

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE FARMACOLOGIA

**EFEECTO DE LOS ALCALOIDES 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -
MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii*
SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al **TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.**

BRANNY WILSON MONTECINOS MUÑOZ

VALDIVIA – CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE : Dra. Viviana Bustos S. _____

PROFESOR COPATROCINANTE : Dr. Frédérick Ahumada M. _____

PROFESOR COLABORADOR : Dr. Orlando Muñoz. _____

PROFESORES CALIFICADORES : Dr. Marcos Moreira. _____

: Dr. Enrique Paredes. _____

FECHA DE APROBACIÓN : 29 de Abril de 2004.

*Con amor a la personita más maravillosa
del mundo, mi hijo Benjamín.*

ÍNDICE.

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	34
AGRADECIMIENTOS.....	38

EFFECTO DE LOS ALCALOIDES 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA

1. RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* en aorta aislada, tanto en ausencia de sustancias vasoactivas como frente a la contracción por noradrenalina y la relajación por acetilcolina.

Se utilizaron ratas machos normotensas de la cepa Sprague Dawley, con pesos entre 250 y 300 gramos. El método empleado fue el de baño órgano aislado, sobre el cual se montaron anillos de aorta conectados a transductores de tensión e incubados por 90 minutos en solución de Krebs Henseleit a 37° C (+/- 0,5°C), en presencia de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Se determinaron cuatro series en estudio. Serie control: preincubada sólo con etanol (0,5°). Series experimentales 1, 2 y 3: preincubada con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml, respectivamente, de alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii*, disueltos en etanol (0,5°).

Los resultados indican que los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*:

- No mostraron actividad contráctil sobre aorta de rata, en ausencia de sustancias vasoactivas.
- Mostraron que la contracción con noradrenalina (3x10⁻⁷M) fue significativamente menor (p<0,05) en la serie experimental 3, respecto a la serie control.
- Mostraron que la relajación con acetilcolina (1x10⁻⁶ ; 3x10⁻⁶ ; 1x10⁻⁵ ; 3x10⁻⁵ M) fue significativamente menor (p<0,05) en la serie experimental 3, respecto a la serie control. La relajación con acetilcolina (3x10⁻⁷M) fue significativamente menor (p<0,05) en la serie experimental 2, y fue inhibida significativamente (p<0,05) en la serie experimental 3, respecto a la serie control.

Se concluye que 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol aislados de *Schizanthus grahamii*:

- No poseen efecto en ausencia de sustancias vasoactivas.
- Disminuyen significativamente (p<0,05) la magnitud de la contracción por noradrenalina.
- Disminuyen o inhiben significativamente (p<0,05) la relajación por acetilcolina, en aorta de rata.

Palabras claves: 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol, *Schizanthus grahamii*, alcaloides tipo tropano, aorta, ratas.

EFFECT OF 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL AND 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN ALKALOIDS ISOLATED FROM *Schizanthus grahamii* OVER THE CONTRACTIBILITY OF RAT AORTA

2. SUMMARY.

The present study analysed the effect of tropane type alkaloids isolated from *Schizanthus grahamii* on rat isolated aorta in absence of a vasoactive agent and also in presence of contraction induced by noradrenaline and relaxation by acetylcholine.

Sprague Dawley male normotensive rats were used, with body weight between 250 and 300 grams. The method of election was isolated organ bath, over which the aortic rings were mounted to a tension transducer and incubated for 90 minutes in a Krebs Henseleit solution at 37°C (+/- 0,5°C), with 95% of O₂ and 5% of CO₂. Four series of study were established. One control serie: preincubated with ethanol (0,5°); and experimental series 1, 2 and 3 preincubated with 0,001; 0,01 and 0,1 mg/ml of tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* dissolved in ethanol (0,5°).

The results suggest that alkaloids isolated from *Schizanthus grahamii*:

- **Did not show any contractile activity on rat aorta in absence of any vasoactive agent.**
- **The contraction with noradrenaline (3x10⁻⁷M), was significantly reduced (p<0,05) in the experimental serie 3 compared to the control serie.**
- **The relaxation with acetylcholine (1x10⁻⁶ ; 3x10⁻⁶ ; 1x10⁻⁵ ; 3x10⁻⁵ M) was significantly less (p<0,05) in experimental serie 3 compared to the control serie. The relaxation with acetylcholine (3x10⁻⁷M) was significantly reduced (p<0,05)) in the experimental serie 2 and was significantly inhibited (p<0,05) in the experimental serie 3 compared to control serie.**

It can be concluded that 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol isolated from *Schizanthus grahamii* :

- Do not have an effect in absence of any vasoactive agent.
- They reduce significantly (p<0,05) the magnitude of the contraction induced by noradrenaline.
- They reduce or inhibit significantly (p<0,05) the relaxation induced by Acetylcholine on rat aorta.

Key words: 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol, *Schizanthus grahamii*, tropane alkaloids type, aorta, rats.

3. INTRODUCCIÓN.

Existen tres tipos de células musculares que presentan una localización, estructura y función diferente en el organismo animal, las que se agrupan en los llamados músculo esquelético, liso y cardíaco (Vander y col., 2001).

El músculo liso se distingue, en el aspecto anatómico, de los músculos esqueléticos y cardíacos porque no tiene estrías transversales visibles. Tiene actina y miosina II, que se deslizan la una sobre la otra para producir la contracción (Ganong, 1998).

El músculo liso de unidades simples se encuentra en la mayoría de las vísceras huecas formando dos capas, una interior o circular y otra exterior o longitudinal (Vander y col., 2001). El músculo liso visceral forma parte de las paredes de casi todas las vísceras, principalmente intestino, conductos biliares, uréteres, útero y vasos sanguíneos (Guyton y Hall, 1997).

Los vasos sanguíneos no son simples conductos que transportan sangre, ya que la pared vascular es considerada actualmente como un “órgano” que ejerce funciones que participan de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Las células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos participan en la regulación del flujo sanguíneo, la formación de trombos y la adhesión de leucocitos, mantienen la estructura parietal, traducen fuerzas biomecánicas y estímulos humorales (Tresguerres y col., 2000).

Anatómicamente las arterias se pueden dividir en tres capas concéntricas; a) una capa interna, la túnica íntima, constituida por células endoteliales; b) la túnica media compuesta por células musculares lisas; c) la túnica adventicia, constituida por fibroblastos y fibras de colágeno. Dentro de esta estructura el endotelio vascular actúa como receptor y transmisor de señales. Las células endoteliales son capaces de registrar cambios hemodinámicos de la sangre, y son consideradas como el principal órgano de regulación vascular con acciones exocrina, paracrina y autocrina. Entre los factores biológicamente activos sintetizados y liberados por las células endoteliales cabe destacar: la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO), la endotelina (ET), entre muchos otros (Tresguerres y col., 2000).

La contracción de las células del músculo liso vascular depende de tres mecanismos que modifican la homeostasis del calcio intracelular:

- Canales de calcio activados por depolarización de membrana, los cuales se abren frente a un cambio de voltaje permitiendo que el calcio extracelular se mueva hacia el interior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico, produciendo la contracción (Hardman y col., 2001).

- Contracciones inducidas por agonistas que no depolarizan la membrana, pero activan receptores acoplados a proteína G, modulando respuestas intracelulares que finalmente producen un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma produciendo la contracción (Meana y García-Sevilla, 1997).
- Canales de calcio operados por receptores los que son activados por neurotransmisores y hormonas (Hardman y col., 2001).

En términos generales, el control de la musculatura lisa vascular está dado por un control local (intrínseco) determinado por mecanismos como son los de autorregulación, metabólicos, hiperemia activa e hiperemia reactiva, y un control central (extrínseco) que incluye mecanismos humorales y neuronales (Cunningham, 1999).

Dentro del mecanismo humoral destacan hormonas con acción vasoactiva como angiotensina II, vasopresina, prostaciclina, bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas y catecolaminas circulantes, éstas últimas liberadas por estimulación simpática (Tresguerres y col., 2000).

El control neuronal es llevado a cabo por el sistema nervioso autónomo (S.N.A). Este sistema es involuntario y controla las funciones viscerales del organismo, activándose principalmente por centros situados en médula espinal, tallo cerebral, hipotálamo y porciones de la corteza cerebral (corteza límbica) que pueden influir en el control autónomo (Ramos y col., 2001). Por lo tanto regula la contracción y relajación de la musculatura lisa vascular (Tresguerres y col., 2000).

El sistema nervioso autónomo se divide en sistema nervioso simpático y parasimpático, con bases anatómicas y funcionales distintas. El S.N.A. inerva la mayor parte de los órganos, y la respuesta es usualmente opuesta, mientras los nervios simpáticos aumentan la contractibilidad vascular, los nervios parasimpáticos la relajan, esta actividad nerviosa es captada por medio de receptores (Ramos y col., 2001).

Un receptor es cualquier macromolécula celular, generalmente una proteína celular, con la cual se liga un fármaco o un neurotransmisor para iniciar la consecuente propagación de su señal reguladora en la célula “blanco” (Hardman y col., 2001).

Los neurotransmisores son agentes químicos específicos mediante los cuales los nervios transmiten información a través de la mayor parte de las sinapsis y las uniones neuroefectoras (Hardman y col., 2001).

Todas la fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas poseen como neurotransmisor específico la acetilcolina, que ejecuta la transmisión por interacción con receptores colinérgicos nicotínicos. Las fibras postganglionares parasimpáticas y algunas simpáticas son también de carácter colinérgico, actuando sobre receptores muscarínicos. La mayoría de las fibras postganglionares simpáticas liberan noradrenalina, por lo que se les denomina adrenérgicas (Flórez, 1997).

La acetilcolina de las fibras simpáticas preganglionares estimulan la médula suprarrenal para la secreción de catecolaminas naturales (noradrenalina, adrenalina y dopamina), que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Las catecolaminas estimulan dos clases de receptores adrenérgicos conocidos como alfa y beta. La noradrenalina estimula principalmente a los receptores alfa y en pequeña medida a los beta. La adrenalina actúa sobre ambos tipos de receptores por igual (Ramos y col., 2001).

Los estudios de fijación de radioligandos agonistas o antagonistas muestran que en un mismo órgano coexisten varios subtipos de α y β receptores, en proporciones distintas, como ocurre en la pared vascular. Los α -receptores son estimulados, en orden de mayor a menor potencia, por adrenalina, noradrenalina e isoproterenol y se les asocia a una actividad contráctil de la musculatura lisa vascular. Bajo consideraciones funcionales y anatómicas se clasifican en dos grandes grupos: los receptores presinápticos clasificados como α_2 -adrenérgicos, que al activarse inhiben la liberación de noradrenalina, teniendo un efecto de retroalimentación negativa, y los receptores postsinápticos “excitatorios” clasificados como α_1 (Flórez, 1997). En 1996 según Hoffman y Lefkowitz (citados por Iturriaga, 2001) los receptores β -adrenérgicos, son estimulados por agonistas adrenérgicos en orden de mayor a menor potencia por isoproterenol, adrenalina y noradrenalina, y se les asocia una actividad relajadora de la musculatura vascular. Se dividen en β_1 , que predominan en el miocardio, β_2 ubicado especialmente en músculo liso y β_3 presente en el tejido adiposo (Flórez, 1997; Hardman y col., 2001).

El neurotransmisor de las fibras parasimpáticas postganglionares es la acetilcolina, que se sintetiza en la terminal axonal y se deposita en vesículas sinápticas. Esta síntesis se realiza por unión del grupo acetilo de la acetil coenzima A con la colina. La acetilcolina activa dos tipos diferentes de receptores llamados receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores nicotínicos se encuentran en la sinapsis entre las neuronas pre y postganglionares de los sistemas simpático y parasimpático y también en las membranas de las fibras musculares esqueléticas en la unión neuromuscular. Los receptores muscarínicos se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por las neuronas postganglionares del sistema nervioso parasimpático (Ramos y col., 2001).

Los receptores muscarínicos pertenecen a la superfamilia de las proteínas receptoras cuyas funciones son mediadas por la interacción con proteínas G. No se sospechaba de la diversidad de los receptores muscarínicos hasta que a fines del decenio de 1970, se examinó la farmacología de la pirenzepina. Estas observaciones, y el estudio subsecuente de otros agonistas y antagonistas, a los que le siguieron adelantos rápidos en la clonación de diversos DNA que codifican los receptores muscarínicos, han hecho que se identifiquen cinco subtipos de estos receptores. Se han designado M_1 a M_5 con base a su especificidad farmacológica (Hardman y col., 2001).

Los receptores M_1 se presentan en ganglios autonómicos y corteza cerebral; los receptores M_2 , predominan en el miocardio y en mucho menor grado en la musculatura lisa; los receptores M_3 y M_5 , se encuentran en células secretoras, en células de musculatura lisa y

células endoteliales; los receptores M_4 se ubican en células endoteliales y neuronas ganglionares (Flórez, 1997; Tresguerres, 2000; Hardman y col.; 2001).

Las interacciones con los miembros de la familia de proteínas G y, por tanto, los cambios inducidos por estas proteínas en las funciones de las distintas moléculas efectoras ligadas a la membrana, median las funciones básicas de los receptores muscarínicos. Los subtipos M_1 , M_3 y M_5 activan a la proteína G denominada $G_{q/11}$, que es la encargada de la estimulación de la actividad de fosfolipasa C; el resultado inmediato es la hidrólisis de polifosfatos de fosfatidilinositol (que son componentes de la membrana plasmática) para que se formen los polifosfatos de inositol. Algunos de los isómeros de fosfato de inositol (principalmente inositol-1,4,5-trifosfato) producen descarga de Ca^{2+} intracelular desde sus sitios de almacenamiento en el retículo endoplásmico. Por tanto, estos receptores median los fenómenos dependientes del Ca^{2+} mencionados, como contracción del músculo liso y secreción. El segundo producto de la reacción de fosfolipasa C, el diacilglicerol, activa a la proteincinasa C (en conjunto con el Ca^{2+}) (Hardman y col., 2001).

Una segunda vía para las reacciones de los agonistas muscarínicos es la evocada por la activación de los receptores M_2 y M_4 . Estos receptores interactúan con un grupo definido de proteínas G (en particular denominadas G_1 y G_0) con inhibición resultante de la adenilciclase, activación de los canales del K^+ operados por receptores (por ejemplo en el corazón) y supresión de la actividad de los canales del Ca^{2+} con compuerta de voltaje en ciertos tipos de células. Las consecuencias funcionales de estos efectos son más claras en el miocardio (Hardman y col., 2001).

Los receptores muscarínicos encargados de la relajación vascular, se encuentran en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los que al ser estimulados descargan factores de relajación que difunden hacia las células del músculo liso adyacentes (Evora y col., 1996).

En términos generales los receptores muscarínicos colinérgicos del tipo M_3 se encuentran en las células del endotelio y en las células del músculo liso de la mayoría de arterias y arteriolas. La activación de estos receptores en las células del músculo liso provoca contracción. Sin embargo, este efecto vasoconstrictor es normalmente anulado por el efecto vasodilatador de activar los receptores M_3 en las células del endotelio vascular. En esta extraña organización, la activación de los receptores M_3 de las células endoteliales provoca la síntesis de óxido nítrico, que después se difunde fuera de las células endoteliales y dentro de las células del músculo liso cercano en donde actúa como vasodilatador. El efecto vasodilatador de estimulación de los receptores M_3 de la célula endotelial es más fuerte que el efecto vasoconstrictor de estimulación y de los receptores M_3 del músculo liso. Por esto el papel de los receptores M_3 del músculo liso permanece en misterio (Cunningham, 1999).

En 1980 Furchgott y Zawadzki (citados por Evora y col., 1996) descubrieron que era necesario la presencia de endotelio para que acetilcolina genere la relajación in vitro de un anillo de aorta de conejo. Dado que dicha relajación no era atribuible a prostaciclina, ya que el experimento se realizó en presencia de inhibidores de ciclooxigenasa. La conclusión a la que se llegó fue que la relajación endotelio dependiente producida por acetilcolina resultaba de la

liberación de una sustancia liberada por el endotelio que se llamo Factor relajante derivado de endotelio (EDRF). En 1987 Palmer y col. (citados por Evora y col., 1996) identificaron el EDRF como óxido nítrico, el cual se sintetiza a partir de L-arginina. El óxido nítrico actúa como mediador local de los llamados vasodilatadores endotelio dependientes, como la acetilcolina y la bradiquinina, o como mediador de la acción vasodilatadora producida en procesos inflamatorios en respuesta a la histamina o la bradiquinina.

Prostaciclina (PGI_2), es otro factor relajante derivado del endotelio, siendo sus principales acciones la inhibición de la agregación plaquetaria y la relajación de las células de la musculatura lisa vascular. Su liberación está dada por acetilcolina, bradicinina y angiotensina II (Tresguerres y col., 2000).

El factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), es también un factor de relajación dependiente de endotelio, el cual produce principalmente una relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular. Es liberado por concentraciones elevadas de acetilcolina y bradicinina, mediando así parcialmente la acción vasodilatadora de estos agentes (Tresguerres y col., 2000).

Entre los factores derivados de endotelio que participan como constrictores de la pared vascular está la endotelina (ET) y los factores constrictores derivados del endotelio, denominados genéricamente así dado que son de naturaleza aún no establecida. Estos serían mediadores de la vasoconstricción producida por la hipoxia y el aumento en la presión transmural (Tresguerres y col., 2000).

En base a lo anteriormente expuesto el endotelio vascular es considerado como el principal órgano de regulación vascular, actuando como receptor y transmisor de señales al ser capaz de registrar cambios hemodinámicos, interactuar con células sanguíneas, modificar los mensajeros químicos circulantes y responder a dichos cambios mediante la liberación de numerosos factores vasoactivos (Tresguerres y col., 2000). Es por esto que prácticamente todas las molestias cardiovasculares están asociadas a una disfunción del endotelio vascular (Evora y col., 1996).

En general los receptores muscarínicos M_3 median la relajación endotelio dependiente, mientras que la contracción puede ser mediada por diversos subtipos. La relajación vascular puede ser mediada también por mecanismos endotelio independientes, dependiendo de la ubicación anatómica del vaso. Se ha observado que los receptores muscarínicos M_3 median la relajación de la arteria coronaria equina, la vasculatura renal de los roedores, la aorta de los conejos, las mesentéricas de las ratas, la arteria uterina de los porcinos, las arterias cerebrales felinas, las arterias coronarias de los simios y algunas arterias bronquiales aisladas. En los vasos aislados de pulmón de rata, receptores muscarínicos M_1 y M_2 median la directa e indirecta vasodilatación respectivamente. Pero a su vez se ha observado que los receptores muscarínicos M_3 median la contracción en coronarias de rata y arterias pulmonares humanas. Es por esto que los receptores muscarínicos que median la contracción y relajación difieren según la especie y ubicación anatómica (Eglen y col., 1996).

Con el nombre de fármacos colinérgicos se ha denominado a todos aquellos fármacos que imitan la acción de la acetilcolina liberada en las terminaciones post-ganglionares parasimpáticas. Acetilcolina es una molécula flexible, y las pruebas indirectas con que se cuenta sugieren que las conformaciones del neurotransmisor son diferentes cuando este se encuentra fijo en los receptores nicotínicos o muscarínicos (Parsons y col., 1993). Los receptores muscarínicos fueron definidos por Sir Henry Dale en 1914 como aquellos que eran activados selectivamente por muscarina y bloqueados por atropina y los receptores nicotínicos como aquellos activados por nicotina y bloqueados por curare (Hulme y col., 1990; Pollard, 1994). Actualmente se sabe por estudios en biología molecular que existen múltiples variantes de ambos tipos de receptores, que son miembros de dos familias de genes distintos y que coinciden en la propiedad de ser activados por el mismo ligando, la acetilcolina (Hulme y col., 1990).

Dentro de los fármacos que tienen acción sobre los receptores muscarínicos existe un grupo denominado agonista colinérgico de acción muscarínica en donde se encuentra acetilcolina, metacolina, carbacol, betanecol, muscarina, pilocarpina y oxotremorina que es de origen sintético (Tresguerres y col., 2000).

Los fármacos agonistas se caracterizan porque se ligan a receptores fisiológicos o imitan los efectos de los compuestos reguladores endógenos, interactuando de modo reversible con su receptor, por lo que el efecto es proporcional al número de receptores ocupados y se manifiesta un efecto máximo cuando todos ellos están ocupados (Hardman y col., 2001).

Los agonistas muscarínicos clásicos son de selectividad limitada por un cierto órgano o sistema. Su acción sobre el sistema vascular está dado por vasodilatación generalizada a nivel arteriolar y contracción a nivel venoso siempre y cuando el endotelio esté intacto, es el caso de acetilcolina que es un agente vasorelajador endotelio-dependiente al igual que todos los agonistas muscarínicos mencionados, pero además es el neurotransmisor endógeno colinérgico del sistema nervioso central y periférico (Flórez, 1997; Hardman y col., 2001).

Existen fármacos que actúan a nivel de órgano y bloquean la acción muscarínica de acetilcolina, es decir inhiben la función del sistema parasimpático, son llamados anticolinérgicos, antimuscarínicos o antagonistas colinérgicos (Sakmann, 1992).

Los fármacos antagonistas se caracterizan por unirse al receptor para inhibir la actividad de un agonista, pero no desencadenan por si mismos efecto alguno. El antagonismo competitivo se produce cuando la inhibición puede vencerse o superarse mediante incrementos de la concentración del agonista, y al final se logrará el efecto máximo. En tanto el antagonismo no competitivo ocurre cuando el fármaco antagonista actúa en un sitio de fijación íntimamente relacionado con el receptor, pero diferente del sitio de fijación del agonista, evitando que este en cualquier concentración, produzca su efecto máximo (Flórez, 1997; Hardman y col., 2001).

Existen dos fármacos anticolinérgicos muy conocidos que son alcaloides naturales (extraídos de plantas), el más importante por su uso en clínica es atropina, que se extrae de las plantas *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*. El otro alcaloide de importancia es escopolamina que se obtiene de *Hyoscyamus niger*. De estos alcaloides se derivan otros sintéticos como son: homatropina, bromuro de metescopolamina, metilbromuro de escopolamina, metilbromuro de homatropina, anisotropina, climidio, glicopirrolato, ipratropio y fentonio (Marken, 1996).

Los anticolinérgicos presentan diversas aplicaciones terapéuticas como las que se señalan a continuación: bloqueo de la hiperactividad parasimpática, situaciones de hiperactividad gastrointestinal y urinaria, úlcera gastroduodenal, enfermedad respiratoria, medicación preanestésica, aplicaciones oftálmicas, depresión del sistema cardiovascular (Marken, 1996).

Durante el desarrollo de la farmacología han sido aislados numerosos alcaloides, que de acuerdo a estudios en modelos biológicos, presentan múltiples propiedades como son por ejemplo; antiinflamatorios, antiarrítmicos, bactericidas y relajantes musculares. Los alcaloides provienen de familias como Berberidáceas, Menispermáceas y Solanáceas entre muchas otras. Es así como se han determinado alcaloides con efectos sobre la musculatura lisa vascular, como la tetrandina, con efecto vasodilatador, y alcaloides con esqueleto de tipo tropano con propiedades anticolinérgicas, pertenecientes a la familia Solanaceae (Iturriaga, 2001).

Las plantas que contienen alcaloides de tropano presentan compuestos del tipo atropina y derivados, y por tanto de efectos bloqueantes colinérgicos; de ahí que las investigaciones farmacológicas estén dirigidas al tratamiento de intoxicaciones por organofosforados, en la farmacoterapia de afecciones oculares por su efecto midriático, como inhibidores de la secreción de HCl, estados broncoconstrictivos de predominio vagal, reductoras de la espasticidad del músculo liso intestinal, en la disminución riesgosa de la frecuencia cardíaca, mareos, vómitos y últimamente para minimizar los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Una característica de estas moléculas es que la selectividad de sus efectos es variable, presentando a menudo reacciones adversas inconvenientes (Muñoz, 1992). Así ningún anticolinérgico único es totalmente selectivo por un subtipo de receptor presente en un tejido u otro, sin embargo los recientes y futuros adelantos en la comprensión de la estructura molecular de los receptores muscarínicos habrá de facilitar el desarrollo de futuros agonistas mucho más selectivos (Hardman y col., 2001).

Las plantas de la Familia Solanaceae producen una variedad de alcaloides, algunos de innegable importancia terapéutica. Precisamente en esta familia de plantas fue donde primero se encontraron los alcaloides de tropano y es la que ha recibido mayor atención, particularmente los géneros *Datura*, *Atropa* y *Scopolia*, de donde se extraen comercialmente los principales alcaloides de tropano de interés medicinal: atropina y escopolamina, inhibidores de los efectos muscarínicos de la acetilcolina que bloquean sobre todo los órganos que reciben inervación parasimpática. Los efectos se manifiestan a nivel cardíaco, vascular, visceral (tracto digestivo y urinario), en las secreciones (digestivas, pancreáticas, sudorales y salivales), a nivel bronquial y ocular (Brachet y col., 1997).

Las plantas del genero *Schizanthus*, pertenecientes a la familia Solanaceae, son endémicas de Chile con excepción de *Schizanthus grahamii* cuya área de distribución alcanza también a Argentina (Coccuci, 1989). Estas plantas concentran una variada gama de bases de esqueleto tipo tropano. Existen más de 27 especies diferentes dentro del género *Schizanthus*, pero son más conocidas por sus características ornamentales que por sus propiedades químicas o su potencial aplicabilidad a la medicina. Suelen ser reconocidas por una serie de sinonimias comunes: “orquídea del hombre pobre”, “ flor de pajarito”, “ pajarito”, etc. (Muñoz, 1992). (Foto N° 1 y N° 2)



Foto N° 1: *Schizanthus grahamii* *



Foto N° 2: *Schizanthus grahamii* **

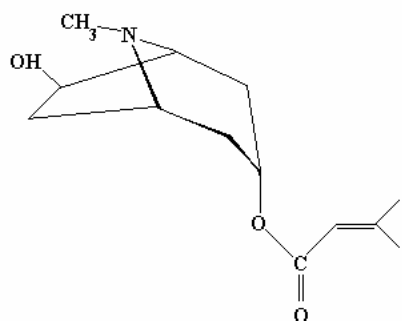
*: Disponible en Internet: http://www.thompson-organ.com/seeds/us/product_7429_1.html

** : Disponible en Internet: http://www.anniesannuals.com/signs/S/Schizanthus_grahamii.htm

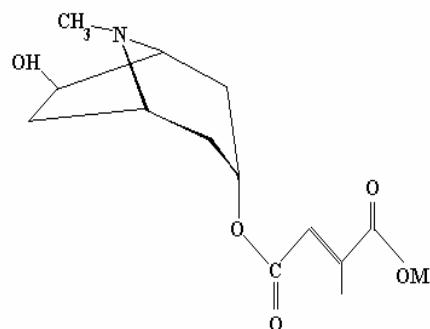
Los estudios químicos del género *Schizanthus* en Chile comenzaron con las investigaciones de Castillo y colaboradores a partir de los años 80 (San Martín y col., 1980; Gambaro y col., 1983). Pero ya en el año 1979, en el Instituto de Cultivos de Plantas de Halle en la República Democrática Alemana se había informado el primer aislamiento de alcaloides tipo tropano provenientes de este genero (Muñoz, 1992). Se pudo inferir que el género acumula un amplio espectro de alcaloides derivados del tropano con estructuras únicas (San Martín y col., 1987; De la Fuente y col., 1988), conformación de mono y diésteres derivados principalmente de los ácidos angélico, tíglico, senecioico, itacónico y/o mesacónico; así como la síntesis de derivados de higrina e higrolina (Gambaro y col., 1983).

Trabajos en *Schizanthus grahamii* han permitido el aislamiento de una serie de bases diméricas de tropano: Schizanthina C 35, D 37 y E 38; 3 α -senecioloxitropano 36 (San Martín y col., 1987); Higrina; Higrolina A; Higrolina B; Tropinona; Tropina; Pseudotropina; 3 α -acetoxitropano; 3 α ,7 β -dihidroxitropano; 5-(2-oxopropil)-higrina; 5-(2-hidroxi)-higrina; Cuscohigrina; 3 α senecioloxi-7 β -hidroxitropano; Shizanthina F, G, H e I (Muñoz, 1992).

Los alcaloides de *Schizanthus grahamii* que se emplearon en este trabajo son: 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol, extraídos y purificados a partir de las partes aéreas de la planta.



3 α -senecioloxitropan 6 β -ol



3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol

Se han demostrado numerosos efectos biológicos para los alcaloides con esqueleto tipo tropano (Lounasmaa y Tamminen, 1993). Se sabe que la actividad anticolinérgica sobre los vasos sanguíneos inhibe por completo la vasodilatación periférica y la caída de la presión sanguínea producida por agonistas colinérgicos como acetilcolina y carbacol (Hardman y col., 2001), por lo que se hace un desafío importante la determinación de potenciales efectos cardiovasculares, en el caso de los alcaloides provenientes del género *Schizanthus* (Ahumada y col., 1991).

Existen cuadros patológicos caracterizados por disminución del tono de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos y bradicardia, además de intoxicaciones con productos organofosforados, en los cuales la farmacoterapia es la utilización de bloqueadores colinérgicos no selectivos como atropina y derivados. El inconveniente que tiene esta terapia es la aparición de reacciones no deseadas, como, fotofobia; sequedad de mucosas, atonía intestinal. (Muñoz, 1992).

En relación a lo anteriormente mencionado es importante la investigación de nuevos alcaloides con acción vascular, y son de especial interés los aislados de *Schizanthus grahamii*.

En base a los antecedentes descritos se planteo como hipótesis de trabajo:

3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol aislados de *Schizanthus grahamii* producen disminución o inhibición de la relajación de la musculatura lisa vascular inducida por acetilcolina en aorta aislada de rata.

Los objetivos planteados para el presente trabajo fueron:

- Evaluar el efecto de los alcaloides con esqueleto tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* sobre el tono de la musculatura lisa vascular en ausencia de sustancias vasoactivas.
- Evaluar el efecto de los alcaloides con esqueleto tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata frente a la contracción inducida por noradrenalina.
- Evaluar el efecto de los alcaloides con esqueleto tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata frente a la relajación inducida por acetilcolina.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. MATERIAL.

4.1.1. Material biológico: Se utilizaron 10 ratas normotensas, machos, cepa Sprague Dawley con un peso entre 250 y 300 gramos, provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, con ciclos de luz-oscuridad alternados de 12 horas. La temperatura se mantuvo entre 18° y 22°C y la alimentación fue ad-libitum.

4.1.2. Material farmacológico:

- Acetilcolina ^{*}.
- Etanol ^{*}.
- Noradrenalina ^{**}.
- Sales para solución Krebs Henseleit (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄ y glucosa) ^{**}.
- Alcaloides 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol aislados de *Schizanthus grahamii* ^{***}.
- Mezcla gaseosa con 95% de O₂ y 5% de CO₂ ^{****}.

4.1.3. Instrumentos:

- Baños de órgano aislado.
- Transductor de tensión Grass modelo FCO3C.
- Computador con software ACQ 4.0.
- Baño de flujo recirculante.
- Equipo de ultrasonido Doppler (parks medical electronics modelo 811-B).
- Material quirúrgico y de laboratorio.

^{*} Laboratorio Sigma.

^{**} Laboratorio Merck.

^{***} Proporcionados por el Dr. Orlando Muñoz, Dpto. de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

^{****} AGA S.A.

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Obtención de la aorta de rata: previo al sacrificio a todas las ratas se les registró la presión sanguínea con un equipo Doppler, para determinar su condición de normotensas. Posteriormente fueron sacrificadas por decapitación con guillotina y se les extrajo el segmento de aorta comprendido entre el arco aórtico y el diafragma.

El segmento de aorta fue depositado sobre una placa de petri que contenía una solución de Krebs Henseleit cuya composición era (en mM): NaCl 118,4; KCl 4,7; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 24,9; KH₂PO₄ 1,2 y glucosa 11,1. La solución se reemplazó cada 5 minutos, mientras el segmento de aorta se limpió cuidadosamente de tejido adiposo y adherencias, para luego cortar anillos de 3 a 5 mm de largo.

4.2.2. Preparación del montaje de la aorta aislada de rata: Según lo descrito por Evora y col. (1996), Nakamura y col. (2002) se montaron los anillos de aorta en los baños de órgano aislado.

Los anillos de aorta fueron montados introduciendo su lumen cuidadosamente sobre dos pequeños ganchos metálicos, ubicados en el interior del baño de órgano aislado. Los ganchos metálicos estaban conectados a un transductor de tensión isométrico que registró los cambios de la actividad contráctil de la aorta para ser graficados por el software ACQ 4.0. El baño de órgano aislado contenía 3 ml de solución Krebs Henseleit a 37°C (+/- 1°C), la cual fue recambiada cada 10 minutos.

Los anillos de aorta, montados en los baños de órgano aislado, fueron estabilizados a 2 gramos de tensión durante 90 minutos, siendo burbujeado constantemente con una mezcla gaseosa de 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Las bases utilizadas en la preparación y montaje de la aorta aislada, fueron establecidas en base a protocolos descritos por Enna y col. (1998).

4.2.3. Determinación de la viabilidad del tejido: Según Evora y col. (1996); Nakamura y col. (2002), con el objeto de determinar la viabilidad del tejido, transcurridos 90 minutos de estabilización, se contrajo la aorta de rata con noradrenalina (3×10^{-7} M) y a continuación se relajó con acetilcolina (3×10^{-5} M). Luego se realizaron 3 lavados cada 10 minutos, manteniendo la estabilización a 2 gramos.

4.2.4. Series en estudio: Una vez estabilizado y determinada la viabilidad del tejido, el protocolo utilizado consideró 4 series:

➤ **Serie control:** Preincubada durante 10 minutos con etanol (0,5%).

- **Serie experimental 1:** Preincubada durante 10 minutos con 0,001 mg/ml de alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* disueltos en etanol (0,5°).
- **Serie experimental 2:** Preincubada durante 10 minutos con 0,01 mg/ml de alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* disueltos en etanol (0,5°).
- **Serie experimental 3:** Preincubada durante 10 minutos con 0,1 mg/ml de alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii* disueltos en etanol (0,5°).

4.2.5. Evaluaciones realizadas en cada serie en estudio:

Cabe destacar que la evaluación de cada una de las series experimentales en el baño de órgano aislado fue mediante a un transductor de tensión isométrico que registró los cambios de la actividad contráctil de la aorta para ser graficados por el software ACQ 4.0.

4.2.5.1. Evaluación del efecto de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* sobre aorta de rata en ausencia de sustancias vasoactivas: posterior a la determinación de viabilidad del tejido, se preincubó durante 10 minutos cada una de las 4 series experimentales, y se evaluó el efecto contráctil sobre el tono muscular de la aorta de rata en ausencia de sustancias vasoactivas.

Después de la evaluación de etanol y los alcaloides en cada una de las 4 series en estudio se estabilizaba nuevamente a 2 gramos por 10 minutos reemplazando la solución de Krebs Henseleit cada 5 minutos. Este último procedimiento se repitió también al evaluar el efecto de los alcaloides sobre la actividad de aorta de rata frente a noradrenalina y acetilcolina

4.2.5.2. Evaluación del efecto de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata frente a noradrenalina: luego de evaluada la actividad de etanol y los alcaloides en ausencia de sustancias vasoactivas, y con la finalidad de determinar un probable efecto sobre la magnitud de la contracción, se valoró en forma separada el efecto en las 4 series en estudio sobre la actividad de aorta de rata contraída con noradrenalina (3×10^{-7} M) durante 5 minutos.

4.2.5.3. Evaluación del efecto de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata frente a la relajación inducida por acetilcolina (Ach): posterior a la contracción con noradrenalina (3×10^{-7} M), para determinar un posible efecto inhibitorio en la relajación (Ponce, 2002; Gottschalk, 2003), se evaluó en forma separada el efecto de las 4 series en estudio sobre la actividad de aorta de rata relajada con 6 concentraciones de acetilcolina (1×10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 1×10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 1×10^{-5} ; 3×10^{-5} M). Ver cuadro N° 1.

Cuadro N°1: Evaluaciones realizadas en las cuatro series en estudio:

SERIES	EVALUACIÓN PREINCUBACIÓN	EVALUACIÓN CONTRACCIÓN	EVALUACIÓN RELAJACIÓN
Control	Etanol 0,5 °	Noradrenalina (3×10^{-7} M)	Acetilcolina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} M)
Experimental 1	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,001 mg/ml	Noradrenalina (3×10^{-7} M)	Acetilcolina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} M)
Experimental 2	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,01 mg/ml	Noradrenalina (3×10^{-7} M)	Acetilcolina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} M)
Experimental 3	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina (3×10^{-7} M)	Acetilcolina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} M)

4.2.6. Procedimiento estadístico: Los resultados obtenidos se expresaron en valores promedios y sus errores típicos, efectuándose además pruebas inferenciales interserie paramétricas y no paramétricas. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05; se consideró como significativo un $p < 0,05$.

A continuación se detalla la metodología estadística aplicada en el análisis de los resultados de este estudio:

- Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, la que se usó para comprobar la normalidad de los datos (Zar, 1999).
- Prueba de homocedasticidad de Bartlett, usada para comprobar que las varianzas entre las series sean homogéneas (Zar, 1999).
- Análisis de varianza paramétrico (Andeva) de una vía, cuyo objetivo es comparar los promedios de tres o más grupos de datos (Spiegel, 1991).
- Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, usada en los casos en que el Andeva paramétrico resultó significativo (Zar, 1999).
- Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, el que se usó en los casos en que no se cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Rosner, 2000).
- Prueba de comparación múltiple no paramétricas de Dunn, la que se aplicó en los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativa (Rosner, 2000).
- El análisis de los resultados se realizó usando el programa computacional estadístico Graph Pad Prism (versión 4.0).

5. RESULTADOS.

5.1. EFECTO DE 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA DE RATA EN AUSENCIA DE SUSTANCIAS VASOACTIVAS:

Las evaluaciones en la serie control preincubada con etanol y las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados, no mostraron actividad contráctil de la aorta de rata en ausencia de sustancias vasoactivas. De acuerdo a esto no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Ver Anexos N° 1 y N° 9).

5.2. EFECTO DE 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA DE RATA CONTRAIDA CON NORADRENALINA:

Al contraer con noradrenalina ($3 \times 10^{-7} M$), la serie control preincubada con etanol y de las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la contracción de la serie experimental 3, respecto a la contracción de la serie control (Gráfico N° 1, Anexo N°2)

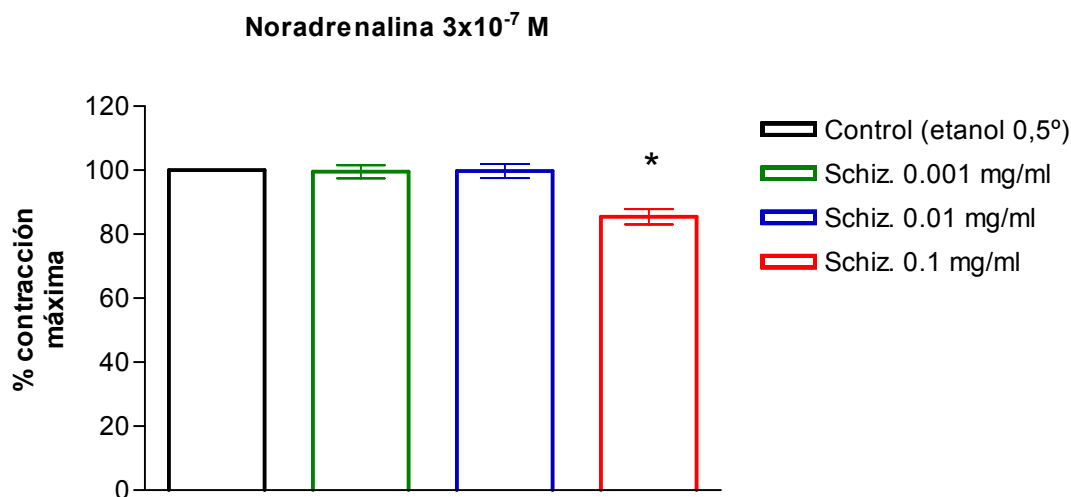


Gráfico N° 1: Porcentaje de contracción máxima inducida por noradrenalina ($3 \times 10^{-7} M$), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm error típico ($n = 10$ animales). Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

5.3. EFECTO DE 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA DE RATA FRENTE A LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA.

Al relajar la aorta de rata con 6 concentraciones de acetilcolina (1×10^{-7} a 3×10^{-5} M), se observó una menor relajación con un desplazamiento hacia la derecha de las curvas de las 3 series experimentales respecto a la curva control. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre:

- La serie experimental 2 y el control para la dosis 3×10^{-7} M de acetilcolina (Gráfico N° 3).
- La serie experimental 3 y el control para las dosis 3×10^{-7} ; 1×10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 1×10^{-5} ; 3×10^{-5} M de acetilcolina. (Gráfico N° 2).

Curva dosis-respuesta

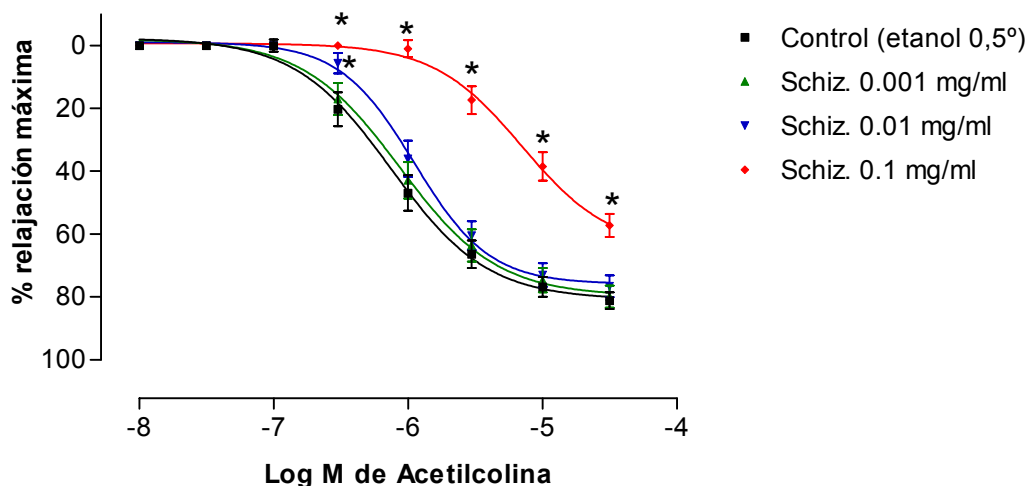


Gráfico N° 2: Curvas de dosis-respuesta inducidas por Acetilcolina. Serie control preincubada con etanol y las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada punto representa el promedio \pm error típico ($n = 10$ animales). Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

La inhibición de la relajación de las 3 series experimentales no es significativa ($p < 0,05$), con relación al control con acetilcolina en concentración de 1×10^{-7} M (Gráfico N° 3, Anexo N° 3).

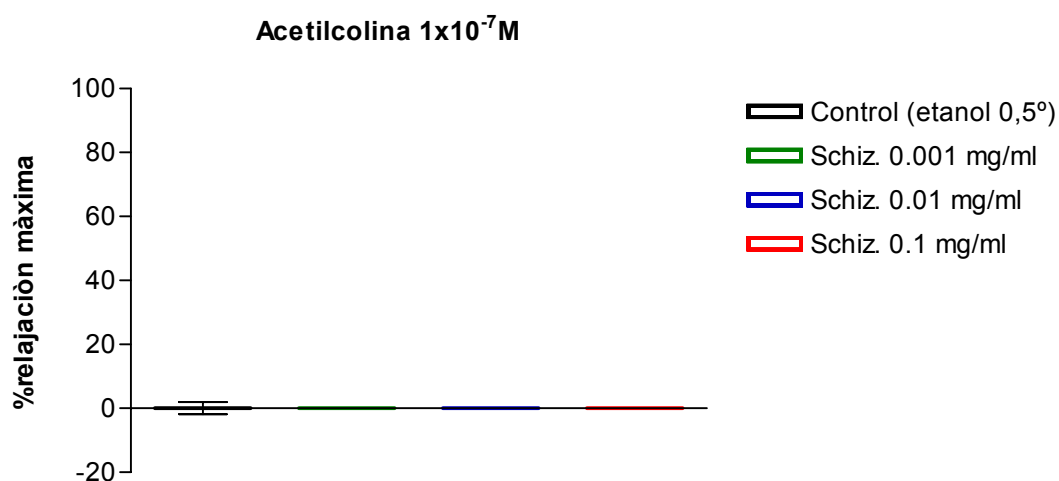


Gráfico N° 3: Porcentaje de relajación máxima inducida por acetilcolina (1×10^{-7} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio +/- el error típico (n = 10 animales).

En el gráfico N° 4 se observa que acetilcolina en concentración de 3×10^{-7} M produce diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de la relajación; produciendo en la serie experimental 2 una disminución, y en la serie experimental 3 una inhibición total de la relajación, en relación ambas, al control (Gráfico N° 4, Anexo N° 4).

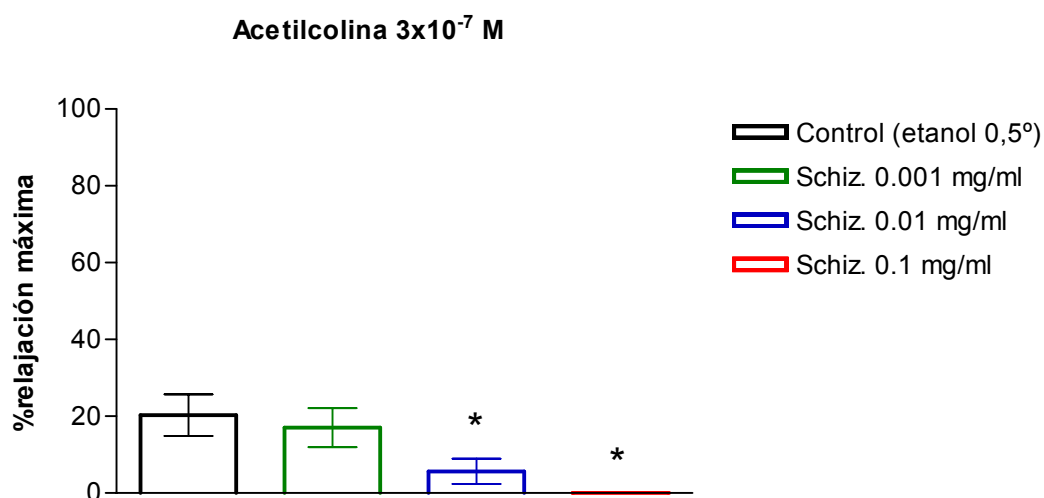


Gráfico N° 4: Porcentaje de relajación máxima inducida por acetilcolina (3×10^{-7} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio +/- el error típico (n = 10 animales). Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

Acetilcolina en concentración de 1×10^{-6} M (gráfico N° 5), 3×10^{-6} M (gráfico N° 6), 1×10^{-5} M (gráfico N° 7), 3×10^{-5} M (gráfico N° 8), produce una disminución significativa ($p < 0,05$) de la relajación en la serie experimental 3 con concentración de 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*, respecto al control (Anexos N° 5 al N° 8)

Acetilcolina 1×10^{-6} M

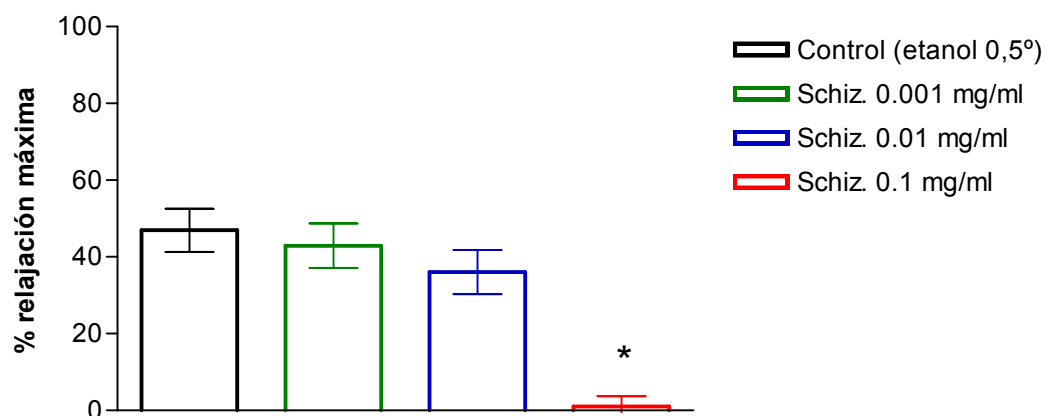


Gráfico N° 5: Porcentaje de relajación máxima inducida por Acetilcolina (1×10^{-6} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm el error típico ($n = 10$ animales). Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

Acetilcolina 3×10^{-6} M

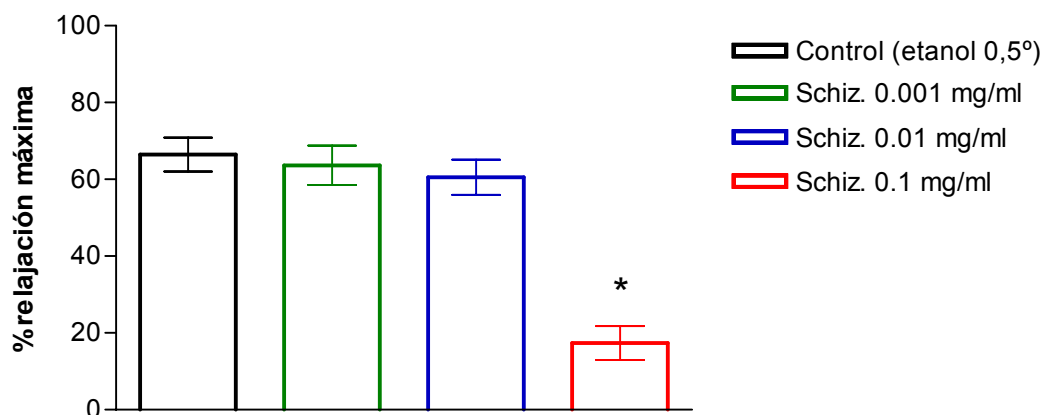


Gráfico N° 6: Porcentaje de relajación máxima inducida por Acetilcolina (3×10^{-6} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm el error típico ($n = 10$ animales). Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

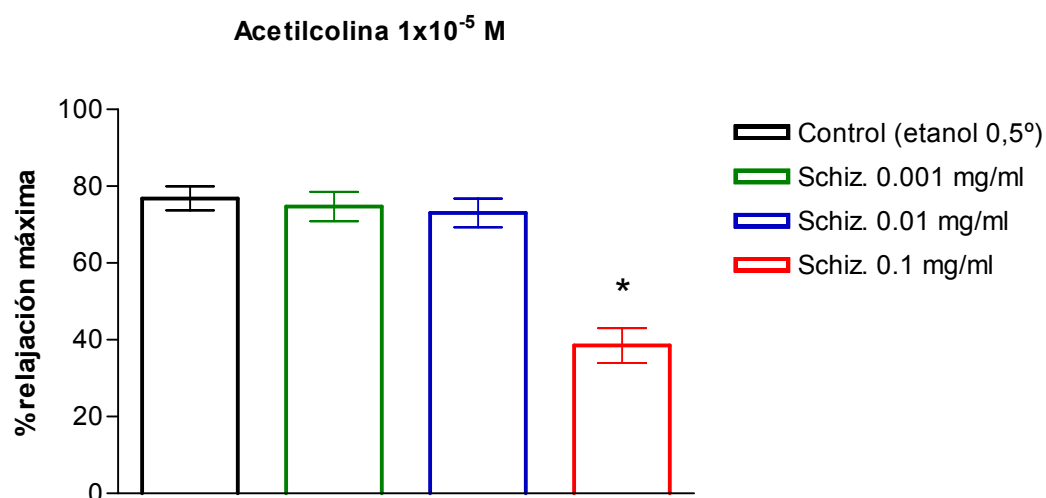


Gráfico N° 7: Porcentaje de relajación máxima inducida por Acetilcolina (1×10^{-5} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm el error típico ($n = 10$ animales). Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

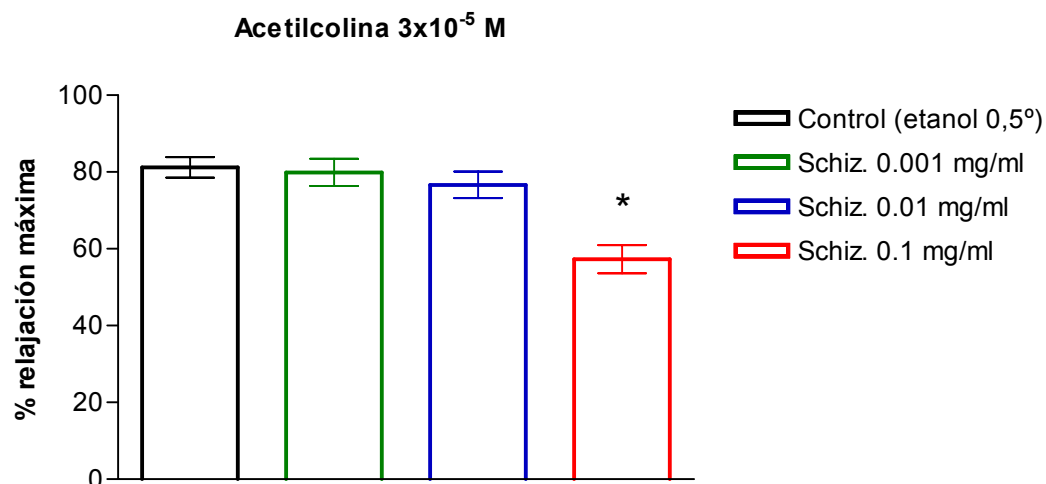


Gráfico N° 8: Porcentaje de relajación máxima inducida por Acetilcolina (3×10^{-5} M), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm el error típico ($n = 10$ animales). Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

Los valores de EC_{50} , que corresponden a la concentración del fármaco en la que se obtiene la mitad del efecto máximo, fueron para las series control y experimentales de: 6,126; 6,061; 5,953 y 5,153 $-\text{Log}_{10}$ respectivamente, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la serie control y la serie experimental 3 con concentración de 0.1 mg/ml de los alcaloides en estudio (Gráfico N° 9)

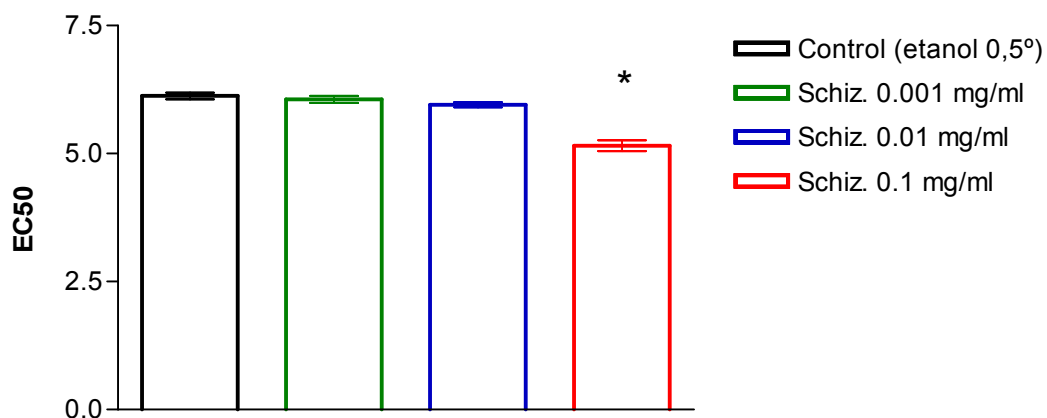


Gráfico N° 9: EC_{50} en aorta de rata relajada con Acetilcolina, en la serie control preincubada con etanol y en las 3 series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml respectivamente, de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio \pm el error típico ($n = 10$ animales). Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

6. DISCUSIÓN.

Durante los últimos años el estudio y evaluación de la actividad de nuevos alcaloides que posean actividad sobre el sistema circulatorio se ha hecho incesante para los investigadores de todo el mundo. Estas investigaciones se realizan en varias especies animales, ya sea in vivo o in vitro, y en diferentes porciones anatómicas (Eglen y col., 1996; Iturriaga, 2001; Maciel y col., 2002; Kwan y col., 2003; Lahlou y col., 2004).

Los alcaloides con esqueleto tipo tropano presentes en especies de la familia Solanaceae constituyen un importante material de investigación por su gran potencial terapéutico, tanto para la medicina humana como veterinaria, debido a sus características químicas y farmacológicas, las que han sido estudiadas desde el siglo XIX (Gadzikowska y Gryniewicz, 2002).

En el presente estudio se ocupó el método del baño de órgano aislado (BOA), para la evaluación de la actividad contráctil de la aorta de rata. Este método es uno de los más versátiles usados en farmacología actualmente (Enna y col, 1998; Gonzáles y col., 2000).

El BOA en aorta de rata ha sido utilizado entre otros por Pupo y col. (1999) y Nakamura y col. (2002), tanto para evaluar la contracción de la musculatura lisa, relajación o ambas condiciones. En este trabajo se usaron anillos extraídos del segmento comprendido entre el arco aórtico y el diafragma (Orallo y Alzueta, 2001).

Los segmentos de aorta se trabajaron con endotelio intacto, pues se usó acetilcolina como agonista colinérgico de los receptores M_3 del endotelio vascular, con lo cual se produjo relajación de la musculatura lisa. Si se hubiese lesionado el endotelio, acetilcolina estimularía los receptores M_2 que se localizan en las células del músculo liso y produciría vasoconstricción (Jaiswal y col., 1991).

Se utilizó etanol (0,5%) como solvente de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*, esto se basa en trabajos de Maciel y col. (2002) que utilizaron extractos de plantas disueltos en etanol, para evaluar su actividad contráctil en aorta de rata.

Para determinar si las diferencias obtenidas en la actividad contráctil de aorta aislada de rata, son atribuidas a los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* y no al solvente (etanol), se usó como control el efecto de etanol frente a la dinámica de la aorta en concentración de 0,5% (0,26 M), esto concuerda con trabajos de Malinowska y col. (1990) quienes señalan que el etanol en concentraciones menores a 0,3 M no produce cambios en el potencial de contracción de vasos sanguíneos de rata.

6.1. EFECTO DE 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA EN AUSENCIA DE SUSTANCIAS VASOACTIVAS.

Antes de desarrollar el protocolo de estudio en BOA de aorta de rata, se valoró el efecto de los alcaloides sobre el tejido, previo enfrentamiento de éste a una sustancia vasoactiva como noradrenalina (Li y col., 1998).

En el presente trabajo las cuatro series experimentales no mostraron variaciones significativas en el tono de la musculatura lisa de la aorta de rata frente a los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* en ausencia de sustancias vasoactivas. Esto concuerda con el trabajo de Gottschalk (2003), quien usando los mismos alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* en otras concentraciones, tampoco obtuvo variación en el tono muscular de aorta de rata.

De estos resultados se puede concluir que los alcaloides valorados en el presente estudio no poseen actividad agonista, ya que no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tejido estabilizado con Krebs Henseleit. Esto coincide con trabajos de Anselmi y col. (1994) e Iturriaga (2001), en los que se valoraron alcaloides naturales los cuales solo causaron efecto frente a otras sustancias vasoactivas.

6.2. EFECTO DE 3 α -SENECIOLOXITROPAN 6 β -OL Y 3 α -MESACONILMETILOXITROPAN 6 β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA CONTRAÍDA CON NORADRENALINA.

Adrenalina, dopamina y noradrenalina componen el conjunto de las catecolaminas naturales, las cuales juegan un importante rol en la regulación del sistema cardiovascular (Flórez, 1997)

Noradrenalina es el principal mediador químico liberado por los nervios adrenérgicos posganglionares del sistema nervioso simpático periférico en los mamíferos (Hardman y col., 2001). La noradrenalina es el agonista más potente para los receptores adrenérgicos α (Iturriaga, 2001), los cuales están ubicados tanto en el endotelio como en la musculatura lisa vascular, generando vasoconstricción de la aorta (Oriowo, 1994).

Anselmi y col. (1994) y Pires y col. (2000), han descrito alcaloides naturales tales como *Albizia inopinata*, *Tetrandrina* e *Isotetrandrina* los cuales poseen la propiedad de modificar la actividad de noradrenalina, sobre la musculatura lisa de aorta de rata. Esto motivo a evaluar la actividad de los alcaloides en estudio, sobre la contracción producida por noradrenalina (3×10^{-7} M).

Los resultados obtenidos al contraer con noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de la contracción con la serie experimental 3 preincubada con 0,1 mg/ml de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*, con respecto a la contracción de la serie control. Esto concuerda con estudios en los que se ha probado la capacidad de diferentes alcaloides para disminuir o inhibir la respuesta contráctil de noradrenalina, en aorta aislada de rata (Chen y col., 1994; Kuramochi y col., 1994; Rhyu y col., 2000).

Satake y col. (1992); Kwan y col. (2003) señalan que atropina y escopolamina, además de sus conocidas propiedades anticolinérgicas, poseen la capacidad de relajar la musculatura lisa vascular, inhibiendo o disminuyendo las contracciones inducidas por noradrenalina. Estas propiedades han sido observadas para atropina en aorta aislada de conejo y rata, en concentraciones tóxicas de 10 hasta 100 veces más altas que las utilizadas para generar bloqueo de los receptores muscarínicos o efecto anticolinérgico. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concordarían con los antecedentes antes citados considerando que los alcaloides 3α -senecioloxitropan 6β -ol y 3α -mesaconilmetiloxitropan 6β -ol de *Schizanthus grahamii* al igual que atropina y escopolamina, son de esqueleto tipo tropano al compartir una base molecular dada por un anillo tropanico. Estas similitudes hacen que posiblemente posean propiedades farmacológicas similares (Muñoz, 1992).

Los alcaloides usados en este trabajo, disminuyeron la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina. Este resultado coincide con el obtenido por Iturriaga (2001), en otros alcaloides, sugiriendo que esta capacidad podría estar dada por: a) un efecto directo sobre la musculatura lisa vascular, o b) un efecto directo por una intervención en la actividad de los sistemas que producen contracción de esta musculatura.

a) Los mecanismos de acción más probables para explicar un efecto directo sobre la musculatura de aorta de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*, serían:

- Interfiriendo con la movilización de Ca^{2+} intracelular o directamente sobre los receptores que operan los canales de calcio, como es el caso descrito por Satake y col. (1992), en el cual atropina disminuye la contracción inducida por noradrenalina en músculo liso de aorta de conejo.
- Intervención de los canales de K^+ descrito por Kwan y col. (2003), en la cual atropina disminuye la contracción inducida por noradrenalina en músculo liso de aorta de rata.

b) La intervención sobre los mecanismos involucrados en la contracción de la aorta tales como:

- Antagonismo o bloqueo de receptores α adrenérgicos descrito por Iturriaga (2001) para alcaloides bisbencilisoquinolinicos.

- Inhibición del metabolismo de fosfato de inositol para la formación final del inositol trifosfato, un segundo mensajero que participa en la cascada de eventos para finalmente producir liberación de calcio intracelular en el músculo liso vascular, descrito por Satake y col. (1992) para atropina.
- Estimulación directa de receptores β_2 adrenérgicos (Oriowo, 1994).
- Estimulación directa de factores relajantes derivados de endotelio como prostaciclina (PGI_2) y óxido nítrico, descritos por Pires y col. (2000), y Rhyu y col. (2000) para alcaloides naturales que disminuyeron la contracción con noradrenalina en aorta torácica de rata con endotelio intacto.

Para dilucidar cual es el o los mecanismos que están involucrados en esta disminución de la actividad contráctil de la musculatura de la aorta, existen protocolos experimentales tanto en modelos de órgano aislado como en cultivos celulares de músculo liso (Enna y col., 1998; Campos y col., 2000; Kwan y col., 2003).

6.3. EFECTO DE 3α -SENECIOLOXITROPAN 6β -OL Y 3α -MESACONILMETILOXITROPAN 6β -OL AISLADOS DE *Schizanthus grahamii* SOBRE AORTA FRENTE A LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA.

Acetilcolina es un neurotransmisor endógeno, que se ubica a nivel de las sinapsis y las uniones neuroefectoras colinérgicas. A pesar de que carece virtualmente de aplicaciones terapéuticas, por lo difuso de su acción y su hidrólisis rápida, tanto por acetilcolinesterasa, como por la butirilcolinesterasa plasmática (Hardman y col., 2001), es usada ampliamente a nivel mundial en el estudio de la fisiología vascular en BOA (Shan y Wang, 2000; Nakamura y col., 2002;). Acetilcolina es capaz de activar todos los subtipos de receptores muscarínicos, aunque se fija más fuertemente a los receptores M_2 y M_3 (Flórez, 1997).

El efecto de acetilcolina como agonista colinérgico sobre el tono de la musculatura lisa de anillos de aorta con endotelio intacto es producir vasodilatación, dado por su participación directa sobre receptores muscarínicos especialmente el subtipo M_3 . El endotelio debe permanecer intacto para utilizar acetilcolina como estimulante de los receptores M_3 del endotelio vascular (Jaiswal y col., 1991).

Cuando se estimulan los receptores M_3 ubicados a nivel endotelial en la aorta de rata, las células endoteliales descargan óxido nítrico (factor relajante derivado de endotelio), el que difunde hacia las células del músculo liso adyacente, produciéndose la relajación (Neelam y col., 1991). Esto ocurre normalmente en ratas normotensas a diferencia de lo descrito en ratas hipertensas donde la activación de receptores M_3 por parte de acetilcolina, en dosis de 3×10^{-7} a $3 \times 10^{-5}M$, producen contracción de la aorta aislada de rata a través de la liberación de factores constrictores derivados de endotelio (Boulanger y col., 1994).

Los alcaloides tipo tropano pertenecientes a la familia Solanaceae, como atropina y escopolamina, han sido estudiados química y farmacológicamente, debido principalmente a su acción anticolinérgica al bloquear receptores muscarínicos (Muñoz, 1992; Mancilla, 2002). Todas las acciones de acetilcolina y sus congéneres en los receptores muscarínicos se pueden bloquear con atropina, porque bloquea de manera selectiva por ocupación competitiva, los sitios de los receptores colinérgicos en las células efectoras autonómicas y en los receptores muscarínicos de las células ganglionares (Hardman y col., 2001). En trabajos de Castillo (2002), Mancilla (2002), y Ponce (2002), se determinó la capacidad de los alcaloides tipo tropano presentes en plantas del género *Schizanthus*, de inhibir la acción de agentes colinérgicos, produciendo disminución de la contracción en íleon de rata.

El resultado obtenido del efecto de los alcaloides en estudio sobre la relajación inducida por acetilcolina, mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) de la relajación, con un evidente desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta de la serie experimental 3 (concentración mayor de los alcaloides) en comparación a la curva dosis-respuesta de la serie control. Esto concuerda con resultados obtenidos en estudios en los que se ha probado la capacidad de diferentes alcaloides del género *Schizanthus* para inhibir o disminuir el efecto de agonistas colinérgicos como acetilcolina y carbacol sobre el tono de la musculatura lisa de íleon aislado de rata (Castillo, 2002; Mancilla, 2002; Ponce, 2002)

Según Flórez (1997) existen diferentes mecanismos por los cuales ciertos fármacos pueden provocar una disminución de la actividad inducida por acetilcolina. Dentro de estas posibilidades los alcaloides 3α -senecioloxitropan 6β -ol y 3α -mesaconilmetiloxitropan 6β -ol de *Schizanthus grahamii* pudiesen estar actuando por medio de:

- Bloqueo de receptores muscarínicos (Cheng y col., 2002).
- Inhibición directa de los factores relajantes derivados de endotelio, como óxido nítrico (Munch, 1994; Kwan y col., 1999).
- Antagonismo de canales de calcio a nivel de retículo endoplasmático que participa en la cascada de formación final de óxido nítrico (Kwan y col., 1999).
- Incremento en el metabolismo de fosfato de inositol para la formación final del inositol trifosfato, un segundo mensajero que participa en la cascada de eventos para finalmente producir liberación de calcio intracelular en el músculo liso y producir contracción (Cheng y col., 2002)

Sin embargo, aunque las propiedades anticolinérgicas aparecen como uno de los mecanismos más probables para explicar el efecto de los alcaloides en estudio frente a la relajación inducida por acetilcolina, no es posible asegurar la existencia de dichas propiedades. Esto dado a que es necesario comprobar efectivamente si los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* se unen a receptores colinérgicos o bien están operando a través de los mecanismos anteriormente señalados.

Según Schmeller y col. (1995) los alcaloides tipo tropano tienen la capacidad de unirse a receptores colinérgicos, tanto muscarínicos como nicotínicos, esto coincide con la acción de los alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii* como inhibidores de la relajación de la musculatura lisa de aorta de rata inducida por acetilcolina.

De acuerdo a lo anterior, los alcaloides 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol pueden presentar propiedades anticolinérgicas, como las descritas para otros alcaloides tipo tropano, como atropina y escopolamina (Flórez, 1997).

Con los antecedentes entregados y el propósito de conocer mejor los efectos de los alcaloides tipo tropano aislados de *Schizanthus grahamii*, se deja una puerta abierta para nuevas investigaciones dirigidas a determinar los mecanismos de acción específicos por los cuales actúan dichos alcaloides a nivel vascular, con el fin de contribuir a la obtención de nuevos fármacos.

6.4. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo al evaluar los alcaloides tipo tropano 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol, presentes en *Schizanthus grahamii*, sobre la actividad contráctil de aorta de rata, se concluye que estos alcaloides:

- No generan actividad contráctil en ausencia de sustancias vasoactivas.
- Producen una disminución en la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina.
- Producen una disminución de la relajación inducida por Acetilcolina.

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada: “3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol aislados de *Schizanthus grahamii* tienen propiedades inhibitorias sobre la relajación de la musculatura lisa vascular inducida por acetilcolina en aorta de rata”.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- AHUMADA, F., F. ASPEE, G. WIKMAN, J.L. HANCKE. 1991. *Withania somnifera* Extract. Its Effect on Arterial Blood Pressure in Anaesthetized Dogs. *Phytother. Res.* 5: 111-114.
- ANSEMI, E., M.D. GOMEZ-LOBO, M.A. BLAZQUEZ, M.C. ZAFRA-POLO, M.P. D'OCÓN. 1994. Influence of the absolute configuration on the vascular effects the tetrandrine and isotetrandrine in rat aorta. *Pharmazie* 49: 440-443.
- BOULANGER, C.M., K.J. MORRISON, P.M. VANHOUTTE. 1994. Mediation by M₃ muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 112: 519-524.
- BRACHET, A., O. MUÑOZ, M. GUPTA, J.L. VEUTHEY, P.H. CHRISTEN. 1997. Alkaloids of *Erithroxylum lucidum* Stem-Bark. *Phytochemistry* 46: 1439-1442.
- CAMPOS, M.G., M.V. OROPEZA, T. VILLANUEVA, M.I. AGUILAR, G. DELGADO, H.A. PONCE. 2000. Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Life. Sci.* 67: 327-333.
- CASTILLO, C.A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus hookeri* sobre íleon de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CHEN, W.Y., F.N. KO, Y.C. WU, S.T. LU, TENG. C.M. 1994. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 380-382.
- CHENG, K., S. KHURANA, Y. CHEN, R.H. KENNEDY, P. ZIMNIAK, J.P. RAUFMAN. 2002. Lithocholylcholine, a bile acid acetylcholine hybrid, is a muscarinic receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 29-35.
- COCCUCI, A. 1989. El mecanismo floral de *Schizanthus*. *Kurtziana* 20: 113-132.
- CUNNINGHAM, J. 1999. Fisiología Veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill interamericana. Ciudad de México. México.
- DE LA FUENTE, G., M. REINA, O. MUÑOZ, A. SAN MARTIN, P.J. GIRAULT. 1988. Tropane alkaloids from *Schizanthus pinnatus*. *Heterocycles* 27: 1887-1897.
- EGLÉN, R.M., H.S. SHARATH, N. WATSON. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 48: 531-556.

- ENNA, S.J., M. WILLIAMS, J.W. FERKANY, T. KENAKIN, R.D. PORSOLT, J.P. SULLIVAN. 1998. Current Protocols in Pharmacology. Volumen 1. Current Protocols. U.S.A.
- EVORA, P.R., P.J. PEARSON, J.F. SECCOMBE, B. DISCIGIL, H.V. SCHAFF. 1996. Metodos experimentais no estudo da funcao endotelial. *Arch. Brasil. de cardiol.* 66: 278-291.
- FLÓREZ, J. 1997. Farmacología humana. 3ª ed., Masson. Barcelona. España.
- GADZIKOWSKA, M., G. GRYNKIEWICZ. 2002. Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. *Acta pol. pharm.* 59: 149-60.
- GAMBARO, V., C. LABBE, M. CASTILLO. 1983. Angeloyl, tigloyl and seneciroyl oxitropane alkaloids from *Schizanthus hoockeri*. *Phytochemistry* 22: 1838-1839.
- GANONG, W. 1998. Fisiología Médica. 16ª ed., El manual moderno. Ciudad de México. México.
- GONZALES, R.J., R.W. CARTER, N.L. KANAGY. 2000. Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic rings segments. *Adv. Physiol. Educ.* 24: 13-21.
- GOTTSCHALK, C.F. 2003. Evaluación de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- GUYTON, A. C., J. E. HALL. 1997. Contracción y excitación del músculo liso. Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México. México.
- HARDMAN, J., L. LIMBIRD, A. GOODMAN. 2001. The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed., McGraw-Hill. New York. U.S.A.
- HULME, E.C., N.J. BIRDSALL, N.J. BUCKLEY. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 573-633.
- ITURRIAGA, P. 2001. Análogos simplificados de alcaloides bisbencilisoquinolínicos como posibles relajantes musculares. Tesis de Doctorado en Química. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile.
- JAISWAL, N., G. LAMBRECHT, E. MUTSCHLER, R. TACKE, K.U. MALIK. 1991. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 842-850.
- KURAMOCHI, T., J. CHU, T. SUGA. 1994. Gou-teng (from *Uncaria rhynchophylla* Miquel) induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta. *Life sci.* 54: 2061-2069.

- KWAN, C.Y., F.M. MA, S.C. HUI. 1999. Inhibition of endothelium dependent vascular relaxation by tetrandrine. *Life Sci.* 64: 2391-2400.
- KWAN, C.Y., W.B. ZHANG, T.K. KWAN, Y. SAKAI. 2003. In vitro relaxation of vascular smooth muscle by atropine: involvement of K⁺ channels and endothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368: 1-9.
- LAHLOU, S., A.F. FIGUEIREDO, P.J. MAGALHAES, J.H. LEAL-CARDOSO, P.D. GLORIA. 2004. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats *Life Sci.* 19: 2401-2412.
- LI, W., B.T. ALTURA, B.M. ALTURA. 1998. Differential effects of methanol on rat aortic smooth muscle. *Alcohol* 16: 221-229.
- LOUNASMAA, M., T. TAMMINEN. 1993. The tropane alkaloids. In: The alkaloids Chemistry and Pharmacology. Cordell, G.A.Ed. Academic Press Inc. London .p: 44.
- MACIEL, S.S., K. DIAS, R. ALMEIDA, I. MEDEIROS. 2002. Comparison of the hypotensive effect induced by the ethanol extrat of *Albizia inopinata* G.P. Lewis in normotensive and chronically L-NAME hypertensive rats. *Acta Farm. Bonaer.* 21: 21-25.
- MALINOWSKA, B., M. PIETRASZEK, E. CHABIELSKA, D. PAWLAK, W. BUCZKO.1990. The effect of ethanol and serotonin on blood vassels of the rat. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 42: 333-342.
- MANCILLA, C.A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presentes en plantas del género *Schizanthus* sobre íleon de rata. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- MARKEN, P.A. 1996. Anticholinergic drug abuse and misuse; epidemiology and therapeutic implications. *CNS Drugs.* 5. p: 190-198.
- MEANA, J.J., J.A. GARCÍA-SEVILLA. 1997. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: Flórez, J. Farmacología humana. 3^a ed.. Ed. Masson. Barcelona. p: 235-260.
- MUNCH, P.A. 1994. Endothelium mediated and direc actions of acetylcholine on rabbit aortic baroreceptors. *Circ. Res.* 74: 422-433.
- MUÑOZ, O. 1992. Química de la flora de Chile Solanaceae. Departamento técnico de investigación. Universidad de Chile, Santiago, Chile, pp. 189-212.
- NAKAMURA, Y., H. MATSUMOTO, K. TODOKI. 2002. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta. *J. Pharmacol.* 89: 29-35.

- NEELAM, J., G. LAMBRECHT, E. MUTSCHLER, R. TACKE, K.U. MALIK. 1991. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 842-850.
- ORALLO, F., A.F. ALZUETA. 2001. Preliminary study of the vasorelaxant effects of nantenine, an alkaloids isolated from *Platycapnos spicata*, in rat aorta. *Planta. Med.* 67: 800-806.
- ORIOWO, M.A. 1994. Atypical β -adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. *Br. J. Pharmacol.* 113: 699-702.
- PARSONS, S.M., C. PRIOR, J.G. MARSHALL. 1993. Acetylcholine transport, storage, and release. *Int. Rev. Neurobiol.* 35: 279-390.
- PIRES, S.L., T.S. DE ASIS, R.N. DE ALMEIDA, J.M. FILHO, C. JULIEN, I.A. MEDEIROS. 2000. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hipotensive and vasorelaxant responses induced by the aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Albizia inopita* (Harmas) G.P. Lewis in rats. *Phytomed.* 7: 91-98.
- POLLARD, B.J. 1994. Interaction involving relaxants. In: Applied Neuromuscular Pharmacology. Oxford University Press, Oxford. P: 202-248.
- PONCE, J.A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus pinnatus* sobre el tono muscular de íleon de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- PUPO, A.S., D. CAVENAGHI, M. CAMPOS, P. MORAIS, N.H. JURKIEWICZ, A. JURKIEWICZ. 1999. Effects of indoramin in rat vas deferens and aorta: connomitant α 1-adrenoceptor and neuronal uptake blockade. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1832-1836.
- RAMOS, M., C. ROVIRA, L. UMFUHRER, E. URBINA. 2001. Sistema nervioso autónomo. *Rev. de Postg. de la Cát. Via Med.* 101: 1-7.
- RHYU, M.R., D.K. KIM, H.Y. KIM, B.K. KIM. 2000. Nitric oxide mediated endothelium dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by aqueous extract of red rice fermented with *Monascus rubber*. *J. Ethnopharmacol.* 70:29-34.
- ROSNER, B. 2000. Fundamentals of Biotatistics. 5th ed., Duxbury. New York.
- SAKMANN, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science.* 256: 503-512.

- SAN MARTIN, A., J. ROVIROSA, V. GAMBARO, M. CASTILLO. 1980. Tropane alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry* 19: 2007-2009.
- SAN MARTIN, A., C. LABBE, O. MUÑOZ, M. CASTILLO, M. REINA, G. DE LA FUENTE, A.G. GONZALEZ. 1987. New tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii*. *Phytochemistry* 26: 819-822.
- SATAKE, N., S. KIYOTO, S. SHIBATA, V. GANDHI, D.J. JONES, M. MORIKAWA. 1992. Possible mechanisms of inhibition with atropine against noradrenaline-induced contraction in the rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* 107: 553-558.
- SCHMELLER, T., F. SPORER, M. SAUERWEIN, M. WINK. 1995. Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie* 50: 493-495.
- SHAN, L.M., H. WANG. 2002. Pharmacological characteristics of the endothelial target for acetylcholine induced vascular relaxation. *Life Sc.* 70: 1285-1298.
- SPIEGEL, M. 1991. Estadística. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- TRESGUERRES, J.F., E. AGUILAR, M.V. CACHOFEIRO, D. CARDINALI, P. GIL, V. LAHERA, J.A.
MARTÍNEZ, F. MORA, R. RODRÍGUEZ, M. ROMANO, J. TAMARGO, P. ZARCO. 2000. Fisiología humana. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España.
- VANDER, A.J., J.H. SHERMAN, D.S. LUCIANO. 2001. Human Physiology. The mechanisms of body function. 8th ed., McGraw-Hill Interamericana. Boston. U.S.A.
- ZAR, H. 1999. Bioestatistical analysis. 4th ed., Plentice-Hall International Inc. New Jersey.

8. ANEXOS.

ANEXO N° 1:

Tabla N° 1: Promedio de las variaciones del tono (VT) de la musculatura lisa de aorta y su error estándar (EE) para las preincubaciones realizadas en las series en estudio en ausencia de sustancias vasoactivas.

SERIE	VT (gramos)	EE
Control (etanol 0,5°)	0,0075	0,02
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	0,0001	0,02
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	0,0116	0,01
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0,0090	0,01

ANEXO N° 2:

Tabla N° 2: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de noradrenalina de $3 \times 10^{-7} M$.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	100,0	00,00
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	99,52	02,05
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	99,74	02,17
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	85,47	02,38

ANEXO N° 3:

Tabla N° 3: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de 1×10^{-7} M.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	00,06	01,93
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	00,00	00,00
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	00,00	00,00
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	00,00	00,00

ANEXO N° 4:

Tabla N° 4: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de 3×10^{-7} M.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	20,29	05,41
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	17,03	05,08
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	05,66	03,26
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	00,00	00,00

ANEXO N° 5:

Tabla N° 5: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de 1×10^{-6} M.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	46,94	05,63
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	42,90	05,78
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	36,06	05,77
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	01,04	02,70

ANEXO N° 6:

Tabla N° 6: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-6} M$.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	66,46	04,40
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	63,63	05,12
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	60,55	04,61
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	17,36	04,42

ANEXO N° 7:

Tabla N° 7: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de $1 \times 10^{-5} M$.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	76,83	03,15
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	74,71	03,86
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	73,07	03,76
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	38,52	04,52

ANEXO N° 8:

Tabla N° 8: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-5} M$.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol 0,5°)	81,22	02,67
Experimental 1 (<i>S. grahamii</i> 0,001 mg/ml)	79,91	03,50
Experimental 2 (<i>S. grahamii</i> 0,01 mg/ml)	76,66	03,48
Experimental 3 (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	57,29	03,67

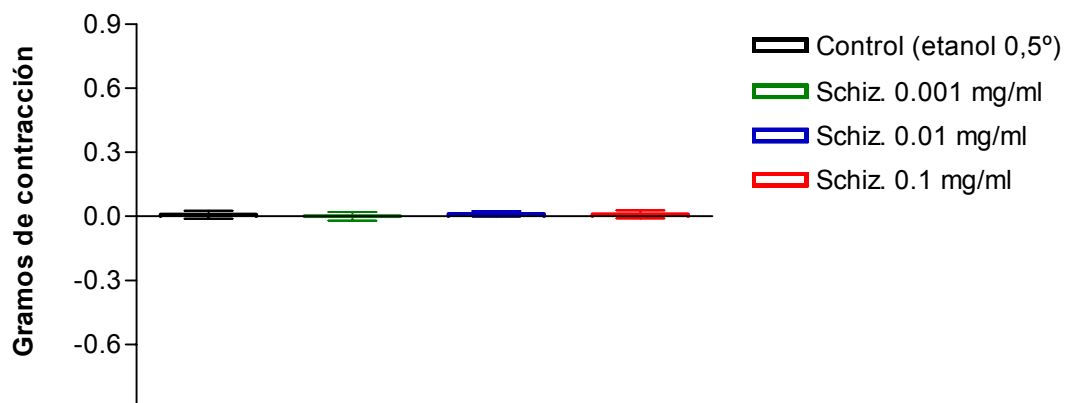
ANEXO N° 9:

Gráfico de la variación de la actividad contráctil de aorta de rata en ausencia de sustancias vasoactivas, en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales preincubadas con 0,001; 0,01 y 0,1 mg/ml de alcaloides aislados de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio +/- error típico (n = 10 animales).

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta memoria de título, especialmente:

- A Pamela, por su amor, compañía y comprensión.
- A mis padres y hermanas, por su amor y apoyo incondicional.
- A mi profesor patrocinante Dra. Viviana Bustos, por su confianza, excelente disposición, apoyo y amistad.
- A mi profesor copatrocinante Dr. Frédérick Ahumada, por su orientación y apoyo.
- Al Dr. Medardo Fernández, por su fundamental ayuda en el desarrollo del método experimental de este trabajo.
- Al Dr. Luis Améstica por su incondicional colaboración y grata compañía durante toda la realización de este trabajo.
- A los profesores del Instituto de Farmacología, en especial al Dr. Marcos Moreira, Dr. Rafael Burgos y Dr. Juan Hancke por su colaboración durante la realización de este trabajo.
- Al Dr. Orlando Muñoz, profesor colaborador, por proveer el extracto utilizado en esta memoria.
- Al Sr. Darío Salazar, por su gran ayuda en el manejo y cuidado de las ratas.
- A la Srta. Juana Vargas, por su paciencia y buena disposición prestada.
- A la Sra. Nury Sánchez, por su ayuda en la preparación del material farmacológico utilizado en este trabajo.
- A mis compañeros tesisistas del Instituto de Farmacología, por su grata compañía y buenas vibras, en especial a Felipe Gottschalk, por su colaboración y compañía en la realización del método experimental.
- A Tamara Tadich por su ayuda en la traducción de textos.
- A mi amigo Victor Vargas por su apoyo en la realización de este trabajo.