



**UNIVERSIDAD MICHOCANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
*opción* BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto antihipertensivo de *Justicia spicigera*  
Schltdl. y su relación con el estrés oxidativo y  
nitrosativo en riñón de rata”**

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:  
**M. en C. EDGAR ROMUALDO ESQUIVEL GUTIERREZ**

DIRECTOR DE TESIS:  
**D. en C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA**

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
**D. en C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**MORELIA, MICHOCÁN, AGOSTO DE 2013.**

## **Agradecimientos:**

A mis asesores de tesis, **D.C. Alfredo Saavedra Molina** y **D.C. Rafael Salgado Garciglia**, por su paciencia y el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

Al **D.C. Salvador Manzo Avalos** por sus consejos y valiosa amistad.

Al **Dr. Rafael Villalobos Molina**, **Dr. Héctor Riveros Rosas**, **Dr. Daniel Godínez Hernández**, **Dr. Salvador Manzo Avalos** y a la **Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**, por sus valiosas observaciones y recomendaciones para mejorar mi formación académica.

Al **Dr. Rafael Molina** y **Dr. Maximiliano Ibarra** por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la **QFB. Mónica Clemente**, **Biol. Alejandra Hernández**, **L.Q. Yolanda Rodríguez**, **Biol. Yolanda García**, **M.C. Enrique Ramírez** y al **Sr. Juan Javier López** por su amistad y el aporte técnico brindado.

A las **D.C. Patricia Castro** e **Itzel Gallardo** por su paciencia y dedicación.

A todos los que forman parte del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

A mis compañeros de laboratorio: **Ruth**, **Melchor**, **Claudia**, **Erika**, **Omar**, **Lucio**, **Jesús (chucho)**, **Andrea**, **Jorge**, **Melina**, **Rafita**, **Rodo** y **Luis (enano)**.

Este trabajo se realizó gracias a los donativos de CONACyT (169093)-Gobierno del Estado de Michoacán (2.10 RSG y 2.16 ASM).

*A ellos mi más profundo agradecimiento:*

*Edgar R. Esquivel G.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	<i>iv</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>vi</i>
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. HIPERTENSIÓN	5
3.2. MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN	6
3.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO EN LA HIPERTENSIÓN	8
3.4. LA MITOCONDRIA	12
3.5. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y EL USO DE PLANTAS MEDICINALES	13
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVO GENERAL	18
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
9. MATERIALES Y MÉTODOS	20
9.1. REACTIVOS	20
9.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE <i>Justicia spicigera</i>	20
9.2.1. MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	20
9.2.2. GRUPOS DE ANIMALES	20
9.2.3. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN	21

	<b>Pág.</b>
9.3. ANALISIS DE LOS METABOLITOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE <i>Justicia spicigera</i>	21
9.3.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	21
9.3.2. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	23
9.4. EFECTO VASORRELAJANTE DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE <i>Justicia spicigera</i>	23
9.4.1. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE <i>Justicia spicigera</i>	23
9.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ANILLOS DE AORTA	23
9.4.3. EFECTO DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA RELAJACIÓN DE ANILLOS DE AORTA	24
9.4.4. REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE VASORRELAJACIÓN	27
9.5. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATAS HIPERTENSAS	27
9.5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS	27
9.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MITOCONDRIAL	28
9.5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL	28
9.5.4. PERFIL DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	30
9.5.5. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL	30
9.5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
10. RESULTADOS	32
CAPÍTULO 1	
PLANTAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CON PROPIEDADES ANTIDIABETICAS Y ANTIHIPERTENSIVAS	33
CAPÍTULO 2	
EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE <i>Justicia spicigera</i> EN RATAS HIPERTENSAS INDUCIDAS CON L-NAME	44

	<b>Pág.</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
DETERMINACIÓN DEL EFECTO VASORRELAJANTE DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CON MAYOR EFECTO ANTIHIPERTENSIVO	57
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ANTIHIPERTENSIVO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN	
11. DISCUSIÓN GENERAL	59
12. CONCLUSIÓN GENERAL	64
13. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	67
14. LITERATURA CITADA	67
	68

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Pág.
Figura 1. Síntesis del NO por la NOS	10
Figura 2. Representación esquemática y microfotografía de una mitocondria	12
Figura 3. Fotografía de la parte aérea de <i>Justicia spicigera</i> (muicle)	16
Figura 4. Cromatografía en capa fina	22
Figura 5. Cámara para órgano aislado	25
Figura 6. Equipo para órgano aislado	25
Figura 7. Ejemplo de un registro típico de contracción en respuesta a la fenilefrina en anillos de aorta con y sin endotelio	26
Figura 8. Reacción de diazotización para la detección de nitritos	29
Figura 9. Efecto del extracto metanólico de <i>J. spicigera</i> sobre la presión arterial en ratas normotensas	54
Figura 10. Efecto del extracto metanólico de <i>J. spicigera</i> sobre la presión arterial en ratas hipertensas	54
Figura 11. Efecto del extracto hexánico de <i>J. spicigera</i> sobre la presión arterial en ratas normotensas	55
Figura 12. Efecto del extracto hexánico de <i>J. spicigera</i> sobre la presión arterial en ratas hipertensas	56
Figura 13. Efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i> en aorta con endotelio	58
Figura 14. Efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i> en aorta sin endotelio	58
Figura 15. Concentración de NO en mitocondrias de riñón de rata	60
Figura 16. Perfil de nitrosilación de proteínas de mitocondrias de riñón de rata	61
Figura 17. Análisis densitométrico del perfil de nitrosilación de las proteínas mitocondriales	62
Figura 18. Efecto del extracto clorofórmico de <i>J. spicigera</i> en la lipoperoxidación mitocondrial	63

Cuadro 1. Composición de solución Krebs-Henseleit.

27

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
DMSO	Dimetil sulfóxido
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
PA	Presión arterial
HTA	Hipertensión arterial
SOD	Superóxido dismutasa
Ang II	Angiotensina II
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS <sub>e</sub>	Óxido nítrico sintasa endotelial
NOS <sub>n</sub>	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS <sub>i</sub>	Óxido nítrico sintasa inducible
NOS <sub>m</sub>	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
GMP <sub>c</sub>	Guanosín 3':5' monofosfato cíclico
L-NOARG	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DM	Diabetes mellitus
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
CV	Cardiovascular
GCs	Guanilato ciclasa soluble
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina

FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$\cdot\text{O}_2^-$	Anión superóxido
$^1\text{O}_2$	Singulete de oxígeno
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
TLC	Cromatografía en capa fina

## 1. RESUMEN

Las enfermedades crónico-degenerativas son los padecimientos que predominan entre la población de edad adulta y constituyen las principales causas de muerte. La hipertensión arterial destaca entre estos padecimientos por su elevada prevalencia y graves complicaciones incluyendo a las nefropatías. Uno de los principales factores atribuibles al desarrollo de la hipertensión es el estrés oxidativo, con un papel clave en la patogénesis. Por otro lado, el óxido nítrico (NO) es la principal molécula vasorrelajante, lo que lo hace esencial para la regulación de la presión arterial. La inactivación del NO mediada por las especies reactivas de oxígeno, contribuye potencialmente al desarrollo de la hipertensión así como al daño a los órganos y tejidos. En la medicina tradicional mexicana se encuentra una variedad de plantas con fines terapéuticos para el tratamiento de la hipertensión, sin embargo, en muchas de ellas se desconoce su mecanismo de acción o el componente responsable de la disminución de la presión arterial. *Justicia spicigera* (muicle) es una planta con amplio uso en la meseta Purépecha, no obstante, carece de estudios científicos que avalen su terapéutica como antihipertensivo. En el presente estudio, se evaluó el efecto antihipertensivo de *J. spicigera*, con principal énfasis en investigar la relación que tiene entre el estrés oxidativo y nitrosativo en un modelo de rata hipertensa inducida por N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Primeramente se determinó el efecto antihipertensivo de cuatro extractos (acuoso, hexánico, metanólico y clorofórmico), obtenidos de la parte aérea de *J. spicigera* por maceraciones sucesivas. Los resultados obtenidos muestran que los extractos de hexano, metanol y agua no disminuyen la presión arterial, sin embargo el extracto de cloroformo ejerció un efecto antihipertensivo, logrando disminuir la presión arterial en las ratas hipertensas de 180/164±1.7/3.2 mmHg a 149/133±4.0/3.7 mmHg. Ninguno de los extractos tuvieron efecto sobre la presión arterial de los animales control, y los vehículos empleados no modificaron la presión arterial en ninguno de los grupos experimentales. Estudios posteriores revelaron que esta disminución no está relacionada con el estrés oxidativo y nitrosativo, ya que no se observaron cambios en la peroxidación de lípidos, ni en el perfil de nitrosilación de

proteínas en las mitocondrias de riñón de ratas hipertensas. En este mismo orgánulo, los niveles de óxido nítrico siempre se observaron incrementados tanto en las ratas hipertensas como en los controles ( $41.36 \pm 0.64$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína y  $51.80 \pm 0.86$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína respectivamente), probablemente debido a que *per se* la patología se induzca la producción de NO como mecanismo compensatorio a la deficiencia de NO, ocasionado por la inhibición de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS<sub>e</sub>) por el L-NAME. Sin embargo, cuando se administra el extracto de cloroformo de *J. spicigera* (150 mg/kg de peso V.O.), tanto en el grupo control como en el hipertenso los niveles de óxido nítrico se incrementan ( $51.37 \pm 1.03$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína y  $73.44 \pm 1.97$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína respectivamente), concluyendo hasta este punto que el extracto de cloroformo de *J. spicigera* tiene un efecto positivo sobre la producción de NO mitocondrial. El extracto de cloroformo de *J. spicigera* fue fraccionado por cromatografía en capa fina; a fin de determinar que fracción posee el efecto antihipertensivo, un ensayo de vasorrelajación fue llevado a cabo. Cuatro fracciones fueron obtenidas y probadas, los resultados mostraron que todas las fracciones poseen la capacidad de relajar los anillos de aorta; se determinó que este efecto es independiente del óxido nítrico, por lo que se requieren de estudios adicionales empleando herramientas farmacológicas para elucidar el mecanismo por el cual el extracto clorofórmico de *J. spicigera* disminuye la presión arterial. Con el objeto de determinar que componentes están presentes en las fracciones del extracto clorofórmico, se realizaron análisis por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), los resultados revelan la presencia de los flavonoides kaempferol, hesperidina y naringenina, todos ellos reportados con propiedades relacionadas al tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por lo que en este estudio, se les atribuye el efecto tanto antihipertensivo como vasorrelajante.

## 2. SUMMARY

The prevalence on non transmissible diseases still remains one of the major public health problems between adulthood, also are the main death causes. Hypertension is noteworthy between these disorders because serious complications like nephropathy and their high mortality rates are present. Therefore, nowadays hypertension is the main cause for high prevalence in cardiovascular and renal disorders. Oxidative stress is an important and attributable cause for primary hypertension. On other hand, nitric oxide (NO) is the main vasorelaxant molecule, therefore is essential for blood pressure regulation. Inactivation of nitric oxide mediated by ROS, contribute firmly to hypertension progression and also lead to important damages in organs and tissues. In Mexican folk medicine, there is a wide variety of medicinal plants with antihypertensive effects, notwithstanding, in most of them the action mechanism is unknown and therefore, the chemical compound responsible for these effects. *J. spicigera* is a Mexican medicinal plant with a variety uses in Purepecha region, but without scientific studies to supports their therapeutic use. Therefore, the present study was focused to evaluate the effect of *J. spicigera* over the blood pressure, and the relationship with the oxidative and nitrosative stress in hypertensive model (L-NAME). Aerial parts of *J.spicigera* were fractionated with hexane, chloroform, methanol and water and our results showed that only chloroform extract reduced the blood pressure (from 180/164±1.7/3.2 mmHg to 149/133±4.0/3.7 mmHg). None of the extracts had effect on blood pressure in control animals as well as vehicles. The decrease observed with chloroform extracts was not related to oxidative or nitrosative stress. Studies on lipid peroxidation do not showed any change in this parameter, and nitrosilation profile remains unchanged in mitochondria from kidney. But the NO level was always elevated in mitochondria from kidney in control and hypertensive rats (41.36 ± 0.64 µmol/mg protein and 51.80 ± 0.86 µmol/mg protein respectively). However, the administration of chloroform extract of *J. spicigera* (150 mg/kg weight), in both groups of NO levels are increased (51.37 ± 1.03 controls y 73.44 ± 1.97 L-NAME rats), concluding the chloroform extract of muicle has a positive effect on mitochondrial nitric oxide

production. The chloroform extract was fractionated by thin layer chromatography, to determine which fraction has antihypertensive effect through vasorelaxation assay. Four fractions were obtained, and the results showed that all of them have the ability to relax aortic rings; this effect is independent of nitric oxide, so it will require additional studies using pharmacological tools to elucidate the mechanism by which the PA decreases. In order to determine which components are present in this extract fractions, analysis was performed by high performance liquid chromatography (HPLC), the results indicate the presence of flavonoids kaempferol, naringenin, and hesperidin, all related properties reported the treatment of cardiovascular diseases, so that in this study, the effect is attributed both antihypertensive and vasorelaxant.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. HIPERTENSIÓN**

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y renal, las cuales son importantes causas de mortalidad en México. En tan solo seis años, la prevalencia se incrementó en un 19.7%, afectando a 1 de cada 3 adultos mexicanos, es decir al 31.6% de la población. Su prevalencia aumenta con la edad y es mayor después de los 70 años (ENSANUT, 2012). Los costos económicos asociados al tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones, representan una carga para los pacientes y los servicios de salud (NOM-030-SSA2-1999, 2012). Por lo cual, es importante el estudio de este padecimiento que actualmente aqueja a la población mundial.

Se ha clasificado a la HTA en primaria y secundaria y es altamente prevalente en el mundo debido a que se incrementa la longevidad y los factores que contribuyen a su desarrollo, tales como la obesidad (Hall, 2002) y la diabetes mellitus (DM) (WHO, 2012). Su principal característica son los incrementos continuos de la presión arterial (PA), lo cual aumenta el riesgo de infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal. Cuando no se controla, puede causar ceguera, irregularidades del ritmo cardiaco, falla cardiaca y renal. El riesgo se incrementa si se presentan otros factores de riesgo cardiovascular como las dislipidemias y la DM (SSA, 2001).

La HTA se define como un aumento sostenido de la PA  $\geq 140/90$  mmHg (PA sistólica/PA diastólica respectivamente). El riesgo de una enfermedad cardiovascular es más bajo con PA sistólica (PAS) menores a 120 mmHg y PA diastólica (PAD) inferior a 80 mmHg; estos riesgos aumentan de manera progresiva con PAS y PAD más altas (Hoffman, 2007). La presión sanguínea es la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier unidad de área de la pared del vaso y su regulación comprende relaciones complejas entre los sistemas cardiovascular, endocrino, renal y adrenérgico central y periférico (Guyton y Hall, 2001).

El tratamiento farmacológico de pacientes con HTA acompañada de PAD alta, reduce la morbilidad y la mortalidad por afección cardiovascular. Mientras que el tratamiento de la HTA ha mostrado prevenir enfermedades cardiovasculares para extender y mejorar la vida, la HTA continua siendo mal manejada (WHO, 2012), no obstante se puede prevenir y tratar. En algunos países en desarrollo, prevenir y tratar la HTA ha hecho que disminuyan tanto el riesgo de padecerla como las muertes por sus complicaciones. La HTA primaria humana es compleja, multifactorial bajo control poligénico (NOM-030-SSA2-2009, 2012). La HTA es una comorbilidad muy frecuente en la DM, afectando del 20 al 60% de la población diabética. La prevalencia de la HTA en estos pacientes es de 1.5 a 3 veces superior que en los no diabéticos, por lo que contribuye al desarrollo y progresión de las complicaciones comunes en la DM. Existe evidencia epidemiológica extensa que indica que los individuos que cursan DM desarrollan hipertensión con un riesgo marcadamente alto de padecer enfermedades cardiovasculares, retinopatía diabética y muy importante la insuficiencia renal (Grundy *et al.*, 1999).

### **3.2. MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN**

Con el fin de comprender la patogénesis y para estudiar el tratamiento y prevención de una enfermedad, es útil el uso de modelos animales. Varios modelos experimentales han sido desarrollados para obtener información de la etiopatogénesis de la HTA. Los modelos animales de hipertensión comparten muchos rasgos comunes a la hipertensión humana. Muchos de estos modelos han sido desarrollados utilizando los factores etiológicos que se presumen son los responsables de la HTA en humanos tales como una ingesta excesiva de sal, hiperreactividad del sistema renina angiotensina, factores genéticos, entre otros modelos como el de la inhibición crónica de óxido nítrico (Badyal *et al.*, 2003).

Los derivados de la L-arginina; N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) han sido usados ampliamente para inhibir la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en diferentes sistemas biológicos (Pfeiffer *et al.*, 1996).

La administración de L-NAME, provoca un desbalance entre el óxido nítrico (NO) y la angiotensina II (Ang II), modificándose este balance a favor de la vasoconstricción (Moncada *et al.*, 1991). El L-NAME es soluble en agua y activo por vía oral, además de incrementar la PA se ha observado que el bloqueo agudo del NO es crónicamente de incrementar la PA se ha observado que causa daño glomerular debido a la hipertensión capilar glomerular, el cual se ha visto involucrado en la patogénesis de la enfermedad glomerular primaria (Baylis *et al.*, 1992).

En los sistemas biológicos el papel del NO como un factor de relajación derivado del endotelio, se ha vuelto un importante sujeto de investigación en enfermedades cardiovasculares. El endotelio libera sustancias vasorrelajantes y el principal efecto vascular es atribuido al NO. La administración aguda de análogos de la L-arginina (L-NAME), provocan una marcada hipertensión y vasoconstricción renal, presumiblemente como consecuencia de una inhibición de la biosíntesis del NO. Ribeiro y col. En 1992 publican el estudio que marca el inicio de un nuevo modelo de hipertensión, basándose en las observaciones previas de que la inhibición de la síntesis de NO provoca incrementos marcados en la PA. Aunque este efecto puede relacionarse a la síntesis de NO, otros mecanismos pueden contribuir a esta forma de hipertensión, tomando en cuenta que el NO puede influir en la actividad de varios sistemas involucrados en la regulación cardiovascular (Zanchi *et al.*, 1995).

Actualmente, modelos animales de hipertensión se están desarrollando como nuevas perspectivas para el mejor entendimiento de la patogénesis. Estos modelos también se están usando en la selección de agentes antihipertensivos ya que nuevas moléculas han sido aisladas y sintetizadas; principalmente a partir de plantas, por lo que el uso de estos modelos se ha incrementado para probar sus efectos terapéuticos. Diferentes cepas de ratas con HTA genética están disponibles, estudios terapéuticos son llevados a cabo generando conocimiento nuevo en la patogénesis de la HTA (Badyal *et al.*, 2003).

### 3.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO EN LA HIPERTENSIÓN

El término estrés oxidativo se refiere a la condición bajo la cual una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), superan los mecanismos de defensa antioxidante, conduciendo a la oxidación de biomoléculas incluyendo lípidos (marcador de daño oxidativo), proteínas, carbohidratos y ADN (Hermann *et al.*, 2007).

Los oxidantes son producidos en la célula de manera continua como subproductos del metabolismo aerobio. Alrededor del 2 al 3% del oxígeno consumido por una célula es convertido a ERO (Shigenaga, 1994), principalmente en la mitocondria a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial ya que en este orgánulo se consume alrededor del 98% de O<sub>2</sub> que se inhala (Duchen, 2004). Los principales sitios de producción de las ERO han sido localizados en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones. Estos complejos pueden transferir electrones al O<sub>2</sub> y dar como resultado la producción del anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Cuando la cadena transportadora de electrones es inhibida río abajo del complejo III, los electrones de la oxidación del succinato pueden generar  $\cdot\text{O}_2^-$  por revertir el transporte de electrones del complejo II al complejo I. La producción de las ERO se incrementa cuando el transporte de electrones es reducido, lo cual ocurre a bajas tasas de respiración o en situaciones patológicas (Hervouet, *et al.*, 2007).

Las ERO se componen de una serie de derivados de oxígeno que incluyen al anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), y el singulete de oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). El  $\cdot\text{O}_2^-$  es inestable en solución acuosa con una vida media de segundos (Panieri *et al.*, 2013). Además de la cadena de transporte de electrones, también es producido vía enzimática por la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, xantina oxidasa, p450 monooxigenasa, NAD(P)H oxidasa y por el desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa (NOS). El  $\cdot\text{O}_2^-$  es dismutado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la superóxido dismutasa (SOD). Esta especie relativamente débil, mantiene una posición central en el metabolismo de otras ERO. Sin embargo, en una reacción catalizada con hierro, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce al radical  $\cdot\text{OH}$  por la reacción

de Haber-Weiss (Sachse y Wolf, 2007), esta ERO es más dañina que su antecesor el  $\cdot\text{O}_2^-$ . Una vez generadas, las ERO inducen la oxidación de lípidos y proteínas, generando varios compuesto activos como los radicales lipídicos peroxil y alcoxil (Sachse y Wolf, 2007; Xu *et al.*, 2013;) los cuales pueden ser medidos como marcadores de daño oxidativo.

Un incrementado estrés oxidativo, se ha visto que interfiere en las funciones del NO, el cual es un radical libre de vida media corta ( $\sim 1\text{s}$ ), generado por varias células en respuesta a un estímulo (Blantz y Munger, 2002; Giulivi *et al.*, 2006). La biosíntesis del NO es catalizada por las isoenzimas de la NOS (NOS, EC 1.14.13.39) en dos pasos que comprende la pentaoxidación del amino guanidino de su sustrato, la L-arginina, con la formación de la N-hidroxi-L-arginina como intermediario (Figura 1) (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006).

La familia de las NOS conocidas hasta 1995, comprendía a la NOS neuronal (NOSn), la NOS inducible (NOSi) y la NOS endotelial (NOSe) (Alderton *et al.*, 2001; Brookes, 2006; Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006). Entre 1995 y 1996, en los laboratorios de Kobzik-Stamler y Hellsten-Bates, fue descubierta simultáneamente una enzima de la NOS localizada en la mitocondria. La NOS mitocondrial (NOSmt) (Kanai *et al.*, 2001) se sugiere que es una modificación post-traduccional de la NOSn que consiste en una miristilación y fosforilación en la región C terminal confiriendo anclaje a la membrana interna mitocondrial (Valdez *et al.*, 2005). Por consiguiente, la mitocondria también produce NO vía la NOSmt. La NOSmt se ha encontrado en mitocondrias de cerebro, riñón, hígado, músculo esquelético y cardiaco (Kanai *et al.*, 2001). Todas las NOS usan diversos cofactores, como la tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y NADPH (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006). Debido a sus efectos en la neurotransmisión, respuesta inmune y muy importante en la vasodilatación, el NO juega un importante papel en la fisiología y patología (Giulivi *et al.*, 1998) incluyendo la HTA.

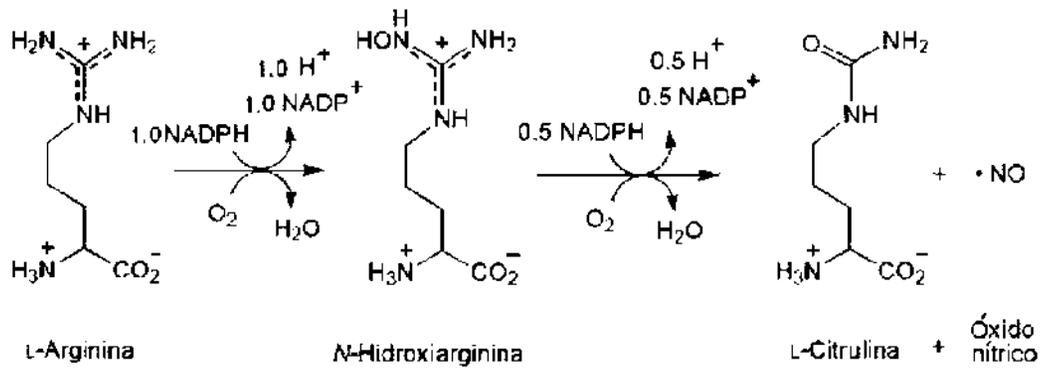


Figura 1. Síntesis del NO por la NOS. La reacción consume oxígeno, requiere NADPH y produce L-citrulina como co-producto final. (Tomado de Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006).

Como molécula señal participa en una amplia variedad de sistemas biológicos. Es liberado en una manera dependiente de Ca<sup>++</sup> y conduce a múltiples funciones entre ellas la relajación de los vasos sanguíneos a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y la consecuente acumulación del GMPc en las células del músculo liso vascular. Este mecanismo juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo y en el control de la PA en los humanos (Moncada *et al.*, 1991).

El  $\cdot\text{O}_2^-$  reacciona directamente con el NO para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Beckman *et al.*, 1990) y de este modo lo inactiva. El  $\text{ONOO}^-$  es extremadamente reactivo y su tiempo de vida media es relativamente corta (10 – 20 ms), por lo que no permite que el  $\text{ONOO}^-$  formado en el citoplasma difunda hacia la mitocondria. Sin embargo, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos modificados por el  $\text{ONOO}^-$  existen en la mitocondria, sugiriendo su formación en la misma (Ghafourifar y Sen, 2007). La asociación de la NOSmt con la membrana interna mitocondrial permite que el NO producido inhiba la actividad de la citocromo c oxidasa, también localizada en la membrana interna mitocondrial, o reaccionar con el  $\text{O}_2^-$  para generar  $\text{ONOO}^-$ , afectando de esta manera la función mitocondrial (Radi, 2004; Bartesaghi, 2007; Ghafourifar y Sen, 2007;).

La función integral del estrés oxidativo y nitrosativo en la HTA ha sido demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro* mostrando que sustancias que protegen contra el daño producido por el anión superóxido, tales como superóxido dismutasa (SOD) y la vitamina C, restauran la vasodilatación dependiente del endotelio tanto en modelos animales como en humanos (Hermann *et al.*, 2007).

La disfunción endotelial está asociada con la HTA y el tono vascular juega un papel importante en regular la PA, la cual al elevarse causa una serie de complicaciones a nivel de vasos sanguíneos, llegando a afectar órganos importantes como lo son riñón y corazón. Por lo tanto, la regulación del tono vascular es muy importante para el tratamiento de las enfermedades vasculares. Entre los procesos de relajación vascular, las células endoteliales involucran mecanismos de vasodilatación. Uno de los principales factores de relajación es el NO, el cual es producido por la NOS endotelial (NOSe) y liberado desde el endotelio. Por lo que, el deterioro de la bioactividad del NO juega un papel importante en la disfunción endotelial. El entendimiento del papel del NO en la regulación de la PA puede tener implicaciones para mejorar el tratamiento de la hipertensión y reducir el riesgo de morbi y mortalidad cardiovascular (CV) (Levy *et al.*, 2010).

Una disminuida biodisponibilidad del NO por las ERO, la principal característica de la disfunción endotelial, está presente en la HTA. Pacientes con HTA tiene incrementados los niveles de ERO, las cuales secuestran al NO, reduciendo su disponibilidad. La biodisponibilidad del NO puede mejorarse con tratamientos farmacológicos o no farmacológicos; cofactores de la NOS tal como la tetrahidrobiopterina o el mismo sustrato (L-arginina), así como fuentes externas de antioxidantes restauran la función endotelial. Además, se ha observado que el tratamiento o la administración de fuentes antioxidantes endógenas (enzimáticas) o exógenas, que interactúan con las células endoteliales, reducen la presión arterial. Estas acciones antioxidantes son particularmente importantes ya que se cree que el estrés oxidativo y la remoción resultante del NO por una excesiva producción de ERO, es una de las principales causas de la alteración en la HTA (Wilcox 2005; Hermann *et al.*, 2007).

### 3.4. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares caracterizados por tener su propio ADN y ser desde el punto de vista metabólico importantes; sin embargo, su función es dependiente de la fisiología celular y completamente integrada a ella (Vázquez, 2002). Son ubicuas, encontrándose en todas las células nucleadas y son las principales generadoras de energía (Greaves y Taylor, 2006). Están compuestas por una membrana externa que rodea una membrana interna de gran área de superficie que, a su vez, rodea un centro rico de proteína denominado matriz mitocondrial (figura 2) (Logan, 2006). La membrana externa le permite el paso libre de metabolitos a diferencia de la membrana interna que es selectivamente permeable para aniones como el piruvato y para cationes como el calcio y protones. Esta propiedad de la membrana le permite establecer un gradiente de iones que es esencial para llevar a cabo la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena transportadora de electrones y el consumo de oxígeno.

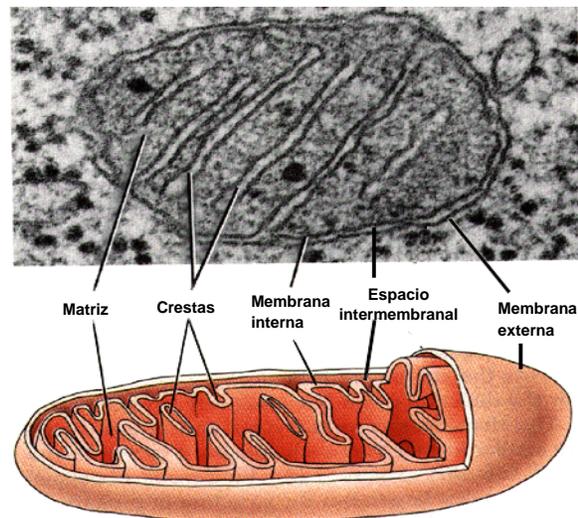


Figura 2. Representación esquemática y microfotografía de una mitocondria. Tomada y modificada de [www.academic.brooklyn.cuny.edu](http://www.academic.brooklyn.cuny.edu)

La mitocondria es el orgánulo que constantemente metaboliza oxígeno (del 85% al 90% consumido por la célula), por consiguiente produce especies reactivas de

oxígeno como un subproducto (Chen *et al.*, 2003; Duchon 2004), y aunque cuentan con su propia maquinaria para removerlas, la tasa de producción es más alta que la de remoción, resultando en un metabolismo incompleto del oxígeno consumido (aproximadamente del 1% al 3%), es decir, la mitocondria produce ERO en cantidades basales, necesarias para regular la función celular (Shigenaga *et al.*, 1994; Patricó, 2002). Los subproductos del metabolismo del oxígeno son el  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el radical  $\text{OH}\cdot$  (Zhou *et al.*, 2012). La formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  ocurre vía la transferencia de un electrón libre al oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). La reacción ocurre en la cadena de transporte de electrones, la cual reside en la membrana interna mitocondrial (Shigenaga *et al.*, 1994). Los complejos I y III; NADH deshidrogenasa y ubisemiquinona, respectivamente, producen la mayor parte del  $\cdot\text{O}_2^-$  el cual es convertido por la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de Mn (SODMn) a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  a su vez por la acción de la glutatión peroxidasa (GSPx) se convierte a agua. De este modo se detoxifican las ERO producidas. Bajo ciertas condiciones patológicas, en presencia de metales de transición reducidos, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede producir  $\text{OH}\cdot$ , una especie altamente reactiva que causa daño al DNA, proteínas y lípidos (Hervouet *et al.*, 2007).

### **3.5. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y EL USO DE PLANTAS MEDICINALES**

La HTA es una enfermedad que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial. Aunque millones de dólares se gastan anualmente para el tratamiento y detección de enfermedades cardiovasculares, los tratamientos convencionales han hecho poco por reducir el número de pacientes con HTA (WHO, 2012).

Para el tratamiento de la HTA existe una variedad de drogas antihipertensivas, entre las que se incluyen los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina II, bloqueadores de los canales de calcio, y bloqueadores  $\beta$  con o sin propiedades vasodilatadoras dándolas solas o combinadas con diuréticos (Mancia, 2012). Debido a que el propósito del tratamiento de la hipertensión es disminuir el riesgo cardiovascular, quizá se

requieran otras intervenciones dietéticas y farmacológicas (Barbosa-Filho *et al.*, 2006). Por ejemplo, incluir una dieta saludable libre de grasas y baja en sodio, así como la administración de antioxidantes y ejercicio físico constante, ya que se ha observado que la PA es más baja en personas que modifican estos hábitos (SSA, 2012).

En la medicina tradicional, existe una gran variedad de plantas con actividad antihipertensiva de importancia mundial de las cuales se han aislado compuestos vasoactivos. Los efectos terapéuticos de las plantas se deben en particular al contenido de diferentes metabolitos secundarios, los cuales se han probado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Esquivel-Gutiérrez *et al.* 2012), por ejemplo, *Agastache mexicana* media sus efectos antihipertensivos a través de la apertura de canales de potasio, así como por la vía de NO/GMPc, estos efectos son atribuidos a la tialinina un compuesto aislado de esta planta (Hernández-Abreu *et al.*, 2012).

La medicina alternativa ofrece una vía efectiva para disminuir el número de personas con PA elevada. Incluyendo a la dieta, el ejercicio, el manejo del estrés, suplementos alimenticios y plantas con propiedades antihipertensivas. Actualmente hay una gran cantidad de plantas medicinales reportadas en la literatura, las cuales pueden usarse con seguridad para el tratamiento de la HTA (Agrawal *et al.*, 2010; Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Desde tiempos prehispánicos, la población mexicana ha hecho uso de plantas medicinales para tratar problemas simples de salud. Nuestro país es un buen lugar para llevar a cabo estudios etnobotánicos dada su vasta y diversa flora. Este tipo de estudios indican que en México, así como en otras partes del mundo, los curanderos tradicionales tratan las enfermedades cardiovasculares con preparaciones herbales. Las medicinas herbales son usadas por alrededor del 80% de la población mundial para el cuidado de su salud (Andrade-Cetto, 2009), muchas de ellas han sido estudiadas como agentes terapéuticos potenciales en el manejo de la HTA y sus complicaciones relacionadas. Los tratamientos naturales para la hipertensión esencial pueden lograr disminuir los valores de la PA dentro del rango normal; sin

embargo, si los cambios de estilos de vida saludable no se mantienen, los valores de PA se incrementarían (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Actualmente se sabe que las propiedades curativas de las plantas se asocian a la producción de metabolitos secundarios, compuestos sumamente activos que les confieren la facultad de interactuar con su medio ambiente, ya que le permiten en gran medida la capacidad de sobrevivir ante condiciones de estrés abiótico provocado por exceso o insuficientes intensidades de luz, temperatura, viento, nutrientes, falta o exceso de agua, salinidad, entre otros, ó ante el estrés biótico provocado por agentes patógenos como virus, hongos, bacterias, herbívoros y nematodos (Croteau *et al.*, 2000).

Recientemente se han encontrado en la literatura pocos estudios que tratan de entender el mecanismo de acción de estos metabolitos secundarios sobre la PA. En la actualidad, estudios realizados con metabolitos aislados o sintéticos son probados por sus efectos vasorrelajantes o antihipertensivos, por ejemplo, el ácido cinámico (derivado de *Cinnamomum spp*), se ha involucrado en una gama de efectos terapéuticos incluyendo: antimicrobiano, antifúngico y antitumoral; pero recientemente, se probó su efecto vasorrelajante vía NO/GMPc en aorta torácica de rata (Kang *et al.*, 2013). Tiliánina, un metabolito aislado de *Agastache mexicana* fue probado como agente vasorrelajante y además fue elucidado su mecanismo de acción (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). La identificación de compuestos orgánicos en las plantas tiene una importancia clínica debido a que pudieran tener un efecto terapéutico en uno o varios desórdenes. Debido a que las plantas continúan siendo culturalmente adecuadas como parte del tratamiento de muchas enfermedades, es importante documentar sus usos y realizar estudios acerca de sus actividades farmacológicas para asegurar su eficacia y seguridad.

*J. spicigera* (Figura 3) es una planta medicinal integrante de la familia de las Acanthaceas (Acanthaceae). Es una planta usada en la Huasteca Potosina, en la Península de Yucatán y muy importante en la región Purépecha (Michoacán) para el tratamiento de varios padecimientos en los que se incluyen la DM e HTA. Es un arbusto siempre verde con flores tubulares de color naranja que crece muy bien en

climas cálidos. Es nativa de México, y su cultivo se extiende hasta el sur de América (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).



Figura 3. Fotografía de la parte aérea de *Justicia spicigera* (muicle).

En México se distribuye ampliamente del centro al sur del país y es conocida con el nombre de muicle, muitle o muite. Esta especie de *Justicia* es descrita como un arbusto erecto con hojas pecioladas con un margen completo. Las inflorescencias en espigas o panículas y rara vez tiene flores solitarias, terminales o axilares. Las brácteas y bractéolas suelen ser visibles e imbricadas. Pueden ser fácilmente reconocidas por su corola bilabial, con un labio posterior que generalmente se presenta dos veces lobulado, un labio anterior trilobulado, dos estambres, una cápsula con cuatro semillas y una porción estéril basal (Graham, 1990; Braz *et al.*, 2002; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Tradicionalmente las partes aéreas de *J. spicigera* son usadas como infusiones y están indicadas en el tratamiento de trastornos intestinales, dolor de cabeza crónico, epilepsia, cáncer, DM e HTA. En el año 2012, Ortiz-Andrade y colaboradores evaluaron la propiedad antidiabética de muicle, encontrando que el extracto etanólico de *J. spicigera* tiene un efecto antidiabético el cual está relacionado a la estimulación de la toma de glucosa por las

células adiposas de humano y murino. Es el primer estudio que avala su terapéutica en una enfermedad ligada a la HTA. Sin embargo no hay evidencia científica acerca de sus propiedades antihipertensivas.

Desde 1982, Euler y Alam aislaron al flavonoide kaempferitrina, posteriormente Dominguez y col., en 1990 lo confirma en un estudio químico de muicle. Recientemente, estudios realizados en esta planta, atribuyen sus propiedades curativas por la capacidad antioxidante que posee a través de este grupo de moléculas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2009; Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En Muicle, siendo una planta usada en la medicina tradicional mexicana como antihipertensiva, es importante determinar sus efectos sobre la presión arterial. Además, investigar si este efecto se relaciona a la modulación del estrés oxidativo y nitrosativo ya que este último se relaciona a la etiopatología de la HTA.

#### **5. HIPÓTEISIS**

*Justicia spicigera* disminuye la presión arterial modulando el estrés oxidativo y nitrosativo.

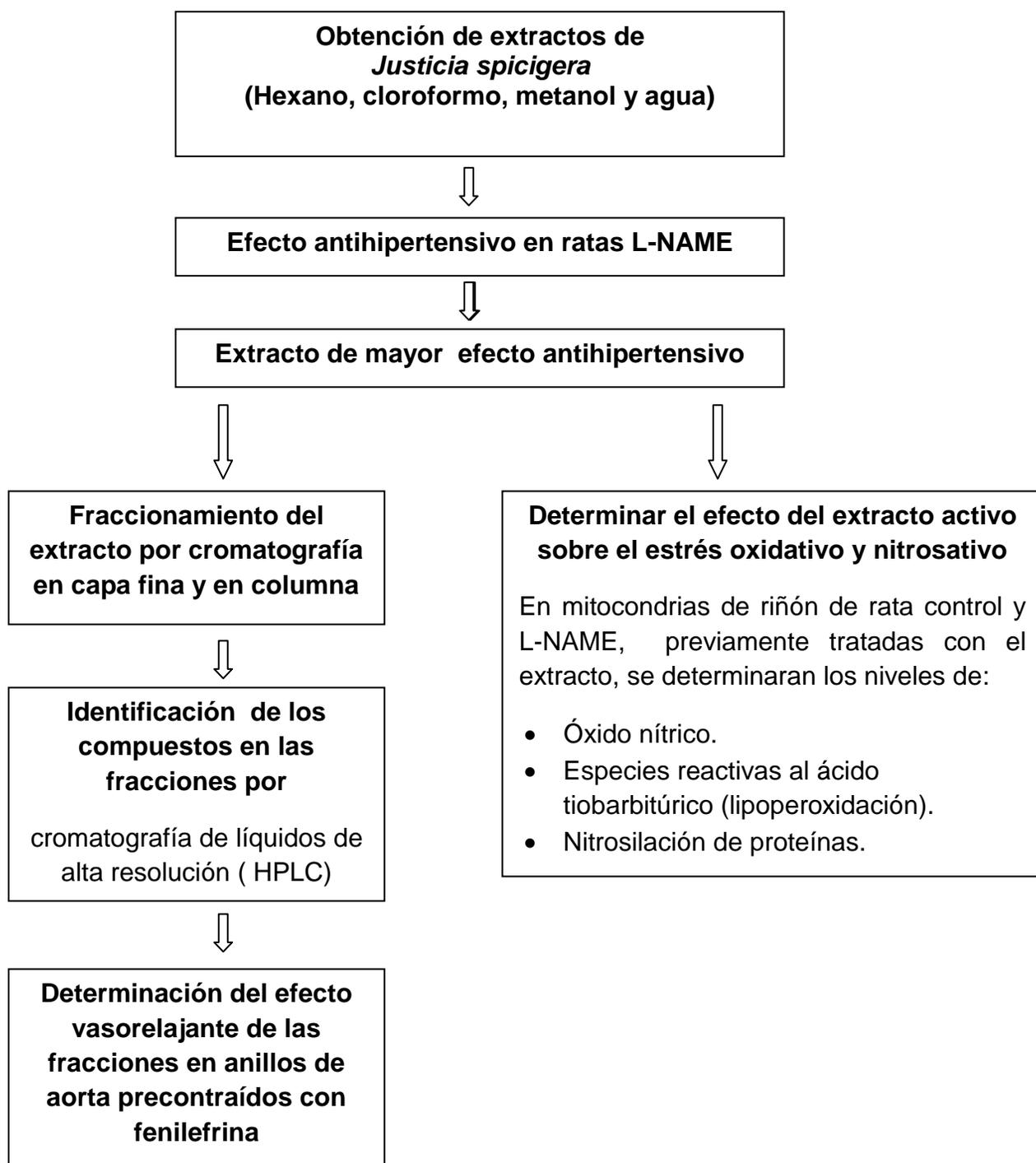
#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto antihipertensivo de los extractos de *Justicia spicigera* y su relación con el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata.

#### **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto antihipertensivo de diferentes extractos de *J. spicigera*.
2. Identificar los compuestos mayoritarios responsables del efecto antihipertensivo.
3. Determinar el efecto vasorrelajante de las fracciones del extracto con mayor efecto antihipertensivo.
4. Determinar el efecto del extracto antihipertensivo sobre el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1. REACTIVOS**

Todos los reactivos y sustancias empleadas fueron grado reactivo y de la más alta pureza disponible en el mercado.

### **9.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTESIVO DE *Justicia spicigera***

#### **9.2.1. MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS**

Partes aéreas de *J.spicigera* fueron colectadas en el mes de Octubre de 2009 en la comunidad de El Letrero, Michoacán, Méx. Una vez colectada se procedió al secado bajo la sombra y a temperatura ambiente. La planta seca se pulverizó y almacenó hasta su uso en un lugar seco y fresco, protegiéndolo de la luz.

Los extractos crudos fueron preparados por maceración sucesiva en orden ascendente de la polaridad empleando, hexano, cloroformo, metanol y agua (agua: etanol; 1:1) por 5 días a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Después de la filtración, los extractos fueron concentrados en rotavapor con presión reducida a una temperatura máxima de 40°C. Los extractos fueron almacenados a 4°C protegidos de la luz hasta su uso. Pruebas de solubilidad fueron realizadas y el extracto hexánico se disolvió en aceite de maíz, y el clorofórmico y metanólico en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5%.

#### **9.2.2. GRUPOS DE ANIMALES**

Se emplearon ratas macho Wistar pesando entre 200 y 250g, las cuales fueron colocadas en 12 grupos de la siguiente manera:

- Control
- Control + vehículo
- Control + extracto hexánico
- Control + extracto clorofórmico
- Control + extracto metanólico
- Control + extracto acuoso (H<sub>2</sub>O: Etanol 1:1)
- L-NAME
- L-NAME + vehículos
- L-NAME + extracto hexánico
- L-NAME + extracto clorofórmico
- L-NAME + extracto metanólico
- L-NAME + extracto acuoso (H<sub>2</sub>O: Etanol 1:1)

Todos ellos con acceso de agua y alimento *Ad libitum* mantenidos en condiciones de bioterio de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2002.

### **9.2.3. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN**

La hipertensión fue inducida por la administración crónica de L-NAME, el cual fue administrado en el agua de beber ajustando las dosis para que el animal ingiriera 75mg/kg de peso por día durante 21 días. La presión sistólica y diastólica se midió por pletismografía usando un analizador de presión LE 5007 (Letica, PanLab, Barcelona, España).

## **9.3. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Justicia spicigera***

### **9.3.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

Para la separación de las fracciones, 100µL del extracto clorofórmico de *J. spicigera* fueron separados por cromatografía en capa fina, utilizando placas TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK) de 5cm x 10cm con el objeto de identificar los grupos de compuestos

(Figura 4). Se ensayaron diferentes mezclas de solventes para la fase móvil, obteniendo mejores resultados para la mezcla hecha con hexanos: acetato de etilo: metanol (3:2:1).

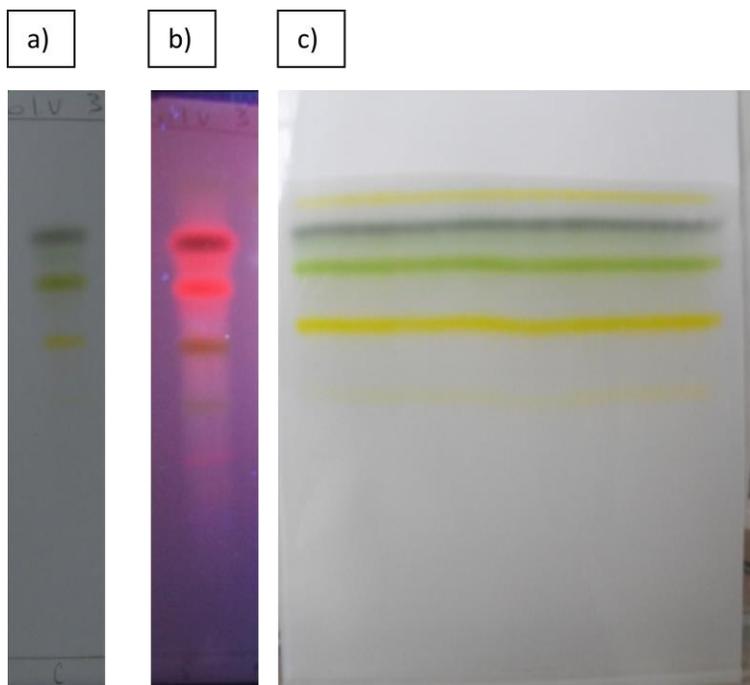


Figura 4. Cromatografía en capa fina. Imagen representativa de la separación del extracto clorofórmico de *J spicigera* empleando el sistema Hexano: Acetato de etilo: Metanol (3:2:1) en placas de 5 x 10cm (a y b) y 20 x 20cm (c).

Después de su corrimiento, las placas se revelaron con luz ultravioleta (UV) de onda corta ( $\lambda=254$  nm) (lámpara Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois USA), para determinar las bandas representativas de grupos de compuestos que se separaron en 4 fracciones, determinando para cada una de ellas el factor de corrida ( $R_f$ ). Posteriormente, se corrieron placas preparativas de 20 X 20 cm y 2.5 mm de espesor (Figura 4C), con gel de sílice como absorbente para la fase estacionaria (Silica gel 60, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) y para la fase móvil, utilizando una mezcla de hexano: acetato de etilo: metanol (3:2:1), esto con el fin de obtener los grupos de compuestos para su posterior análisis por HPLC.

### **9.3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

El análisis fue llevado a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa (Agilent Technologies Model 1200) (Palo Alto, CA, USA), equipado con un inyector automático G1329C, una bomba G1312A, un detector de diodos G1315B y una columna analítica C18 Zorbax Eclipse XDB (150 X 4.6 mm, 5 µm i.d.) a temperatura constante (25°C) y a flujo constante de 1 mL/min. Para la fase móvil se empleó metanol: acetonitrilo: agua (40:15:45) (v/v) con ácido acético al 1% bajo condiciones isocráticas. Los cromatogramas fueron obtenidos a 282 nm para hesperidina, quercetina y naringenina (Rojas-Llanez *et al.*, 2007) y a 368 nm para kaempferol (Zu *et al.*, 2006).

Los estándares de hesperidina, kaempferol, naringenina y quercetina fueron comprados de Sigma-Aldrich (Toluca, México). Todos los solventes fueron grado HPLC de Merck (Ciudad de México, México). Las curvas de calibración son construidas para cada flavonoide en un rango de 0.01-10 µg.

## **9.4. EFECTO VASORRELJANTE DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Justicia spicigera***

### **9.4.1. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Justicia spicigera***

El fraccionamiento se realizó por cromatografía en capa fina (como se indicó previamente). Adicionalmente, se filtraron cada una de las fracciones obtenidas en una columna con gel de sílice. Las fracciones fueron concentradas, secadas y almacenadas en congelación hasta su utilización.

### **9.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ANILLOS DE AORTA**

En este estudio se emplearon ratas macho Wistar de 300g a 350g ± 30g que se mantuvieron bajo condiciones de bioterio con acceso libre a agua y alimento, (NOM-062-ZOO-1999, 2002). Las ratas fueron sacrificadas, previa exposición a éter etílico

o una sola inyección intraperitoneal de pentobarbital a una dosis de 60mg/kg de peso y mediante una incisión abdominal se procedió a la exposición de la arteria aorta torácica. La arteria se removió y se mantuvo inmersa en solución Krebs-Henseleit, se disecó y se limpió de tejido conectivo y graso. Posteriormente la arteria se cortó en anillos de 4-6 mm de longitud. Adicionalmente se procedió a la remoción del endotelio a la mitad de los anillos frotando suavemente la superficie interna de los anillos de aorta con un dispositivo metálico rugoso.

#### **9.4.3. EFECTO DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE LA RELAJACIÓN DE ANILLOS DE AORTA**

Los anillos de aorta se introdujeron en cámaras para órgano aislado que contenían 10 ml de solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl, 11.8; KCl, 4.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25.0; dextrosa, 5.8; EDTA, 0.026.

Las cámaras para órgano aislado se mantuvieron a 37°C, pH 7.4 y burbujeo constante con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Cada anillo se montó en dos ganchos de nikrom; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), que estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), para registrar cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales (Vergara-Galicia *et al.*, 2010) (Figuras 5 y 6).

Una vez montados los anillos se les dio una tensión inicial de 3g y se dejaron estabilizar por un lapso de 30 minutos. Después se sensibilizó a los anillos 3 veces a intervalos de 30 minutos con una concentración submáxima de fenilefrina ( $1 \times 10^{-7}$  M). Lo anterior permitió que la arteria se contrajera y se estabilizara la respuesta al estímulo exógeno. En la última sensibilización se probó la presencia de endotelio, al observar la respuesta vasorrelajante del tejido cuando se expuso a una solución de

carbacol ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Solo aquellos anillos con endotelio se relajan, no siendo así para aquellos en los que fue removido.



Figura 5. Cámara para órgano aislado. En esta imagen se muestra un anillo de aorta sostenido con dos ganchos de níquel-cromo; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión.

Posterior a la sensibilización del tejido se dio un lapso de 30 minutos para que el tejido se restableciera; durante este periodo se hicieron lavados cada 15 minutos con solución Krebs-Henseleit. Finalmente los anillos se ajustaron a 3g de tensión y se contrajeron con fenilefrina ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) hasta alcanzar la respuesta máxima. Una vez observada la respuesta a la fenilefrina, se procedió a la exposición de concentraciones crecientes de las diferentes fracciones del extracto clorofórmico de *J. spicigera*.



Figura 6. Equipo para órgano aislado. En esta imagen se observan las cámaras para órgano aislado y los transductores de tensión. Adicionalmente se observa el matraz balón de doble fondo que suministra la solución Krebs-Henseleit.

Las concentraciones de las fracciones estudiadas fueron de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 10, 30, 100 y 300mg. En la figura 7 se observan dos registros de dos anillos de aorta, el registro de color rojo es un anillo de aorta con endotelio, mientras que el registro de color azul es de un anillo de aorta al cual se le removió el endotelio. El punto 1 indica el último lavado después de estabilizar la aorta una vez montada. En el punto 2 se agrega fenilefrina ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) como parte de la sensibilización. Los puntos 3, 4 y 5 son lavados con solución Krebs – Henseleit con la finalidad de remover la fenilefrina. Los puntos 6 y 10 se hacen una 2a y 3a sensibilización respectivamente. De los puntos 7 – 9 son lavados posteriores a la adición de fenilefrina, El punto 11, previo al lavado, se le agregó carbacol ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) con el fin de comprobar la integridad del endotelio y del funcionamiento de la maquinaria vasorrelajante. En los puntos 12 al 14 se dan dos lavados continuos para remover cualquier sustancia presente. Una vez estabilizados los anillos, se adiciona fenilefrina  $1 \times 10^{-7}$  hasta la contracción máxima y se inicia la administración de la fracción del extracto clorofórmico que se desea estudiar (dosis crecientes hasta completar 1mg/mL).

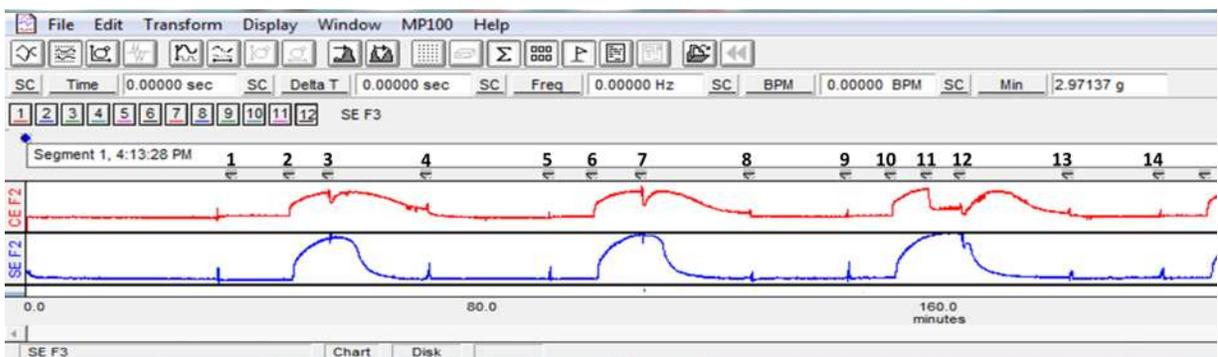


Figura 7. Ejemplo de un registro típico de contracción en respuesta a la fenilefrina en anillos de aorta con y sin endotelio.

#### 9.4.4. REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE VASORRELAJACIÓN

Fármacos utilizados: Fenilefrina y carbacol, adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones de estos fármacos fueron hechas en agua destilada.

Solución Krebs-Henseleit: Manitol, NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  adquiridos en J.T Baker. Dextrosa en Fermont.  $\text{NaHCO}_3$  en Mallinckrodt. EDTA en Reproquifin (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición de solución Krebs-Henseleit.

SUSTANCIA	1 L
Dextrosa	1.05g
$\text{NaHCO}_3$	2.1g
KCl	0.35g
$\text{MgSO}_4$	0.29g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.16g
Ca EDTA $\text{Na}_2$	0.01g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.37g
NaCl	6.9g

#### 9.5. EFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATAS HIPERTENSAS

##### 9.5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

El aislamiento de las mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Las ratas macho Wistar, tanto control como L-NAME, se sacrificaron por decapitación después del tiempo de tratamiento (3 h después de administrar 150mg/kg V.O. del extracto o el vehículo). Se extrajeron los riñones mediante una incisión en el abdomen; se colocaron en medio 1 (220 mM de

manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EGTA (ácido etilén glicol-bis(beta-aminoetil éter N, N', N'-tetraacético) y 2 mM de MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico), a un pH de 7.4). Todo el proceso de aislamiento se realizó a 4°C. Los riñones se cortaron en trozos pequeños y se lavaron 3 veces en medio 1. Posteriormente, se homogeneizaron a 1500 rpm en un tubo de vidrio con un vástago de teflón. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) durante 10 min a 4°C. Se desechó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 7500 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 2 mL de medio 2 (220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa y 2 mM de MOPS, a un pH de 7.4). Se le adicionaron 160 µL de albúmina de suero de bovino (10 mg/mL) y se dejó a 4°C por 10 min. Esta solución se colocó sobre un gradiente de Percoll al 20% v/v empleando el medio 2. Se centrifugó a 19300 rpm por 10 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en un volumen de 7 mL de medio 2, y por último se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min a 4° C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 1 mL del medio 2. Las mitocondrias se mantuvieron a 4° C hasta el momento de su utilización.

### **9.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MITOCONDRIAL**

La concentración de la proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen que tuviera una concentración de 1 mg/ml, que fue empleada en todos los experimentos, excepto donde se indique otra concentración.

### **9.5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL**

El óxido nítrico (NO) se determinó de acuerdo al método de Griess modificado y reportado por Green y col. (1982). Este método cuantifica de manera indirecta las concentraciones de NO. Este ensayo depende de la reacción de diazotización que

fue originalmente descrito por Griess en 1879. El reactivo de Griess se basa en la siguiente reacción química (Figura 8) el cual usa sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1- naftiletilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas para formar un compuesto azo colorido que se lee espectrofotométricamente a 546 nm.

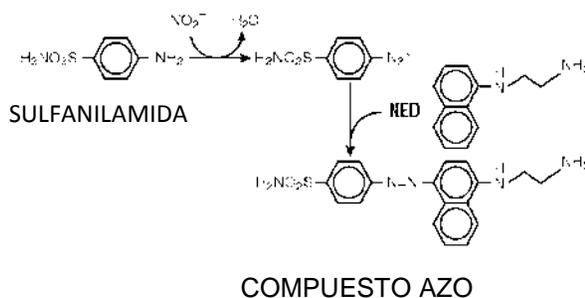


Figura 8. Reacción de diazotización para la detección de nitritos.

Las mitocondrias se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en una solución que contiene 220 mM de manitol, 10 mM de MOPS, 5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EGTA, a pH 7.4, con 10 mM de succinato y 2 μM de rotenona en un volumen final de 2 ml en agitación suave y constante. La reacción se detiene con la adición de ácido perclórico al 0.4%. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min y a 1500 μl del sobrenadante se le adicionan 100 μl del reactivo de Griess y se dejan incubar por 30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Pasado este tiempo se determinó la absorbencia a 546 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se corrió un blanco y un estándar de nitritos a una concentración de 8 μM. La concentración del NO se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{NO} = \frac{\text{(lectura del problema a 546 nm)} \text{ (estándar } 8 \mu\text{M)}}{\text{lectura del estándar a 546 nm}} = \mu\text{mol de NO}$$

#### **9.5.4. PERFIL DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES**

El perfil de nitrosilación se analizó mediante inmunodetección. Las proteínas mitocondriales se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 13%) de acuerdo al protocolo de Laemli y col. (1970). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) de acuerdo al protocolo descrito por Towbin y col. (1979). Las membranas con las proteínas transferidas se lavaron con TBST-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.6) y posteriormente se incubaron con TBS-T-gelatina (5%) por 1 h en agitación constante para bloquear sitios inespecíficos. Después de lavar con TBS-T, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-3NT de conejo (1:2000) (Molecular Probes) en TBS-T-gelatina por 1h con agitación constante y moderada. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T para remover el anticuerpo unido inespecíficamente y después se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de burro acoplado a peroxidasa (1:4000) (Santa Cruz Biotechnology) en TBS-T-gelatina (5%). La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia.

#### **9.5.5. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL**

Para la determinación de los niveles de lipoperoxidación, como medida indirecta del estrés oxidativo, se utilizó una modificación del método reportado por Buege y Aust (1978), para determinar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) entre las que se encuentra el malondialdehído (MDA), el principal producto de la lipoperoxidación.

La proteína mitocondrial se colocó en un tubo con buffer de fosfatos 0.15 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 7.0, con el propósito de prevenir interferencias debido a la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con alguno de los componentes del medio de aislamiento mitocondrial como el manitol o la sacarosa. Después de 30 min. en

agitación constante y a 37°C, se le adicionaron 2 ml de una solución ácida recién preparada que contenía TBA 0.02M, ácido tricloroacético 0.9 M y HCl 0.25N. Posteriormente, los tubos se sometieron a un calentamiento en baño de agua hirviendo y después de 15 min los tubos fueron enfriados en hielo para después centrifugarlos a 7500 rpm por 5 min. Se tomaron 1.5 ml del sobrenadante para determinar la absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 18. Para los cálculos se empleó el coeficiente de extinción molar para el malondialdehído ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Buege y Aust, 1978) y los resultados son expresados en nanomolas de TBARS/mg de proteína.

#### **9.5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba *t* de Student para determinar la significancia de la diferencia entre los valores promedio ( $p < 0.05$ ), respecto al control dentro de cada tratamiento.

## 10. RESULTADOS.

Los resultados de esta investigación se presentan por capítulos.

El capítulo uno corresponde a una revisión titulada: “**Plants used in traditional medicine with antidiabetic and hypertensive properties**”. 2013. Edgar R. Esquivel-Gutiérrez, Ruth Noriega-Cisneros, Alfredo Saavedra-Molina, Rafael Salgado-Garciglia.

La cual fue aprobada para su publicación en la revista *Pharmacology On Line\_PhOL* (PhOL\_2013\_2\_001N).

El capítulo dos corresponde a los resultados obtenidos de los objetivos 1 y 2:

1. Determinar el efecto antihipertensivo de diferentes extractos de *Justicia spicigera*.
2. Identificar los compuestos mayoritarios responsables del efecto antihipertensivo.

Estos resultados fueron publicados en el artículo: “**Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats**”. 2013. Edgar R. Esquivel-Gutiérrez, Ruth Noriega-Cisneros, Melchor Arellano-Plaza, Maximiliano Ibarra-Barajas, Rafael Salgado-Garciglia, Alfredo Saavedra-Molina. *Pharmacology On Line\_PhOL*, 2:99-106.

El capítulo tres corresponde a los resultados obtenidos en los objetivos 3 y 4:

1. Determinar el efecto vasorrelajante de las fracciones del extracto con mayor efecto antihipertensivo.
2. Determinar el efecto del extracto antihipertensivo sobre el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón.

## **CAPÍTULO 1.**

### **PLANTAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CON PROPIEDADES ANTIDIABÉTICAS Y ANTIHIPERTENSIVAS**

#### **Resumen**

La diabetes mellitus y la hipertensión arterial son enfermedades que se presentan con alto riesgo cardiovascular y las que más afectan a la mayor parte de la población mundial adulta en ambos sexos. En México, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad. La diabetes mellitus es la primera causa de muerte en mujeres y la cardiopatía isquémica se convierte en la primera causa de muerte en hombres; la hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad de la arteria coronaria y accidente vascular cerebral por lo que actualmente se encuentra dentro de las primeras diez causas de muerte a nivel mundial. Generalmente para el manejo terapéutico de ambas enfermedades se utilizan medicamentos con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, que tienen el propósito de normalizar los niveles de glucosa en sangre y disminuir las cifras de presión arterial. Los tratamientos son administrados de por vida, lo que representa muchas veces un alto costo económico. Por otra parte, la aparición de efectos adversos o reacciones de hipersensibilidad, son situaciones que obligan a suspender el tratamiento o cambiarlo constantemente. Con estos señalamientos resulta importante el desarrollo de nuevos agentes con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas, en donde las plantas medicinales son una opción. El interés científico dirigido a la búsqueda de fitoterapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades, ha llevado a la realización de investigaciones que validan el uso de plantas medicinales o han encontrado nuevos compuestos con estas propiedades. En México, en diversas instituciones educativas y de investigación reportan un gran número de plantas ampliamente utilizadas en la medicina tradicional y con un alto potencial para ser utilizadas en los tratamientos de la diabetes mellitus y la hipertensión.

# Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties

Edgar R. Esquivel-Gutiérrez, Ruth Noriega-Cisneros, Alfredo Saavedra-Molina, Rafael Salgado-Garciglia\*.

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, Ciudad Universitaria 58030, Morelia, Michoacán, México.

\*[rafael.salgadogarciglia@gmail.com](mailto:rafael.salgadogarciglia@gmail.com)

## Abstract

Diabetes mellitus and hypertension (high blood pressure) are the most common diseases with high risk affecting most of the worldwide adult population in both sexes. In Mexico, cardiovascular diseases are the first cause of morbidity and mortality. Diabetes mellitus is the first cause of death in women and ischemic heart disease becomes the leading cause of mortality in men; high blood pressure is one of the major risk factors for coronary artery disease and stroke, is currently among the ten leading causes of death worldwide. Generally, for the therapeutic management of both diseases is using multiple drugs with different chemical structures and different mechanisms of action, which aim to normalize blood glucose and blood pressure levels. These are managed for a long time, which often represents a high economic cost. On the other hand, some patients have no adherence to treatment as this one, is ineffective, the adverse effects are situations that require change or discontinue medication immediately. With these remarks it is important the developments of new antidiabetic or antihypertensive agents, the medicinal plants are an option. Scientific interest aimed at the search phytotherapeutic drugs for the treatment of these diseases has led the conduct of research that validates the use of medicinal plants, or they have found new agents with antidiabetic and antihypertensive properties. In Mexico, has been reported at educational institutions and research, a number of plants widely used in Mexican folk medicine, with high potential to be used in the treatment of diabetes mellitus and hypertension.

Key words: Medicinal plants, diabetes mellitus, hypertension, antidiabetic, antihypertensive

## Introduction

The ethnobotanical study is an important activity in the area of research and development of drugs since some reports claim that approximately 40% of pharmaceuticals consumed in developed countries come from natural sources, mainly from plants. In Mexico, most of the traditional knowledge that is about medicinal plants comes from pre-Hispanic times and different ethnic groups currently retain it. For more than 30 years has been the need to integrate traditional medicines within official systems to improve the quality of life of patients this for cultural and economic reasons (1).

The therapeutic effects of plants are due to the content of different secondary metabolites such as essential oils, tannins, phenolic acids, sesquiterpenolactones, ketones and flavonoids, among others (1). Among the plant secondary metabolites that are prescribed to patients that presents painful diseases and cancer, including taxol, active principle from *Taxus brevifolia* and *Taxus cuspidata*, a compound with anticancer activity (2); reserpine, synthesized by the species of *Rauwolfia serpentina* and *Rauwolfia vomitoria*, with antihypertensive activity and tranquilizer (3); and morphine and noscapine, the active compounds of *Papaver somniferum*, that are analgesic and antitumor, respectively (4, 5).

The main strategy developed to achieve the integration of folk medicines for disease treatments, has been the research in order to verify its effectiveness scientifically. In countries such as China, India and Thailand have been significant advances in the articulation of integrated models of health; while in some countries in Latin America like Mexico, Nicaragua and Brazil have interesting experiences with progress towards the integration of traditional medicines in modern medicine (6). Investigations in Mexico with medicinal plants have been developed from greatly in the last decade, indicative of the importance of the Mexican folk medicine.

Currently, the reports indicate the existence of scientific literature supporting the use of plants, extracts or their active compounds against various diseases such as diabetes, hypertension and cancer, or with antibacterial, antifungal, antiprotozoal, relaxing and sedative properties (1).

Diabetes mellitus and hypertension are two of the most important degenerative chronic diseases in Mexico, being the main cardiovascular risk factors, which tend to be frequently associated. Found that high blood pressure affects more than 20% of people in industrialized countries and diabetes is considered to be endocrine disease of higher incidence among the population (347 million worldwide) (6).

Diabetes and hypertension are not curable diseases, but with a control proper levels of glucose in the blood and in the normal values of blood pressure, can be avoided or help delay damages that occur in the body.

Both diabetes and high blood pressure are not curable diseases, however, with a control proper levels of blood glucose and in the normal values of blood pressure can be avoided or at least delay damage that occurs in the body (7). This can be achieved through changes in lifestyle (reduction of weight and physical exercise) or with pharmacological treatment.

Due to the high costs that may represent the treatment for both conditions, an alternative is the use of medicinal plants or active compounds derived from them, since they are considered safer and less expensive than allopathic, chemical synthesis-based treatments. The plants are an important source of biologically active substances, with great potential as drugs or as raw material for the pharmaceutical industry. The increase of the world population demand an increase of the sources of drugs, making it both developed and underdeveloped countries directed their efforts towards the evaluation and exploitation of the plants species, since the use of medicinal plants has increased as an alternative to the current health problems, especially in countries located in the tropics (8).

This paper describes some of the progress made in the last 12 years of scientific research conducted in our country, using medicinal plants in order to demonstrate their effectiveness to diabetes and hypertension.

### **A history of the use of medicinal plants in Mexico**

Mexico has a rich tradition in the use of medicinal plants among its several popular healing practices. The first book of Aztec medicinal herbs and one of the most important bibliographical historical sources in America in medicine, named "Book of the medicinal herbs of the

Indians", it knew four centuries later as Badiano Codex (de la Cruz-Badiano Codex), it is a work that describes more than 150 Mexico native plants that have medicinal use (9).

It is estimated that Mexican medicinal flora contains between 3,000 and 5,000 plants that have therapeutic potential. A total of 3,000 species has been compiled in an atlas of medicinal plants used by various ethnic groups. Incredibly, approximately 1% of medicinal plants have been studied thoroughly in its medicinal properties. Therefore, it is clear that must be more clinical and ethnobotany research, to determine scientifically the medicinal benefit of these plants (1, 10).

Although the reports indicate a large number of medicinal plants used in our country, the most used are: cudweed (*Gnaphalium* sp.), blue gum tree (*Eucalyptus globulus*), peppermint (*Mentha x piperita*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), indian fig (*Opuntia ficus-indica*), mexican arnica (*Heterotheca* sp.), trumpet tree or guarumo (*Cecropia obtusifolia*), vervain (*Verbena carolina*), yellow elder (*Tecoma stans*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), aloe vera (*Aloe vera*), rue (*Ruta graveolens*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), among others (11, 12).

#### **Medicinal plants as a source of drugs**

Currently, is the knowledge that many compounds derived from plants, whose pharmacological activity is important, are produced by additional metabolic pathways to primary metabolism, known as secondary metabolism by which these compounds are called secondary metabolites (13). Many of these metabolites, pure or mixtures possess various effects as stimulants, analgesics or therapeutic, are mostly used in the pharmaceutical, food and textile industries, in agrochemistry, perfumery and cosmetology (14).

The distribution of secondary metabolites in the plant Kingdom is very wide, it is estimated that about 50,000 plant species are used medicinally, of which only a 20% of them have been determined its medicinal properties (15).

Ethnobotanical knowledge is strongly linked to the cultural aspect and constitutes a particular indicator of population response to find cure for diseases. Recent works have reported that certain metabolites have pharmacological activity for the treatment of

gastrointestinal, skin, central nervous system, cardiovascular diseases, cancer and diabetes, among other (16).

#### **Diabetes and medicinal plants**

Diabetes mellitus is a metabolic syndrome that is characterized by hyperglycemia, which is caused by defects in the secretion and action of insulin (17). Chronic hyperglycemia is associated with damage, dysfunction and failure of various organs. It especially affects eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels. The diabetic patient presents 40 times risk greater than their lower limb amputation, 25 times higher risk of end-stage renal failure, 20 times more than blindness, 2 to 5 times higher between 2 and 3 times greater of acute myocardial infarction and cerebrovascular accidents (18). It has also increased susceptibility of developing hypertension, dyslipidemia and obesity (19).

This disease constitutes a serious public health problem, it is estimated that currently 347 million people in the world suffer from it and approximately 35% of the diabetic population comes from industrialized countries and 65% of them live in developing countries (6). In Mexico, about 10% of the population has diabetes mellitus and it is estimated that the 90% cases are type II. It occurs most frequently in older adults and in obese people, so it has become the leading cause of death with 12% of the total deaths (20).

There are currently various medical strategies for diabetes control, one of them is research aimed at obtaining new hypoglycemic drugs that can help control the disease. However, in our country and in other underdeveloped countries, a sector of the population does not have access to modern treatment of this disease, due to the economic and cultural limitations. For this reason, herbal medicine or natural medicine provides the alternative with equal effectiveness but fewer side effects that occur with synthetic drugs, as well as being a cheaper therapy (21).

Medicinal plants or extracts thereof can optimize glucose metabolism and diabetes management not only by hypoglycemic effects but also to improve the lipid profile, antioxidant and capillary function. More than 400 products from plants are commercialized for the treatment of diabetes worldwide (22).

According to Marles and Farnsworth (23, 24), the botanical families that contribute with more species with antidiabetic properties around the world are Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Liliaceae, Poaceae and Euphorbiaceae, among others. Among the most important are Cucurbitaceae (*Momordica charantia*), Apocynaceae (*Catharanthus roseus*), Anacardiaceae (*Anacardium occidentale*), Liliaceae (*Allium cepa*, *Allium sativum* and *Aloe vera*), Myrtaceae (*Syzygium cumini*), Bignoniaceae (*Tecoma stans*), Urticaceae (*Urtica dioica*), and Fabaceae (*Lupinus albus* and *Trigonella foenum-graecum*). More recently, has been established the antidiabetic or hypoglycemic effect of Musaceae (*Musa paradisiaca*) (25), Malvaceae (*Guazuma ulmifolia*) (26) and a Fabaceae (*Deguelia rufescens*) (27).

Research with plants is usually conducted in laboratory animals with type I or type II diabetes induction. Most of these are performed at the experimental level, 90% are acute effect studies and only 10% of them are clinical and toxicological studies. In these, only 10% are with chronic treatments, many of them targeting the biological determination in the medium term (28).

#### **Hypertension and medicinal plants**

In the seventh report of the Committee of the Board national about the prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (29), it is recommended to maintain values of arterial hypertension of < 140/90 mmHg for most patients and < 130/80 mmHg in patients with diabetes mellitus or kidney disease (30). High blood pressure affects approximately 26.4% of the adult population and between 60% and 70% people in the seventh decade of life (31). In Mexico, it is a disease very prevalent, because according to the national health and nutrition survey, for the year 2006 was presented at the 30.8% of the population older than 20, reporting that more than 50% of the men and 60% women over the age of 50 years they have it (32).

High blood pressure is a co-morbidity of extremely common in diabetics, affecting 20 to 60% of the population with diabetes mellitus. The prevalence of hypertension in diabetics is 1.5 to 3 times higher than in non-diabetics, so contributing to the development and progression of chronic disease complications. There is extensive epidemiological evidence that diabetics with high blood pressure have a higher risk of cardiovascular

disease, kidney failure and diabetic retinopathy (33). In studies with patients with moderate systolic hypertension and impaired glucose tolerance in fasting (in non-diabetics), has been shown that these presenting increased risk of mortality from cardiovascular disease (34).

Pharmacological treatments with drugs are based on the control of hypertension by different mechanisms, as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition, the use of type angiotensin receptor antagonists II (ARA II), thiazide type diuretics in low doses, calcium antagonists and  $\beta$ -blockers. In general, all of the available agents caused a reduction of about 10-15 mmHg in systolic blood pressure and 5-10 mm Hg in diastolic blood pressure (35).

Some of the plants with global importance antihypertensive activity are *Rauwolfia serpentina* (3), *Veratrum album* (36) and *Rhododendron molle* (37). Ajmalicine, reserpine and rescinnamine are antihypertensive metabolites, isolated from *R. serpentina*; the protoveratrin A and B are the active principles of *V. album*; and the romitoxina is the agent antihypertensive of *R. molle* (38).

#### **Research in Mexico with antidiabetic and antihypertensive plants**

Mexico has research centers and educational institutions such as the National Autonomous University of Mexico, the Autonomous University of the State of Mexico, the National Polytechnic Institute and others of the different states, which carry out research for the development of new herbal drugs. Through these works and an intensive program of drug tracking the selection of medicinal plants with therapeutic potential has been possible. Wild plants of our country, used in traditional medicine, have been evaluated to identify the major chemical components, to determine its pharmacological effects, the stability of its products and its clinical behavior, in order to find new compounds with medicinal properties or validate its folk medicinal use.

Some of these investigations have been conducted to evaluate the antidiabetic or antihypertensive effects of different plants growing in Mexico. Through the review of related publications, this work points out studies aimed at the determination of extracts or compounds

with pharmacological activity in the treatment of diabetes and hypertension. Below we describe research with Mexican plants with antidiabetic and antihypertensive effect.

#### **Plants with antidiabetic properties**

Ethnobotanical records in the Medicinal Herbarium of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) of plants used for the treatment of diabetes indicate more than 300 species corresponding to 70 families (39). Within the recommended plants is the nopal (*Opuntia joconostle*) (40), *Cecropia obtusifolia*, commonly known as guarumbo or chancarro (41, 42), *Guazuma ulmifolia*, commonly called guácima, guácimo or caulote (43), *Parmentiera aculeata* whose common name is cuajilote (44) and the thunderstrike (*Tecoma stans*) (45).

Table 1 describes some of the plants used in Mexican folk medicine that have been studied in the past 12 years in order to confirm the antidiabetic effect, through the application of extracts or active compounds. Studies are performed using *in vivo* and *in vitro* tests, mainly in animal normglycemic and hyperglycemic (rats, mice and rabbits). The induction of diabetes in animal experiments (insulin-dependent) is carried out with aloxan, streptozotocin, uric acid, dehydroascorbic acid, some quinolones, some salts of magnesium and hormones such as epinephrine, glucagon, ACTH, somatotropin and pituitary extract (46). They are also used such as Zucker rats genetically obese hyperglycemic animals *fa/fa* (47), yellow mouse KK (48) and spontaneous diabetes in mice of strain C57BLKs-jdbdb (49). Studies are carried out *in vitro* in Caco-2 cells, adipocytes and myocytes L6 (50).

#### **Plants with antihypertensive properties**

Different plants with antihypertensive properties are used in Mexican folk medicine, example of them are ternstroemia flowers (*Ternstroemia mutis*), passion flower (*Passiflora suberosa*) and white sapote (*Casimiroa edulis*) (1). Investigations of medicinal plants with properties antihypertensive in Mexico are scarce in comparison to those made with the antidiabetic plants, although from 2010 has increased the interest in studying this type of plants. Table 2 describes the results of research from 2005 to date, shows that between 2000 and 2005 investigations for this purpose is scarce. The results of these studies show that extracts or active principles of some plants used as antihypertensive,

present antihypertensive activity or they regulate mechanisms related to arterial blood pressure, such is the case of *Casimiroa edulis* (White sapote, Rutaceae), *Guazuma ulmifolia* (Guásima, Sterculiaceae), *Lepechinia caulescens* (Bretónica, Lamiaceae) and *Agastache mexicana* (Toronji, Lamiaceae). Also shown antihypertensive properties in the orchids *Laelia autumnalis* and *Laelia anceps* and in trees like *Jacaranda mimosaeifolia* (Jacaranda, Bignoniaceae) and *Cochlospermum vitifolium* (Pongolote, Cochlospermaceae).

To carry out the studies of the effect antihypertensive of plant extracts, or their active ingredients, *in vivo* and *in vitro* tests are used. Normotensive, spontaneously hypertensive (SHR) and hypertensive induced L-NAME (Nitro-L-arginine-methyl-Ester) rats are generally used in *in vivo* tests. The *in vitro* tests are performed in cell systems, tissues and isolated organs. Isolated aortic rings are used to determine the effect of extracts or compounds active on  $\alpha$ -receptor blockers, blockers of calcium channels, the beta receptor blockers, mechanisms dependent or independent of the vascular endothelium, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II antagonists (51, 52).

In our working group will carry out research with two plants used in Mexican folk medicine, *Eryngium carlinae* (grass of the toad, Apiaceae) and *Justicia spicigera* (muicle, Acanthaceae) to determine their antidiabetic and antihypertensive properties, respectively. *E. carlinae* inflorescences ethanol extracts in diabetic rats induced by streptozotocin have shown to have an antihyperlipidemic effect, showing the decrease in triglycerides and cholesterol (16). Different types of extracts derived from aerial parts of *Justicia spicigera* have been tested to determine the antihypertensive effect. The results show that chloroform extract has the ability to decrease the values of blood pressure in male hypertensive Wistar rats induced with L-NAME (unpublished data). Both investigations are carried out in order to determine the active principles as well as the mechanism of action.

#### **Conclusion**

The severity of diabetes mellitus and hypertension *per se*, as well as its complications and the global increase of the affected people motivate the research and search for new drugs that help control. Mexican ethnobotany offers the scientific study of plants used empirically to validate experimentally the effects.

## Acknowledgments

The authors appreciate the partial economic support from CIC-UMSNH (2.16 to ASM; 2.10 to RSG) grants and CONACYT (169093 to ASM). CONACYT for scholarship grant 17228 (EREG).

## References

1. Huerta C. La herbolaria: mito o realidad. CONABIO. Biodiversitas 1997; 12:1-7
2. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Amer Chem Soc 1971; 93:2325-2327
3. Vakil RJ. *Rauwolfia serpentina* in the treatment of high blood pressure: A review of the literature. Circulation 1955; 12:220-229
4. Duke JA. Utilization of papaver. Econ Bot 1973; 27:390-391
5. Bulduk B, Taktak F. Isolation and characterization of antitumor alkaloids from poppy capsules (*Papaver somniferum*). J Chem 2013; 2013: 1-4
6. OMS. *Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002- 2005*. Organización mundial de la salud, Ginebra, Suiza 2002. pp 65
7. Coca A, Aranda P, Marín R, et al. Hipertensión arterial y diabetes no insulino dependiente. En Casos Clínicos en Hipertensión Arterial 2000; pp. 101-106. 2o ed. Barcelona, España.
8. Hernández-Alonso D, Martínez-Cruz OL, Domínguez-Domínguez L, et al. Propuesta metodológica: Vinculación del programa farmacología I con la medicina natural tradicional, Perfil de servicios farmacéuticos. Rev Ciencias Médicas 2007; 11:1-8
9. Valverde J. The aztec herbal of 1552; Martín de la Cruz "Libellus de medicinalibus indorum herbis"; context of sources on nahuatl materia medica. Veroff Int Gesch Pharm 1984; 53:9-30
10. Lozoya, X. Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs. In *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley 1994.
11. Linares E, Bye R. Selección de plantas medicinales de México. Ed. Limusa, México 1990
12. Taddei-Bringas GA, Santillana-Macedo MA, Romero-Cancio JA, et al. Aceptación y uso de herbolario en medicina familiar. Salud Pública de México 1999; 41:216-220
13. Wink P. Addressing end-of-life issues: Spirituality and inner life. Generations 1999; 23:75-80
14. Hartmann T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochem 2007; 68:2831-2846
15. Soejarto DD, Fonga HHS, Tana GT, et al. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit sharing. J Ethnopharmacol 2005; 100:5-22
16. Noriega-Cisneros R, Ortiz-Ávila O, Esquivel-Gutiérrez E, et al. Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. Biochem Res Int 2012; 2012:1-5
17. ADA (American Diabetes Association). Standards of medical care for patients with Diabetes mellitus. Diabetes Care 2002; 25(1):213-229
18. Mann JI. Diet and risk of coronary heart disease and type 2 diabetes. Lancet 2002; 360:783-789
19. Klein S, Wadden T, Sugerman HJ. AGA technical review on obesity. Gastroenterology 2002; 123:882-932
20. Cabrera-Pivaral CE, Rivera-Clara E, Balderas-Peña LMA, et al. Aptitud clínica del médico familiar ante pacientes con diabetes gestacional. Ginecol Obstet Mex 2008; 76:97-106
21. Hunt LM, Arar NH, Akana LL. Herbs, prayer, and insulin: use of medicinal and alternative treatments by a group of Mexican American diabetes patients. J Fam Pract 2000; 49:216-223
22. Yeh G. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. Diabetes Care 2003; 26:1277-1294
23. Marles RJ, Farnsworth R. Plants as sources of antidiabetic agents. In Wagner H, Farnsworth NR (eds.), *Economic and medicinal plants research*. London Academic Press 1994; pp 42
24. Marles RJ, Farnsworth R. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine 1995; 2:137-189
25. Nahar N, Rokeya B, Ali L, et al. Effects of three medicinal plants on blood glucose levels of nondiabetic and diabetic model rats. Diab Res 2000; 35:41-49
26. Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA. The antidiabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam. are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. J Ethnopharmacol 2008; 118:252-256
27. Pereira AC, Arruda MSP, Da Silva EAS, et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and hypoglycemic effect of stilbenes from the Amazonian plant *Deguelia rufescens* var. Uruçu (Ducke) (Leguminosae). Planta Med 2012; 78:36-38
28. Alarcón-Aguilar FJ, Hernández-Galicia E, Román-Ramos R. Diabetes mellitus y plantas medicinales en México. En Rivas-Vilchis JF (ed.), *Anuario de investigación en etnomedicina, medicinas complementarias y utilización de plantas medicinales*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa 2008; pp. 27-39
29. JNC 7. The seventh report of the joint national committee on

prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, In JNC 7 Report (Chobanian AV, Bakris GL, Black HR). JAMA 2003; 289:2560-2571

30. Cheng JWM. Aliskiren: Renin inhibitor for hypertension management. Clin Therap 2008; 30:31-47

31. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, et al. XXY Klinefelter's syndrome patients. Hum. Reprod. Update 2003; 9:319-330

32. ENSANUT. Encuesta nacional de salud y nutrición 2006. México: Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) 2006.

33. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, et al. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American heart association. Circulation 1999; 100:1134-1146

34. Henry P, Thomas F, Benetos A, Guize L. Impaired fasting glucose, blood pressure and cardiovascular disease mortality. Hypertension 2002; 40:458-463

35. Sowers JR, Williams M, Epstein M, Bakris G. Hypertension in patients with diabetes. Strategies for drug therapy to reduce complications. Postgrad Med 2000; 107:47-60

36. Nash HA, Brooker RM. Hypotensive alkaloids from Veratrum album, protoveratrine A, protoveratrine B and germitetrine B. J Am Chem Soc 1952; 75:1942-1948

37. Mao HY, Tu YS, Nei FD, et al. Rapid antihypertensive effect of rhomotoxin in 105 hypertension cases. Chin Med J (Engl) 1981; 94(11):733-6

38. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environm. Health Perspect 2001; 101:69-75

39. Juárez-Flores BI. Diabetes mellitus y medicina tradicional. ciencia@sanluispotosí.mx 2006; 1:4

40. Sánchez VG, Figueroa SB. Distribution and variation of *Opuntia joconostle* Weber in the state of Zacatecas. Agric Geograp 1994; 20:69-78

41. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 2001; 78:145-154

42. Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García-Hernández B, et al. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Manrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetes. Phytomed. 2004; 11:561-566

43. Alarcón-Aguilar FJ, Román-Ramos R, Pérez-Gutiérrez S, et al. Study of the hypoglycemic effect of plants used as antidiabetics. J Ethnopharmacol 1998; 61:101-110

44. Pérez-Gutiérrez RM, Pérez C, Zavala MA, et al. Hypoglycemic effects of lactucin-8-O-methylacrylate of *Parmentiera edulis* fruit. J Ethnopharmacol 2000; 71:391-394

45. Lozoya-Meckes M, Mellado-Campos V. Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy? J Ethnopharmacol 1985; 14:1-9

46. Herold KC, Bloch TN, Vezys V, Sun Q. Diabetes induced with low doses of streptozotocin is mediated by V beta 8.2+ T-cells. Diabetes

1995; 44:354-359

47. Rosen P, Herberg L, Reinauer H, Toput B. Different types of postinsulin receptor defects contribute to insulin resistance in hearts of obese Zucker rats. Endocrinol 1986; 119:1285-1291

48. Basnet P, Kadota S, Shimizu M, et al. A potent hypoglycemic agent in streptozotocin (ST2)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. Planta Med 1994; 60:507-511

49. Kanamaru T, Shinagawa S, Asai M, et al. An antidiabetic P-aminobetaine derived from a novel fungal metabolite. Life Sci 1985; 37:217-223

50. Coman C, Rugina OD, Socaciu C. Plants and natural compounds with antidiabetic action. Not Bot Horticult Agrobiol 2012; 40:314-325

51. Massion PB, Balligand JL. Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. Curr Heart Fail Rep 2007; 4:18-25

52. Guerrero MF. Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos. Biomédica 2009; 29:547-557

53. Alarcón-Aguilar FJ, Jiménez M, Reyes R, et al. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* mice. J Ethnopharmacol 2000; 69:207-215

54. Pérez-Gutiérrez RM, Ramírez ELM, Vargas RS. Effect of *Cirsium pascuense* on blood glucose levels of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice. Phytotherapy Res 2001; 15:552-555

55. Pérez-Gutiérrez RM, Vargas RS. Triterpenes from *Agarista mexicana* as potential antidiabetic agents. Phytother Res 2002; 16:55-58

56. Garduño-Ramírez ML, Delgado G. New eremophilanoids from the roots of *Psacalium radulifolium* hypoglycemic, antihyperglycemic and anti-oxidant evaluations. J Mex Chem Soc 2003; 47:160-166

57. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Acosmium panamense* bark on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 2004; 90: 217-220

58. Guerrero-Analco JA, Hersch-Martínez P, Pedraza-Chaverri J, et al. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. Planta Med 2005; 71:1099-1105

59. Marroquín-Segura R, Flores MP, García MMB, et al. Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. Rev Mex Cs Farm 2003; 36:27-32

60. Cristians S, Guerrero-Analco JA, Pérez-Vásquez A, et al. Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. J Nat Prod 2009; 72:408-413

61. Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochem Pharmacol 2009; 78:54-61

62. Alonso-Castro AJ, Zapata-Bustos R, Romo-Yanez J, et al. The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. J

63. Pérez-Gutiérrez RM, Hoyo-Vadillo C. Actividad antidiabética de un extracto de hexano de *Prosthechea michuacana* en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. BLACMA 2011; 10:570-580

64. Rivera-Ramírez F, Escalona-Cardoso GN, Garduño-Siciliano L, et al. Antiobesity and hypoglycemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. J Biomed Biotechnol 2011; 1:1-6

65. Ávila-Acevedo JG, García-Bores AM, Martínez-Ramírez F, et al. Antihyperglycemic effect and genotoxicity of *Psittacanthus calyculatus* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. BLACMA 2012; 11:345-353

66. Lugo-Radillo A, Delgado-Enciso I, Peña-Beltrán E. Betanidin significantly reduces blood glucose levels in BALB/c mice fed with an atherogenic diet. Nat Prod Bioprospect 2012; 2:154-155

67. Nicasio P, Meckes M, Haro R, et al. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosaeifolia* leaves in rats. J Ethnopharmacol 2005; 97:301-304

68. Aguirre-Crespo FJ, Vergara-Galicia J, Villalobos-Molina R, et al. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. Life Sci 2006; 79:1062-1068

69. Magos AG, Mateos JC, Páez E, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. J Ethnopharmacol 2008; 117:58-68

70. Vergara-Galicia J, Ortiz-Andrade R, Rivera-Leyva J, et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. Fitoterapia 2010; 81:350-357

71. Lorenzana-Jiménez M, Magos-Guerrero GA, García-González X, et al. *Struthanthus venetus* (injerto o matapalo) planta potencialmente útil en terapéutica cardiovascular. Rev. Dig Univ 2009; 10:1-7

72. Vázquez-Cruz B, Vázquez-Muñoz M, Navarrete-Bastida R, et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of the aqueous extract of *Casimiroa edulis*. Pharmacologyonline 2009; 3:73-83

73. Sánchez-Salgado JC, Castillo-España P, Ibarra-Barajas M, et al. *Cochlospermum vitifolium* induces vasorelaxant and antihypertensive effects mainly by activation of NO/cGMP signaling pathway. J Ethnopharmacol 2010; 130:477-484

74. Perez YY, Jimenez-Ferrer E, Alonso D, et al. *Citrus limetta* leaves extract antagonizes the hypertensive effect of angiotensin II. J Ethnopharmacol 2010; 128:611-614

75. Jiménez-Ferrer E, Hernández-Badillo F, González-Cortazar M, et al. Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (*Lamiaceae*): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. J Ethnopharmacol 2010; 130:340-346

76. Estrada-Soto S, Navarrete-Vázquez G, León-Rivera I, et al. Antihypertensive effect of *Lepechinia caulescens* extract on spontaneously hypertensive rats. Phytopharmacol 2012; 2:170-178

Plant species (Part used)	Extracts or Active principles	Ref.
<i>Psacalium decompositum</i> (root)	Aqueous	(53)
<i>Parmentiera edulis</i> (fruit)	Chloroformic	(44)
<i>Cirsium pascuarens</i> (leaf)	Hexanic	(54)
<i>Bidens pilosa</i> (whole plant)	Aqueous-Ethanollic	(28)
<i>Salvia officinalis</i> (whole plant)	Aqueous-Ethanollic	(43)
<i>Cecropia obtusifolia</i> (leaf)	Chlorogenic acid	(41)
<i>Agarista mexicana</i> (stem)	12-ursene-dimethyl-ethyl-stigmastene	(55)
<i>Psacalium radulifolium</i> (root)	Methanolic	(56)
<i>Acosmium panamense</i> (bark)	Buthanolic	(57)
<i>Hintonia standleyana</i> (bark)	3-β-d-glucopyranosyl-23,24-dihydro-cucurbitacin F	(58)
<i>Colubrina elliptica</i> (bark)	Aqueous	(59)
<i>Hintonia standleyana</i> (leaf)	Phenyl-coumarin 1	(60)
<i>Hintonia latiflora</i> (leaf)	Phenyl-coumarin 2	
<i>Agastache mexicana</i> (aerial parts)	Tilianine	(61)
<i>Tecoma stans</i> (leaf)	Aqueous	(62)
<i>Teucrium cubense</i> (leaf and stem )	Aqueous	
<i>Prosthechea michuacana</i> (pseudobulb)	Hexanic	(63)
<i>Ibervillea sonora</i> (root)	Aqueous	(64)
<i>Psittacanthus calyculatus</i> (aerial parts)	Methanolic	(65)
<i>Hylocereus ocamponis</i> (fruit)	Betanidin	(66)

Table 1. Some medicinal plants of Mexico with antidiabetic properties over the period of 2000-2012 researches

<b>Plant species (Part used)</b>	<b>Extracts or Active principles</b>	<b>Assay methods</b>	<b>Ref.</b>
<i>Jacaranda mimosaeifolia</i> (leaf)	Aqueous-Ethanolic	Normotensive rats	(67)
<i>Lepechinia caulescens</i> (aerial parts)	Methanolic Ursolic acid	Aortic rings Wistar rats	(68)
<i>Guazuma ulmifolia</i> (bark)	Procianidine fraction	L-NAME rats	(69)
<i>Laelia autumnalis</i> (aerial parts)	Methanolic	Aortic rings SHR rats	(70)
<i>Struthanthus venetus</i> (leaf)	Aqueous-Methanolic	Aortic rings Wistar rats	(71)
<i>Casimiroa edulis</i> (leaf)	Aqueous	Angiotensin II in L-NAME rats	(72)
<i>Agastache mexicana</i> (aerial parts)	Tilianine	SHR rats	(61)
<i>Cochlospermum vitifolium</i> (bark)	Methanolic	SHR rats	(73)
<i>Citrus limetta</i> (leaf)	Aqueous	Angiotensin II in mice	(74)
<i>Salvia elegans</i> (whole plant)	Aqueous-Ethanolic	Angiotensin II in mice	(75)
<i>Laelia anceps</i> (roots)	Methanolic	SHR rats	(70)
<i>Lepechinia caulescens</i> (aerial part)	Methanolic	SHR rats	(76)

Table 2. Mexican medicinal plants with antihypertensive properties over the period 2005-2012 researches

## CAPÍTULO 2

### EFFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE *justicia spicigera* EN RATAS HIPERTENSAS INDUCIDAS CON L-NAME

#### Resumen

Los desórdenes cardiovasculares de la hipertensión son una de las principales enfermedades no comunicables en el mundo, y es responsable de más del 80% de las muertes en los países en vías de desarrollo. *J. spicigera* (muicle) es una planta usada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de varios desordenes, incluyendo a la hipertensión. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos sobre la presión sanguínea de los diferentes extractos obtenidos de partes aéreas de muicle (Acantácea). A la fecha, no existen reportes de que *J. spicigera* haya sido validada con esta finalidad. Para el propósito de este estudio, los extractos fueron administrados en ratas macho Wistar hipertensas inducidas con L-NAME. Los resultados muestran que los extractos hexánicos y metanólicos no muestran un efecto sobre la presión arterial y el extracto acuoso solo logra disminuir la presión arterial diastólica (de 163/148±6.65/6.64 mmHg a 156/128± 11.8/4.51 mmHg) en las ratas hipertensas, pero no en las normotensas. Sin embargo, el extracto clorofórmico baja la presión arterial (139/123±4.9/2.5 mmHg) a valores similares a los normotensos (111/97±1.1/1.5 mmHg). Los extractos no tuvieron ningún efecto sobre los animales control y el vehículo no modifica la presión arterial en ninguno de los animales. Finalmente, el extracto clorofórmico de partes aéreas de *J. spicigera* fue analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para identificar y cuantificar el perfil de flavonoides, como principales compuestos bioactivos. Los resultados muestran la presencia de tres flavonoides identificados como hesperidina, naringenina y kaempferol, metabolitos que pueden ser los responsables del efecto antihipertensivo de *J. spicigera*.

## Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats

Esquivel-Gutiérrez, E.R.<sup>1</sup>; Noriega-Cisneros, R.<sup>1</sup>; Arellano-Plaza, M.<sup>1</sup>; Ibarra-Barajas, M.<sup>2</sup>; Salgado-Garciglia, R.<sup>1</sup>; Saavedra-Molina, A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, 58030, México.

<sup>2</sup>FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Edo. de México 54090, México.

\*[saavedra@umich.mx](mailto:saavedra@umich.mx)

### Abstract

The cardiovascular disorder of hypertension is one of the main non-communicable diseases worldwide, and is responsible for over 80% of the deaths in low- and middle-income countries. *Justicia spicigera* (muicle) is a plant used in Mexican traditional medicine for the treatment of various disorders, including hypertension. The principle aim of this work was to evaluate the effects on blood pressure of different extracts taken from the aerial parts of the muicle plant *Justicia spicigera* (Acanthaceae). To the best of our knowledge there are no such previous reports. For the purpose of this study, the extracts were applied in hypertensive L-NAME Wistar rats. The results show that hexane and methanol extracts did not lower blood pressure and the aqueous extract only decreased the diastolic blood pressure (from 163/148±6.65/6.64mmHg to 156/128±11.8/4.51 mmHg) in the hypertensive rats, but not in the normotensive animals. However, the chloroform extract lowered the arterial blood pressure (180/164±1.7/3.2 mmHg) to values similar to those of the normotensive rats (149/133±4.0/3.7 mmHg). The extracts had no effect on the control animals and the vehicles did not modify arterial blood pressure in any of the animals. Finally, the chloroform extract of aerial parts of *J. spicigera* was further analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify major bioactive flavonoid compounds profile. As revealed by the results, the chloroform extract yielded three major flavonoid compounds, identified as hesperidin, naringenin and kaempferol, metabolites that could be responsible of antihypertensive effects of *J. spicigera*.

Key words: Hypertension, blood pressure, *Justicia spicigera*, alternative medicine, flavonoids

## Introduction

High blood pressure, also called hypertension, is a condition that afflicts almost 1 billion people worldwide, and is a leading cause of morbidity and mortality<sup>28,30</sup>. It also represents a major risk factor for developing other diseases such as endothelial dysfunction, metabolic syndrome, diabetes, congestive heart failure, coronary artery disease, stroke and renal dysfunction<sup>29</sup>. In fact, in México 30.8% of individuals that are 20 years of age have hypertension; in other words, 17 million adults. More than both 50% of men and 60% of women over 60 years of age have hypertension and epidemiological studies have demonstrated that cardiovascular diseases are the principal cause of death in almost all countries, including Mexico (Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, 2012)<sup>14</sup>. Modern hypertension treatment is costly for many people in developing countries, and such medical expenses represent an additional burden<sup>30</sup>. This population often relies on the alternative therapy of medicinal plants for the treatment of various disorders.

Hypertension treatment has been shown to prevent cardiovascular diseases, extending and enhancing life, but its inadequate management is widespread<sup>30</sup>. The World Health Organization estimates that more than 80% of people use traditional medicine, mainly plants, to treat the primary diseases, and about 85% of traditional medicine involves the use of plant extracts<sup>31</sup>. In Mexico, it is a common practice in the indigenous communities and correlates with the diversity of plants and the ethno-medical knowledge of the Mesoamericans. Notwithstanding, on a worldwide level, chemical validation of the pharmacological effects on biomedical practices has only been carried out in approximately 5% of the vegetable species<sup>13</sup>.

Muicle (*Justicia spicigera*), or Mexican honeysuckle, is a medicinal plant that belongs to the Acanthaceae family and is used in Mexican traditional medicine for the treatment of various disorders, including hypertension. This family comprises *Justicia*, an important genus in medicine that has species with significant biological activity such as *J.*

*secunda* Vahl, *J. procumbens* Linn, *J. pectoralis* Jacq, *J. simplex* Vahl, and *J. insularis*. All of these species synthesize types of cytotoxic molecules, justicidine A and B have anti-leukemic and analgesic activity and prostadiladine A, B and C produce antidepressive action<sup>12,17,18</sup>. Muicle is a native Mexican plant that is used as a blood tonic, a stimulant and as anti-dysentery, anti-inflammatory, and antispasmodic agents. It also provides relief in menstrual disorders, anemia, nervousness, insomnia, bronchitis, intestinal disorders that include nausea, diarrhea and vomiting, and it is used to treat cancer and kidney infections. The aerial parts of *Justicia spicigera* are used in Mexican traditional medicine<sup>12,4</sup>.

*Justicia spicigera* appears to have a broad range of molecules that modify cell function and some studies have reported on its antioxidant activity, total phenolic content, and total flavonoid content in the stem, leaves and flowers. Two types of extracts have been used; aqueous extract and methanol, and the results suggest that muicle is a rich source of antioxidants, which lends support to its use as an anti-inflammatory agent against various free radical-related disorders<sup>26</sup>.

Therefore, we studied the acute effects of muicle extracts on blood pressure in L-NAME hypertensive rats. Accordingly, we were able to address whether or not the extracts (hexane, chloroform, methanol or aqueous extract) had an effect on blood pressure. The metabolites that could be responsible of antihypertensive effects of *J. spicigera* as well were studied.

## Material and Methods

### Animals

We divided male Wistar rats (200-250g) into 12 groups of 3-5 rats each. 1 Control, 2 Control + Vehicle (DMSO 0.5%), 3 Control + Hexane extract, 4 Control + Chloroform extract, 5 Control + Methanol extract, 6 Control + Aqueous extract, 7 L-NAME, 8 L-NAME + Vehicle, 9 L-NAME + Hexane extract, 10 L-NAME + Chloroform extract, 11 L-NAME + Methanol extract and 12 L-NAME + Aqueous extract. All of

them had free access to tap water and food.

#### **L-NAME rats**

Male Wistar rats were used and maintained under standard laboratory conditions with free access to food and water. All animal procedures were conducted in accordance with the Mexican Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México) and were approved by the Institutional Committee of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, for the Use and Care of Animals.

Experimental hypertension was induced by chronic administration of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in the drinking water (75 mg/kg/day) over a period of 18 days. All the extracts were administered by orally through oropharyngeal probe using a single dose (150 mg/kg/w) and the blood pressure was measured 3 h after. Blood pressure was measured by tail cuff plethysmography using an LE 5007 automatic blood pressure recorder (Letica, PanLab, Barcelona Spain).

#### **Plant material and extraction**

*Justicia spicigera* aerial parts were collected in October 2009 in El Letrero, Michoacán, México. Voucher specimen (No. HFB11JS) has been deposited in the Herbarium of the Biology Faculty, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Briefly, the dried plant material was pulverized and extracts were prepared by successive maceration with hexane, chloroform, methanol and aqueous extract (5 days at room temperature), adding 10 mL of solvent per 1 g of plant material. After filtration, the extracts were evaporated to dryness in rotary evaporator with reduced pressure at 40°C and dissolved in DMSO (0.5%) to a final concentration of 150 mg/mL. The extracts were stored at 4°C until use. Table 1 shows yield quantities of different treatments.

#### **HPLC analysis**

An aliquot (1 mL) of chloroform extract was filtered through a small column of C18 silica (55-105 mm, 0.50 g) and the column eluted with 9 mL of

methanol. The volume of the eluent was completed to 10 mL to obtain a concentration of 1 mg/mL, 20 µL of this solution was injected to HPLC analysis.

The analysis was achieved by RP-HPLC (Agilent Technologies Model 1200) (Palo Alto, CA, USA) apparatus equipped with an autosampler G1329C, a pump G1312A, a diode array detector G1315B and an analytical C18 column Zorbax Eclipse XDB (150 X 4.6 mm, 5 µm i.d.), at constant temperature (25°C) and at 1 mL/min flow rate. The mobile phase consisted of methanol/acetonitrile/water (40:15:45) (v/v) with acetic acid 1% under isocratic conditions. The chromatograms were recorded at 282 nm to hesperidin, quercetin and naringenin<sup>25</sup> and at 368 nm to kaempferol<sup>24</sup>.

The standards of hesperidin, kaempferol, naringenin and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, México). All HPLC grade solvents were purchased from Merck (México City, México). The calibration curves were constructed for each flavonoid in the range of sample quantity 0.01 – 10 µg.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis and graphs were made using the software Graph Pad Prism 5.01 software (San Diego, California, USA). The results were arithmetic averages of individual values assigned to the standard error of the mean ( $m \pm SE$ ). Differences were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

#### **Results and Discussion**

L-NAME ingestion caused a large rise in the resting mean arterial pressure (MAP) ( $175 \pm 5$  mm Hg) and heart rate (HR) ( $440 \pm 17$  beats per minute) compared with the untreated control rats (resting MAP:  $112 \pm 2$  mm Hg and HR:  $345 \pm 8$  beats per minute) when the dose was high (100mg/kg/day)<sup>7</sup>. Tail-cuff pressure rose progressively in the L-NAME rats (60-70 mg-100 ml<sup>-1</sup>), reaching  $168 \pm 7$  mmHg by treatment day 30, compared with  $108 \pm 5$  mmHg in the untreated controls ( $p < 0.05$ )<sup>9</sup>. The hypertension

model of chronic L-NAME administration is characterized by endothelial dysfunction, thereby causing vasoconstriction<sup>4</sup>. It also affects the glomerular filtration rate<sup>34</sup> and activation of the renin angiotensin system<sup>35</sup>, which are features that are also described in primary hypertension in humans. Furthermore, this model is characterized by the development of cardiac hypertrophy and renal damage. In the present study using a single dose (150 mg/kg/w), we evaluated the antihypertensive effect of *Justicia spicigera* (muicle) in a rat model of hypertension, L-NAME rats. There are no studies about the toxicity of muicle, even though, the limited dose generally accepted is 1000 mg/kg in rodents (National Centre for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research), but previous reported the use of less than 500 mg/kg to evaluate antihypertensive effects<sup>33</sup>. Also, it was decided to measure blood pressure 3 h later because we wanted to avoid pressure variations due to stress generated when extracts were administered. Besides, taking into account that *Justicia spicigera* contains flavonoids and these have been involved in lowering blood pressure in a dose-dependent manner and its effect persists up to 12 h<sup>33</sup>.

In Mexican traditional medicine, *Justicia spicigera* plant leaves have been used in the treatment of circulation-related disorders<sup>21</sup>. The whole plant and its aerial parts are typically used in folk medicine. In this context, the aerial parts (stem, flowers and leaves) of the muicle plant were employed to obtain four extracts (hexane, chloroform, methanol and aqueous extract) in order to determine if any of them modified blood pressure.

In our results we found that chloroform extract showed the best effect antihypertensive effect; it lowered the blood pressure in L-NAME rats that had values of 180/164 ± 1.7/3.2 mmHg (systolic/diastolic) to values of 149/133 ± 4.0/3.7 mmHg (systolic/diastolic) with  $P < 0.05$  (Figure 1). Because blood pressure values vary markedly within 24 hours due to day-night changes, and there can also be variations at different hours, minutes, and even in adjacent heart beats<sup>15</sup>, all measurements were

carried out at the same hour. The control animals were treated with the vehicle and extract under the same conditions as the L-NAME rats, and blood pressure was not affected (Figure 2).

No changes were observed in the blood pressure of the L-NAME rats treated with hexane or methanol extracts (data not shown) and the aqueous extracts only modified diastolic blood pressure, going from values of 148 ± 6.6 mmHg (diastolic) to 128 ± 4.5 (diastolic) (Figure 3). Data from overviews suggest that a 2 mmHg reduction in diastolic blood pressure would result in an important decrease in the prevalence of hypertension and the risk of stroke.

The healing properties of plants are known to be associated with the production of secondary metabolites, highly active compounds that give them the ability to interact with their environment<sup>6</sup>. Different mechanisms regulate blood pressure and the secondary metabolites from plants have the potential to modify cell biology; the following are some examples: the effects of methanol extracts from *Laelia anceps* were mediated by calcium-channel antagonism<sup>29</sup>, aqueous avocado seed extract (*Persea americana* Mill.) reduced blood pressure and heart rate of Sprague-Dawley rats<sup>2</sup>, and there are others plants whose metabolites have been identified like tilianin, isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening<sup>13</sup>. The chloroform extracts of different plants has been used in hypertensive models to clarify the vasorelaxant effects such as *Kaempferia galanga* (Zingiberaceae)<sup>16</sup>, *Muntingia calabura* (Tiliaceae)<sup>27</sup> and *Spilanthes acmella* (Asteraceae)<sup>22</sup>.

The HPLC chromatogram from *J. spicigera* chloroform extract showed three major peaks with retention times (tR) of 1.88, 3.9 and 5.3 min, each peak corresponded to a single component, and were identified as hesperidin, naringenin and kaempferol, respectively (Figure 4). Those were corresponding with tR of standard flavonoids (Figure 5). The quercetin flavonoid (tR=2.16) was not of the major compounds present in the *J.*

*spicigera* extract. The quantification using a standard curve showed a greater amount of hesperidin (1.8 mg/g dry weight plant), followed by naringenin (0.06 mg/g dry weight plant) and of kaempferol (0.003 mg/g dry weight plant).

Flavonoids had been reported to possess hypotensive and vasodilator action  $Ca^{2+}$  antagonism<sup>11,22</sup>. As well, flavonoids appear to be a potential candidate as antihypertensive compounds, since these compounds are known to exert NO-dependent vasorelaxation<sup>8</sup>. A number of flavonoids have been reported to dilate vascular smooth muscle and then reduce blood pressure in various animal models of hypertension<sup>5-9</sup>. The oral administration of hesperidin<sup>10</sup>, and quercetin<sup>8</sup> has been shown to exert potent antihypertensive effects.

Our observations of a hypotensive effect of *J. spicigera* provide evidences for potential therapeutic applications of this plant extract, and that the antihypertensive effect could be due to flavonoids.

### Conclusions

This is the first time the effect of *Justicia spicigera* on blood pressure, a characteristic of hypertension, has been demonstrated *in vivo*. The chloroform extract had a potential antihypertensive effect due to the presence of three flavonoids, metabolites with antihypertensive properties, justifying the traditional use of this plant in hypertension treatment. Further studies are needed to determine the pharmacological profile. However, it should be stressed that the results cannot be extrapolated to humans or replace the current hypertension drug therapy.

### Acknowledgments

This study was financed by grants from the CIC-UMSNH-RSG2012, CIC-UMSNH 2012 (2.16) to ASM and CONACYT to ASM (169093). The authors wish to express their gratitude to the CONACYT for scholarship grant 17228 (EREG). We thank to Yolanda Rodríguez-Aza for her assistance with the

HPLC quantification.

### References

- Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, Domínguez F, et al. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schitdl (Acanthaceae). *J Ethnopharm* 2012; 141:888-894
- Anaka ON, Ozula RI, Okpo SO. Effect of the aqueous seed extract of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) on the blood pressure of sprague-dawley rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2009; 3:485-490
- Baylis C, Harton P, Engels K. Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1:875-881
- Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 112:78-281
- Bematova I, Pechanova O, Babal P, et al. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol* 2002; 282:H942-H948
- Croteau R, Kutcher TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan W, Gruissem W, Jones R. (Eds.) 2002; pp 1250-1318
- Cunha RS, Cabral AM, Vasquez EC. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens* 1993; 6:806-809
- Duarte J, Pérez-Vizcaíño F, Jiménez J, et al. Flavonoids and cardiovascular diseases. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-Ur-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam 2001; 25(part F):565-605
- Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, et al. *J Hypertens* 2002; 20:1843-854
- Galati EM, Trovato A, Kirjavainen S, et al. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmacol* 1996; 5:1219-221
- Ghayur MN, Khan NH, Gilani AH. Antispasmodic bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoids. *Arch Pharm Res* 2007; 30:970-975
- Ghosal S, Banerjee S, Srivastava RS. Simplexolin a new lignan from *Justicia simplex*. *Phytochem* 1979; 18:503-505
- Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León Rivera I, et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol* 2009; 78:54-61
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al. Global burden of hypertension: analysis of world wide data. *Lancet* 2005; 365:217-223
- Mancia G. Short- and long-term blood pressure variability. Present and future. *Hypertension* 2012; 60:512-517
- Mustafa MR, Mustafa AM, Hashim S. Vasorelaxant effects of the chloroform extract of *Kaempferia galanga* on smooth muscles of the rat aorta. *Asia Pac J Pharm* 1996; 11:97-101
- Okigawa M, Maeda T, Kawano N. Isolation and structure of three new lignans from *Justicia procumbens* var. *leucantha*. *Tetrahedron* 1970; 26:4301-4305
- Okigawa M, Maeda T, Kawano N. Isolation of neojustin from *Justicia procumbens* var. *leucantha*. *Chem Pharmaceut Bull* 1970; 18:862-863

19. Oliveira RM, Antunes E, De Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20:298-303
20. Parra-Carrillo JZ, Verdejo-Paris J, Lemus-Carmona EA, Saucedo Sánchez N. Costo-efectividad del tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial sistémica. *Rev Mex Cardiol* 2009; 20:141-148
21. Pérez-Ortega G, González-Trujano ME. Evaluación del efecto ansiolítico-sedante de *Justicia spicigera* Schltld., planta medicinal del estado de Morelos. *Rev Latinoamericana Quím* 2012; 39:214
22. Pietta P. Flavonoids in medicinal plants. In: *Flavonoids in health and disease* (Rive-Evans CV, Packer L, Eds), New York, Marcel Dekker, 1998; pp 61-110
23. Piotrkowski B, Fraga CG, De Cavanagh EMV. Mitochondrial function and nitric oxide metabolism are modified by enalapril treatment in rat kidney. *Am J Physiol* 2007; 292:R1494-R1501
24. Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, De la Mora-De la Mora JI, et al. Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proc West Pharmacol Soc* 2001; 44:151-152
25. Rojas-Llanez P, Perea-Villamil A, Ortiz-López C. Determinación por HPLC de flavononas en jugos cítricos de variedades cultivadas en Santander. *Sci Tech* 2007; 33:293-294
26. Sepúlveda-Jiménez G, Reyna-Aquino C, Chaires-Martínez L, et al. Antioxidant activity and content of phenolic and flavonoids from *Justicia spicigera*. *J Biol Sci* 2009; 9:629-632
27. Shih CD, Chen JJ, Lee HH. Activation of nitric oxide signaling pathway mediates hypotensive effect of *Muntingia calabura* L. (Tiliaceae) leaf extract. *Am J Chinese Med* 2006; 34:857-872
28. Talha J, Priyanke M, Akanksha A. Hypertension and herbal plants. *Intl Res J Pharm* 2011; 2:26-30
29. Vergara-Galicia J, Ortiz-Andrade R, Rivera-Leyva J, et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of metabolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia* 2010; 81:350-357
30. WHO (2012) Hypertension guidelines [www.who.org](http://www.who.org)
31. WHO (2012) The global importance of plant-derived drugs [www.who.org](http://www.who.org)
32. Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya S, et al. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int J Mol Sci* 2008; 9:2724-2744
33. Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54:95-98
34. Zu YG, Fu YJ, Liu W, et al. Simultaneous determination of four flavonoids in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) leaves using RP-LC-DAD. *Chrom* 2006; 63:499-505

Extract	Dry matter (g)	Extract (g)	% Yield
Hexane	75	1.41	1.88
Chloroform	75	0.728	0.97
Methanol	75	5.950	7.92
Aqueous	75	12.254	16.33

Table 1: Yield quantities under different treatments.

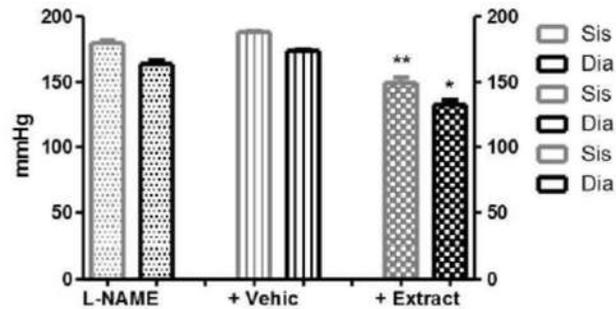


Figure 1. Effects of chloroform extract (150 mg/kg/w) on blood pressure L-NAME-rats. Blood pressure was measured 3 h after administration orally through oropharyngeal probe. Vehicle (Vehic) employed was DMSO 0.5%. The results show the mean (n=5) and SE with P values 0.008 (systolic, Sys,\*\*) and 0.0184 (diastolic, Dia,\*) compared with hypertensive animals. DMSO 0.5 % does not modify the blood pressure.

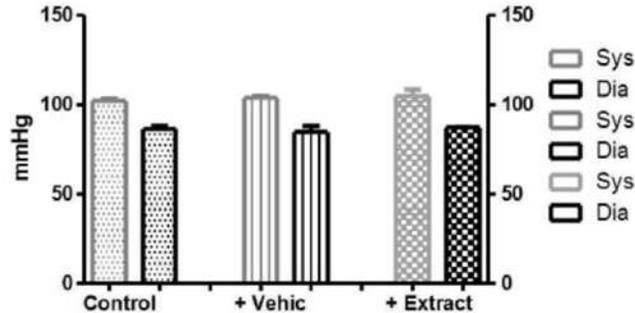


Figure 2. Effects of chloroform extract (150 mg/kg/w) on blood pressure control rats. Blood pressure was measured 3 h after administration orally through oropharyngeal probe. Vehicle (Vehic) employed was DMSO 0.5%. The results show the mean (n=5) and SE. Diastolic (Dia); Systolic (Sys). There were no significant differences between control rats and treated with vehicle or extract

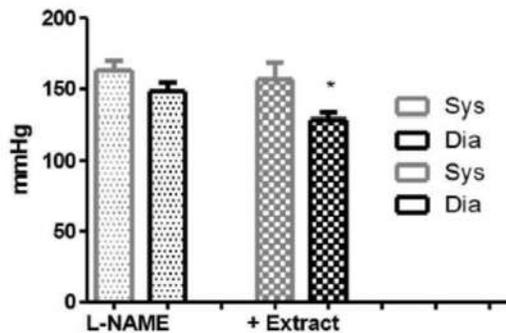


Figure 3. Effect of aqueous extract (150 mg/kg/w) on blood pressure L-NAME-rats. Blood pressure was measured 3 h after administration through orally oropharyngeal probe. Vehicle employed was water. The results show the mean (n=5) and SE with P values 0.0145 (\*) (diastolic, Dia) blood pressure compared with diastolic blood pressure in hypertensive animals. There were no significant differences between systolic blood pressure L-NAME-rats and systolic (Sys) blood pressure treated with extract. Water does not modify the blood pressure.

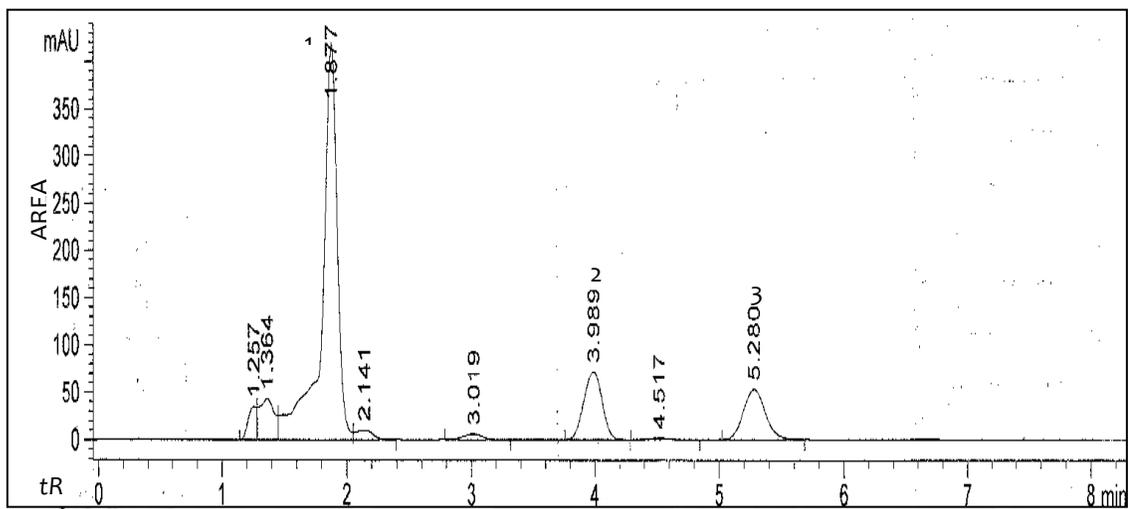


Figure 4. Flavonoids in HPLC chromatogram of chloroform extract of *J. spicigera*: (1) Hesperidin (tR=1.877), (2) Naringenin (tR=3.989) and (3) Kaempferol (tR=5.280).

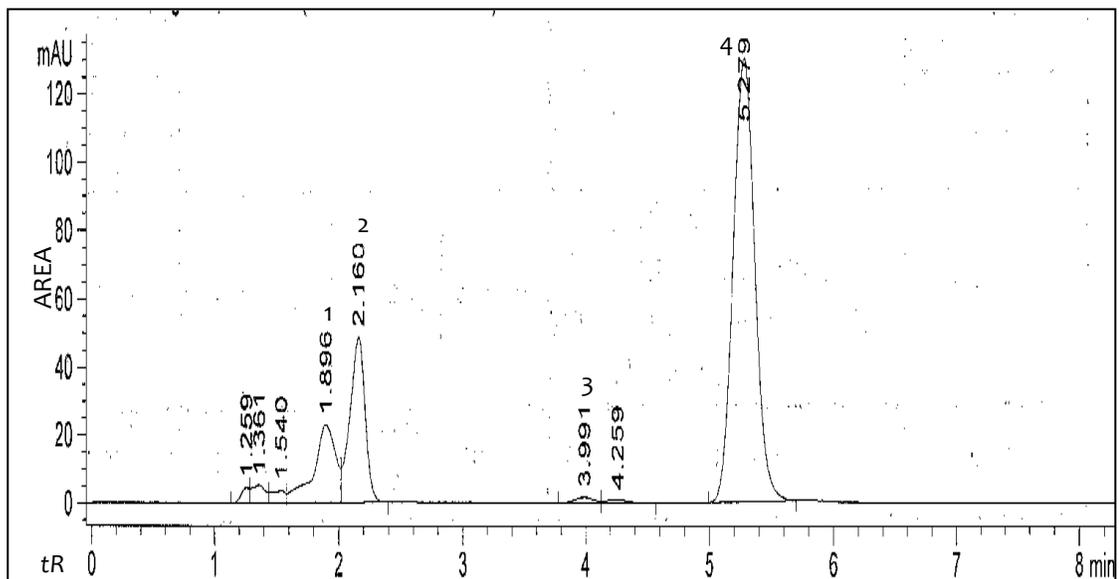


Figure 5. Chromatogram of four flavonoids standards: 1) Hesperidin (tR=1.896); 2) Quercetin (tR=2.160); 3) Naringenin (tR=3.991) and 4) Kaempferol (tR=5.279).

## **RESULTADOS NO MOSTRADOS DEL OBJETIVO 1 EN EL ARTÍCULO “Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats”**

Los datos no mostrados corresponden al efecto del extracto hexánico y metanólico de *J. spicigera*, los cuales se resumen en las siguientes figuras:

A fin de investigar si *J. spicigera* posee la capacidad de disminuir la PA, partes aéreas de esta planta medicinal fueron fraccionadas como se indica en materiales y métodos. Los extractos de hexano, cloroformo, metanol y agua se administraron a ratas hipertensas inducidas con L-NAME. 150 mg/kg de peso de cada uno de los extractos fueron administrados en una sola dosis por V.O a través de una sonda orogástrica y 3 h después la PA fue medida. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso, solo disminuye la PAD. Sin embargo, el extracto clorofórmico posee la capacidad de disminuir tanto a la PAS como a la PAD por lo que los efectos antihipertensivos de *J. spicigera* se atribuyen a los compuestos presentes en esta fracción. Los extractos hexánico y metanólico no mostraron tener efecto sobre la PA en ninguno de los grupos de animales (control y L-NAME). En la figura 9 se muestran los resultados del efecto del extracto metanólico de *J. spicigera* sobre la presión arterial en ratas normotensas. Este extracto no modifica la PA en los animales control. Este mismo ensayo se realizó en animales hipertensos a fin de determinar si esta fracción de *J. spicigera* pudiera tener la actividad antihipertensiva (Figura 10). Los resultados obtenidos demuestran que la PA no disminuye por lo que el efecto antihipertensivo de muicle no se atribuye a los componentes químicos de este extracto. El vehículo empleado (DMSO 0.5%) no modifica la PA.

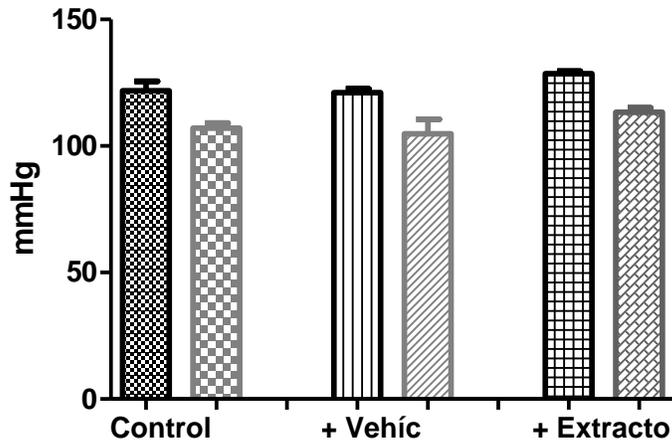


Figura 9. Efecto del extracto metanólico de *J. spicigera* sobre la presión arterial en ratas normotensas. La PA fue medida 3 h después de la administración de una sola dosis del extracto (150mg/kg) a través de una sonda orogástrica. Los resultados muestran la media (n=3) y el SEM con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras negras indican la PAS y las barras grises la PAD.

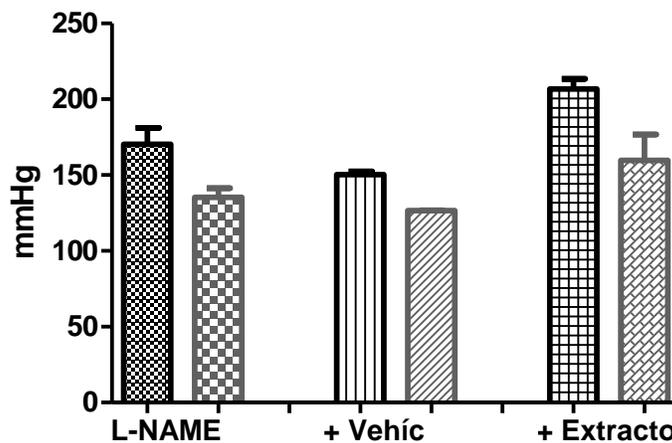


Figura 10. Efecto del extracto metanólico de *J. spicigera* sobre la presión arterial en ratas hipertensas. La PA fue medida 3 h después de la administración de una sola dosis del extracto (150mg/kg) a través de una sonda orogástrica. Los resultados muestran la media (n=3) y el SEM con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras negras indican la PAS y las barras grises la PAD.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos del extracto hexánico de *J. spicigera* probado en animales normotensos. Los resultados obtenidos no muestran modificaciones a la PA en los animales control. Este mismo ensayo se hizo con animales hipertensos (Figura 12) a fin de saber si esta fracción posee el efecto antihipertensivo de muicle. Sin embargo, la PA no se modifica por el efecto de este extracto. El vehículo empleado no modifica la PA en este grupo de animales.

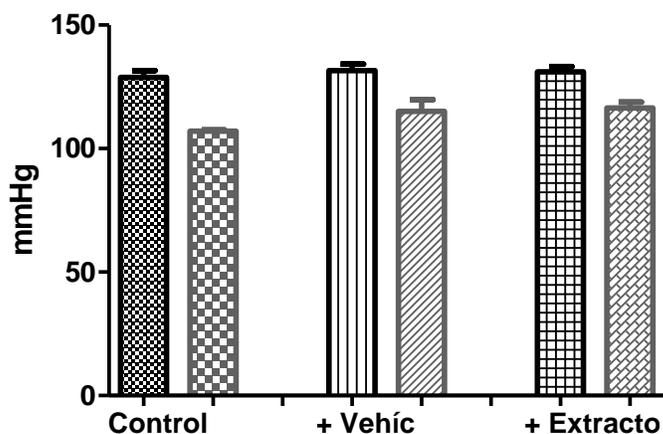


Figura 11. Efecto del extracto hexánico de *J. spicigera* sobre la presión arterial en ratas normotensas. La PA fue medida 3 h después de la administración de una sola dosis del extracto (150mg/kg) a través de una sonda orogástrica. Los resultados muestran la media (n=3) y el SEM con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras negras indican la PAS y las barras grises la PAD.

El extracto acuoso solamente modifica la PAD y el extracto clorofórmico fue el único en modificar tanto la PAS como la PAD, por lo que el efecto antihipertensivo de *J. spicigera* se debe esencialmente a los componentes que conforman esta fracción. Estudios fitoquímicos se realizaron en el extracto clorofórmico en búsqueda de él o los componentes químicos responsables de esta actividad (Capítulo 2).

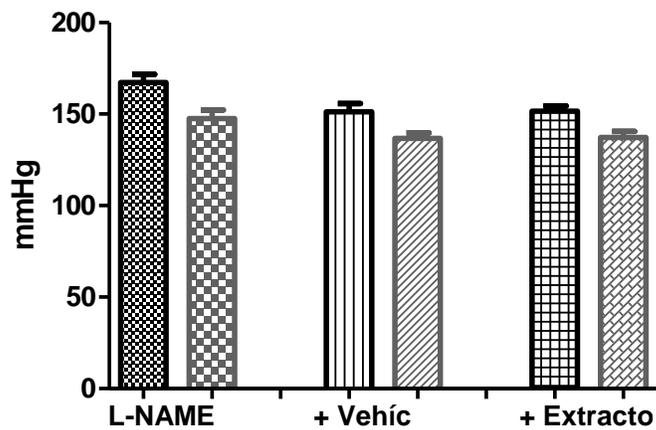


Figura 12. Efecto del extracto hexánico de *J. spicigera* sobre la presión arterial en ratas hipertensas. La PA fue medida 3 h después de la administración de una sola dosis del extracto (150mg/kg) a través de una sonda orogástrica. Los resultados muestran la media (n=3) y el SEM con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras negras indican la PAS y las barras grises la PAD.

### CAPÍTULO 3

- **DETERMINACIÓN DEL EFECTO VASORRELAJANTE DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO CON MAYOR EFECTO ANTIHIPERTENSIVO**

Los vasodilatadores son útiles para el tratamiento de la HTA, así como para el mejoramiento de la circulación periférica. Muchos vasodilatadores dependen del endotelio activando la liberación del NO.

La presente investigación se llevó a cabo para determinar que fracción del extracto clorofórmico de *J. spicigera* posee la capacidad de vasorelajar y si esta vasorelajación es dependiente del NO.

El extracto clorofórmico de *J. spicigera* fue sometido a un fraccionamiento del cual se obtuvieron cuatro fracciones bien definidas (Figura 4 de esta tesis). Estas fracciones fueron probadas en un ensayo *in vitro* para determinar su efecto vasorrelajante. Los estudios fueron conducidos en anillos de aorta con y sin endotelio para determinar primero, si presentan algún efecto relajante sobre los anillos precontraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ), y posteriormente investigar si el efecto es mediado por el NO (anillos sin endotelio). Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 13 y 14. Como se puede observar, todas las fracciones tienen un efecto vasorrelajante, sin embargo, la F3 es la que mejor efecto presenta tanto en anillos con y sin endotelio con una  $CE_{50} = 1.1456 \mu\text{g/mL}$  y  $CE_{50} = 1.1985 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este efecto vasorrelajante es independiente del NO, ya que todas las fracciones relajan anillos de aorta sin endotelio, sugiriendo que, dentro de los componentes químicos de el extracto clorofórmico de *J. spicigera* median sus efectos por otras vía

Previamente, se investigó qué compuestos están presentes en cada una de las fracciones, y los análisis por HPLC revelan la presencia de flavonoides (hesperidina, naringenina y kaempferol) (capítulo 2), los cuales han sido reportados tanto con efectos antioxidantes, como con efectos vasorrelajantes. Los resultados anteriores permiten concluir que el efecto vasorrelajante de las fracciones ensayadas median

sus efectos por un mecanismo independiente del endotelio y que pudieran estar dados por la presencia de los flavonoides de *J. spicigera*.

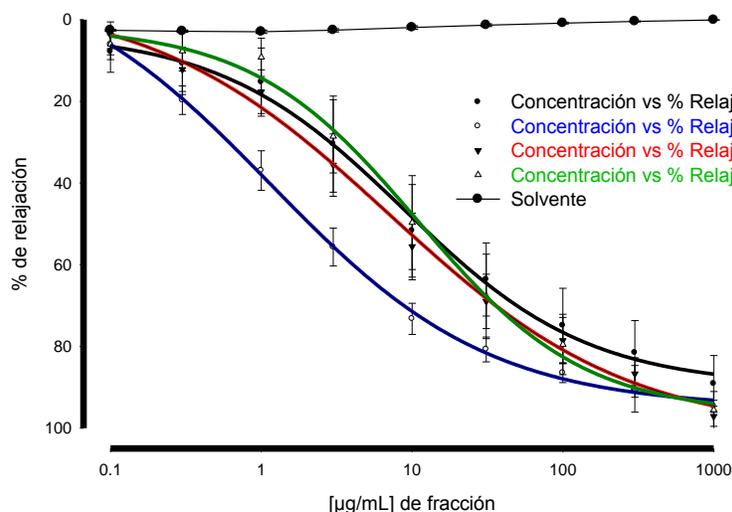


Figura 13. Efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de *J. spicigera* en aorta con endotelio. Los anillos con endotelio fueron precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-7} M$ . El solvente no tiene ningún efecto en la relajación de los anillos. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM.  $n=6$ .

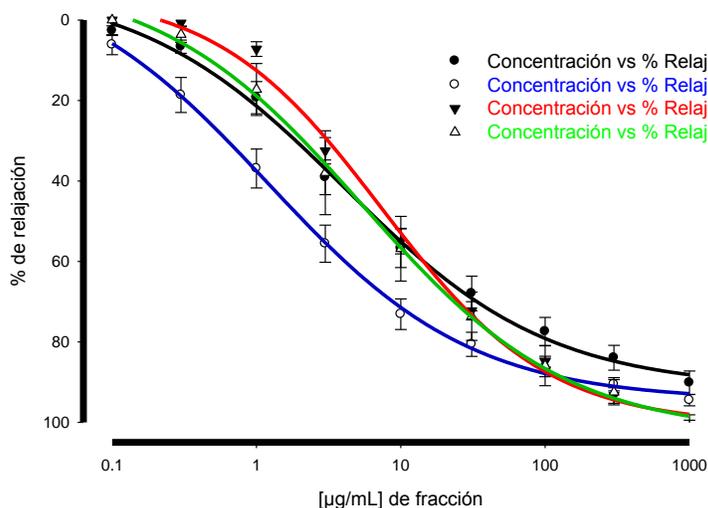


Figura 14. Efecto vasorrelajante de las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de *J. spicigera* en aorta sin endotelio. El endotelio fue removido de los anillos y fueron precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-7} M$ . El solvente no tiene ningún efecto en la relajación de los anillos (Fig. 7). Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM.  $n=6$ .

- **DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ANTIHIPERTENSIVO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN**

## **CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA**

La degradación o rompimiento de NO produce nitritos ( $\text{NO}_2$ ); los cuales son un producto estable y no volátil, por lo que la medición de estos, resulta una medida indirecta de las concentraciones del NO producidas en un sistema biológico. Las concentraciones de NO se midieron en las mitocondrias de los riñones de rata obtenidas de todos los grupos experimentales: Control, Control + Vehículo, Control + Extracto, L-NAME, L-NAME + Vehículo y L-NAME + Extracto. Los valores de PA de cada uno de los animales fueron medidos para corroborar el efecto de la condición experimental. La administración de una sola dosis VO del extracto clorofórmico de *J. spicigera* (150mg/kg) disminuye la PA en animales L-NAME, no afectando las PA de los animales control (Capítulo 2). Una vez comprobado el efecto antihipertensivo que posee *J. spicigera*, los animales fueron sacrificados y las mitocondrias de riñón fueron obtenidas. Las concentraciones de NO se midieron como se indica en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15. Como se puede observar, el NO mitocondrial tiende a incrementarse en los animales hipertensos en comparación al grupo control donde las concentraciones se ven más bajas ( $51.80 \pm 0.86 \mu\text{mol/mg}$  proteína vs  $41.36 \pm 0.6476 \mu\text{mol/mg}$  de proteína respectivamente). Lo anterior probablemente es debido a que *per se*, la patología sobreactive la producción de NO en este órgano como mecanismo compensatorio a la deficiencia de NO ocasionado por la inhibición de la NOS provocada por el L-NAME. No obstante, al administrar el extracto, los niveles de NO se incrementan en ambos grupos experimentales, sugiriendo que alguno de los componentes del extracto puede estar funcionando como donador del NO o active a la enzima NOSmt, o por sus efectos antioxidantes, pudiera incrementar la biodisponibilidad del mismo. El vehículo empleado no afecta los niveles del NO en ninguno de los grupos, por lo

que el efecto observado es atribuido a los componentes del extracto clorofórmico de *J. spicigera*.

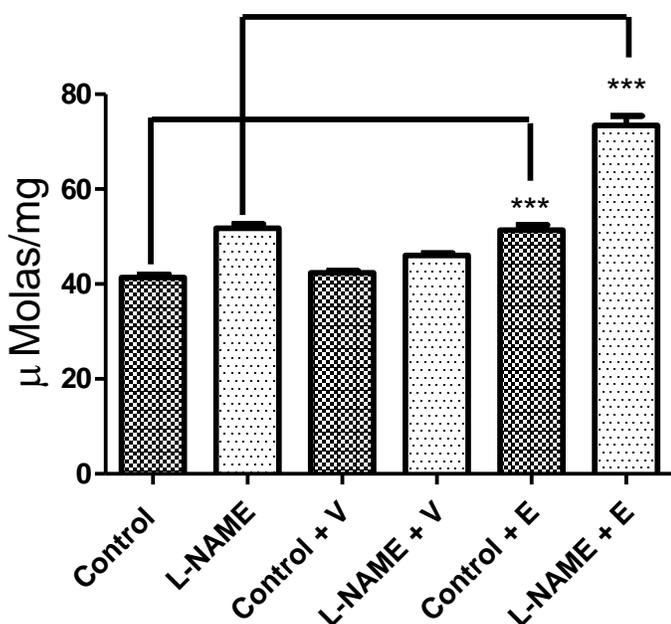


Figura 15. Concentración de NO en mitocondrias de riñón de rata. El gráfico muestra los resultados obtenidos como un promedio  $\pm$  SEM de tres repeticiones en una  $n=3$ .  $p<0.05$ . Los grupos experimentales fueron control, L-NAME (hipertensos), control más vehículo (control+V), L-NAME más vehículo (L-NAME + V), control más 150mg/kg del extracto clorofórmico de *J. spicigera* (control + E) y L-NAME más 150mg/kg del extracto clorofórmico de *J. spicigera* (L-NAME + E).

### EFFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *J. spicigera* EN EL PERFIL DE NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA

El NO reacciona con el  $\cdot\text{O}_2^-$  para formar  $\text{ONOO}^-$ , el cual es un potente oxidante que puede modificar residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosinas. Este producto es estable y se ha vuelto un marcador específico de las especies reactivas de nitrógeno, el cual se ha visto involucrado en procesos patológicos como la HTA. Con el objetivo de determinar si el extracto clorofórmico de *J. spicigera* media sus efectos a través del estrés nitrosativo, se evaluó el perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales, ya que el  $\text{ONOO}^-$  está presente en la mitocondria modificando esta clase de

biomoléculas. Para el presente estudio se empleó el anticuerpo anti 3-NT (Santa Cruz, Ca. USA) en análisis de Western blot. El perfil de nitrosilación se realizó empleando mitocondrias de riñón de animales control y L-NAME que recibieron o no 150 mg/kg del extracto clorofórmico de *J. spicigera*, así como el vehículo empleado (Figura 16). Dado que a simple vista no se observan diferencias en el perfil de nitrosilación, se hizo un análisis densitométrico (Figura 17).

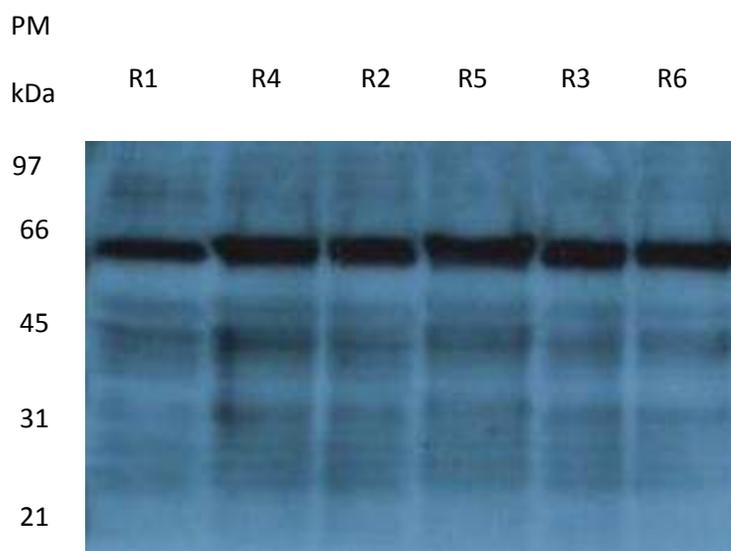


Figura 16. Perfil de nitrosilación de proteínas de mitocondrias de riñón de rata. Western blot representativo (n=3) de la inmunodetección empleando el anticuerpo anti-3-nitrotirosinas (3NT). El carril R1 representa el perfil de nitrosilación de una animal control, R2 control más vehículo, R3 control más extracto, R4 L-NAME, R5 L-NAME más vehículo y R6 L-NAME más extracto.

En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos del análisis densitométrico de todas las bandas nitrosiladas (misma área en todos los casos), no se observan cambios en el perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales en ninguno de los grupos experimentales (ratas control y L-NAME las cuales fueron tratadas con 150 mg/kg de extracto clorofórmico de *J. spicigera*). Los resultados anteriores sugieren

que el extracto clorofórmico de *J. spicigera* no media sus efectos a través del estrés nitrosativo en mitocondrias de riñón.

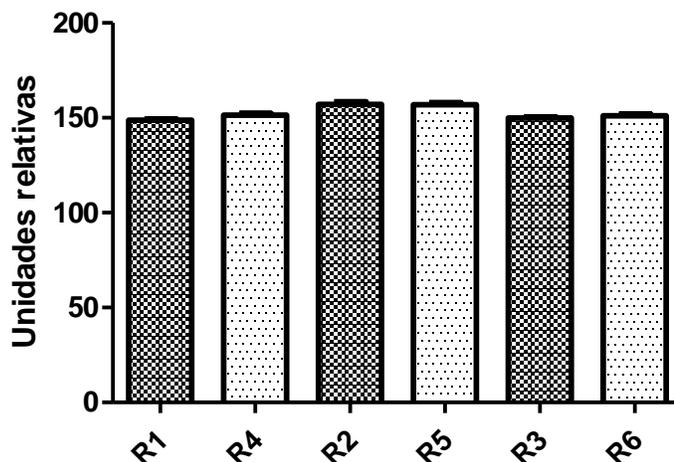


Figura 17. Análisis densitométrico del perfil de nitrosilación de las proteínas mitocondriales. R1 = control, R4 = L-NAME, R2 = Control más vehículo, R5 = L-NAME más vehículo, R3 = Control más extracto y R6 = L-NAME más extracto. Las densitometrías se realizaron con el software ImageJ Ver 1.37v. Las unidades empleadas son relativas al análisis de una misma área determinada para cada una de las bandas y muestran la media  $\pm$  el SEM de una  $n=3$ .

### **EFFECTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *J. spicigera* EN LA LIPOPEROXIDACIÓN EN LAS MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA**

Un marcador de daño por estrés oxidativo es la peroxidación de lípidos. Partiendo de que en la mitocondria se produce la principal especie reactiva de oxígeno, el anión superóxido, se evaluó el daño a lípidos en la mitocondria, ya que son blancos de las ERO. En el presente estudio se analizó este parámetro para determinar si el extracto clorofórmico de *J. spicigera* modifica el estrés oxidativo mitocondrial. Para este análisis se empleó una modificación al método de TBARS reportado por Buege y Aust (1978). Los resultados obtenidos no muestran cambios significativos en la lipoperoxidación mitocondrial en ninguno de los casos (Figura 18). Probablemente, se requiera una administración crónica de L-NAME (mayor a 3 semanas) para poder

observar cambios en la lipoperoxidación mitocondrial ya que los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico no cambian en ninguno de los grupos experimentales, dado lo anterior puede concluir que la administración del extracto no modifica el daño a lípidos de mitocondrias obtenidas de ratas hipertensas.

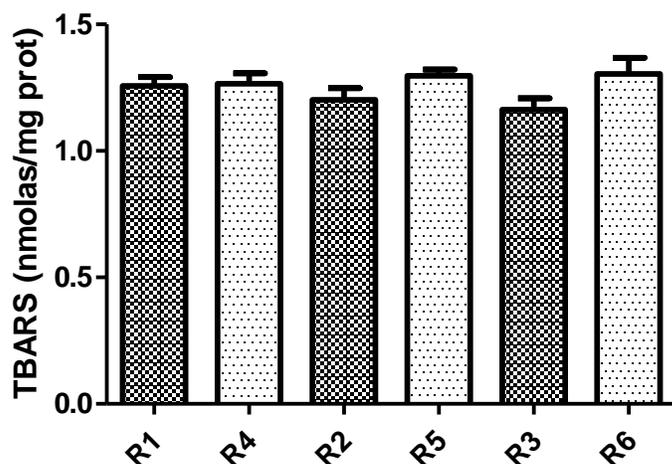


Figura 18. Efecto del extracto clorofórmico de *J. spicigera* en la lipoperoxidación mitocondrial. El gráfico muestra los resultados obtenidos como promedio  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ )  $p<0.05$ . Se analizó la lipoperoxidación en mitocondrias de riñón de ratas control (R1), hipertensas (R4), control más vehículo (R2), hipertensa más vehículo (R5), control más extracto (R3) e hipertensa más extracto (R6).

## 11. DISCUSIÓN GENERAL

La administración crónica vía oral de L-NAME causa incrementos de la PA de hasta  $175 \pm 5$  mmHg comparado con los animales control ( $112 \pm 2$  mmHg). A dosis altas de L-NAME la PA se incrementa progresivamente. El modelo de hipertensión con L-NAME se caracteriza por una disfunción endotelial, causando vasoconstricción. Además, afecta la función renal por incrementar la tasa de filtración glomerular que posteriormente conlleva a un daño renal, rasgos que también han sido descritos en la HTA en humanos. Estos modelos animales permiten su uso en la evaluación de nuevas drogas con posibles efectos sobre las enfermedades cardiovasculares, entre ellas la HTA (Baydal *et al.*, 2003). En general, todos los agentes disponibles en la terapéutica de la HTA producen una reducción de aproximadamente 10- 15 mmHg en la presión arterial sistólica y de 5-10 mmHg en la presión arterial diastólica (Sowers *et al.*, 2000). En la medicina tradicional mexicana, entre otros usos, las hojas de muicle son empleadas para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares. La planta completa o partes aéreas son comunmente los candidatos más idóneos usados por la población que recurre a esta práctica. En este contexto, tallos, hojas y flores de muicle fueron empleados en este trabajo para obtener extractos, en orden de determinar si alguno de ellos modifica la PA en un modelo animal de HTA. No hay estudios que avalen su uso en la HTA, pero si en la DM una patología muy relacionada a los desórdenes cardiovasculares (Ortiz- Andrade *et al.*, 2012), razón por la cual se evaluó en el presente estudio lográndose observar que muicle disminuye la PA tanto sistólica como diastólica en la dosis ensayada (Capítulo 2). No existen reportes acerca de la citotoxicidad de muicle, por lo que se empleó una dosis moderada (150mg/kg) y que actualmente es reportada en otras especies de *Justicia* (Manda *et al.*, 2011). Estudios fitoquímicos de extractos de hojas de *J. spicigera* muestran la presencia de kaempferitrina (Domínguez *et al.*, 1990), un flavonoide vasoactivo. Recientemente, la kaempferitrina fue aislada de *J. spicigera*, y se presume que tiene la capacidad de remover ERO dada su naturaleza química (Sepúlveda *et al.*, 2009; Ortiz-Andrade *et al.*, 2012). En este estudio se logra identificar la presencia de la aglicona de la kaempferitrina; el kaempferol, en el extracto clorofórmico de *J.*

*spicigera*. Adicionalmente, se logró identificar la presencia de compuestos relacionados: hesperidina, quercetina y naringenina, los cuales se han descrito con la capacidad para remover ERO y con propiedades antiinflamatorias (Tenorio-López *et al.*, 2006). Comercialmente se puede encontrar una mezcla de hesperidina y diosmina (Daflon<sup>®</sup>, Sanfer) en la terapéutica de enfermedades relacionadas al sistema cardiovascular. Dado lo anterior, los resultados encontrados en el presente trabajo avalan su uso en el tratamiento de la HTA.

Adicional al efecto antihipertensivo del extracto clorofórmico de *J. spicigera*, también se determinó en este trabajo la capacidad de relajar anillos de aorta precontraídos con fenilefrina, propiedad independiente del endotelio, esto lo hace ser un buen candidato en la búsqueda de compuestos químicos relacionados a aquellos empleados en la terapia de la HTA no relacionados a la vía del NO. El NO es el principal componente liberado en las arterias y contribuye a disminuir la PA entre el 20% y el 30% de la respuesta máxima a la acetilcolina en arterias precontraídas, por lo que, la capacidad para modular la biodisponibilidad del NO desde el endotelio es, una ventana abierta hacia la terapéutica de la HTA (Greenstein, 2012). Sin embargo, a nivel arterial, *J. spicigera* no involucra al NO como mecanismo de relajación.

De acuerdo con los resultados de esta investigación, se presume que los compuestos químicos presentes en el extracto clorofórmico de *J. spicigera* muestran tener la actividad que permite disminuir la PA en ratas L-NAME de valores que van desde los 180/164 ± 1.7/3.2 mmHg hasta 149/133 ± 4.0/3.7mmHg (Capítulo 2). Datos en otras investigaciones, sugieren que la reducción de 2 mmHg en la PAD, puede resultar en una importante disminución el riesgo de infarto al miocardio (Mancia 2012), por lo que, a la dosis administrada de este extracto se puede atribuir una disminución en la prevalencia de la HTA. Las propiedades benéficas de las plantas son conocidas porque se asocian a la producción de metabolitos secundarios, compuestos muy reactivos a los cuales se les ha atribuido una capacidad antioxidante, antihipertensiva, hipoglucemiante, entre otras. Otros extractos de cloroformo extraídos de plantas, han sido usados en modelos de HTA para clarificar los efectos vasorrelajantes, tal es el caso de *Kaempferia galanga*, *Muntingia calabura* y

*Spilanthes acemella* (Othman *et al.*, 2006). Son diferentes los mecanismos por los cuales promueven estos efectos. Se deduce que los componentes del extracto clorofórmico, dada su naturaleza química, pudieran estar mediando el efecto antipertensivo a través de la capacidad para remover ERO. La evidencia indica que unos de los principales factores que contribuyen a la génesis de la HTA, es el estrés generado continuamente por las células. Sin embargo, en este trabajo, los análisis que permite evaluar daño por estrés oxidativo y nitrosativo no revelan que el efecto antihipertensivo se relacione con este factor importante en la HTA. Otros estudios demuestran que los efectos antihipertensivos se deben a que los metabolitos aislados de las plantas medicinales median sus efectos por antagonismo de los canales de calcio (*Laelia anceps*) (Vergara-Galicia *et al.*, 2010). En el caso de *Persea americana* Mill., la reducción de la PA se presume que es debido a su alto contenido de ácido oleico, al cual se le atribuye ser cardioprotector por mediar el estrés (Terés *et al.*, 2008). Tialinina, un compuesto aislado de *Agastache mexicana* media sus efectos antihipertensivos a través de la apertura de canales de potasio y también lo hace vía NO/GMPc (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). Muy particularmente, se requiere de estudios adicionales que permitan elucidar el mecanismo de acción por el cual *J. spicigera* tiene un efecto antihipertensivo en las ratas L-NAME.

## **12. CONCLUSIÓN GENERAL**

Los efectos antihipertensivos de *J. spicigera* (muicle) no están relacionados al estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón, sin embargo, activa mecanismo que favorecen la biodisponibilidad del NO en este orgánulo. Adicionalmente, los efectos vasorrelajantes no son dependientes del endotelio en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina.

## **13. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

Realizar estudios para aislar y purificar el compuesto o los compuestos responsables del efecto antihipertensivo del extracto clorofórmico de *J. spicigera*, así como estudios farmacológicos que eluciden su mecanismo de acción.

#### 14. LITERATURA CITADA

Alderton W.K., Cooper C.E. y Knowles R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.

Agrawal M., Nandini D., Sharma V. y Chauhan S. 2010. Herbal remedies for treatment of hypertension. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 1:1-21.

Andrade-Cetto A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *J. Ethnopharmacology.* 122:163-171.

Arellano-Rodríguez J.A., Flores Guido J.S., Tun J., Garrido M.M. y Bojórquez C. 2003. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucataán. *Etnoflora Yucatanense.* 20,5-6.

Badyal D.K., Lata H. y Dadhich A.P. 2003. Animal models of hypertension and effect of drug. *Indian J. Pharmacol.* 35:349-362.

Barbosa-Filho J.M., Martinis V.K.M., Rabelo L.A., Moura m.D., Silva M.S., Cunha E.V.L., Souza M.F.V., Almeida R.N. y Madeiros I.A. 2006. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (3):421-446.

Bartesaghi S., Ferrer S.G., Peluffo G., Valez V., Zhang H., Kalyanaraman B. y Radi R. 2007. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids.* 32:501-515.

Baylis C., Mitruka B. y Deng A. 1992. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest.* 1:278-281.

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. y Freeman B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1620-1624.

Blantz R.C. y Munger K. 2002. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*. 4:373-378.

Braz D.M., Carvalho-Okano R.M. y Kameyama C., 2002. Acanthaceae da reserva florestal mata do paraíso. *Rev. Bras. Bot.* 25:495–504.

Brookes P.S., 2004. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 3:187-204.

Buege J.A. y Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.

Croteau R., Kutcher T.M. y Lewis N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan W, Gruissem W, Jones R. (Eds.) pp 1250-1318.

Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel H.L. y Lesnfsky E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 38:36027–36031.

Didion SP. Antioxidant 1 in hypertension. 2012. *Hypertension*. 60:285-287.

Dominguez X.A., Achenbach A., González C y Ferré-D'Amare A.R. 1990. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Rev. Latinoamer. Quím.* 21:142-143.

Duchen M.R. 2004. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 53:S96 –S102.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2007. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Resultados por entidad federativa, Michoacán. [www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx) (Accesada en noviembre de 2012).

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2012. Evidencia para la política pública en salud. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control. <http://ensanut.insp.mx> (Accesada en enero de 2013).

Esquivel-Gutiérrez E.R., Noriega-Cisneros R., Bello-González M.A., Saavedra-Molina A. y Salgado-Garciglia R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*. 14:45-52.

Ghafourifar P. y Saavedra-Molina A. 2006. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: Lamas S y Cadenas E. *Nitric Oxide, Cell Signaling and Gene Expression*. Taylor and Francis. USA. 4:77-98.

Ghafourifar P. y Sen C.K. 2007. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Front. Biosci*. 12:1072-1078.

Giulivi C. Poderoso J.J. y Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem*. 18 (273):11038-11043.

Giulivi C., Kato K. y Cooper C.E. 2006. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 291:C1225-C1231.

Gornall A.G., Bardawill G.J. y David M.M. 1949. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem*. 177:751-760.

Graham V.A. 1990. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). *Kew Bulletin*. 43, 551–624.

Greaves L.C. y Taylor R.W. 2006. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *IUBMB Life*. 58:143-151.

Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.I., Wishnok J.S. y Tannenbaum S.R. 1982. Analysis of nitrate, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem*. 126:131-138.

Greenstein A.S. New targets and opportunities at the level of the endothelium. *hypertension*, 2012. 60:896-897.

Grundey S.M., Benjamin I.J., Burke G.L., Chaint A., Eckel R.H., Howard B.V., Mitch W., Smith S.C. y Sowers J.R. 1999. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American heart association. *Circulation*. 100:1134-1146.

Guyton A. y Hall J. 2001. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México. Méx.

Hall J.E. 2002. The kidney, hypertension and obesity. *Hypertension*. 41:625-633.

Hervouet E., Simonnet H. y Godinot C. 2007. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie XX*:1-9.

Hermann M., Flammer A. y Lüscher TF. 2007. Nitric Oxide in Hypertension. *J Clin. Hypert.* 8(12):17-29.

Hernández-Abreu O., Castillo-España P., León-Rivera I., Ibarra- Barajas M., Villalobos-Molina R., González-Christen J., Vergara- Galicia J. y Estrada-Soto S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of Tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol*. 78:54-61.

Hoffman B.B. 2007. Terapéutica de la hipertensión. En Brunton L.L., Lazo J.S. Parker K.L. (11ª ed.) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill Interamericana. Colombia. Pp. 845-846.

Kanai A.J., Pearce L.L., Clemens P.R., Birder L.A., VanBibber M.M., Choi S., de Groat W.C. y Peterson J. 2001. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Physiology*. 98:14126-14131.

Kang Y.H., Kang J.S y Shin H.M. 2013. Vasodilatory Effects of Cinnamic Acid via the Nitric Oxide–cGMP–PKG Pathway in Rat Thoracic Aorta. *Phytother. Res*. 27: 205–211.

Laemli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Levy B., Collin S., Sennoun N., Ducrocq., Kimmoun A., Asfar P., Perez P. Y Meziani F. 2010. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med.* 36:2019-2029.

Logan D.C., 2006. The mitochondrial compartment. *J. Experim. Bot.* 57:1225-1243.

Mancia G. 2012. Short- and Long-Term Blood Pressure Variability. Present and Future. *Hypertension.* 60:512-517.

Manda P., Abrogoua D.P., Bahi C., Dano D.S. Gnahoui G y Kablan B.J. 2011. Evaluation of the antihypertensive activity of total aqueous extract of *Justicia secunda* Valh (Acanthaceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5(16):1838-1845.

Moncada S., Palmer R.M. y Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Review* 43:109-142.

NOM-030-SSA2-1999. 2001. Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. *DOF.* 1-20.

NOM-030-SSA2-2009. 2012. Guía de tratamiento farmacológico y control de la HAS. *Rev. Mex. Cardiol.* 23 (1): 4A-38A.

NOM-062-ZOO-1999. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Gaceta médica de México.* 3(138): 295-298.

Ortiz-Andrade R., Cabañas-Wuan A., Arana-Argáez V.E., Alonso-Castro A.J., Zapata-Bustos R., Salazar-Olivo L., Domínguez F., Chávez M., Carranza-Álvarez C. y García-Carrancá A. 2012. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae). *J. Etnopharm.* 143:455-462.

Othman R., Ibrahim H., Mohd M.A., Mustafa M.R. y Awang K. 2006. Bioassay-guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kaempferia galanga* L. *Phytomedicine*. 13:61-66.

Panieri E., Gogvadze V., Norberg E., Venkatesh R., Orrenius S. y Zhivotovsky B. 2013. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Rad Biol Med*. 57:176-187.

Patricó D. 2002. Lipid peroxidation and the aging process. *Sci. Aging. Knowledge Environ*. 50:re5.

Pfeiffer S., Leopold E., Schmidt K., Brunner F. y Mayer B. 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol*. 118:1433-1440.

Radi R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 12:4003-4008.

Ribeiro M.O., Antunes E., Nucci G., Lovisollo S.M. Y Zatz R. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 20:298-303.

Rodrigo R., González J Y Paoletto F. 2011. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypert. Res*. 1–10.

Rojas-Llanaez P., Perea-Villamil A. y Ortiz-López C. 2007. Determinación por HPLC de flavononas en jugos cítricos de variedades cultivadas en Santander. *Sci. Tech*. 33:293-294

Saavedra-Molina A. y Devlin T.M. 1997. Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis in rat liver. *Amino Acids* 12: 293-298.

Shigenaga M.K., Hagen T.M y Ames B.N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:10771-10778.

Shiva S. 2013. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology*. 1:40-44.

Sowers J.R, Williams M, y Bakris E.P. 2000. Hypertension in patients with diabetes. Strategies for drug therapy to reduce complications. *Postgrad Med*. 107(4):47-60.

SSA. 2001. Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. [www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx) (Accesada en noviembre de 2012).

Sachse A. y Wolf G. 2007. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 18:2439-2446.

Sueishi Y. y Hori M. 2011. Nitric oxide scavenging rates of solubilized resveratrol and flavonoids. *Nitric oxide*. 29:25-29.

Terés S., Barceló-Coblijn G., Benet M., Álvarez R. Bressani, R., Halver J.E. y Escriba, P.V. 2008. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *PNAS*. 105:13811-13816.

Tenorio López F.A., Mondragón L, y Hernández G.P. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Rev. Arch. Cardiol. Mex*.76:S4 33-45.

Touyz R. M. 2004. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension: What Is the Clinical Significance? *Hypertension*, 44:248-252.

Towbin H., Staehelin T., y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:4350-4354.

Valdez L.B., Zaoborny T. y Boveris A. 2005. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Cell Biol. Physiol*. 396:444-455.

Vázquez M.M.E. y Tuena de Gómez P.M. 2002. Mitocondria. *Editorial Prado, S. A. de C. V.* Chávez E y Zazueta C. Transporte de metabolitos en mitocondrias. 3:49-64.

Vergara-Galicia J., Ortiz-Andrade R., Rivera-Leyva J., Castillo-España P., Villalobos-Molina R., Ibarra-Barajas M., Gallardo-Ortiz I. y Estrada-Soto S. 2010. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia*. 81:350-357.

Wilcox C.S. 2005. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289:R913-R935.

WHO, Hypertension guidelines. [www.who.org](http://www.who.org) (Accesado en noviembre de 2012).

Xu J., Duan X., Yang J., Beeching JR y Zhang P. 2013. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiol.* 161:1517-1528.

Yun H.K., Jae S.K. y Heung M.S. 2013. Vasodilatory effects of cinnamic acid in the nitric oxide-CGMP-PKG pathway in rat thoracic aorta. *Phytoter. Res.* 27:205-211.

Zanchi A., Schaad N.C., Osterheld M.C., Grouzmann E., Nussberger J., Bruner H.R. y Waeber B. (1995). Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on rennin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J. Physiol.* 268:H2267-H2273.

Zhou R-H., Vendrov A.e., Tchivilev I., Niu X-L., Molnar K.C., Rojas M., Carter J.D. Tong H., Stouffer G.A., Madamanchi N.R. y Runge M.S. 2012. Mitochondrial oxidative stress in aortic stiffening with age. The role of smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:745-755.

Zu Y.G., Fu Y.J., Liu W., Hou C.L. y Kong Y. 2006. Simultaneous determination of four flavonoids in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves using RP-LC-DAD. *Chrom* 63:499-505.