3. Evaluaciones farmacológicas en modelos <i>ex vivo</i> .....	39
3.1 Efecto vasorelajante.....	40
3.2 Mecanismo de acción dependiente de endotelio .....	41
3.3 Mecanismo de acción por receptores $\alpha$ -adrenérgicos .....	42
3.4 Mecanismo de acción por despolarización de la membrana con KCl 80mM.....	42
3.5 Mecanismo de acción por canales de $Ca^{2+}$ .....	43
4. Determinación del efecto antihipertensivo .....	44
4.1 Evaluación del efecto antihipertensivo del ED <sub>AmF</sub> en un modelo agudo no invasivo.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
1. Obtención de los extractos.....	46
2. Evaluaciones farmacológicas.....	47
2.1 Efecto vasorrelajante .....	47
2.2 Mecanismo de acción dependiente de endotelio .....	48
2.3 Mecanismo de acción por receptores $\alpha$ -adrenérgicos .....	50
2.4 Mecanismo de acción por despolarización de la membrana con KCl 80mM y participación de los canales de $Ca^{2+}$ .....	51
3. Determinación del efecto antihipertensivo .....	53
3.1 Evaluación del efecto antihipertensivo del ED <sub>AmF</sub> en un modelo agudo no invasivo .....	53
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS .....	58
ANEXOS.....	60
REFERENCIAS.....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema Cardiovascular .....	15
Figura 2: Características de los diferentes vasos sanguíneos (Berne y Levy, 2009). .....	16
Figura 3: Principales arterias.....	17
Figura 4: Estructura de la arteria.....	17
Figura 5: Mecanismo de contracción del músculo liso (Liu y Khalil, 2018). .....	19
Figura 6: Producción de óxido nítrico.....	22
Figura 7: <i>Achillea millefolium</i> .....	26
Figura 8: Extracción de la aorta torácica de rata .....	40
Figura 9: Evaluación del efecto vasorrelajante del ED <sub>AmF</sub> en anillos de aorta de rata .....	41
Figura 10: Determinación del mecanismo de acción del ED <sub>AmF</sub> dependiente de endotelio.....	41
Figura 11: Determinación del mecanismo de acción del ED <sub>AmF</sub> por receptores $\alpha$ -adrenérgicos.....	42
Figura 12: Mecanismo de acción sobre la hiperpolarización de la membrana y movilización de $Ca^{2+}$ .....	43
Figura 13: Mecanismo de acción por impedimento en el flujo de $Ca^{2+}$ .....	43
Figura 14: Determinación del efecto antihipertensivo en un modelo <i>in vivo</i> en roedores de la cepa SHR. ....	44
Figura 15: Cromatografía en capa fina de los extractos. ....	46

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Defunciones causadas por enfermedades del corazón. ....	25
Gráfica 2: Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos e hidroalcohólico de <i>Achillea millefolium</i> en anillos de aorta aislada de rata precontractados con NA en ausencia de endotelio. ....	31
Gráfica 3: Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos e hidroalcohólico de <i>Achillea millefolium</i> en anillos de aorta aisladas de rata precontractados con NA en presencia de endotelio. ....	31
Gráfica 4: Efecto vasorrelajante del ED <sub>AmF</sub> , evaluación realizada en un modelo <i>ex vivo</i> de aorta de rata con un $E_{max}= 97.45\% \pm 2.35$ ; $CE_{50}=199.35 \mu\text{g/mL}$ en presencia de endotelio vascular y un $E_{max}=79.3\% \pm 3.12$ ; $CE_{50}=317.69 \mu\text{g/mL}$ en ausencia de endotelio. ....	47
Gráfica 5: Efecto vasorrelajante inducido por el ED <sub>AmF</sub> en presencia de ODQ ( $E_{max}= 72.29\% \pm 4.32$ ) y L-NAME ( $E_{max}= 49.99\% \pm 7.66$ ) en un modelo <i>ex vivo</i> de aorta de rata.....	48
Gráfica 6: Efecto vasorrelajante inducido por el ED <sub>AmF</sub> en presencia de Indometacina ( $E_{max}= 69.39\% \pm 9.82$ ) en un modelo <i>ex vivo</i> de aorta de rata. ....	49
Gráfica 7: Efecto vasoconstrictor de la NA en presencia del ED <sub>AmF</sub> en su $CE_{50}= 199.35 \mu\text{g/mL}$ ( $E_{max}= 14.98\% \pm 4.89$ ) en un modelo <i>ex vivo</i> de aorta de rata. ....	50
Gráfica 8: A) Efecto vasorrelajante del ED <sub>AmF</sub> en la contracción inducida por KCl 80mM ( $E_{max}= 82.14\% \pm 2.34$ ) y B) Efecto inhibitorio del ED <sub>AmF</sub> en la contracción generada por $CaCl_2$ ( $E_{max}= 37.73 \pm 8.99$ ) en un modelo <i>ex vivo</i> de aorta de rata.....	52
Gráfica 9: Disminución máxima de: A) presión arterial sistólica, B) presión arterial diastólica y C) frecuencia cardíaca (expresada en %) generada por la administración oral de 100 mg / kg del ED <sub>AmF</sub> en ratas de la cepa SHR.....	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Sustancias vasoactivas secretadas por el endotelio _____	22
Tabla 2: Clasificación de la HAS de acuerdo con el PROY-NOM-030-SSA2-2017 _____	23
Tabla 3: Principales 10 causas de defunciones registradas en 2019 _____	24
Tabla 4: Compuestos reportados que se encuentran en <i>A. millefolium</i> _____	27
Tabla 5: Características de los principales compuestos de <i>Achillea millefolium</i> (Ali et al., 2017)___	29
Tabla 6: Peso y rendimiento del extracto diclorometánico obtenido de la flor de <i>Achillea millefolium</i> _____	46
Tabla 7: Efecto vasorrelajante máximo del ED en presencia de diferentes inhibidores _____	50

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Agonista
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AI</b>	Angiotensina I
<b>AI</b>	Angiotensina II
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaP</b>	Calponina
<b>cGMP</b>	3,5-monofosfato de guanosina cíclico
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>EDRF</b>	Factor de relajación derivado del endotelio
<b>GC</b>	Guanilil ciclasa
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteína G
<b>Gq</b>	Proteína de unión GTP heterotrimérica
<b>HA</b>	Hipertensión arterial
<b>HAS</b>	Hipertensión arterial sistémica
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
<b>ML</b>	Músculo liso

<b>MLC</b>	Cadenas ligeras de miosina
<b>MLCK</b>	Cinasa de las cadenas ligeras de miosina
<b>MLV</b>	Músculo liso vascular
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NOs</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAS</b>	Presión arterial sistémica
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipasa C
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>R</b>	Receptor
<b>SRAA</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo
<b>SNP</b>	Sistema nervioso parasimpático
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>SR</b>	Retículo sarcoplásmico



# RESUMEN

## RESUMEN

**Introducción:** Las enfermedades crónico-degenerativas se presentan cada vez con mayor frecuencia en personas de la tercera y mediana edad, tal es el caso de la hipertensión arterial; este padecimiento se debe mayormente a factores dependientes de los hábitos y estilos de vida de las personas, además de los factores genéticos que predisponen al paciente. Además, aunque existen en el mercado una gran variedad de fármacos, los pacientes son poco adherentes a sus tratamientos farmacológicos y la eficacia del medicamento disminuye significativamente. Adicionalmente, optan por consumir remedios caseros o preparados herbolarios de la medicina tradicional para tratar de controlar los síntomas relacionados al aumento de la presión arterial; sin embargo, pocas plantas han sido validadas desde de un punto de vista científico (químico y farmacológico) para garantizar la eficacia de los preparados herbolarios. En este sentido, la planta silvestre *Achillea millefolium* es utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la hipertensión arterial y existen estudios previos que demuestran sus propiedades vasorrelajantes. Así, el presente trabajo se planteó para corroborar el uso medicinal que se le atribuye a la especie *A. millefolium* por su actividad antihipertensiva y establecer el mecanismo de acción vasorrelajante funcional del extracto más activo.

**Materiales y Métodos:** Se realizaron maceraciones exhaustivas de la flor de *Achillea millefolium* con disolventes en orden creciente de polaridad, el extracto diclorometánico (ED<sub>AmF</sub>) se llevó a sequedad utilizando un rotavapor al alto vacío. Posteriormente, se realizaron evaluaciones farmacodinámicas utilizando un modelo *ex vivo* (anillos de aorta de rata), y para ello se utilizaron agonistas e inhibidores de enzimas involucradas en las vías de señalización en los procesos de relajación y contracción muscular, en presencia y ausencia de endotelio vascular, según sea el caso. Para la interpretación se realizaron gráficas concentración-respuesta. Por otro lado, se determinó *in vivo* el efecto antihipertensivo, es decir, se administró por vía intragástrica a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) una dosis de 100 mg/kg del extracto, se monitoreó la presión arterial sistólica, la diastólica y la frecuencia cardiaca. Por cada animal se realizaron un mínimo de 8 lecturas antes de la administración (hora 0) y a las horas 1, 3, 5 y 7 posteriores a la administración.

**Resultados:** El ED<sub>AmF</sub> mostró un efecto dependiente de la concentración, con E<sub>max</sub> de 97.45% ± 2.35; CE<sub>50</sub>=199.35 µg/mL en presencia de endotelio vascular, y E<sub>max</sub>=79.3% ± 3.12; CE<sub>50</sub>=317.69 µg/mL en ausencia de éste; los resultados son parcialmente dependientes de la presencia de endotelio con diferencia significativa (p<0.05), el extracto es más eficaz pero menos potente que carbacol y nifedipina, utilizados como controles positivos. Asimismo, se determinó el modo de acción del ED<sub>AmF</sub>, en donde la construcción de curvas concentración-respuesta contráctil, inducida por Noradrenalina, fue modificada por el ED<sub>AmF</sub> a su CE<sub>50</sub>, provocando disminución significativa de la potencia y del efecto máximo, estos resultados demostraron que ED<sub>AmF</sub> posee componentes que podrían estar actuando por antagonismo, no competitivo, a un sitio alostérico sobre los receptores adrenérgicos o por antagonismo funcional, que involucra la interacción en la señalización posterior a la unión agonista-receptor. Adicionalmente, la evaluación del efecto relajante en presencia L-NAME (inhibidor de eNOS) y ODQ (inhibidor de guanilil ciclasa soluble), indicó que la vía NO/GMPc está involucrada en el proceso de relajación del músculo liso de aorta. Por otro lado, la evaluación del extracto sobre las contracciones inducidas por KCl (80 mM) y por CaCl<sub>2</sub> indicó el posible bloqueo de canales de calcio por el extracto en su efecto relajante. Finalmente, el ED<sub>AmF</sub> mostró acción antihipertensiva en ratas SHR.



# ABSTRACT

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic-degenerative diseases occur more and more frequently in people of the third and middle age, such is the case of arterial hypertension; this condition is mainly due to factors dependent on the habits and lifestyles of people, in addition to the genetic factors that predispose the patient. In addition, although there is a wide variety of drugs on the market, patients are not adhering to their pharmacological treatments and the effectiveness of the drug decreases significantly. Additionally, they choose to consume home remedies or herbal preparations of traditional medicine to try to control the symptoms related to the increase in blood pressure; however, few plants have been validated from a scientific point of view (chemical and pharmacological) to ensure the efficacy of herbal preparations. In this sense, the wild plant *Achillea millefolium* is used for the treatment of various diseases, including high blood pressure and there are previous studies that demonstrate its vasorelajantes properties. Thus, the present work was proposed to corroborate the medicinal use attributed to the species *A. millefolium* for its antihypertensive activity and to establish the mechanism of functional vasorelajante action of the most active extract.

**Materials and Methods:** Exhaustive macerations of the *Achillea millefolium* flower were performed with solvents in increasing order of polarity, the diclorometan extract (ED<sub>AmF</sub>) was brought to dryness using a high vacuum rotavapor. Subsequently, pharmacodynamic evaluations were performed using an *ex vivo* model (rat aorta rings), and for this purpose agonists and inhibitors of enzymes involved in the signaling pathways in the processes of relaxation and muscle contraction were used, in the presence and absence of vascular endothelium, as the case may be. For the interpretation, concentration-response graphs were made. On the other hand, the antihypertensive effect was determined *in vivo*, that is, a dose of 100 mg/kg of the extract was administered intragastrically to spontaneously hypertensive rats (SHR), systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate were monitored. For each animal, a minimum of 8 readings were performed before administration (hour 0) and at hours 1, 3, 5 and 7 after administration.

**Results:** The ED<sub>AmF</sub> showed a concentration-dependent effect, with E<sub>max</sub> of 97.45% ± 2.35; EC<sub>50</sub>=199.35 µg/mL in the presence of vascular endothelium, and E<sub>max</sub>=79.3% ± 3.12; EC<sub>50</sub>=317.69 µg/mL in the absence of this; the results are partially dependent on the presence of endothelium with significant difference (p<0.05), the extract is more effective but less potent than carbachol and nifedipine, used as positive controls. Likewise, the mode of action of the ED<sub>AmF</sub> was determined, where the construction of concentration-contractional response curves, induced by Noradrenaline, was modified by the ED<sub>AmF</sub> to its EC<sub>50</sub>, causing a significant decrease in power and maximum effect, these results showed that ED<sub>AmF</sub> it has components that could be acting by antagonism, non-competitive, to an allosteric site on adrenergic receptors or by functional antagonism, which involves interaction in signaling after agonist-receptor binding. Additionally, the evaluation of the relaxing effect in the presence of L-NAME (eNOS inhibitor) and ODQ (soluble guanylyl cyclase inhibitor), indicated that the NO/cGMP pathway is involved in the relaxation process of the smooth muscle of the aorta. On the other hand, the evaluation of the extract on the contractions induced by KCl (80 mM) and by CaCl<sub>2</sub> indicated the possible blockage of calcium channels by the extract in its relaxing effect. Finally, the ED<sub>AmF</sub> showed antihypertensive action in SHR rats.



# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Conforme a los datos emitidos por la Organización Panamericana de la Salud, entre el 20 y el 40% de la población adulta padece hipertensión arterial; esto equivale a alrededor de 250 millones de personas. Cada año en América fallecen 1.6 millones de personas como consecuencia de alguna enfermedad cardiovascular, de las cuales alrededor de medio millón son menores de 70 años (OPS, *s. f.*).

La elevada prevalencia de la HAS se debe, mayormente, a factores dependientes de los hábitos y estilo de vida de las personas, tales como la obesidad, la ingesta excesiva de sodio, el sedentarismo y el consumo elevado de alcohol. Así, una forma de prevenir o tratar la HAS es por cambios en el estilo de vida y en los hábitos alimenticios; otra forma de tratamiento es el consumo de medicamentos, pero, aunque existen en el mercado una gran variedad de fármacos para esta enfermedad, los pacientes son poco adherentes a sus tratamientos farmacológicos y optan por consumir remedios caseros o preparados herbolarios de la medicina tradicional.

México tiene una gran herencia cultural en el uso de plantas medicinales, se han identificado alrededor de 5,000 especies de plantas con efectos terapéuticos, que son utilizadas por más de 60 grupos étnicos, la mayor parte de estas plantas son silvestres (Juárez-Rosete et al., 2013).

La planta silvestre *Achillea millefolium* es utilizada en gran parte de Norteamérica y Eurasia para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la hipertensión arterial, la inflamación en general y los dolores. Por lo anterior, en este trabajo se corrobora la actividad antihipertensiva atribuida a *Achillea millefolium* en la medicina tradicional; se profundiza en ella y se determina el mecanismo de acción mediante el cual ocurre la relajación de los vasos sanguíneos, que trae como consecuencia el efecto antihipertensivo.



# ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

### I. Sistema Cardiovascular

El sistema cardiovascular es un sistema cerrado, compuesto por un órgano central de impulsión (corazón) y un conjunto de conductos (arterias, venas y capilares) con estructuras, tamaños y propiedades diversas, la unión de todos estos componentes configura una red de transporte y distribución de sangre a todo el cuerpo (circulación). La finalidad de la circulación es suministrar oxígeno, nutrientes y hormonas a los tejidos y líquidos corporales para mantener el equilibrio interno, así como recoger los desechos metabólicos para su posterior eliminación (Figura 1).

Anatómicamente, la circulación se divide en circulación sistémica y circulación pulmonar. La *circulación sistémica* está conformada por el ventrículo izquierdo del corazón, la aorta y sus ramas, los capilares y las venas que conducen la sangre a la aurícula derecha, la sangre transportada es rica en oxígeno. La *circulación pulmonar* está conformada por el ventrículo derecho, la arteria pulmonar y sus ramas, los capilares pulmonares, las venas pulmonares y la aurícula izquierda, la sangre transportada es carboxigenada (Latarjet & Ruiz Liard, 2019).

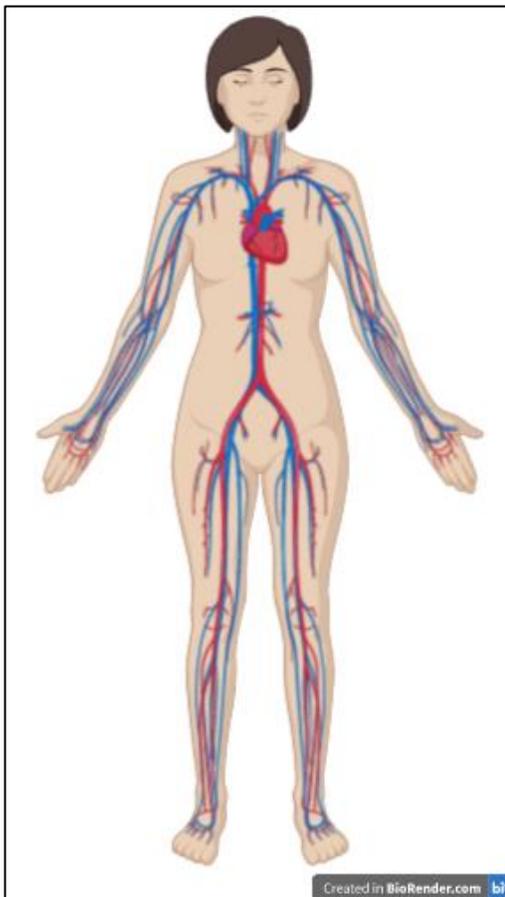


Figura 1: Sistema Cardiovascular

#### I.1 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son los conductos mediante los cuales se transporta la sangre del corazón hacia los tejidos, y desde los tejidos de regreso hacia el corazón. Existen 3 tipos de vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares, estos se ramifican a lo largo del cuerpo, con la finalidad de transportar las sustancias y componentes necesarios para el adecuado funcionamiento del organismo (Figura 2) (Boron et al., 2017; Costanzo, 2018).

**Las arterias:** Tienen la función de transportar la sangre rica en oxígeno desde el corazón hacia el resto del cuerpo, la presión a la que transportan la sangre es relativamente elevada en comparación con venas de similar calibre, la sangre pasa de la arteria de mayor calibre hacia arterias de menor calibre, la diferencia entre arterias se basa en la cantidad de tejido elástico y muscular, su grosor y la función que desempeñan (Berne y Levy, 2018; Le Vay, 2015; Moore et al., 2017).

**Las venas:** Su función es retornar la sangre pobre en oxígeno del cuerpo hacia el corazón, esta sangre pasa de venas con un calibre pequeño hacia venas de mayor calibre. Por lo general, las venas no poseen pulso ni tienen la capacidad de producir sangre a chorro cuando son lesionadas. En el cuerpo humano hay más venas que arterias, los diámetros de las venas son mayores a los de las arterias correspondientes; además, las paredes de las venas son más delgadas, esto les permite tener mayor capacidad de expansión. Debido a que el diámetro de las venas es superior y poseen mayor capacidad de expansión, el 80% de la sangre se encuentra en las venas (Moore et al., 2007).

**Los capilares:** Son tubos endoteliales simples que conectan a las arteriolas con las vénulas, permitiendo así el intercambio de materiales y sustancias. Los capilares contienen músculo no liso, razón por la que no tienen la capacidad de cambiar activamente sus diámetros (Moore et al., 2007; Mohrman, Heller y Girón, 2007).

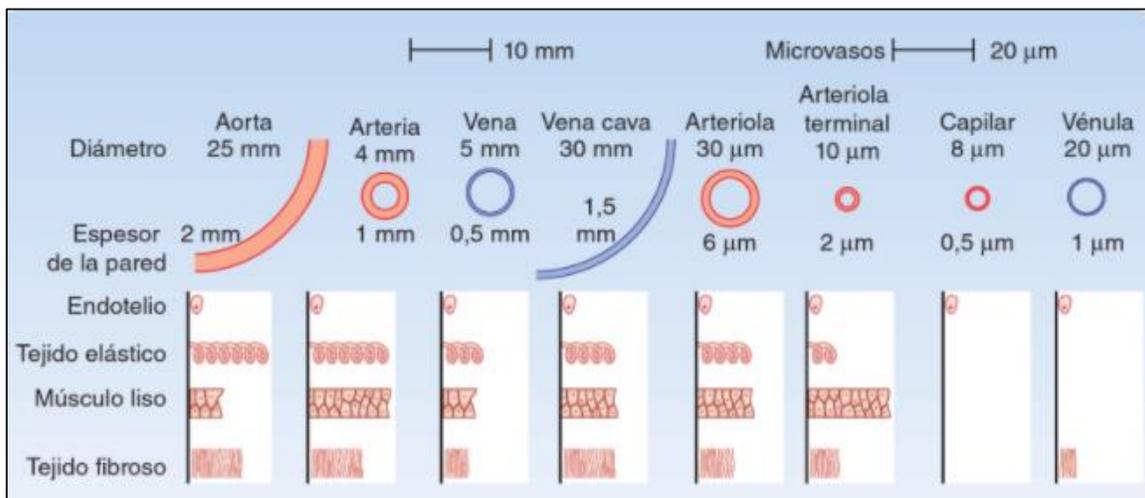


Figura 2: Características de los diferentes vasos sanguíneos (Berne y Levy, 2009).

Para fines de la presente investigación nos enfocaremos en las arterias (Figura 3). Las principales arterias del sistema circulatorio son el tronco pulmonar y la aorta. El tronco pulmonar mide aproximadamente 5 cm de largo y 3 cm de ancho, sale del ventrículo derecho del corazón y se divide en arteria pulmonar derecha y arteria pulmonar izquierda. La aorta es un conducto principalmente elástico de unos 13 cm de largo, conforme esta se va ramificando, las arterias subsecuentes

son cada vez más musculares, hasta que la capa muscular se convierte en la predominante.

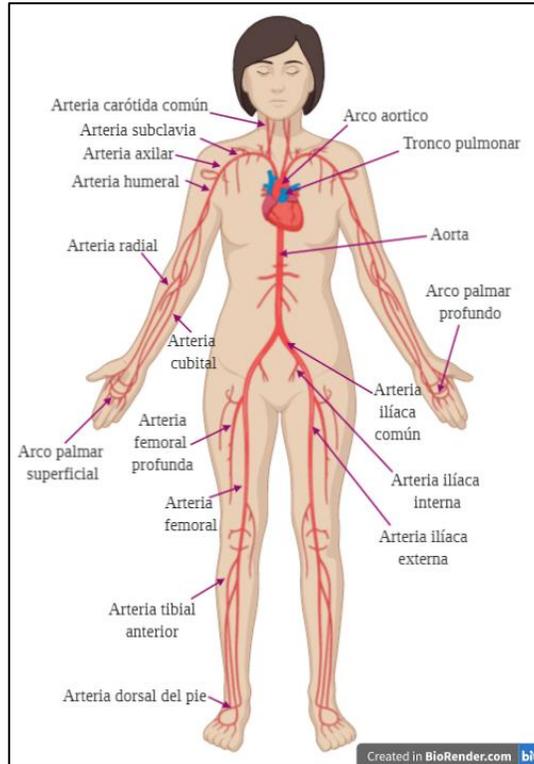


Figura 3: Principales arterias

Las arterias están conformadas por 3 capas, cubiertas o túnica (figura 4) y como se mencionó, las arterias se van a diferenciar por el grosor de esas capas:

- a. **Adventicia:** Es la capa externa, conformada por tejido conectivo (fibroelástico denso) y nervios. Al ser muy elástica sus paredes pueden expandirse permitiendo la medición de la presión arterial como un método de diagnóstico.
- b. **Media:** Capa conformada por células del músculo liso vascular (MLV), fibrillas elásticas y una matriz extracelular. Esta capa está separada de la íntima por una lámina elástica interna conformada por tejido conectivo, brindando así la función de contracción y relajación vascular.

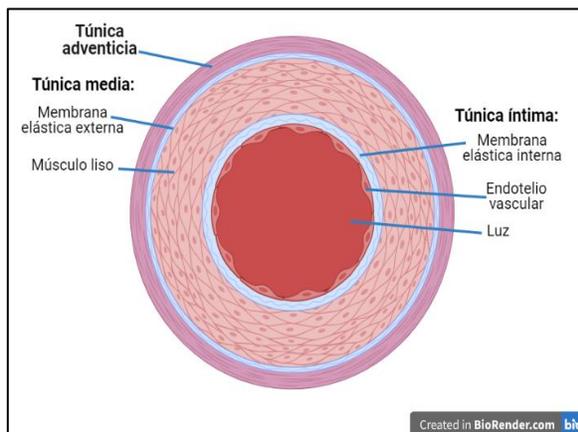


Figura 4: Estructura de la arteria

c. *Intima*: El recubrimiento de esta capa está conformado únicamente por células endoteliales y una matriz extracelular, al ser la capa más interna está en contacto con la sangre.

## I.II Músculo liso (ML)

Son músculos que se encuentran en la conformación de las paredes de casi todos los vasos sanguíneos y órganos viscerales, estos músculos mueven o restringen las sustancias que fluyen a través de ellos por medio de pulsaciones o contracciones débiles, lentas, coordinadas, secuenciales o de tono sostenido. Las pulsaciones son involuntarias y son estimuladas por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), la contracción de este tipo de músculo puede ser provocada también por acciones hormonales o estímulos locales (Moore et al., 2017; Tortora y Derrickson, 2013).

El ML se divide en 2 tipos: el primero es el tejido muscular liso visceral (de unidad única) que es el más común y se encuentra en la piel, en las paredes de arterias y venas pequeñas, en órganos huecos como lo son el estómago, intestino, vejiga y útero; el segundo es el tejido muscular liso de unidades múltiples, este tipo de músculo liso está compuesto por fibras individuales que cuentan con sus propias terminaciones de neuronas motoras y con pocas uniones en hendidura con fibras vecinas, este tipo de tejido se encuentra en las paredes de las grandes arterias, vías aéreas pulmonares, en algunas zonas del ojo y en los músculos erectores de los pelos. Una fibra de músculo liso relajado puede medir entre 30-200  $\mu\text{m}$  de longitud, su grosor es mayor en la zona central (3-8  $\mu\text{m}$ ) y menor a los extremos. Cada fibra contiene un único núcleo central en forma oval (Tortora y Derrickson, 2013).

### I.II.I Contracción y relajación

La contracción de una fibra de músculo liso es más lenta pero más persistente que las contracciones de músculo esquelético, además, el músculo liso se puede acortar y estirar en mayor grado que otros tipos de músculo.

Contracción del MLV (Figura 5): Un agonista vasoconstrictor (A) se une a su receptor (R) y se acopla a la proteína de unión GTP heterotrimérica (Gq) y activa la fosfolipasa C (PLC $\beta$ ) que estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El agonista también activa la fosfolipasa D (PLD) que hidroliza la fosfatidilcolina (PC) en colina y DAG. IP<sub>3</sub> estimula la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico (SR). El agonista también estimula la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> se une a la calmodulina (CaM), formando el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM, este complejo activa la enzima cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), utilizando una molécula de ATP, la MLCK fosforila la serina en posición 19 de las cadenas ligeras de miosina (MLC) e inicia la

contracción del MLV. La DAG, fosfatidilserina (PS) y  $\text{Ca}^{2+}$  provocan la activación y translocación de proteína cinasa C (PKC). La PKC fosforila la Calponina (CaP), lo que permite que la actina se una a la miosina. El DAG es transformado por la DAG lipasa en ácido araquidónico (AA), y la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) aumenta la hidrólisis de fosfatidiletanolamina (PE) en AA, que produce a su vez la inhibición de la fosfatasa de las MLC (Tortora y Derrickson, 2013; Liu y Khalil, 2018).

Relajación del MLV: Ocurre con la disminución de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta disminución desencadena la ruptura del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, desactivándose en consecuencia la MLCK, al estar inactiva la enzima se produce la desfosforilación de la Serina 19 en la MLC, revirtiéndose la fosforilación de la CaP rompiéndose la unión entre actina y miosina. Finalmente, las fibras del músculo liso se relajan (Liu y Khalil, 2018).

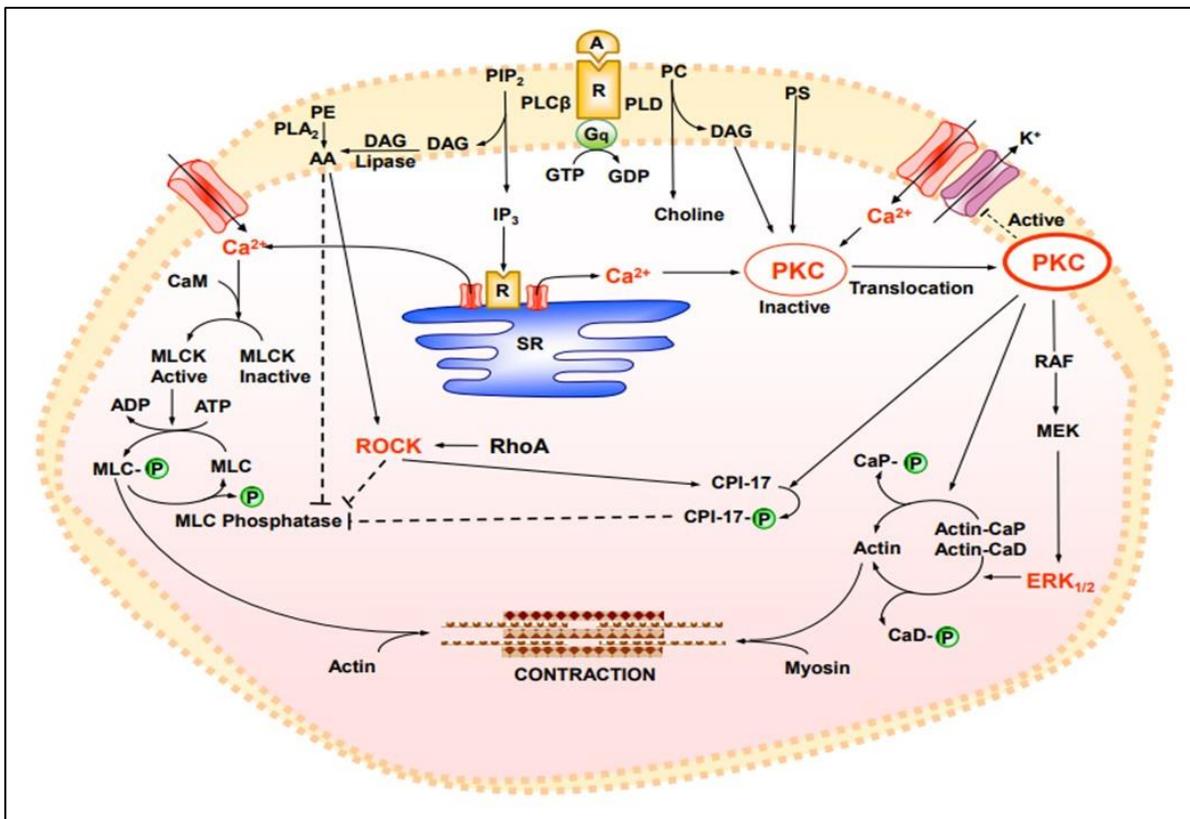


Figura 5: Mecanismo de contracción del músculo liso (Liu y Khalil, 2018).

### I.III Presión Arterial

La sangre fluye de zonas de mayor presión a zonas de menor presión, entre mayor sea la diferencia de presión, mayor será el flujo sanguíneo. La contracción de los ventrículos genera la presión arterial (PA), que es la presión hidrostática que la sangre ejerce contra las paredes de los vasos sanguíneos (Barrett et al., 2013). La PA está determinada por el gasto cardíaco, volemia y resistencia vascular: el gasto cardíaco es el volumen de sangre eyectado por el ventrículo hacia la aorta cada minuto, la volemia es el volumen total de sangre circulante, la resistencia vascular es la oposición que presenta el flujo sanguíneo debido a la fricción entre la sangre y las paredes de los vasos sanguíneos, esta depende: 1. del tamaño de la luz del vaso sanguíneo (entre más pequeña es la luz del vaso sanguíneo, mayor es la resistencia vascular), 2. la viscosidad de la sangre (a mayor viscosidad de la sangre, mayor resistencia. Cualquier situación que incremente la viscosidad de la sangre, aumenta la presión arterial) y 3. el largo total del vaso sanguíneo (a mayor longitud, mayor resistencia) (Berne y Levy, 2018; Tortora y Derrickson, 2013).

La presión arterial sistólica (PAS) es la mayor presión sanguínea que alcanzan las arterias durante la sístole (contracción ventricular) y la presión arterial diastólica es la menor presión sanguínea alcanzada durante la diástole (relajación ventricular). Varios sistemas de retroalimentación negativa interconectados controlan la presión arterial, algunos permiten un rápido ajuste para enfrentar cambios abruptos y otros actúan más lentamente para proveer regulación de la presión arterial a largo plazo (Tortora y Derrickson, 2013).

#### I.III.I Mecanismos de regulación de la presión sanguínea

##### Sistema Nervioso Simpático

Los barorreceptores, por su sensibilidad a la presión, se encargan de enviar impulsos nerviosos al centro cardiovascular para ayudar a regular la presión sanguínea; cuando estos receptores perciben una disminución en la presión arterial envían con menor frecuencia impulsos nerviosos hacia el centro cardiovascular, por lo que el centro cardiovascular disminuye la estimulación parasimpática e incrementa la estimulación simpática. Las neuronas posganglionares simpáticas liberan Noradrenalina (NA) como neurotransmisor y las células cromafines de la médula suprarrenal liberan la NA como hormona (Guyton y Hall, 2016).

La NA como hormona aumenta la frecuencia de despolarización espontánea, lo que aumenta la frecuencia cardíaca, también promueve la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales lentos de  $Ca^{2+}$  regulados por voltaje, esto aumenta la contractilidad cardíaca, el incremento de la frecuencia y fuerza de la contracción

cardíaca produce que se eleve el gasto cardíaco, al aumentar el gasto cardíaco incrementa por consecuencia la presión arterial (Liu y Khalil, 2018).

Al estimularse el SNS, las neuronas posganglionares secretan NA como neurotransmisor; una vez secretada, la NA activa los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos que se encuentran en las fibras del MLV. En el MLV la activación de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos induce vasoconstricción y la activación de receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos induce vasodilatación (Tortora y Derrickson, 2013).

### Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

Cuando el volumen y la presión sanguínea se ven disminuidos, las células yuxtaglomerulares secretan renina hacia la sangre; asimismo, el SNS estimula directamente la secreción de renina mediante las células yuxtaglomerulares, una vez liberada, la renina cataliza la conversión del angiotensinógeno, una proteína sintetizada por los hepatocitos, en angiotensina I (AI), un péptido de 10 aminoácidos. Luego, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), tras la hidrólisis de dos aminoácidos más, convierte la AI en angiotensina II (AII), que es la forma activa de la hormona (Guyton y Hall, 2016).

La AII estimula la contracción del músculo liso en las arteriolas, produciendo vasoconstricción. La AII se une a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs, AT1) y activa una proteína de unión a GTP y PLC $\beta$ , que estimulan la hidrólisis de PIP $_2$  en IP $_3$  y DAG, IP $_3$  estimula la liberación de Ca $^{2+}$  de SR, mientras que DAG activa la PKC, como resultado se produce vasoconstricción y aumento en la presión arterial. (Liu y Khalil, 2018).

La AII estimula la corteza suprarrenal y esta libera aldosterona, una hormona que estimula las células principales en los túbulos colectores, para que estos reabsorban más Na $^+$  y Cl $^-$  y secreten más K $^+$ . Como consecuencia del aumento en la reabsorción de Na $^+$  y Cl $^-$ , aumenta la reabsorción de agua, esto produce un aumento de la volemia y la presión arterial. (Liu y Khalil, 2018).

### I.IV Endotelio vascular

El endotelio es mucho más que una capa o barrera interna que se interpone entre el flujo sanguíneo y la pared vascular, tiene funciones de un órgano y es la glándula endócrina más grande, está conformado por células endoteliales (CE) que tienen forma longitudinal y se encuentran orientadas en la dirección del flujo sanguíneo. Las CE tienen una función crucial para la homeostasis del sistema cardiovascular, tienen la capacidad de responder a los cambios en el flujo, el estiramiento, las diversas sustancias circulantes y los mediadores inflamatorios; para mantener la homeostasis secretan reguladores del crecimiento y sustancias vasoactivas (tabla 1) (Porth, 2010).

Tabla 1: Sustancias vasoactivas secretadas por el endotelio

Vasodilatadoras	Vasoconstrictoras
Óxido nítrico	Endotelina-1
Cininas	Liberación local de serotonina plaquetaria
Prostaciclina	Tromboxano A <sub>2</sub>

### I.IV.I Óxido nítrico

El endotelio vascular es esencial para la acción vasodilatadora de la acetilcolina (ACh), debido a que la estimulación de los receptores muscarínicos de las CE provoca la liberación del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), que es el óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado a partir de L-Arginina a L-Citrulina, en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOs), la NOs tiene 3 isoformas identificadas, la NOs-1 que se encuentra en el sistema nervioso, la NOs-2 localizada en macrófagos y otras células inmunitarias y la NOs-3 que se ubica en las células endoteliales. La NOs-1 y la NOs-3 se activan mediante agentes encargados de aumentar el Ca<sup>2+</sup> intracelular (como la ACh y la bradicinina), mientras que la NOs-2 no se activa con calcio sino con citocinas (Berne y Levy, 2018; Porth, 2010; Guyton & Hall, 2016). El NO que se formó en el endotelio se difunde a las CMLV, en donde activa la Guanilil Ciclasa soluble (GC) y produce 3,5-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), el cGMP actúa como mensajero para la relajación del MLV, dilatando los vasos sanguíneos y disminuyendo la presión sanguínea (Figura 6) (Tortora y Derrickson, 2013).

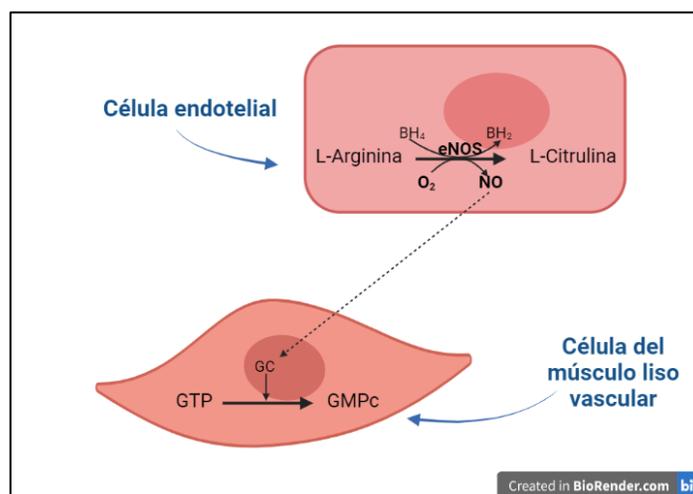


Figura 6: Producción de óxido nítrico

## II. Hipertensión arterial sistémica

De acuerdo con el PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-030-SSA2-2017, *Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica*, se define como Hipertensión Arterial Sistémica “Al padecimiento multifactorial caracterizado por la elevación sostenida de la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica o ambas  $\geq 130/90$  milímetros de mercurio”.

### II.I Clasificación de la HAS

La HAS se puede clasificar, etiológicamente, en dos tipos:

1. **Primaria:** Este tipo es el causante del 95% de los casos de HAS. Sus causas son diversas, presenta propensión hereditaria multigénica, que da origen a fenotipos hipertensivos, estos fenotipos por sí solos generalmente no causan la enfermedad y requieren de factores ambientales para su expresión clínica, los factores ambientales que contribuyen a la expresión de la enfermedad son: obesidad, ingestión excesiva de sodio, sedentarismo y consumo elevado de alcohol.
  2. **Secundaria:** Este tipo es causante del 5% restante de los casos de HA. En este caso, la HAS es parte de los signos y síntomas de una enfermedad conocida, dentro de las enfermedades que la generan podemos encontrar: renales, endocrinas, del Sistema Nervioso Central, inducidas por medicamentos, inducidas por estupefacientes y tóxicos, entre otras.
- Otra forma de clasificar la HAS es de acuerdo con los valores de PA obtenidos en consultorio (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de la HAS de acuerdo con American Heart Association

Categoría	Presión arterial sistólica (mmHg)		Presión arterial diastólica (mmHg)
Presión Arterial Normal	Menor a 120	y	Menor a 80
Presión Arterial Elevada	120 - 129	y	Menor a 80
Hipertensión Grado 1	130 - 139		80 - 89
Hipertensión Grado 2	140 o mayor	o	90 o mayor
Crisis Hipertensiva	Mayor a 180	y/o	Mayor a 120

## II.II Epidemiología

Al dar a conocer el INEGI las 10 principales causas del total de defunciones registradas en el 2019 (Tabla 3), encontramos que la principal causa de muerte son las enfermedades del corazón, con un total de 156,041 muertes registradas, de las cuales el 53.36% se presentaron en el género masculino.

Del total de muertes registradas por enfermedades del corazón, las enfermedades hipertensivas representaron el 16.2% (un total de 25 265 casos), ocupando así el 2° lugar de las enfermedades del corazón causantes de defunciones (Gráfica 1).

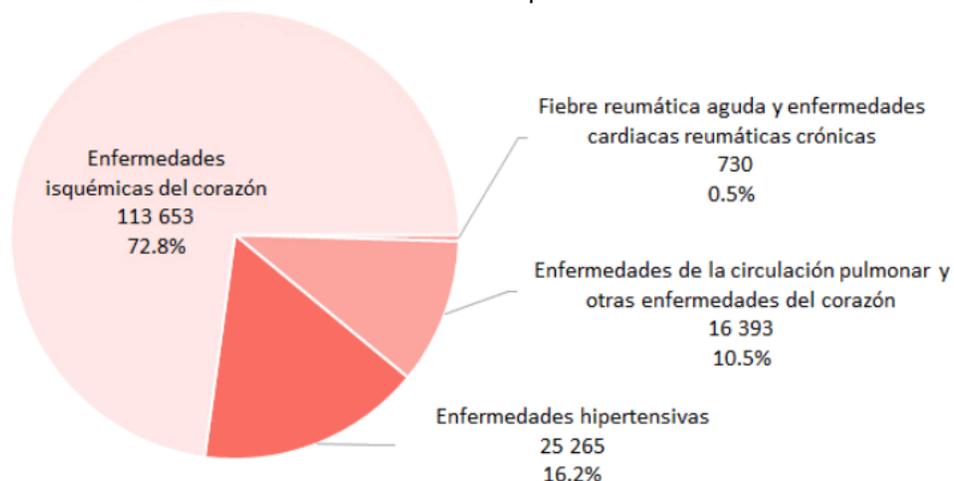
Tabla 3: Principales 10 causas de defunciones registradas en 2019

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	Enfermedades del corazón 156 041	Enfermedades del corazón 83 258	Enfermedades del corazón 72 768
2	Diabetes mellitus 104 354	Diabetes mellitus 51 711	Diabetes mellitus 52 643
3	Tumores malignos 88 680	Tumores malignos 43 296	Tumores malignos 45 384
4	Enfermedades del hígado 40 578	Agresiones (homicidios) 32 530	Enfermedades cerebrovasculares 17 659
5	Agresiones (homicidios) 36 661	Enfermedades del hígado 29 692	Influenza y neumonía 14 046
6	Enfermedades cerebrovasculares 35 303	Accidentes 25 758	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 269
7	Accidentes 33 524	Enfermedades cerebrovasculares 17 644	Enfermedades del hígado 10 879
8	Influenza y neumonía 31 081	Influenza y neumonía 17 034	Accidentes 7730
9	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 23 768	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 12 499	Insuficiencia renal 6359
10	Insuficiencia renal 14 630	Insuficiencia renal 8 271	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal 4 969

■ Enfermedades del corazón   
 ■ Diabetes mellitus   
 ■ Tumor maligno   
 ■ Otras enfermedades no transmisibles   
 ■ Accidentes   
 ■ Agresiones (homicidios)   
 ■ Enfermedades transmisibles

Fuente: INEGI. Estadística de defunciones registradas 2019. *Diez principales causas de muerte por sexo*

Gráfica 1: Defunciones causadas por enfermedades del corazón.



Fuente: INEGI. Estadística de defunciones registradas 2019. *Defunciones por enfermedades de corazón.*

### II.III Terapéutica de la Hipertensión Arterial

El tratamiento de la HAS tiene como finalidad evitar que la enfermedad avance, prevenir las complicaciones agudas y crónicas que esta pudiera provocar, mejorar la calidad de vida del paciente y reducir la mortalidad. Los tratamientos que se sugieren hasta el momento son:

- 1) Tratamiento no farmacológico: Consiste en realizar cambios positivos en el estilo de vida, entre los que destacan la pérdida de peso corporal, limitar el consumo de bebidas alcohólicas, ejercitarse al menos 3 veces por semana durante 30 minutos, reducir la ingesta de sodio, evitar el consumo de tabaco y controlar el estrés (Porth, 2010).
- 2) Tratamiento farmacológico: Existen 6 principales grupos de fármacos clasificados de acuerdo con su mecanismo de acción: 1. Diuréticos, disminuyen el volumen de sangre al favorecer la eliminación de agua y sal por medio de la orina. 2. Inhibidores de la ECA, bloquean la formación de angiotensina II. 3. Betabloqueantes, inhiben la secreción de renina y disminuyen la frecuencia cardíaca y la contractilidad. 4. Bloqueantes de los canales de calcio, enlentecen la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células musculares lisas vasculares. 5. Antagonistas de receptores de AII, bloquean los receptores de AII impidiendo así que esta tenga actividad. 6. Alfa bloqueadores, actúan como antagonistas de los receptores  $\alpha$  permitiendo así la relajación del MLV (Flórez et al., 2014).

### III. *Achillea millefolium*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Achillea*

Especie: *A. millefolium*

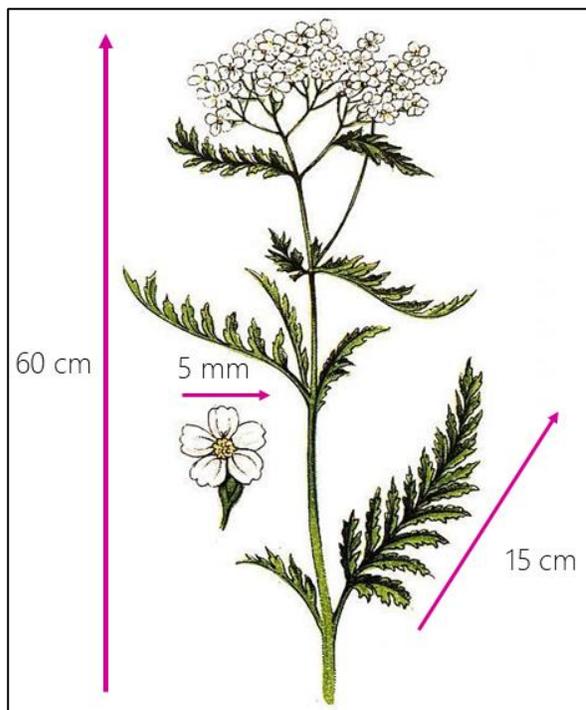


Figura 7: *Achillea millefolium*

#### III.I Nombres comunes

- Mil hojas
- Mil flores
- Milenrama / Mil en rama
- Milefolio
- Ciento en rama
- Alcanfor
- Meona
- Yarrow (inglés)
- Artemisa bastarda
- Flor de la pluma
- Hierba de las heridas
- Hierba de los soldados
- Hierba de Aquiles
- Hierba de los carpinteros

#### III.II Botánica

Es una hierba perenne ramificada de larga vida y fuertemente aromática, típicamente de 30 a 60 cm de largo, sus hojas son pecioladas y pueden llegar hasta los 15 cm de largo, las flores están en inflorescencia de copa plana (lo que parece ser una sola flor pequeña de unos 5 mm de ancho, es en realidad una cabeza de flor), las flores generalmente son de color blanco, aunque también se pueden encontrar en rosa, magenta y ocasionalmente en rojo (Lim, 2014; Small y Catling, 2000).

#### III.III Origen y Agroecología

El nombre *Achillea* hace referencia al legendario héroe griego de la guerra de Troya, de acuerdo con *La Iliada* de Homero, Aquiles utilizó el follaje de la planta para detener las hemorragias de sus compañeros soldados. El nombre *millefolium* se refiere a la división que presentan sus hojas en muchos folíolos.

Es una planta autóctona de las zonas templadas y alpinas de Eurasia, se puede encontrar en las zonas templadas y boreales del norte de América. Crece en lugares con clima frío, pero ocasionalmente también crece en las partes más frías y altas de regiones subtropicales, en suelos ácidos a alcalinos, y en sol total a media sombra. Tolerante a heladas y sequías (Lim, 2014; Small y Catling, 2000).

### III.IV Usos etnomédicos

Es conocida por su capacidad de curar heridas y detener el sangrado; sin embargo, dentro de la medicina tradicional se utiliza para el tratamiento de: la fiebre, el resfriado común, la diarrea, la inflamación, la disentería y la hipertensión, también se utiliza como cura para el dolor de muelas, el dolor de oído y enfermedades de los pulmones, la vejiga y los riñones. Las preparaciones más comunes para sus usos internos son: infusiones, decocciones y jugos frescos. Mientras que para sus usos externos son: lociones, ungüentos y cataplasma (Lim, 2014; Small y Catling, 2000).

### III.V Fitoquímica

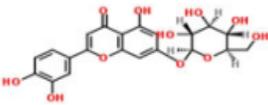
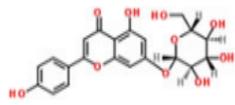
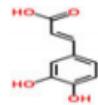
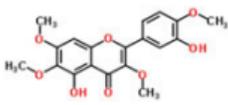
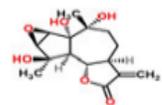
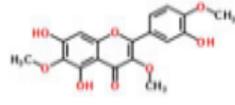
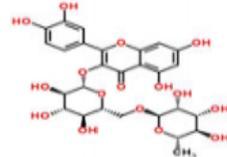
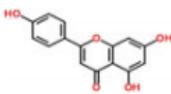
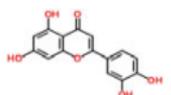
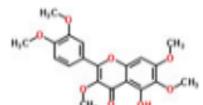
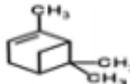
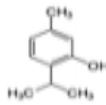
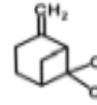
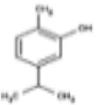
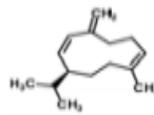
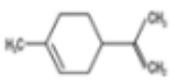
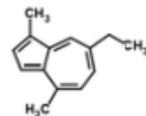
La destilación de un aceite azul volátil por Hoffman (1719) marca el comienzo del análisis químico de *Achillea millefolium*; desde entonces, se han realizado diversas investigaciones de la planta con la finalidad de conocer sus componentes químicos. En la tabla 4 se enlistan los compuestos que se han aislado de *A. millefolium* (Chandler et. al, 1982); en la tabla 5 se muestran las estructuras y fórmulas moleculares de los principales compuestos.

Tabla 4: Compuestos reportados que se encuentran en *A. millefolium*

Aceites volátiles	Lactonas sesquiterpénicas	Carbohidratos
Allo-ocimene	8-Acetoxyartabsin	Alditols
Allo-ocimene isomer	Acetylbanchanolid	Cyclitols (Viburnitol)
Azulene	Achillicin	Saccharides
Borneol	Achillin	<b>Alcaloides y otras bases</b>
Bornyl acetate	8-Anelooxyartabsin	Achiceine
Butyric acid	Austricin (Deacetylmatricarin)	Achilletin
$\Delta$ -Cadinene	Balchanolid	Betain (Glycine betaine, Glycocollbetaine)
Camphene	2,3-Dihydrodeacetyoxymatricin	Betonicine (Achilleine)
Camphor	Hydroxyachillin	Choline
Carophyllene	Leucodin (Leukodin,	Homostachydrine

	Desacetoxymatricarin)	
Chamazulene	Millefin	Moschatine (Moscatine)
Chamazulene carboxylic acid	Millefolide	Stachydrine
1,8-Cineole	Proazulenes	Trigonelline
Copaene	8-Acetoxyartabsin	<b>Diversos</b>
Cuminic aldehyde	<b>Flavonoides</b>	Aldehydes
p-Cymene	Apigenin	Bitter principle (Ivain)
Eugenol	Apigenin glycosides	Carotenoids
Farnesene	Artemetin	Coumarins
Furfural	Casticin	Cyanogenic compound
Furfuryl-alcohol	5-Hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone	Fatty alcohols
Humulene	Isorhamnetin	Hydrocarbons
Isoartemia ketone	Luteolin	Minerals
Isobutyl acetate	Luteolin glycosides	Polyacetylenes
Isovaleric acid	Quercetin glycoside	Polyamines
Limonene	Rutin (Quercetin rhamnoglucoside)	Proteins
Menthol	<b>Ácidos</b>	Protein-Carbohydrate complex
Myrcene	Amino	Resins
α-Pinene	Grasos	Tannins
β-Pinene	Aconitic (Acabelleic)	Thiophene amides
Sabinene	Ascorbic	
Salicylic acid	Caffeic	
α-Terpinene	Folic	
γ-Terpinene	Salicylic	
Terpinen-4-ol	Succinic	
Terpinolene		
α-Thujone		
Tricyclen		

Tabla 5: Características de los principales compuestos de *Achillea millefolium* (Ali et al., 2017)

Compuesto	Estructura 2D	Compuesto	Estructura 2D
Cynaroside C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		Camphene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
Cosmosiin C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>		Caffeic acid C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
Casticin C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>		Achillinin A C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	
Centaureidin C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>		Rutin C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	
Apigenin C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>		1,8- cineole C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	
Luteolin C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>		Bisabolol C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	
Artemetin C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>		α- pinene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
Thymol C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O		β- pinene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
Carvacrol C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O		Germacrene D C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
Limonene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		Camazulene C <sub>14</sub> H <sub>16</sub>	

### III.VI Efectos terapéuticos descritos

#### Efecto vasoprotector

Los resultados obtenidos por Dall'Acqua et al. (2011), sugieren que el extracto metanólico de las partes aéreas de *Achillea millefolium* tiene un efecto vasoprotector contra la inflamación vascular, al mejorar las células primarias del músculo liso de rata (Dall'Acqua et al., 2011; Lim, 2014).

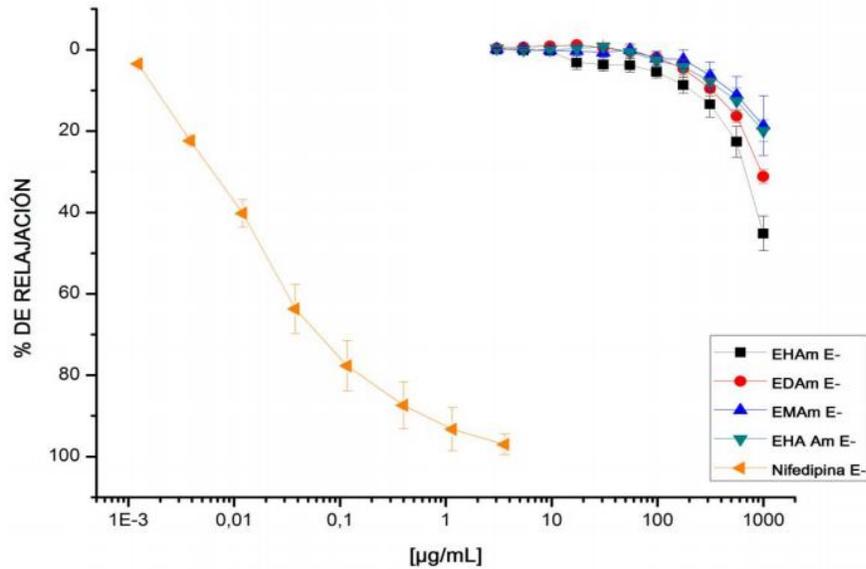
#### Efecto hipotensivo y actividad vasodilatadora

De Souza et al. (2011) reportaron que las fracciones del extracto hidroetanol y diclorometánico de *Achillea millefolium* disminuyeron significativamente la presión arterial media en ratas normotensas; además, encontraron que las fracciones del diclorometánico contenían altas cantidades de artemetina, esta redujo la actividad de la ECA en plasma y vascular *in vitro* (Lim, 2014).

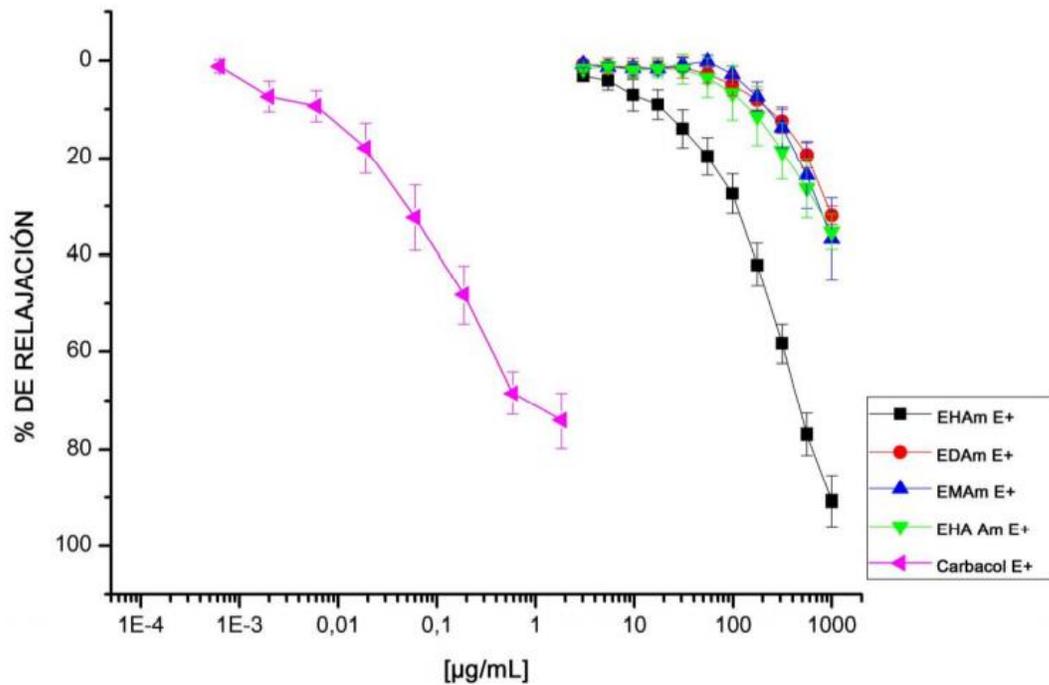
Khan y Gilani (2011) describieron los efectos del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas secas de *Achillea millefolium* en la presión arterial de ratas normotensas, en aurículas de cobayo y en aorta de conejo; los resultados obtenidos mostraron que el extracto causó una caída dependiente de la dosis en la presión arterial media, en la aurícula mostró efecto inhibitorio, dependiente de la concentración, en fuerza y tasa de contracciones espontáneas (efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos), en la aorta tuvo efectos relajantes en las contracciones inducidas por alto K<sup>+</sup>.

Arias-Durán (2015) determinó el efecto vasorelajante de los extractos diclorometánico (ED), metanólico (EM), Hexánico (EH) e hidroalcohólico (EHA) del material vegetal íntegro de *A. millefolium*, este efecto se demostró en un modelo *ex vivo* en aorta aislada de rata, y es parcialmente dependiente de endotelio. Los extractos son menos eficaces y potentes que el control positivo nifedipina, en ausencia de endotelio ( $E_{max}$   $97 \pm 2.48$  % y  $Cl_{50}$  de  $0.01 \pm 3.37$   $\mu\text{g/mL}$ ) y de carbacol en presencia de endotelio ( $E_{max}$  de  $74.06 \pm 5.70$ % y una  $Cl_{50}$  de  $0.08 \pm 0.11$   $\mu\text{g/mL}$ ). El extracto con mayor efecto fue el  $EH_{Am}$ , es dependiente de la concentración y parcialmente del endotelio con  $E_{max}$  de  $90.4 \pm 5.3$  % y  $Cl_{50}$  de  $205.3 \pm 4.4$   $\mu\text{g/mL}$  con endotelio, y  $E_{max}$   $45.2 \pm 4.3$  % y  $Cl_{50}$  de  $549.1 \pm 3.8$   $\mu\text{g/mL}$  sin endotelio, comparado con los controles positivos, carbacol y nifedipina. Los resultados se muestran en las gráficas 2 y 3 (Arias-Durán, 2015).

Gráfica 2: Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos e hidroalcohólico de *Achillea millefolium* en anillos de aorta aislada de rata precontractados con NA en ausencia de endotelio.



Gráfica 3: Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos e hidroalcohólico de *Achillea millefolium* en anillos de aorta aisladas de rata precontractados con NA en presencia de endotelio.





# JUSTIFICACIÓN

## JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que la prevalencia de hipertensión arterial va en aumento y la edad promedio de personas que padecen la enfermedad va en descenso, resulta de gran importancia buscar nuevas alternativas terapéuticas que generen respuestas farmacológicas, mediante su acción en diferentes vías de señalización, que sean mejor aceptadas y mayormente atendidas por los pacientes con hipertensión.

En el caso particular de México, la medicina tradicional basada en el uso de plantas medicinales tiene una gran impacto e importancia, puesto que las generaciones de mayor edad, que son las que comúnmente padecen la enfermedad, confían ampliamente en ella y suelen tener una mejor adherencia al tratamiento, pues tienden a asociar el origen natural de los tratamientos con el bienestar, y generalmente externan renuencia a los tratamientos de la medicina alópata. Por otro lado, el criterio de selección etnomédico, para el estudio químico y farmacológico de plantas medicinales, tiene un papel central en la obtención y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Por las razones antes expuestas, se tomó la decisión de estudiar las flores de la planta silvestre *Achillea millefolium*, a la cual se le atribuyen diferentes propiedades medicinales, destacando, para interés del presente proyecto, el control de la hipertensión; además, hay estudios previos que demuestran la actividad vasorrelajante del material vegetal íntegro.

Adicional a esto, *Achillea millefolium* es una planta abundante en la región norte de Morelos, su ubicación geográfica resulta ventajosa debido a la cercanía a nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, siendo su recolección fácil y económica.



# HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

El extracto diclorometánico de las flores de *Achillea millefolium* (ED<sub>AmF</sub>) producirá vasorrelajación por su interacción con el endotelio vascular, por lo que mostrará un efecto antihipertensivo significativo.



# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo de acción vasorrelajante funcional del extracto diclorometánico obtenido de las flores de *Achillea millefolium*, así como el efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto vasorrelajante del ED<sub>AmF</sub> en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata con y sin endotelio
- Valorar el mecanismo de acción del efecto vasorrelajante producido por el ED<sub>AmF</sub> en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata
- Determinar el efecto antihipertensivo del ED<sub>AmF</sub> en un modelo *in vivo* de ratas espontáneamente hipertensas (SHR)



# METODOLOGÍA

## METODOLOGÍA

### 1. Identificación y recolección del material vegetal

La recolección de la planta silvestre y medicinal *Achillea millefolium* estuvo a cargo del grupo de investigación del laboratorio 10, de la Facultad de Farmacia, bajo la dirección del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto. La identificación taxonómica la hizo la Dra. Irene Perea Arango del Centro de Investigaciones en Biotecnología (CEIB) de la UAEM. Posteriormente la planta se sometió a un proceso de limpieza y desecado a temperatura ambiente y en sombra; una vez seca, de la planta se separaron las diferentes partes que la conforman y se molió únicamente la flor.

### 2. Obtención de los extractos

Se tomaron 200 g del material previamente seco y molido, se sometió a maceración exhaustiva con disolventes, en orden creciente de polaridad (hexano y diclorometano) durante 72 horas, por triplicado. Los extractos obtenidos de las maceraciones se llevaron a sequedad a presión reducida usando el rotavapor BUCHI®.

### 3. Evaluaciones farmacológicas en modelos *ex vivo*

#### ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con 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 Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### REACTIVOS

Para este proyecto se emplearon los siguientes reactivos: Cloruro de Carbacol, Bitartrato de Noradrenalina (NA), Nitro-Arginina-Metil-Éster (L-NAME), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4, 3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), Indometacina y los extractos obtenidos bajo la metodología descrita.

## OBTENCIÓN DE LA AORTA TORÁCICA DE RATA

Los animales fueron sacrificados en una cámara con éter etílico, posteriormente se hizo disección abdominal para extraer la aorta torácica, después de ser extraída se limpió con cuidado para remover el tejido conectivo, luego se cortó en segmentos de 4-5 mm de longitud (Figura 8). Para los segmentos de aorta que se emplearon libres de endotelio, este se removió mecánicamente.

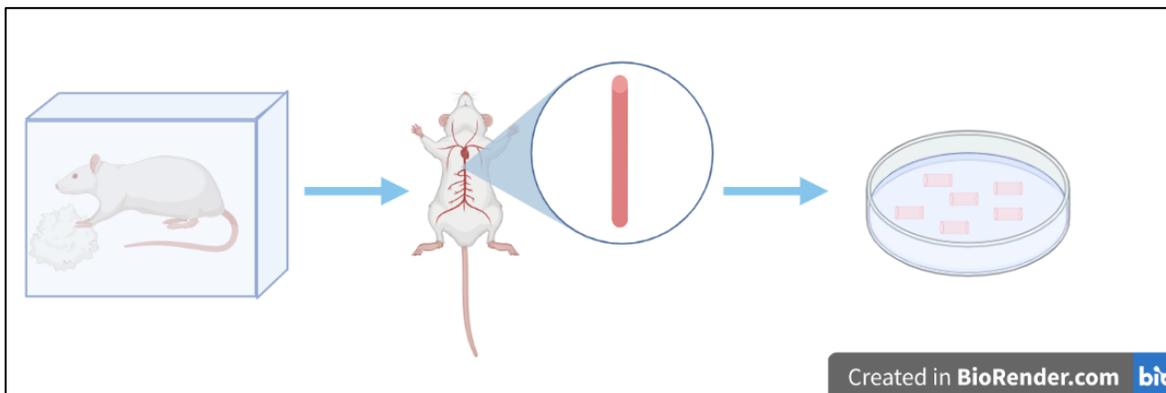


Figura 8: Extracción de la aorta torácica de rata

### 3.1 Efecto vasorrelajante

Los segmentos de aorta, con y sin endotelio, se colocaron en 10 mL de solución de Ringer-Krebs (Anexos), a pH 7.4, con burbujeo constante de una mezcla gaseosa  $O_2/CO_2$  (95:5%), a temperatura de  $37^\circ C$  y con un baño recirculador. Cada uno de los anillos se colocó en la cámara de incubación, con ayuda de un gancho, un lado del anillo de aorta se unió al extremo de la cámara y el otro lado se unió a un transductor de fuerza isométrico, modelo Grass FT03 que emite los registros y envía la información a un polígrafo BIOPAC®.

Una vez colocados los anillos en la cámara de incubación, se sometieron a una tensión basal de 3 gramos de fuerza y se dejó un período de estabilización de 30 minutos. Posteriormente, el tejido se sensibilizó durante 15 minutos con NA  $0.1 \mu M$  a intervalos de 30 minutos (por triplicado). Después de cada estimulación se lavó el tejido con solución de Ringer-Krebs, para recuperar el valor basal de la tensión. Se verificó la presencia de endotelio por adición de carbacol  $1 \mu M$  en la tercera contracción, antes del último lavado (el carbacol es un agonista muscarínico que activa al receptor de acetilcolina en el músculo). El tejido sensibilizado (con y sin endotelio) fue contraído una última vez con NA  $0.1 \mu M$ , y una vez contraído, el tejido fue puesto en contacto con las diferentes concentraciones del extracto diclorometánico de flor de *Achillea millefolium* ( $ED_{AmF}$ ), de manera acumulativa [3 a  $1000 \mu g/mL$ ] en  $\frac{1}{4}$  de logaritmo, las muestras se fueron adicionando en intervalos de 3 minutos, el procedimiento se

ilustra en la figura 9. Posteriormente, se construyeron las curvas concentración-respuesta a partir de los registros.

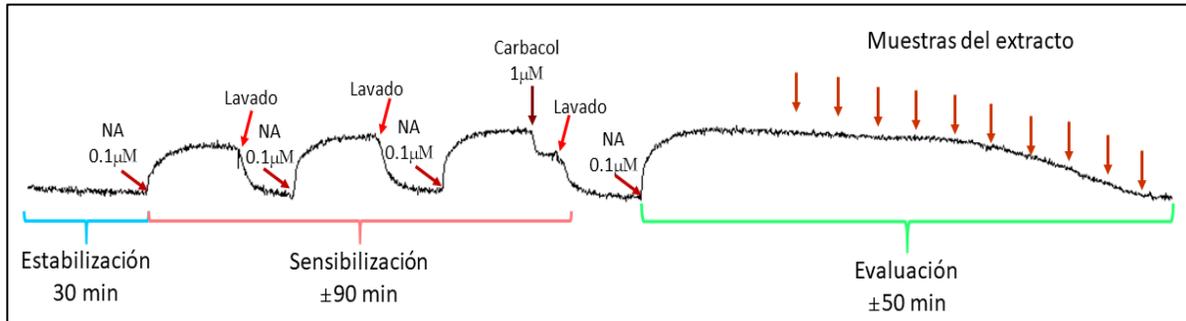


Figura 9: Evaluación del efecto vasorelajante del EDAmF en anillos de aorta de rata

### 3.2 Mecanismo de acción dependiente de endotelio

La metodología es muy similar a la descrita en el numeral 3.1, con la diferencia de que después de la sensibilización, los anillos de aorta se incubaron 15 minutos con un inhibidor enzimático de las vías de señalización del endotelio, en total se usaron 3 inhibidores, el primero fue el N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor inespecífico de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), el segundo fue el 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), un inhibidor de la enzima Guanilil Ciclasa soluble, y el tercero fue la Indometacina, un inhibidor de la enzima Ciclooxygenasa 1 (COX-1), una vez transcurrido el tiempo de incubación, se hizo una última contracción con NA 0.1 μM para, posteriormente, adicionar las diferentes concentraciones del ED<sub>AmF</sub> de manera acumulativa [3 a 1000 μg/mL] en 1/4 de logaritmo (Figura 10). Con los datos obtenidos se construyeron curvas concentración-respuesta.

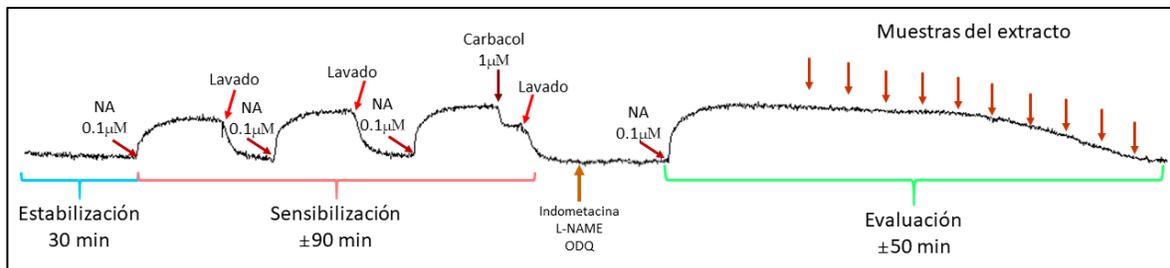


Figura 10: Determinación del mecanismo de acción del ED<sub>AmF</sub> dependiente de endotelio

### 3.3 Mecanismo de acción por receptores $\alpha$ 1-adrenérgicos

Con este ensayo se pretende determinar si el extracto actúa como agonista competitivo o no competitivo sobre los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Arias-Durán, 2015), para esto, se utilizaron anillos de aorta sin endotelio. La metodología para estabilizar y sensibilizar el tejido se describió en el numeral 3.1; para la evaluación se agregaron diferentes concentraciones de NA de forma acumulativa [0.1  $\mu$ M] en intervalos de 3 minutos, tras alcanzar la contracción máxima se lavó el tejido y se esperó hasta su regreso al valor basal. Posteriormente se incubaron 199.35  $\mu$ g/mL del ED<sub>AmF</sub> durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se agregaron nuevamente las diferentes concentraciones de NA de forma acumulativa en intervalos de 3 minutos, el procedimiento se ilustra en la figura 11. Con los registros obtenidos se construyeron curvas concentración-respuesta.

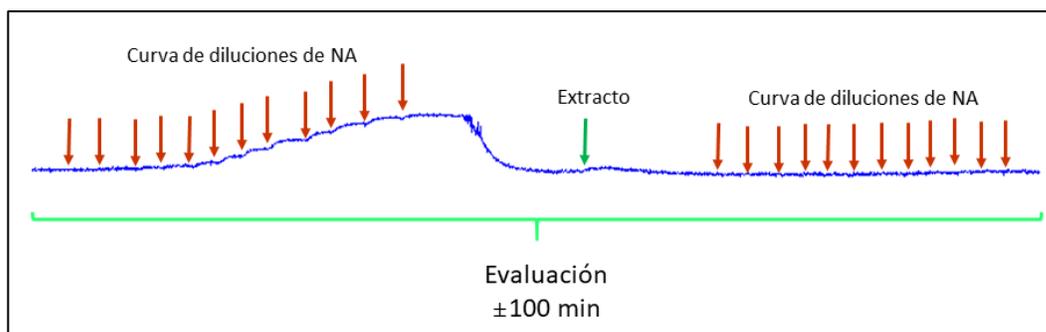


Figura 11: Determinación del mecanismo de acción del ED<sub>AmF</sub> por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos

### 3.4 Mecanismo de acción por despolarización de la membrana con KCl 80mM

La finalidad de este ensayo es determinar si el extracto tiene actividad vasorrelajante que influya en la hiperpolarización de la membrana y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para el ensayo se retiró el endotelio de los anillos aórticos, se estabilizaron y sensibilizaron (numeral 3.1). Para la evaluación se sustituyó la solución de Ringer-Krebs por una solución de KCl 80mM, esto generó una cuarta contracción, una vez que el tejido alcanzó la contracción máxima se adiciona el ED<sub>AmF</sub> a diferentes concentraciones, de manera acumulativa [3 a 1000  $\mu$ g/mL] en  $\frac{1}{4}$  de logaritmo (Figura 12). Posteriormente, se construyeron curvas concentración-respuesta con los registros obtenidos.

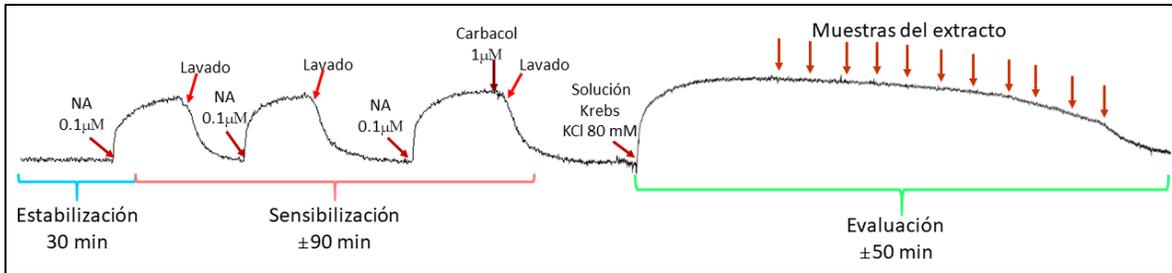


Figura 12: Mecanismo de acción sobre la hiperpolarización de la membrana y movilización de  $\text{Ca}^{2+}$

### 3.5 Mecanismo de acción por canales de $\text{Ca}^{2+}$

En este ensayo se pretende determinar si el efecto vasorrelajante es por impedimento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de las células del músculo liso. Durante el ensayo, los anillos aórticos se estabilizaron y sensibilizaron (numeral 3.1), para la evaluación se hizo un lavado constante de los anillos con solución Ringer-Krebs KCl 80mM libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , una vez que los tejidos regresaron al valor basal de reposo, se agregaron diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de forma acumulativa (80 μM a 27 mM), en intervalos de 3 minutos, tras alcanzar la contracción máxima se lavó el tejido nuevamente con solución Ringer-Krebs KCl 80mM libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y se esperó hasta que el tejido regresara a su valor basal; posteriormente se incubaron 317.69 μg/mL del  $\text{ED}_{\text{AmF}}$  durante 15 minutos, transcurrido el tiempo, se agregaron nuevamente las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de forma acumulativa, en intervalos de 3 minutos, el procedimiento se ilustra en la figura 13. Con los registros obtenidos se construyeron curvas concentración-respuesta.

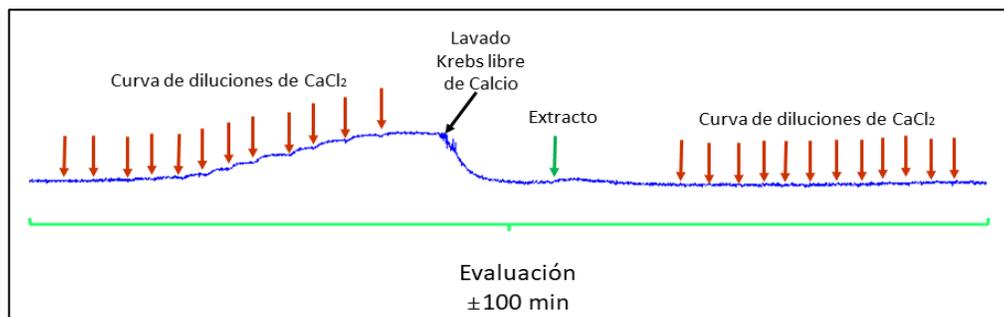


Figura 13: Mecanismo de acción por impedimento en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$

## 4. Determinación del efecto antihipertensivo

### ANIMALES

Se utilizaron ratas macho adultas de una cepa de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), con 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 Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### 4.1 Evaluación del efecto antihipertensivo del ED<sub>AmF</sub> en un modelo agudo no invasivo

Se utilizó un grupo de 5 animales, a los cuales se les administró 100 mg/kg vía intragástrica, utilizando un Pletismógrafo LE5007, Harvard Apparatus provisto del programa Chart V 4.2 de Powerlab ADInstruments, se midió la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca. Por cada animal se hicieron un mínimo de 8 lecturas antes de la administración (hora 0) y a las horas 1, 3, 5 y 7 posterior a la administración, el procedimiento se ilustra en la figura 14.

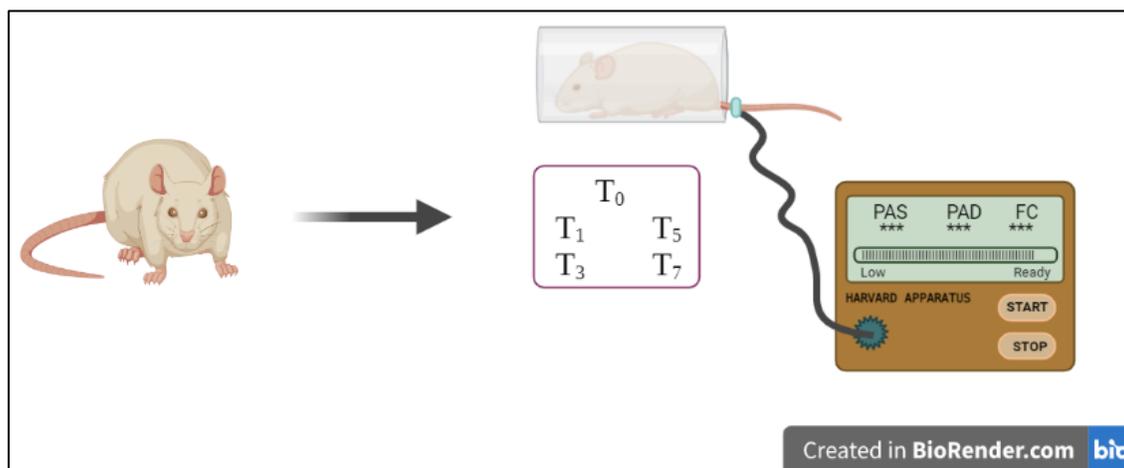


Figura 14: Determinación del efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo* en roedores de la cepa SHR.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Obtención de los extractos

Se obtuvo un extracto diclorometánico de cada maceración de flor de *Achillea millefolium* y se emplearon placas de cromatografía en capa fina, la fase móvil estaba compuesta por Hexano:Acetato de etilo (65:35), las placas fueron reveladas utilizando una lámpara de luz UV (onda corta y onda larga), esto para confirmar que los 3 extractos no presentaban diferencias en su composición (Figura 11), debido a que contenían, aparentemente, los mismos compuestos, se juntaron los 3 extractos obtenidos de las maceraciones en un mismo matraz, el peso y rendimiento del extracto total se muestra en la tabla 6.



Tabla 6: Peso y rendimiento del extracto diclorometánico obtenido de la flor de *Achillea millefolium*

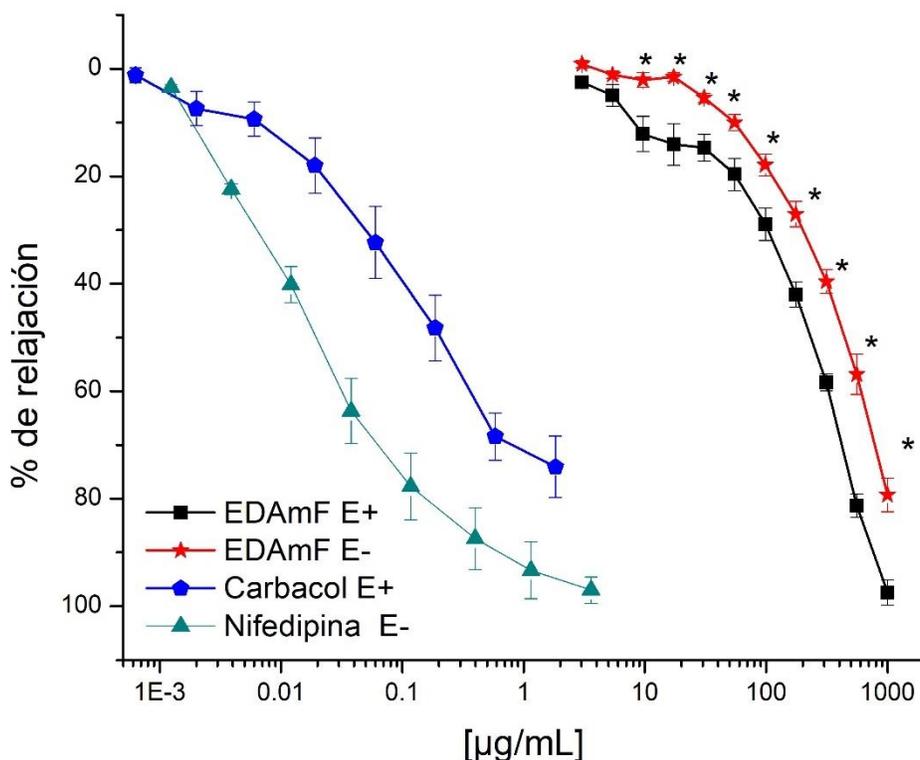
Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Diclorometánico	15.1	3.109

Figura 15: Cromatografía en capa fina de los extractos.

## 2. Evaluaciones farmacológicas

### 2.1 Efecto vasorrelajante

De acuerdo con lo mostrado en la gráfica 4, la respuesta vasorrelajante generada por el ED<sub>AmF</sub> es dependiente de la concentración y parcialmente dependiente de la presencia de endotelio, con diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), el extracto es más eficaz, pero menos potente, que el control positivo (carbacol) en presencia de endotelio; sin embargo, es menos potente y eficaz que el control positivo (nifedipina) en ausencia de endotelio.

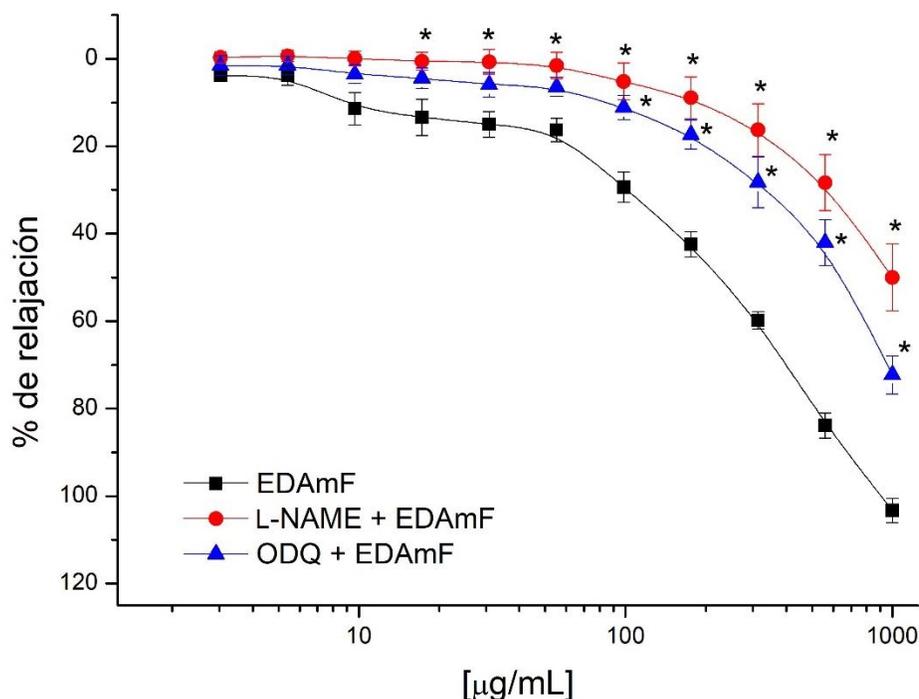


Gráfica 4: Efecto vasorrelajante del ED<sub>AmF</sub>, evaluación realizada en un modelo *ex vivo* de aorta de rata con un  $E_{max} = 97.45\% \pm 2.35$ ;  $CE_{50} = 199.35 \mu\text{g/mL}$  en presencia de endotelio vascular y un  $E_{max} = 79.3\% \pm 3.12$ ;  $CE_{50} = 317.69 \mu\text{g/mL}$  en ausencia de endotelio.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se sugiere que el ED<sub>AmF</sub> ejerce su efecto vasorrelajante por liberar factores de relajación del endotelio vascular; asimismo, a través de vías de señalización del músculo liso vascular (Hernández-Abreu et al., 2009).

## 2.2 Mecanismo de acción dependiente de endotelio

Con el fin de observar si las células endoteliales participan en el efecto vasorrelajante del ED<sub>AmF</sub>, se utilizaron dos inhibidores; en la gráfica 5 se observa que la eficacia del extracto disminuyó L-NAME u ODQ, inhibidores de la enzima Óxido Nítrico Sintasa y de la enzima Guanilil Ciclasa soluble, respectivamente, además la curva concentración-respuesta se desplazó hacia la derecha con respecto al control. El efecto vasorrelajante del ED<sub>AmF</sub> indica que también disminuyó la potencia con respecto a la curva control.



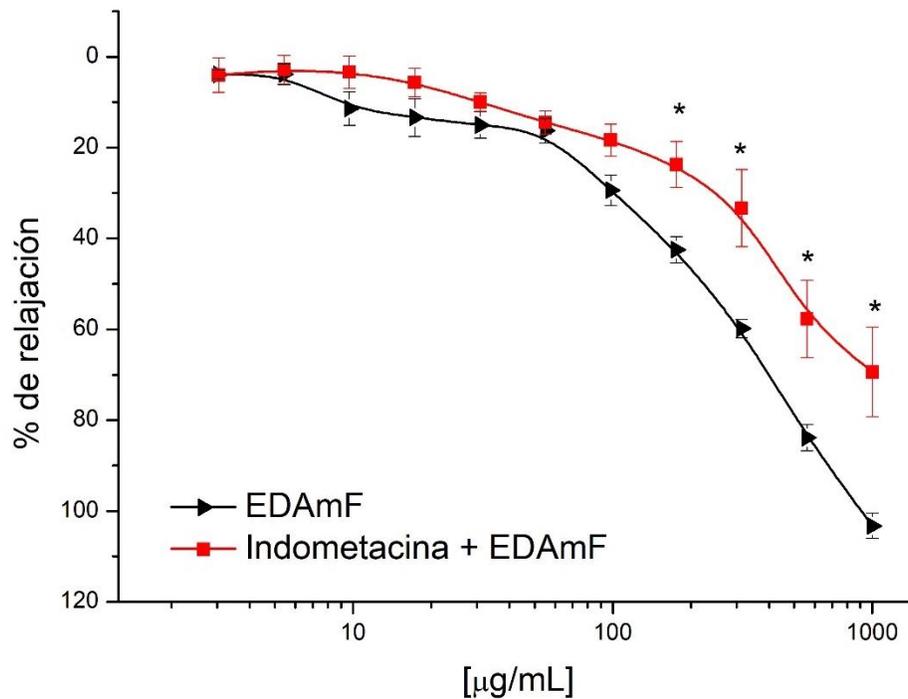
Gráfica 5: Efecto vasorrelajante inducido por el ED<sub>AmF</sub> en presencia de ODQ ( $E_{max}= 72.29\% \pm 4.32$ ) y L-NAME ( $E_{max}= 49.99\% \pm 7.66$ ) en un modelo *ex vivo* de aorta de rata.

Los resultados de las evaluaciones con L-NAME y ODQ indicaron que en el mecanismo ejercido por el ED<sub>AmF</sub> participa la vía NO/GMP<sub>c</sub> para la relajación del músculo liso de aorta, debido a que ante la carencia de óxido nítrico por inhibición de las enzimas NOs y GC, la vasorrelajación por el ED<sub>AmF</sub> se ve parcialmente bloqueada, de esta forma se podría considerar que los compuestos presentes en el extracto pueden activar las enzimas NOs y GC para la síntesis de NO y GMP<sub>c</sub>, respectivamente (Duboscq, 2017).

La incubación del tejido con Indometacina (inhibidor selectivo de la COX-1) mostró vasorrelajación dependiente de la concentración y menor potencia del ED<sub>AmF</sub>, tal como se muestra en la gráfica 6.

De los fosfolípidos membranales de las células endoteliales se libera ácido araquidónico, por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, una vez liberado, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) cataliza la inserción de O<sub>2</sub> en varias posiciones. A partir de los metabolitos del ácido araquidónico, en las células endoteliales se produce prostaglandina (PGI<sub>2</sub>) y actúa sobre las células del músculo liso vía el receptor a prostaciclina (IP), lo que conduce al aumento en la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), segundo mensajero que provoca relajación muscular al bajar la concentración de calcio intracelular (Berne y Levy, 2018).

A partir de este hecho, se sugiere que el ED<sub>AmF</sub> podría ejercer su efecto por activación de la COX-1, que lleva a la liberación de PGI<sub>2</sub> para aumentar la concentración de AMPc.



Gráfica 6: Efecto vasorrelajante inducido por el ED<sub>AmF</sub> en presencia de Indometacina ( $E_{max} = 69.39\% \pm 9.82$ ) en un modelo *ex vivo* de aorta de rata.

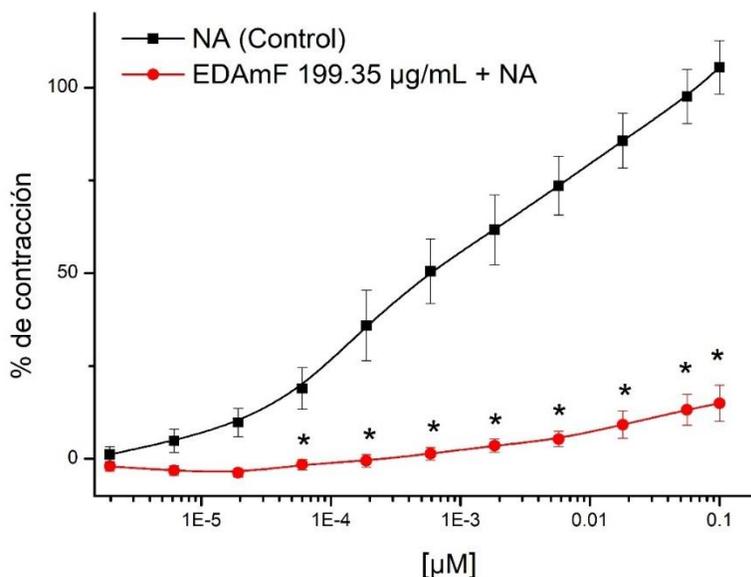
Tabla 7: Efecto vasorrelajante máximo del ED en presencia de diferentes inhibidores

Evaluación	E <sub>max</sub> (%)
EDAmF (control positivo)	97.45% ± 2.35
EDAmF + L-NAME	49.99% ± 7.66
EDAmF + ODQ	72.29% ± 4.32
EDAmF + Indometacina	69.39% ± 9.82

### 2.3 Mecanismo de acción por receptores $\alpha$ 1-adrenérgicos

En comparación con la curva control de contracción con Noradrenalina, la curva del ED<sub>AmF</sub> en su CE<sub>50</sub> tuvo disminución significativa de la potencia y del efecto máximo de contracción (E<sub>max</sub>= 14.98 % ± 4.89).

De acuerdo con los resultados en la gráfica 7, el ED<sub>AmF</sub> tiene componentes que podrían ser antagonistas no competitivos, por su unión en un sitio alostérico de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos o por antagonismo funcional, que consiste en ejercer una interacción en la cadena de señalización posterior a la unión del agonista con el receptor (Liu y Khalil, 2018).



Gráfica 7: Efecto vasoconstrictor de la NA en presencia del ED<sub>AmF</sub> en su CE<sub>50</sub>= 199.35 µg/mL (E<sub>max</sub>= 14.98% ± 4.89) en un modelo *ex vivo* de aorta de rata.

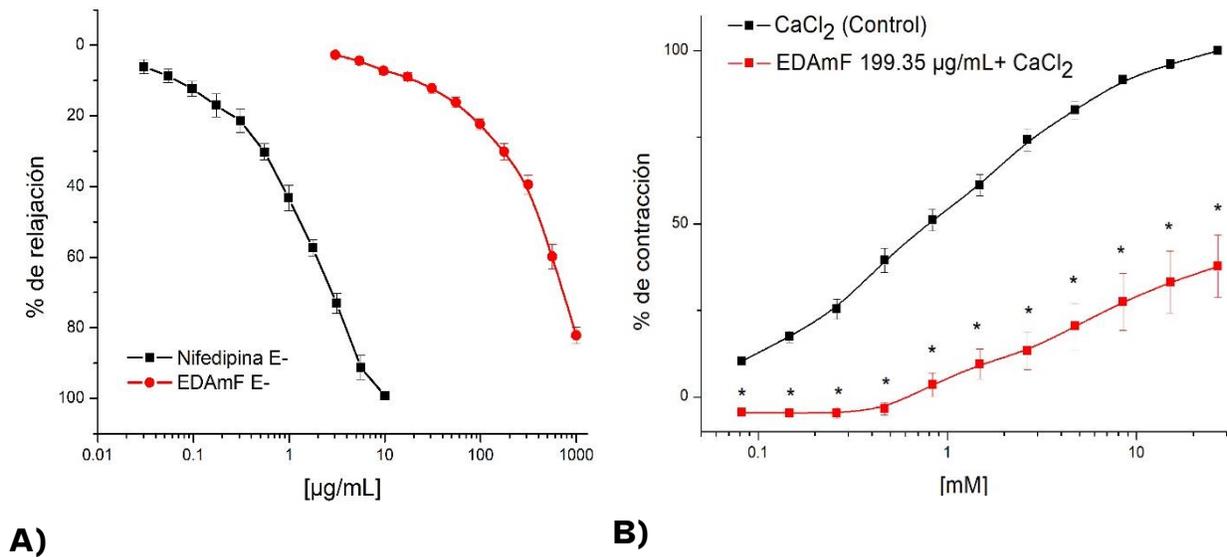
## 2.4 Mecanismo de acción por despolarización de la membrana con KCl 80mM y participación de los canales de Ca<sup>2+</sup>

El efecto relajante del MLV es mediado por diferentes mecanismos, como son: disminución de la movilización de Ca<sup>2+</sup> por inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> en la membrana celular; bloqueo en la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los reservorios intracelulares y la apertura de canales de K<sup>+</sup> (Liu y Khalil, 2018).

Cuando la concentración extracelular de K<sup>+</sup> se incrementa (KCl 80 mM), los canales de K<sup>+</sup> se inactivan, esto despolariza la membrana que permite la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, siendo el Ca<sup>2+</sup> incorporado al interior de la célula debido al ambiente electronegativo que allí predomina, el aumento de flujo de Ca<sup>2+</sup> al interior de las CMLV induce a la vasoconstricción. En cambio, la hiperpolarización de la membrana causa el cierre de los canales Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, la carencia de Ca<sup>2+</sup> en el interior de la célula origina la vasorrelajación (Liu y Khalil, 2018; Aiello, 2013)

Tomando en cuenta esa breve explicación, los resultados en la gráfica 8A demuestran que, ante la contracción inducida por un exceso de K<sup>+</sup> extracelular, el ED<sub>AmF</sub> contiene compuestos que disminuyen la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, y, por ende, relajan los anillos de aorta de rata. Es importante mencionar que de los canales de calcio dependientes de voltaje, en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos (ICaT e ICaL), la función del tipo L (receptores a dihidropiridinas) es el que parece predominar, pues se necesita el *influj*o de *Ca<sup>2+</sup> a través de canales ICaL para generar la contracción arterial in vitro* y es determinante para conservar la presión arterial *in vivo* (Aiello, 2013).

Con la finalidad de determinar la participación del ED<sub>AmF</sub> en el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup>, se construyó una curva de contracción inducida por Ca<sup>2+</sup>. En la gráfica 8B se observa que el ED<sub>AmF</sub> bloqueó de manera parcial la contracción inducida por CaCl<sub>2</sub>, esto sugiere que el flujo de Ca<sup>2+</sup> hacia el interior de las CMLV se ve bloqueado por el extracto.



Gráfica 8: A) Efecto vasorrelajante del ED<sub>AmF</sub> en la contracción inducida por KCl 80mM (E<sub>max</sub>= 82.14% ± 2.34) y B) Efecto inhibitorio del ED<sub>AmF</sub> en la contracción generada por CaCl<sub>2</sub> (E<sub>max</sub>= 37.73 ± 8.99) en un modelo *ex vivo* de aorta de rata.

### 3. Determinación del efecto antihipertensivo

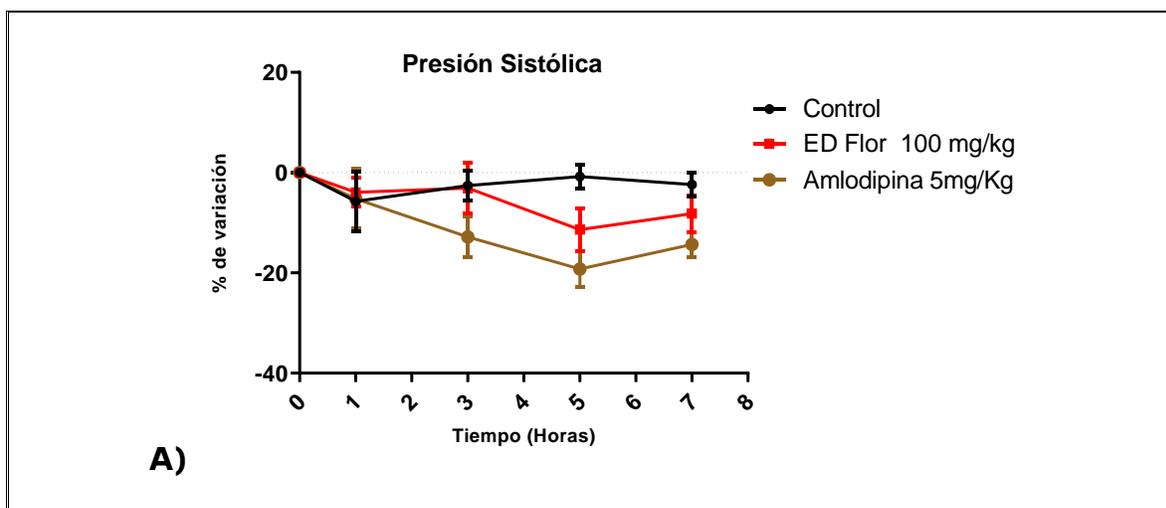
#### 3.1 Evaluación del efecto antihipertensivo del ED<sub>AmF</sub> en un modelo agudo no invasivo

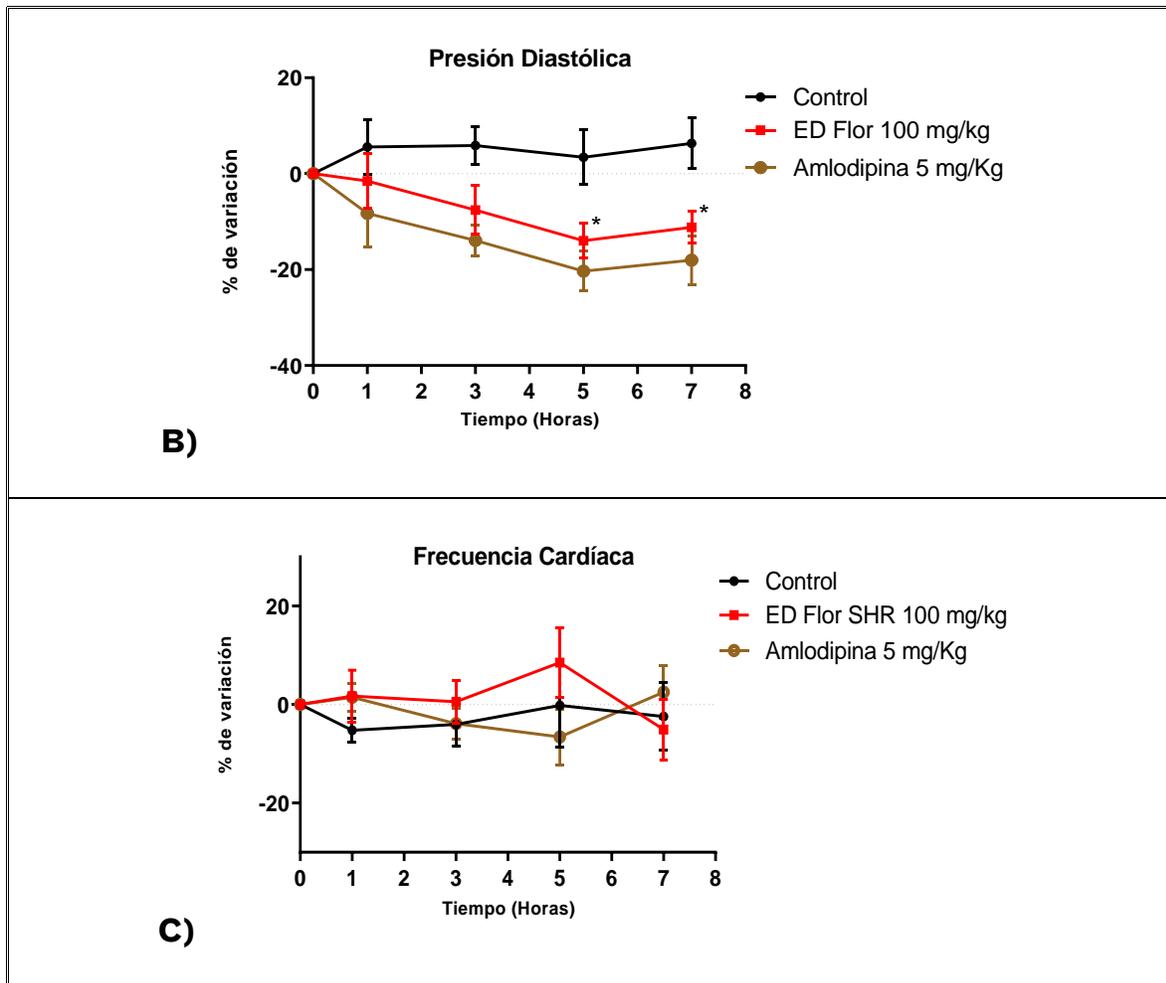
Tras determinar el efecto vasorrelajante y el mecanismo de acción del ED<sub>AmF</sub> *ex vivo* en aorta de rata, se evaluó el efecto antihipertensivo del ED<sub>AmF</sub> *in vivo*, para relacionar los efectos en el modelo *ex vivo* con los del estudio *in vivo*.

El efecto antihipertensivo no fue significativo a una dosis de 100 mg/kg, el porcentaje de variación más bajo en los parámetros de presión sistólica (PAS) y presión diastólica (PAD) es superior al -15%; cabe destacar que el efecto máximo se observó a la hora 5 post administración, lo que podría significar una vida media prolongada. En el caso de la frecuencia cardíaca, no se observó efecto cronotrópico positivo o negativo durante las 7 horas del ensayo.

La poca eficacia del ED<sub>AmF</sub> *in vivo* para evaluar su efecto antihipertensivo puede deberse a varias razones: a que el extracto tiene baja hidrosolubilidad, en consecuencia, el extracto no se disuelve adecuadamente en el vehículo y pequeñas porciones del extracto se quedan retenidas en las paredes del contenedor; la baja solubilidad afecta directamente la absorción dentro del organismo, si los compuestos en el extracto no son adecuadamente absorbidos, no se genera el efecto terapéutico (Flórez et al., 2014)

En los ensayos del modelo *ex vivo* no hay problemas de absorción, ya que el extracto está en contacto directo con el tejido de interés; en estos modelos solo se evalúa la farmacodinamia, en cambio, *in vivo* se evalúa tanto la farmacodinamia como la farmacocinética.





Gráfica 9: Disminución máxima de: A) presión arterial sistólica, B) presión arterial diastólica y C) frecuencia cardíaca (expresada en %) generada por la administración oral de 100 mg / kg del ED<sub>AmF</sub> en ratas de la cepa SHR.



# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- Mediante la obtención y evaluación del ED<sub>AmF</sub>, se corroboró la actividad vasorrelajante y antihipertensiva que se le atribuye en la medicina tradicional.
- El extracto diclorometánico de las flores de *Achillea millefolium* (ED<sub>AmF</sub>) ejerció un efecto relajante en anillos de aorta aislada de rata con endotelio del 97.45% ± 2.35, el efecto depende de la concentración y parcialmente del endotelio, la vía NO/GMPc y el bloqueo parcial de los canales de calcio dependientes de voltaje, en las células del musculo liso vascular, están involucradas en la actividad farmacológica.
- El ED<sub>AmF</sub> logró disminuir de manera significativa la presión arterial diastólica en ratas SHR.
- Se alcanzaron los objetivos propuestos para este proyecto, mismos que muestran que la hipótesis planteada se cumple.



# PERSPECTIVAS

## PERSPECTIVAS

- I. Aislar, purificar y caracterizar los compuestos presentes en el extracto diclorometánico de flor de *Achillea millefolium*.
- II. Efectuar un estudio toxicológico del extracto diclorometánico de flor de *Achillea millefolium*.
- III. Repetir la evaluación del efecto antihipertensivo del ED<sub>AmF</sub> empleando disolventes que mejoren la solubilidad del extracto, pero al mismo tiempo sean inocuos en los organismos vivos utilizados.



# ANEXOS

## ANEXOS

→ <i>Solución Ringer Krebs 10x</i>	
NaCl	69.2g
KCl	3.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6g
MgSO <sub>4</sub>	2.9g
CaCl <sub>2</sub>	3.9g
Aforar a 1L con agua destilada	

→ <i>Solución Ringer Krebs 1x</i>	
Tomar 100mL de solución Ringer Krebs y agregar:	
Dextrosa	2.1g
NaHCO <sub>3</sub>	2.1g
EDTA	0.01g
Aforar a 1L con agua destilada	

→ <i>Solución KCl 80mM libre de Ca<sup>2+</sup></i>	
NaCl	2.50g
Glucosa	2.10g
NaHCO <sub>3</sub>	2.10g
KCl	5.97g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.29g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16g
EDTA	0.01g
Aforar a 1L con agua destilada	

→ <i>Solución KCl 80mM</i>	
NaCl	2.50g
Glucosa	2.10g
NaHCO <sub>3</sub>	2.10g
KCl	5.97g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.29g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16g
EDTA	0.01g
CaCl <sub>2</sub>	0.37g
Aforar a 1L con agua destilada	



# REFERENCIAS

## REFERENCIAS

1. Aiello EA. (2013). Canales de potasio (K<sup>+</sup>) y calcio (Ca<sup>2+</sup>) en músculo liso vascular. En: Hipertensión Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Terapéutica. Eds.: Hernán Gómez Llambí y Daniel Piskorz. Editorial Intermédica, Buenos Aires Argentina. Pp. 87-92.
2. Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1140–1161. doi:10.1002/ptr.5840
3. Arias-Durán, L., Estrada-Soto, S., Hernández-Morales, M., Millán-Pacheco, C., Navarrete-Vázquez, G., & Villalobos-Molina, R. et al. (2021). Antihypertensive and vasorelaxant effect of leucodin and achillin isolated from *Achillea millefolium* through calcium channel blockade and NO production: In vivo, functional ex vivo and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 273. doi: 10.1016/j.jep.2021.113948
4. Balarezo López, G. (2018). Plantas medicinales: Una farmacia natural para la salud pública. *Paideia*, 6(7), 159-170. doi: 10.31381/paideia.v6i7.1606
5. Barrett, K., Barman, S., Boitano, S. and Brooks, H., (2013). Fisiología medica de Ganong. (24a ed.) México: McGraw-Hill
6. Boron, W., Boulpaep, E., Buccino, G., y Possenti, R. (2017). Fisiología médica (3ra ed., pp. 410-555). Elsevier.
7. Burk R.D, Cichacz Z.A., Daskalova S.M., Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. (2010), 4 (3), 225-233.
8. Cardinali, D., Dvorkin, M., & Iermoli, R. (2010). Best & Taylor Bases Fisiológicas de la Práctica Médica (14th ed., pp. 221-310). Editorial Médica Panamericana.
9. Chandler, R. F., Hooper, S. N., & Harvey, M. J. (1982). Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, compositae. *Economic Botany*, 36(2), 203–223. doi:10.1007/bf02858720.
10. Chávez Mejía, M. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, 56(2), 26-47.
11. Costanzo, L. (2018). Fisiología (6th ed., pp. 117-188). Barcelona, España: Elsevier.
12. Dall'Acqua, S., Bolego, C., Cignarella, A., Gaion, R. M., & Innocenti, G. (2011). Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract. *Phytomedicine*, 18(12), 1031–1036. doi: 10.1016/j.phymed.2011.05.005

13. Duboscq, C. (2017). Endotelio Vascular. HEMATOLOGÍA. Fisiología De La Hemostasia Normal, 21(Extrarordinario: 19-30), 19-27. Retrieved from <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/07-Vol%2021-extra.pdf>
14. Flórez, J., Armijo, J., & Mediavilla, A. (2014). Farmacología humana (6th ed.). Barcelona: Elsevier Masson.
15. Fonnegra Gómez, R., & Jiménez Ramírez, S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia (2nd ed., pp. 188-190). Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
16. Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales De La Facultad De Medicina*, 77(4), 327. doi: 10.15381/anales.v77i4.12647
17. Guyton, A., & Hall, J. (2016). Guyton & Hall, tratado de fisiología médica (13th ed.). Barcelona: Elsevier España.
18. Hernández-Abreu, O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., & González-Christen, J. et al. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*, 78(1), 54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016
19. Juárez-Rosete, C. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Bio-Ciencias*, 2 (3), 119-129.
20. Khan, A., & Gilani, A. H. (2010). Blood pressure lowering, cardiovascular inhibitory and bronchodilatory actions of *Achillea millefolium*. *Phytotherapy Research*, 25(4), 577-583. doi:10.1002/ptr.3303
21. Latarjet, M., & Ruiz Liard, A. (2019). Anatomía humana (pp. 913-1055). Panamericana.
22. Le Vay, D. (2015). Anatomía y fisiología humana (2da ed., pp. 261-273). Paidotribo.
23. Levy, M., Stanton, B., Koeppen, B., & Berne, R. (2018). Berne y Levy, Fisiología, séptima edición (7th ed., pp. 300-432). Barcelona: Elsevier España.
24. Lim, T. (2014). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants (7ma ed., pp. 138-157). Springer Netherlands.
25. Liu, Z., Khalil, R. A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 153, 91-122. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.012
26. Mathison, Y, & Israel, A. (2002). El Sistema Óxido Nitríco/GMPc como mecanismo de señalización de las Endotelinas en el Sistema Nervioso. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(1), 74-82.
27. Mohrman, D., Heller, L. and Girón Rojas, A., 2007. Fisiología cardiovascular. (6ta ed.) México: McGraw-Hill.

28. Moore, K., Dalley, A., Agur, A., Gutiérrez, A. Vasallo A. (2017). Anatomía con orientación clínica (8va ed., pp. 110-690
29. Moore, K., Dalley, A., Agur, A., Gutiérrez, A., & Ángeles Castellanos, A. (2007). Anatomía con orientación clínica (5ta ed., pp. 39-44). Editorial Médica Panamericana.
30. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Hipertensión. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/hipertension>
31. Porth, C. (2010). Fisiopatología: salud-enfermedad: un enfoque conceptual (7th ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
32. Saeidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N., & Kiuchi, F. (2011). A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *DARU*, *19*(3), 173-183.
33. Small, E., & Catling, P. (2000). Canadian Medicinal Crops (pp. 6-10). NRC Research Press.
34. Tortora GJ, Derrickson B. (2013) Principios de Anatomía y Fisiología (13ª ed., pp. 144, 328, 354-357). Editorial Médica Panamericana.
35. 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 autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. *Vascular Pharmacology*, *49*(1), 26-31. doi: 10.1016/j.vph.2008.04.002