

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE FARMACOLOGIA

ACTIVIDAD DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA CONTRACCIÓN DE AORTA DE RATA.

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

JOSÉ ANTONIO VARGAS SÁEZ

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Viviana Bustos S.

Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Marcos Moreira E.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Dr. Orlando Muñoz M.

Nombre

Firma

PROFESORS CALIFICADORES

Dr. Frédérick Ahumada M.

Nombre

Firma

Dr. Hedio Bustamante D.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

28 de Febrero del 2005.

*Con Amor a mis Padres
Ruth y Luis.*

ÍNDICE.

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	10
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	20
7. BIBLIOGRAFÍA	24
8. ANEXOS	30
9. AGRADECIMIENTOS	40

1. RESUMEN.

Actividad de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la contracción de aorta de rata.

Se evaluó el efecto vasorrelajador de un extracto de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, frente a la contracción inducida por noradrenalina en aorta de rata. A la vez, se evaluó el posible efecto anticolinérgico de éste tipo de alcaloides.

Se obtuvieron anillos de aorta torácica proveniente de ratas macho de la cepa Sprague Dawley. Estos fueron montados en baños de órgano aislado de 3 ml y conectados a transductores de tensión estabilizados a una tensión de reposo de 2 g. Los anillos fueron incubados en solución Krebs a 37° C ($\pm 0,5^\circ$ C), en presencia de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Después de un período de estabilización de 90 minutos se evaluó el efecto de 0,1 mg/ml de *S. grahamii*, sobre la relajación inducida con acetilcolina (1×10^{-8} M - 3×10^{-5} M), y la respuesta contráctil inducida por noradrenalina en aorta de rata con endotelio (1×10^{-7} M) y sin endotelio (1×10^{-10} M - 1×10^{-6} M). Se utilizaron como controles series con etanol y fentolamina.

El extracto de alcaloides aislados de *S. grahamii*, inhibió significativamente la respuesta de relajación inducida por dosis acumulativas de acetilcolina, aumentando el efecto ($p \leq 0,05$) de la IC₅₀ (6,82 a 5,64 -Log₁₀). Se observó que los alcaloides de *S. grahamii* disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) la contracción inducida con noradrenalina, tanto en anillos de aorta con endotelio como sin endotelio. El efecto antagonista adrenérgico de los alcaloides de *S. grahamii* fue más potente en preparaciones de aorta sin endotelio, observándose una disminución significativa ($p \leq 0,05$) del efecto de la EC₅₀ (8,37 a 7,96 -Log₁₀), siendo similar a lo obtenido con fentolamina.

En conclusión los alcaloides tipo tropano presentes en *S. grahamii*, producen vasorrelajación en anillos de aorta de rata. Este efecto podría ser atribuible a un antagonismo adrenérgico de tipo competitivo, sin embargo no se descarta un posible efecto antagonista sobre receptores muscarínicos a nivel endotelial.

Palabras claves: *Schizanthus grahamii*, alcaloides tipo tropano, aorta, etanol, ratas.

2. SUMMARY.

Activity of tropane type alkaloids of *Schizanthus grahamii* on the contractability of rat aorta.

The vasorelaxant effect of tropane type alkaloids extracted from *Schizanthus grahamii*, on the contraction induced by noradrenaline on rat aorta was evaluated. At the same time, the possible anticholinergic effect of these alkaloids was also evaluated.

Thoracic aortic rings from Sprague Dawley male rats were used. These were mounted in an isolated organ bath of 3 ml and connected to a transducers of tension stabilized to a tension at rest of 2 g. The rings were incubated in Krebs solution at 37° C ($\pm 0,5^\circ$ C), in presence of O₂ (95%) and CO₂ (5%). After a period of stabilization of 90 minutes the effect of 0,1 mg/ml of *S. grahamii* was evaluated, on the relaxation induced by acetylcholine (1×10^{-8} M - 3×10^{-5} M), and the contractile response induced by noradrenaline in endothelium-intact thoracic aortic rings (1×10^{-7} M) and without endothelium (1×10^{-10} M - 1×10^{-6} M). Controls series incubated with ethanol and phentolamine were used.

The extract of *S. grahamii*, containing the isolated alkaloids inhibited the relaxation response induced by cumulative doses of acetylcholine, increasing its IC₅₀ (6,82 at 5,64 - Log₁₀). *S. grahamii* alkaloids diminished significantly ($p \leq 0,05$) the contraction induced by noradrenaline in aorta rings with and without endothelium. The antagonistic adrenergic effect of alkaloids in *S. grahamii* was more potent in aorta preparations without endothelium, with a significant increase ($p \leq 0,05$) of the EC₅₀ (8,37 at 7,96 -Log₁₀), similar effect was observed with phentolamine incubation.

In conclusion, tropane type alkaloids present in *S. Grahamii* caused vasorelaxation in rings of rat aorta. This effect could be attributable to an adrenergic antagonism of competitive type. However, a possible muscarinic antagonistic effect cannot be discarded at the endothelium level.

Key words: *Schizanthus grahamii*, tropane alkaloids type, aorta, ethanol, rats.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR.

La organización básica de todas las arterias es similar. Anatómicamente se pueden distinguir tres capas concéntricas. La capa interna o túnica íntima constituida de células endoteliales con su eje mayor orientado longitudinalmente; una capa media o túnica media compuesta fundamentalmente por células musculares lisas dispuestas circularmente, y una capa externa o túnica adventicia constituida por fibroblastos y fibras de colágeno. La capa íntima y la capa media están separadas por la lámina elástica interna, y la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa. La estructura de la pared vascular, así como sus propiedades biomecánicas, dependen en gran medida de la matriz extracelular, que está compuesta de fibras elásticas y de colágeno incluidas en un gel compuesto por proteoglicanos, ácido hialurónico, glucoproteínas y agua (Tresguerres y col., 1999; Barra, 2002).

3.2. FISIOLÓGÍA DE LA PARED VASCULAR.

3.2.1. Endotelio vascular:

Está ubicado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular, que le permite actuar como receptor y transmisor de señales. Puede registrar y responder a cambios mediante la liberación de factores vasoactivos. En la actualidad, el endotelio vascular es considerado como el principal órgano de regulación vascular con acción exocrina, paracrina y autocrina (Tresguerres y col., 1999).

Entre los factores vasoactivos derivados del endotelio que participan en la relajación están: la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO) y factores hiperpolarizantes del endotelio (EDHF). Por otra parte, los factores derivados de endotelio que participan como constrictores de la pared vascular están: la endotelina (ET), los factores constrictores derivados del endotelio (EDCF) y el tromboxano A₂ (TXA₂) (Guyton y Hall, 1997; Ferrer y col., 1998; Pérez y col., 1998; Tresguerres y col., 1999).

3.2.2. Músculo liso vascular:

El acoplamiento de excitación-contracción en todos los tipos de músculo depende de los cambios de la concentración intracelular de calcio y la energía es aportada por la degradación de ATP a ADP (Cunningham, 1999).

El calcio participa en el inicio de la contracción del músculo liso (Ganong, 1998), donde se conjuga con una proteína fijadora de calcio denominada calmodulina. El complejo calcio-calmodulina, originado por el aumento de calcio intracelular, activa una enzima proteincinasa-miosinocinasa que cataliza la hidrólisis del ATP y lo acopla con la fosforilación

de las cadenas polipeptídicas presentes en las cabezas de las moléculas de miosina. Dicha fosforilación incrementa la afinidad de las cabezas de miosina por los filamentos de actina, y la fuerza de la miosina se transfiere a los filamentos delgados para causar el deslizamiento filamentosos, la contracción y la fuerza (Cunningham, 1999).

La homeostasis del calcio intracelular en la contracción de las células de músculo liso, se modifica por canales iónicos, estos son:

- Canales de calcio activados por depolarización de membrana (VDCCs), 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; Iturriaga, 2001).
- Canales de calcio operados por receptores (ROCs), los que son activados por neurotransmisores y hormonas (Hardman y col., 2001).

Los VDCCs se encuentran en las membranas celulares y membranas intracelulares de múltiples tejidos. Se han identificado 6 subtipos (L, N, P, Q, T y R), donde los subtipos T y L están presentes en células musculares lisas. Al ser excitados, permiten el paso del calcio desde el líquido extracelular. Aun cuando los canales se abren de forma intermitente y durante cortos períodos de tiempo, el enorme gradiente eléctrico y químico empuja el catión hacia el interior de la célula, invadiendo el citosol (Flórez, 1997).

Los ROCs pueden ser activados por noradrenalina en la membrana celular del músculo liso vascular aumentando la entrada de calcio desde el líquido extracelular (Li y col., 2004).

En general, el control de la musculatura lisa vascular se divide en mecanismos de control extrínsecos y mecanismos de control intrínsecos. Dentro de los procesos locales (intrínsecos) se destacan la autorregulación, la hiperemia activa y la hiperemia reactiva. El control central (extrínsecos) puede dividirse en control humoral y neural (Guyton y Hall, 1997; Cunningham, 1999).

En el control humoral, participan hormonas sistémicas con reconocida acción vasoactiva como las catecolaminas, la angiotensina II, la vasopresina y prostaciclina. Otras sustancias con marcado efecto vasoactivo son la bradicinina, la serotonina, la histamina y las prostaglandinas (Guyton y Hall, 1997; Tresguerres y col., 1999).

El control neural depende del sistema nervioso autónomo, que morfológicamente se divide en el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático. Las fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas poseen como neurotransmisor específico la acetilcolina, la cual también es liberada por las terminaciones nerviosas posganglionares del sistema parasimpático, siendo estas últimas denominadas colinérgicas. La mayoría de las fibras posganglionares simpáticas liberan noradrenalina, denominándose a sus terminaciones nerviosas adrenérgicas (Flórez, 1997; Cunningham, 1999). La acetilcolina de las fibras simpáticas preganglionares estimulan la médula suprarrenal para la secreción de catecolaminas naturales, que se sintetizan a partir de tirosina (Ramos, 2001).

3.2.2.1. Trasmisión adrenérgica: Los receptores adrenérgicos son estructuras moleculares glucoproteicas que responden a estas catecolaminas, transformándola en una respuesta celular específica. Los estudios de fijación de radioligando agonistas o antagonistas demuestran que en un mismo órgano coexisten varios subtipos de receptores adrenérgicos, en proporciones distintas, como ocurre en la pared vascular (Flórez, 1997).

A partir de las respuestas obtenidas en diversos órganos a las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina, y a la sintética isoprenalina, Ahlquist en 1948 clasificó los receptores adrenérgicos en dos clases, α y β . Esto fue confirmado con la aparición de fármacos antagonistas que bloquean de una manera selectiva las acciones α (ergotamina y fenoxibenzamina) y β (dicloroisoprenalina y propranolol) (Flórez, 1997; Guimarães, 2001).

Los receptores α son estimulados en orden de potencia: adrenalina, noradrenalina e isoprenalina. Se asocian a una actividad contráctil de la musculatura lisa vascular (Flórez, 1997). Se dividieron inicialmente en dos grupos, α_1 y α_2 . Esto se comprobó en diversos órganos donde la adrenalina, la noradrenalina y otros agonistas con acción α , eran capaces de inhibir la liberación de noradrenalina provocada por la estimulación de receptores en fibras noradrenérgicas, designando a los receptores presinápticos α_2 -adrenoceptores, teniendo un efecto de retroalimentación negativa. Por otro lado, los agonistas α tienen la capacidad de contraer fibra muscular lisa, denominándose receptores postsinápticos α_1 -adrenoceptores (Flórez, 1997; Iturriaga, 2001).

Se ha comparado, *in vivo* e *in vitro*, las acciones farmacológicas de noradrenalina y adrenalina. Ambos son agonistas directos y sus acciones difieren sobre todo en su eficacia para estimular a los receptores α y β_2 . En esencia, son equipotentes para estimular los receptores β_1 . La noradrenalina es un agonista potente de los receptores α , y tiene poca acción en los receptores β_2 (Hardman y col., 2001).

En algunos mamíferos, la contracción del músculo liso vascular es mediada por α -adrenoceptores. En arterias aisladas de perro (aorta, femoral, mesentérica, yeyunal, renal y esplénica) la contracción es mediada por α_1 -adrenoceptores. También estos receptores predominan en arteria carótida, mesentérica, renal y arterias coccígeas de rata, y en arterias humanas. En la vena safena de perros y humanos, predominan α_2 -adrenoceptores, mediando la contracción. En el músculo liso de aorta de rata predominan α_1 -adrenoceptores, mediando la contracción *in vivo* e *in vitro* del órgano aislado (Guimarães, 2001).

Los receptores β son estimulados en orden de potencia: isoprenalina, adrenalina y noradrenalina, y se les asocia a una actividad relajadora de la musculatura vascular (Flórez, 1997). Los receptores β se dividen en β_1 , que predominan en el miocardio; β_2 ubicados especialmente en músculo liso y β_3 presentes en el tejido adiposo (Hardman y col., 2001; Flórez, 1997).

Es bien conocido que los α_1 -adrenoceptores asociados a la proteína G_q , actúan estimulando la fosfolipasa C que hidroliza el fosfoinositol, resultando en la formación de los

segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los que llevan a un aumento del calcio intracelular (Benhan y Tsien, 1988; Flórez, 1997; Guimarães, 2001).

La respuesta molecular de la activación α_2 -adrenoceptores se caracteriza por su capacidad de asociarse a proteína G_i , inhibir la adenilciclase y reducir la concentración del segundo mensajero adenosinmonofosfato (AMPC) (Flórez, 1997), produciendo actividad en los canales de potasio y de calcio (Guimarães, 2001).

La activación de los β -adrenoceptores por un agonista β adrenérgicos, estimula la enzima adenilciclase mediante la interacción con una proteína G_s , lo que estimula un aumento de AMPC. En los vasos, la relajación del músculo liso por activación β -adrenérgica, puede deberse a un aumento de la permeabilidad para el potasio con la consiguiente hiperpolarización de la membrana (Flórez, 1997).

Los efectos clínicos de la activación de los receptores α adrenérgicos en el músculo liso vascular, resultan en un incremento de la resistencia vascular periférica y de la presión arterial. Aunque es limitada la utilidad clínica de estos compuestos, pueden tenerla para tratar algunos pacientes con hipotensión o choque. Fenilefrina y metoxamina son vasoconstrictores de acción directa y son activadores selectivos de los receptores α_1 . Mefentermina y metaraminol actúan de manera directa como indirecta, es decir, una parte de sus efectos es mediada por liberación de noradrenalina endógena (Hardman y col., 2001).

Los antagonistas α adrenérgicos tienen un espectro amplio de especificidades farmacológicas, inhiben la vasoconstricción inducida por las catecolaminas endógenas; causando vasodilatación tanto en los vasos de resistencia arteriolar como en las venas. Algunos de estos fármacos poseen afinidades notablemente diferentes por los receptores α_1 y α_2 . Es así como la prazosina es mucho más potente para bloquear a los receptores α_1 que a los α_2 , denominándose α_1 selectivo. En cambio la yohimbina es selectiva α_2 ; la fentolamina tiene afinidades similares por ambos subtipos de receptores (Hardman y col., 2001).

3.2.2.2. Transmisión colinérgica: La acetilcolina es un neurotransmisor endógeno que estimula dos diferentes tipos receptores, muscarínicos y nicotínicos (Cunningham, 1999; Hardman y col., 2001). Sir Henry Dale en 1914, define como receptores muscarínicos 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). 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, 2001).

La diferente selectividad de algunos receptores muscarínicos en territorios específicos, inició un proceso de diferenciación de subtipos de receptores. Se han determinado al menos 5 subtipos designados de M_1 a M_5 , los cuales se identificaron por clonación. Los receptores

M₁, se presentan en ganglios autonómicos y corteza cerebral; los receptores M₂, predominan en el miocardio y en mucho menor grado en la musculatura lisa; los receptores M₃ y M₅, se encuentran en células secretoras y en células de la musculatura lisa; los receptores M₄, se ubican en células endoteliales y neuronas ganglionares. Los receptores muscarínicos ubicados en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, reciben poca o ninguna inervación colinérgica (Flórez, 1997; Hardman y col., 2001).

Todos los subtipos de receptores muscarínicos ejercen sus efectos mediante proteínas G. Dependiendo de la naturaleza de la proteína G, esta interacción activa el sistema de segundos mensajeros a través de tres vías: inhibición de la enzima adenilciclase, estimulación de la hidrólisis de fosfoinositol y regulación de la abertura de un canal iónico (Flórez, 1997).

La acetilcolina puede activar los receptores M₃ en el endotelio y músculo liso vascular. Estimula principalmente proteínas G_{q/11} que desencadena la activación de la fosfolipasa C, con la siguiente producción de polifosfatos de inositol (IP₃ e IP₄) y de DAG que activa a la proteincinasa C. IP₃ produce descargas de calcio intracelular desde su sitio de almacenamiento en el retículo endoplásmico. Este estímulo provoca la síntesis de NO o factores de relajación derivados del endotelio (Hardman y col., 2001), que se difunde fuera de las células endoteliales y dentro de las células de músculo liso cercano, provocando vasodilatación (Flórez, 1997; Cunningham, 1999).

Los efectos de la activación de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos, varían según la especie animal; localización anatómica del vaso sanguíneo; subtipo de receptor muscarínico predominante y la interacción con agentes muscarínicos (Eglen y col., 1996).

Los agonistas colinérgicos de acción muscarínica imitan los efectos de la acetilcolina; estos de manera característica son congéneres o alcaloides naturales de acción más prolongada (Hardman y col., 2001). Se clasifican en aquellos de acción directa e indirecta. Se encuentran en el grupo de acción directa la acetilcolina, metacolina, carbacol, betanecol, muscarina, pilocarpina, arecolina, aceclidina, entre otros. La acción de la acetilcolina en el sistema cardiovascular es la vasodilatación que se extiende prácticamente a todos los lechos vasculares, siendo más sensible la dilatación arteriolar, esto si el endotelio está intacto (Flórez, 1997).

Los antagonistas muscarínicos o antimuscarínicos son sustancias que inhiben de forma preferente y competitiva los receptores colinérgicos muscarínicos. La atropina y la escopolamina son los fármacos antimuscarínicos más conocidos, siendo *Atropa belladonna* y *Datura stramonium* las plantas donde se encuentra la atropina, y *Hyoscyamus niger* donde proviene la escopolamina. Ambas tienen afinidad con todos los subtipos de receptores muscarínicos (Flórez, 1997).

En los últimos años, el tratamiento de las enfermedades por las plantas ha tenido un resurgimiento especialmente en los países desarrollados. Las explicaciones de este fenómeno son básicamente: las plantas medicinales contienen sustancias que no han podido ser

sintetizadas, los efectos secundarios de las drogas de síntesis y las numerosas investigaciones científicas que se han realizado en relación a la composición de las plantas medicinales (Laboratorios Hochstetter, 1996).

3.3. ALCALOIDES.

El término alcaloide fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819 y se aplica comúnmente a los compuestos de origen vegetal que tienen propiedades alcalinas. Generalmente son insolubles en agua, pero solubles en alcohol, éter, cloroformo, entre otros (Novelly, 1959).

Los alcaloides de tipo tropano son un grupo determinado de alcaloides que se encuentran distribuidos en el reino vegetal en varias familias de plantas entre las que se encuentran: Orchidaceae, Dioscoreaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, Cruciferae, Eritroxilaceae, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Brassicaceae, Olacaceae y Solanaceae (Muñoz, 1992).

La principal familia en donde se encuentran los alcaloides de tipo tropano corresponde a la Solanaceae (Brachet y col., 1997).

Las plantas del género *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). Existen hasta el momento más de 27 especies diferentes dentro del género *Schizanthus*, siendo conocidas más bien por sus características ornamentales que por sus propiedades químicas o su potencial aplicabilidad medicinal. Suelen ser conocidas por una serie de sinonimias comunes: “orquídea del hombre pobre”, “flor de pajarito”, “pajarito”, “mariposa”, etc. (Gambaro y col., 1983; Muñoz, 1992). Los alcaloides tipo tropano son conocidos también como alcaloides de esqueleto tipo tropano o de base de tropano, ya que comparten una estructura molecular común dada por un anillo tropánico. Las diferencias estructurales entre cada uno de los alcaloides están dadas por la diversidad de radicales que se unen al anillo tropánico (Muñoz, 1992).

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).

Los alcaloides tipo tropano han sido aislados de diferentes especies del género *Schizanthus*, entre las que se encuentran *Schizanthus hookerii* (San Martín y col., 1980; Gambaro y col., 1983), *Schizanthus grahamii* (San Martín y col., 1987), *Schizanthus litoralis* (Muñoz y col., 1996) y *Schizanthus pinnatus* (Griffin y Lin, 1999). Esto incentiva a investigar la química y farmacología de los alcaloides tipo tropano presentes en el género *Schizanthus* como una eventual fuente de novedosas estructuras con potencial acción selectiva (Hartmann y col., 1996).

En el Instituto de Farmacología, perteneciente a la Facultad Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, se han realizado diferentes trabajos apuntando al probable efecto anticolinérgico de los alcaloides tipo tropano presentes en el género *Schizanthus*. Siguiendo esta línea de investigación, Castillo (2002) concluyó que los alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus hookeri* inhibieron la respuesta contráctil máxima de íleon de rata, debido a un antagonismo colinérgico frente a acetilcolina y carbacol. Gottschalk (2003) evaluó los alcaloides tipo tropano 3 α -senecioloxitropan 6 β -ol y 3 α -mesaconilmetiloxitropan 6 β -ol, presentes en *Schizanthus grahamii*, donde concluyó que inhiben significativamente la relajación producida por carbacol en aorta de rata. Además de esta actividad anticolinérgica descrita por Gottschalk (2003), observó que esos alcaloides disminuyeron la magnitud de la contracción producida por noradrenalina, indicando más de un efecto sobre la aorta.

3.4. HIPOTESIS.

Los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* disminuyen la contracción máxima de la curva dosis respuesta dependiente de noradrenalina, en aorta de rata.

3.5. OBJETIVOS.

Los objetivos planteados en el siguiente trabajo fueron:

- Evaluar el efecto de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* sobre la curva dosis respuesta inducida por acetilcolina.
- Evaluar el efecto de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata frente a la contracción inducida por noradrenalina.
- Comparar la actividad de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* sobre la curva dosis respuesta inducida por noradrenalina, con fentolamina.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. MATERIAL.

4.1.1. Material biológico:

Se utilizaron 54 ratas machos, cepa Sprague Dawley entre 250 y 300 g de peso, provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile y del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad 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 *ad-libitum* con pellet estandarizado para ratas.

4.1.2. Material farmacológico:

- Fentolamina.¹
- Etanol.²
- Noradrenalina.²
- Acetilcolina.³
- Solución Krebs (NaCl, KCl, NaH₂PO₄, MgCl₂, NaHCO₃, CaCl₂ y glucosa).²
- Alcaloide tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*⁴ (Anexo 1).
- Mezcla gaseosa con 95% de O₂ y 5% de CO₂.⁵

4.1.3. Instrumentos:

- Baño de órgano aislado.
- Guillotina.
- Transductor de tensión Grass modelo FTOC3.
- Polígrafo Grass modelo 7.
- Material quirúrgico y de laboratorio.

¹ Laboratorio Ciba-Geigy.

² Laboratorio Merck.

³ Laboratorio Sigma.

⁴ Proporcionados por el Dr. Orlando Muñoz, Dpto. de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

⁵ AGA S.A.

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Obtención y preparación de la aorta de rata:

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina. Mediante toracotomía se identificó y extrajo un segmento de la arteria aorta entre el arco aórtico y el diafragma (Anexo 2). El segmento extraído fue colocado en una placa de Petri que contenía solución de Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl 120; KCl 5,9; NaH₂PO₄ 1,2; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 15,4; CaCl₂ 2,5 y glucosa 11,5. Posteriormente fue limpiado del tejido conectivo y sangre para cortar pequeños anillos de 3-4 mm de longitud.

Los anillos de aorta se montaron sobre dos pequeños ganchos metálicos ubicados en el interior del baño de órgano aislado, el cual contenía 3 ml de solución Krebs a 37°C (+/- 0,5°C) con constante burbujeo de una mezcla gaseosa de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (Anexo 3). Los ganchos estaban conectados a un transductor de tensión isométrico FTO3C (Grass Instruments C.O. Quince, Mass. USA), y este a un polígrafo Grass modelo 7.

Los anillos de aorta, montados en los baños de órgano aislado, fueron estabilizados a una tensión de reposo de 2 g durante 60 minutos, cambiando la solución de Krebs cada 10 minutos.

En los experimentos donde el endotelio fue removido, este se retiró deslizando un alambre de acero sobre la pared interna de la aorta (Pérez y col; 2002).

Para determinar la ausencia del endotelio, se adicionó acetilcolina (1×10^{-6} M) previa contracción con noradrenalina (1×10^{-8} M). La concentración de noradrenalina (1×10^{-7} M) propuesta por Furchgott y Zawadzki (1980) fue diluida, debido a que no era posible lograr la tensión de reposo en anillos sin endotelio. La ausencia de relajación en presencia acetilcolina, indicó que el endotelio fue removido exitosamente (Wang y col; 1999).

Para determinar si el endotelio estaba intacto, se contrajo los anillos con noradrenalina (1×10^{-7} M) y 5 minutos después se adicionó acetilcolina a una concentración de 1×10^{-6} M. La relajación con acetilcolina, indicó la presencia de endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980; Martín y col., 2002).

El extracto del alcaloide fue disuelto en etanol. La concentración del solvente fue 0,25% en el baño de órgano aislado, estando disuelto en esa concentración 0,1 mg/ml del alcaloide.

Las bases utilizadas en la preparación y valoración de la actividad de aorta aislada, incluyendo la utilización de baños de órgano aislado están de acuerdo a los protocolos descritos por Enna y col. (1998).

4.2.2. Evaluación de alcaloides en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, en anillos de aorta:

Comprobada la integridad del endotelio, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se estabilizó los anillos aórticos a 2 g de tensión durante 30 minutos, cambiando la solución de Krebs cada 10 minutos.
- Los anillos de la Serie Alcaloides fueron preincubados con 0,1 mg/ml del alcaloide por 10 minutos (Tabla 1).
- Se agregó noradrenalina $3 \times 10^{-7} \text{M}$, para luego esperar 5 minutos (Montecinos, 2004).
- Seguidamente se agregó acetilcolina en dosis acumulativas entre $1 \times 10^{-8} \text{M}$ a $3 \times 10^{-5} \text{M}$, calculando concentraciones intermedias para obtener 8 puntos de referencia en las gráficas.

Se realizaron dos curvas controles. La primera fue preincubada con solución de Krebs (Control Krebs) y la segunda con el solvente del extracto (Control Etanol), lo que permitió evaluar el efecto del solvente sobre la musculatura de la aorta.

Los datos de cada relajación provocada por acetilcolina, fueron expresados usando como referencia el porcentaje de la contracción máxima lograda por noradrenalina, calculando en cada serie la IC_{50} (Concentración en la que se obtiene la mitad del efecto inhibitorio).

Tabla 1: Resumen de la evaluación de la relajación provocada por dosis acumulativas de acetilcolina previa contracción con noradrenalina.

SERIES EN ESTUDIO	PREINCUBACIÓN	CONTRACCIÓN	EVALUACIÓN RELAJACIÓN
Control Krebs	Solución de Krebs	Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$)	Acetilcolina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$ a $3 \times 10^{-5} \text{M}$)
Control Etanol	Etanol 0,25%	Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$)	Acetilcolina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$ a $3 \times 10^{-5} \text{M}$)
Serie Alcaloides	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$)	Acetilcolina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$ a $3 \times 10^{-5} \text{M}$)

4.2.3. Evaluación de alcaloides sobre la actividad contráctil de aorta de rata con endotelio y sin endotelio estimulada con una concentración de noradrenalina:

Comprobada la funcionalidad del endotelio, se realizó el mismo procedimiento para los anillos con y sin endotelio:

- Anillos aórticos fueron estabilizados a 2 g durante 30 minutos, cambiando la solución de Krebs cada 10 minutos.
- Los anillos de las series experimentales (Serie con Endotelio y Serie sin Endotelio) fueron preincubados con 0,1 mg/ml del alcaloide por 10 minutos (Tabla 2).
- Se agregó noradrenalina $1 \times 10^{-8} \text{M}$.

Se realizaron dos controles. El primero con solución de Krebs (Control Krebs) y el segundo (Control Etanol) con el solvente del extracto. Los datos de cada contracción fueron expresados en gramos.

Tabla 2: Resumen de la evaluación de la contracción provocada por noradrenalina en aorta de rata con y sin endotelio.

SERIES EN ESTUDIO	PREINCUBACIÓN	CONTRACCIÓN
Control Krebs	Solución de Krebs	Noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$)
Control Etanol	Etanol 0,25%	Noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$)
Serie con Endotelio	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$)
Serie sin Endotelio	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$)

4.2.3. Evaluación de alcaloides en una curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio:

Comprobada la ausencia de endotelio, se estabilizaron los anillos a 2 g de tensión durante 30 minutos, cambiando la solución de Krebs cada 10 minutos.

Para la construcción de la curva dosis respuesta preincubada con los alcaloides (Serie Alcaloides), se realizó el siguiente procedimiento:

- Anillos fueron preincubados con 0,1 mg/ml de los alcaloides por 10 minutos.
- Se agregaron dosis acumulativas de noradrenalina entre $1 \times 10^{-10} \text{M}$ a $1 \times 10^{-6} \text{M}$, calculando concentraciones intermedias para obtener 9 puntos de referencia en las gráficas (Tabla 3).

Para la construcción de la curva dosis respuesta preincubada con fentolamina (Serie Fentolamina), se realizó el siguiente procedimiento:

- Anillos fueron incubados con $2 \times 10^{-8} \text{M}$ de fentolamina por 10 minutos.
- Se agregaron dosis acumulativas de noradrenalina entre $1 \times 10^{-10} \text{M}$ a $1 \times 10^{-6} \text{M}$, calculando concentraciones intermedias para obtener 9 puntos de referencia en la construcción de las gráficas (Tabla 3).

Se realizaron dos curvas controles. La primera fue preincubada con solución de Krebs (Control Krebs) y la segunda (Control Etanol) con el solvente del extracto.

Los datos fueron expresados como porcentaje de la contracción máxima lograda por noradrenalina, calculando en cada serie la EC_{50} (Concentración en la que se obtiene la mitad del efecto máximo).

Tabla 3: Resumen de la evaluación de la contracción provocada por dosis acumulativas de noradrenalina.

SERIES EN ESTUDIO	PREINCUBACIÓN	CONTRACCIÓN
Control Krebs	Solución de Krebs	Noradrenalina ($1 \times 10^{-10} M$ a $1 \times 10^{-6} M$)
Control Etanol	Etanol 0,25%	Noradrenalina ($1 \times 10^{-10} M$ a $1 \times 10^{-6} M$)
Serie Alcaloides	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina ($1 \times 10^{-10} M$ a $1 \times 10^{-6} M$)
Serie Fentolamina	Fentolamina $2 \times 10^{-8} M$	Noradrenalina ($1 \times 10^{-10} M$ a $1 \times 10^{-6} M$)

4.3. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron expresados como medias aritméticas y su error típico. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05; siendo significativo un $p \leq 0,05$ y como no significativo un $p > 0,05$. Además se realizaron pruebas inferenciales intra e interseries paramétricas. La metodología estadística aplicada en el análisis de los valores obtenidos fue el siguiente:

- Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, utilizada con el fin de comprobar la normalidad de los datos (Zar, 1999).
- Prueba de homocedasticidad de Barlett, aplicada con el fin de comprobar que las varianzas entre las serie fueran homogéneas (Zar, 1999).
- Análisis de varianza paramétrico (Andeva) de una vía, cuyo objetivo fue comparar los promedios de tres o más grupos de datos (Spiegel, 1991).
- Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usado en los casos en que el Andeva paramétrico resultó significativo (Zar, 1999).

Para el análisis de la información obtenida, se utilizó el programa computacional estadístico Graph Pad Prism.

5. RESULTADOS.

5.1. EVALUACIÓN DE LOS ALCALOIDES SOBRE LA CURVA DOSIS RESPUESTA DEPENDIENTE DE ACETILCOLINA, EN ANILLOS DE AORTA.

Se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la magnitud de la relajación y un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis respuesta de la Serie Alcaloides, respecto a las curvas Control (Gráfico 1 y Anexos 4 al 11).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar los anillos preincubados con solución de Krebs (Control Krebs) respecto a los preincubados con etanol al 0,25% (Control Etanol).

Los valores de IC_{50} fueron para Control Krebs, Control Etanol y la Serie Alcaloides de: 6,82; 6,8 y 5,64 $-\log_{10}$ respectivamente (Gráfico 2 y Anexo 12). Al valorar el efecto de la relajación sobre la IC_{50} , se pudo constatar un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en los anillos preincubados con el extracto de *Schizanthus grahamii* (Serie Alcaloides).

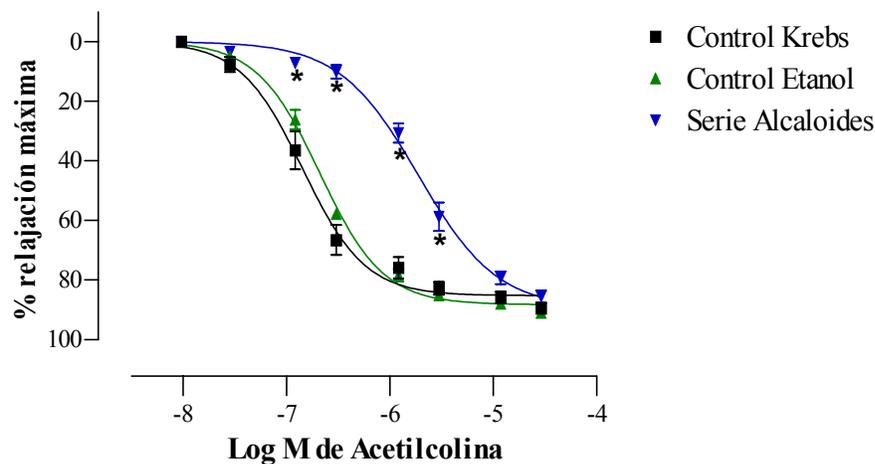


Gráfico 1: Comparación de la relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta preincubados con Krebs (Control Krebs), Etanol (Control Etanol) y Alcaloides 0,1 mg/ml (Serie Alcaloides) extraídos de *Schizanthus grahamii*. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

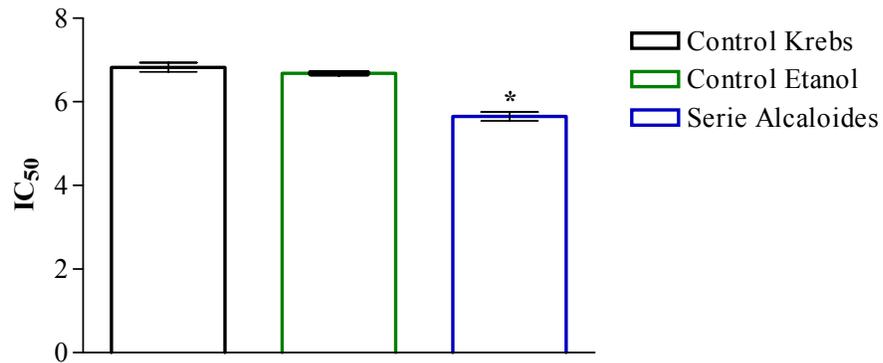


Gráfico 2: IC₅₀ inducida por acetilcolina, en anillos de aorta preincubados con Krebs (Control Krebs), Etanol (Control Etanol) y Alcaloides 0,1 mg/ml (Serie Alcaloides) extraídos de *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio +/- error típico de un “n” de 6 animales. Asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5.2. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA CON ENDOTELIO Y SIN ENDOTELIO ESTIMULADA CON UNA CONCENTRACIÓN DE NORADRENALINA.

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los gramos de contracción de los anillos que fueron preincubados con 0,1 mg/ml de los alcaloides en:

- La Serie con Endotelio y en la Serie sin Endotelio respecto a los Controles.
- La Serie con Endotelio respecto a la Serie sin Endotelio (Gráfico 3 y Anexo 13).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar los anillos preincubados con solución de Krebs (Control Krebs) respecto a los preincubados con etanol al 0,25% (Control Etanol).

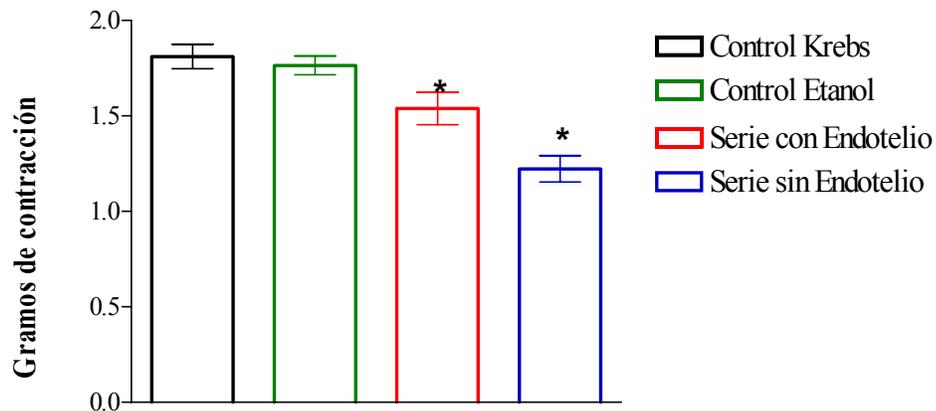


Gráfico 3: Contracción máxima inducida con noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$) en los anillos de aorta de rata preincubados con Krebs (Control Krebs), etanol (Control Etanol), 0,1 mg/ml de los alcaloides presentes en *Schizanthus grahamii* (Serie con endotelio y Serie sin endotelio). Cada barra representa el promedio \pm error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5.3. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LOS ALCALOIDES SOBRE LAS CURVAS DOSIS RESPUESTA DE NORADRENALINA EN ANILLOS DE AORTA SIN ENDOTELIO.

Se observó una menor magnitud ($p \leq 0,05$) de la contracción, además de un desplazamiento hacia la derecha de las curvas dosis respuesta de la Serie Alcaloides y de la Serie Fentolamina, respecto a las curvas Control (Gráficos 4 y 5, Anexos 14 al 22).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar los anillos preincubados con solución de Krebs (Control Krebs) respecto a los preincubados con etanol al 0,25% (Control Etanol). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar los anillos preincubados con los alcaloides (Serie Alcaloides) respecto a los preincubados con fentolamina (Serie Fentolamina) (Gráficos 4 y 5).

Los valores de EC_{50} fueron para Control Krebs, Control Etanol, Serie Alcaloides y la Serie Fentolamina de: 8,37; 8,27; 7,96 y 7,93 $-\text{Log}_{10}$ respectivamente (Gráfico 6 y Anexo 23). Al valorar el efecto de la contracción sobre la EC_{50} , se pudo constatar una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en los anillos de aorta preincubados con el extracto de *Schizanthus grahamii* (Serie Alcaloides) y preincubados con fentolamina (Serie Fentolamina).

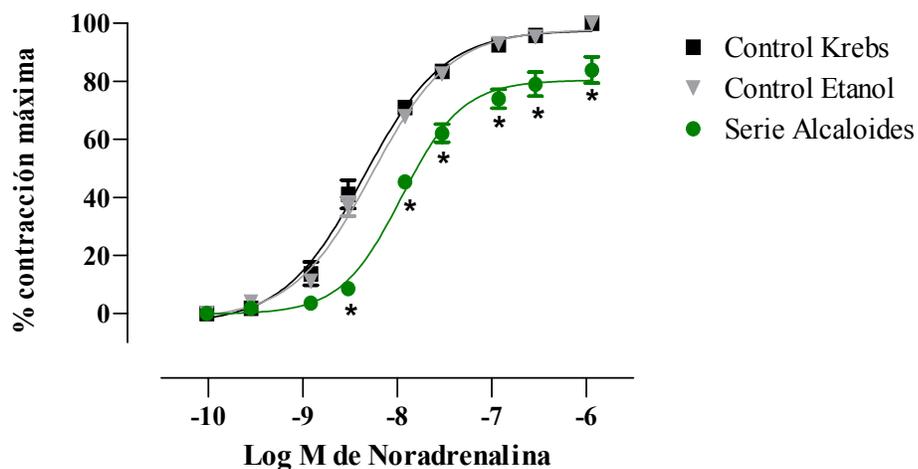


Gráfico 4: Comparación de la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta preincubados con Krebs (Control Krebs), etanol (Control Etanol) y alcaloides 0,1 mg/ml (Serie Alcaloides) extraídos de *Schizanthus grahamii*. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

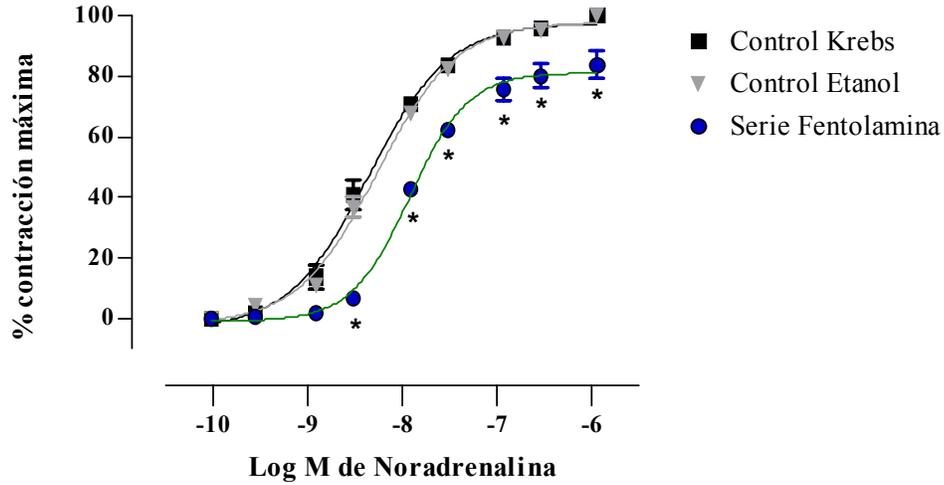


Gráfico 5: Comparación de la contracción inducida por noradrenalina en anillos de aorta preincubados con Krebs (Control Krebs), etanol (Control Etanol) y fentolamina $2 \times 10^{-8} M$ (Serie Fentolamina). Cada punto representa el promedio \pm error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

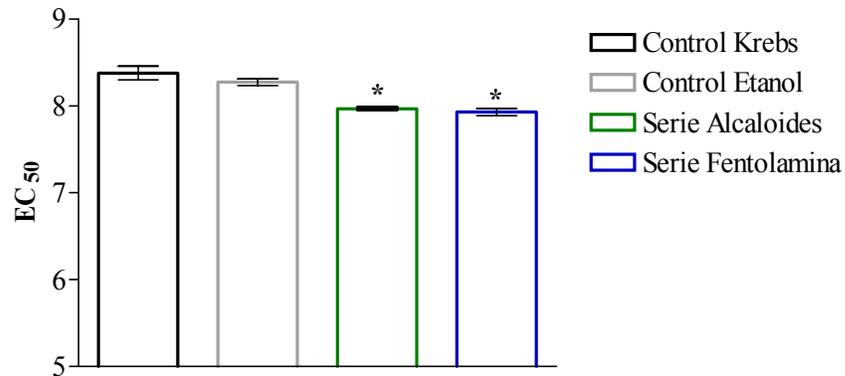


Gráfico 6: EC₅₀ inducida por noradrenalina, en anillos de aorta preincubados con Krebs (Control Krebs), etanol (Control Etanol) y fentolamina $2 \times 10^{-8} M$ (Serie Fentolamina). Cada barra representa el promedio \pm error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSIÓN.

De los estudios químicos del género *Schizanthus*, se pudo inferir que el género acumula un amplio espectro de alcaloides derivados del tropano con estructuras únicas (De la Fuente y col., 1988).

Los alcaloides son solubles en solventes orgánicos como etanol, el cual fue utilizado por Guerrero y col. (2002) en su trabajo en aorta aislada de rata. Sin embargo, existen investigaciones acerca del efecto del etanol en la contracción y relajación en este órgano, al respecto Knych y col. (1984) y Knych (1992) mencionan que induce contracción dependiente de la dosis en aorta de rata, a la vez que Hatake y col. (1993) estudió el efecto del etanol en la relajación inducida por acetilcolina en aorta de rata. Estos antecedentes bibliográficos justifican y validan la realización de un control con etanol.

El posible efecto como bloqueador colinérgico de los alcaloides proveniente del género *Schizanthus* ha sido investigado tanto *in vivo* como *in vitro* en: íleon y aorta aislada de rata (Castillo, 2002; Mancilla, 2002; Montecinos, 2004), en modelos de presión arterial Goldblatt dos riñones una pinza (Ziehlmann, 2003; Zamora, 2004), L-NAME (Cabello, 2003). Sin embargo, Gottschalk (2003) al evaluar alcaloides presentes en *Schizanthus grahamii* en aorta de rata, determinó una menor magnitud en la contracción de aorta de rata inducida por noradrenalina. Esta actividad vasorelajadora ha sido investigada en otros alcaloides y extractos como:

- Gou-teng, una droga obtenida de *Uncaria rhynchophylla*, es usada para el tratamiento de hipertensión en la medicina china. Su mecanismo de acción en aorta de rata es por descarga de EDRF y NO (Kuramochi y col., 1994).
- Sanguinarine, alcaloide extraído de *Sanguinarine canadensis* con actividad antiinflamatoria y antibacterial. En aorta de rata provoca vasorelajación supuestamente por inhibición de formación de IP3 y bloqueo de canales de calcio (Hu y col., 2001).
- *Arbutus unedo*, es usada en Marruecos para tratar la hipertensión arterial. El extracto de la raíz produjo relajación en aorta de rata con endotelio intacto. El mecanismo de acción sugerido es el aumento de la NO_s (óxido nítrico sintasa) endotelial (Ziyyat y col., 2002).
- N-Allylsecoboldine es un derivado de la boldina que fue probado en aorta de rata. El mecanismo de acción es por un bloqueo de canales de calcio y por un antagonismo α_1 -adrenoceptores (Yu y col., 1994).

6.1. EVALUACIÓN DE LOS ALCALOIDES SOBRE LA CURVA DOSIS RESPUESTA DEPENDIENTE DE ACETILCOLINA, EN ANILLOS DE AORTA.

Acetilcolina, a pesar de carecer virtualmente de aplicaciones terapéuticas (Hardman y col., 2001), es usada en el estudio de la fisiología vascular (Pérez y col., 2002).

La dilatación de los lechos vasculares por acetilcolina se debe a la presencia de receptores muscarínicos, primordialmente del tipo M_3 (Jaiswal y col., 1991; Bruning y col., 1994). Cuando se estimulan los receptores M_3 ubicado a nivel endotelial en la aorta de rata, las células endoteliales descargan factor relajante derivado de endotelio u NO, el que difunde hacia las células del músculo liso adyacente, produciéndose la relajación en ratas normotensas (Neelam y col., 1991; Boulanger y col., 1994).

Las plantas que contienen alcaloides de tipo tropano, presentan compuestos de tipo atropina y derivados, por lo tanto, un posible efecto anticolinérgico. Este efecto es la actividad farmacológica más estudiada para los alcaloides de la familia Solaneaceae (Muñoz, 1992).

Los resultados observados en este estudio, mostraron una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la relajación inducida con acetilcolina, con un desplazamiento hacia la derecha de la curva de dosis respuesta de la Serie Alcaloides, comparada con los Controles (Gráfico 1). Esto concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios, en los que se ha probado la capacidad de los alcaloides del género *Schizanthus* para inhibir o disminuir el efecto de diferentes agonistas colinérgicos (acetilcolina y carbacol) en el tono de la musculatura lisa de íleon aislado (Castillo, 2002; Mancilla, 2002; Ponce, 2002) como en el tono de la musculatura lisa en aorta de rata (Gottschalk, 2003; Montecinos 2004). Considerando los valores de IC_{50} (Gráfico 2) y la forma de la curva dosis respuesta (Gráfico 1), se demostró que es necesario aplicar una dosis de mayor concentración de acetilcolina para lograr el 50% del efecto inhibitorio máximo al preincubar con los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahami*. Esto sugiere que los alcaloides podrían actuar como antagonistas sobre receptores muscarínicos a nivel endotelial.

Los antecedentes obtenidos de los alcaloides tipo tropano extraídos del género *Schizanthus*, justificó investigar el efecto anticolinérgico de los alcaloides de este estudio, tal como lo fue para los alcaloides estudiados por Gottschalk (2003) y Montecinos (2004), para luego continuar con la hipótesis planteada.

6.2. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA DEPENDIENTE DE NORADRENALINA.

Noradrenalina es una catecolamina natural, que genera vasoconstricción al activar receptores adrenérgicos en aorta (Fauaz y col., 2000). Se ha utilizado para la contracción de aorta de rata aislada, donde se han investigado mecanismos de vasorelajación de alcaloides y extractos de plantas (Adegunloye y col., 1996; Iturriaga, 2001; Ziyat y col., 2002). La vasorelajación se produciría por mecanismos dependientes del endotelio como de la musculatura lisa vascular, por esto se realizan estudios en anillos de aorta con endotelio y sin endotelio (Kuramochi y col., 1994; Ziyat y col., 2002).

Inicialmente se determinó si los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* condicionaban una disminución en la contracción inducida por noradrenalina. Para esto se usó las mismas concentraciones de alcaloides y noradrenalina trabajado por Gottschalk (2003).

En el Gráfico 3, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los gramos de contracción de los anillos que fueron preincubados con los alcaloides en la Serie con Endotelio y en la Serie sin Endotelio respecto a los Controles. Este resultado indicó que el efecto de los alcaloides de *Schizanthus grahamii* fue disminuir la contracción inducida por noradrenalina. Además se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al comparar la contracción de la Serie con Endotelio respecto a la Serie sin Endotelio, resultado que sugiere una mayor actividad de estos alcaloides sobre el músculo liso vascular.

La inhibición de contracción en anillos de aorta, inducido por los alcaloides de diferentes plantas se pueden atribuir a un efecto sobre receptores adrenérgicos (Chen y col., 1994; Iturriaga 2001), tales como:

- Nantenine, un alcaloide natural aislado desde *Platycapnos spicata* (Orallo, 2003).
- Tetrandrina, obtenido de *Stephania tetrandra* y *Menispermum dauricum* (Kwan y col., 1996; Iturriaga, 2001).

Para determinar un bloqueo α_1 , se utilizan antagonistas α -adrenérgicos como prazosina. Usada, por ejemplo, para relacionar farmacológicamente a ocoteina, un antagonista α_1 -adrenoceptores aislado de *Cassytha filiformis* (Chang y col., 1997).

En este estudio se utilizó fentolamina, antagonista α adrenérgico competitivo con afinidad semejante por los receptores α_1 y α_2 (Hardman y col., 2001). Ha sido utilizado en aorta de rata (Villalobos y col., 1998; Kim y col., 2001) y vena umbilical aislada de ovino (Zhang y Dyer, 1991). Además, Guimarães (2001) afirma que en aorta de rata predominan los receptores α_1 , lo que permitió relacionar la actividad provocada por los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* con un antagonismo α_1 -adrenoceptores.

Existen antecedentes bibliográficos relacionados con el efecto de drogas antimuscarínicas sobre α_1 -adrenoceptores. Holman y McLean (1967), reportó que atropina deprimía la repuesta de noradrenalina exógena en vena mesentérica de oveja. Shinoura y col. (2002) observó que la contracción inducida por metoxamina (vasoconstrictor de acción directa en los receptores α_1) en vena porta de conejo fue menor al aplicar atropina, indicando un antagonismo competitivo α_1 . Posteriormente realizó estudios de fijación de radioligando, demostrado la actividad antagonista de atropina sobre α_1 -adrenoceptores.

En el Gráfico 4, se observó un desplazamiento significativo ($p \leq 0,05$) hacia la derecha de la curva dosis respuesta graficada como Serie Alcaloides y una menor magnitud de la contracción inducida por noradrenalina. Además el valor de EC_{50} (Gráfico 6), indicó que se necesita una mayor concentración de noradrenalina para alcanzar el 50% del efecto máximo al preincubar con los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*. La comparación de las curvas dosis respuesta de los anillos preincubados con 0,1 mg/ml de los alcaloides (Serie Alcaloides) con respecto a los preincubados con 2×10^{-8} M de fentolamina (Serie Fentolamina en el Gráfico 5), no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Esto sugiere que los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* podrían actuar como antagonista competitivo sobre α_1 -adrenoceptores.

Sin embargo, existen una serie de mecanismos involucrados en la contracción de la musculatura lisa de aorta de rata inducida por noradrenalina, sobre los cuales podrían estar actuando los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*, en resumen estos mecanismos son:

- Inhibición de receptores α adrenérgicos (Hardman y col., 2001; Iturriaga, 2001).
- Estimulación de receptores β adrenérgicos (Satake y col., 1992; Hardman y col, 2001).
- Inhibición la entrada de calcio vía ROCs (Li y col., 2004).
- Inhibición la salida de calcio inducido por IP3 (Li y col., 2004).
- Inhibición la entrada de calcio vía VDCCs (Martín y col.,2002).

La estimulación de factores derivados del endotelio que participan en la relajación como en la contracción de la pared vascular, se descarta por la ausencia del endotelio en las curvas dosis respuesta de noradrenalina (Gráficos 4 y 5). Lo anterior, no excluye que los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii* tengan actividad en un vaso sanguíneo con endotelio intacto (como se observó en la Serie con Endotelio del Gráfico 3), permitiendo a futuro evaluar los mecanismos dependientes de endotelio involucrados en el efecto de estos alcaloides.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento de las propiedades de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*, permitiendo realizar nuevas investigaciones para orientar su uso en posibles aplicaciones terapéuticas.

6.3. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo al evaluar los alcaloides presentes en *Schizanthus grahamii*, sobre la actividad contráctil de aorta de rata, se concluye que estos alcaloides:

- Producen una disminución de la relajación inducida por acetilcolina.
- Producen una disminución en la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina.
- Producen una disminución de la contracción inducida por dosis acumulativas de noradrenalina, siendo esta disminución similar a la producida por fentolamina, en las dosis investigadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada: “Los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* disminuyen la contracción máxima de la curva dosis repuesta dependiente de noradrenalina, en aorta de rata”.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- ADEGUNLOYE, B.J., J.O. OMONIYI, O.A. OWOLABI, O.P. AJAGBONNA, O.A. SOFOLA, H.A. COKER. 1996. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 25:235-238.
- BARRA, J.G. 2002. Contribución del músculo liso vascular a la dinámica de la circulación en el estado normotenso y en la hipertensión experimental y clínica. Tesis para Doctorado. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina.
- BENHAM, C.D., R.W. TSIEN. 1988. Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J. Physiol.* 404: 767-784.
- 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.
- BRUNING, T.A., HENDRIKS, M.G., CHANG P.C., KUYPERS, E.A., ZWIETEN, P.A. 1994. In vivo characterization of vasodilating muscarinic receptor subtypes in humans. *Circ. Res.* 74: 912-919.
- CABELLO, D.E. 2003. Efecto de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus tricolor* sobre la presión arterial en ratas normotensas e hipertensas. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CASTILLO, C. A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presenten en *Schizanthus hookeri* sobre íleon de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CHANG, C.W., F.N. KO, M.J. SU, Y.C. WU, C.M. TENG. 1997. Pharmacological evaluation of ocoteine, isolated from *Cassythia filiformis*, as an alpha 1-adrenoceptor antagonist in rat thoracic aorta. *Jpn. J. Pharmacol.* 73:207-214.
- CHEN, WY., KO FN, WU YC, LU ST, TENG CM. 1994. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:380-382.

- COCCUCI, A. 1989. El mecanismo floral de *Schizanthus*. *Kurtziana*. 20: 113-132.
- CUNNINGHAM, J. 1999. Fisiología Veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de Mexico. 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.
- EGLIN, 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. New York. United States of America.
- FAUAZ, G., T. FERES, A. BORGES, T. PAIVA. 2000. Alpha-2 adrenoceptors are present in rat aorta smooth muscle cell, and their action is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 131: 788-794.
- FERRER, D., C. JORGE, R. GARCÍA, P. MARTINEZ. 1998. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan*. 2: 45-53.
- FLÓREZ, J. 1997. Farmacología humana. 3ª ed., Masson. Barcelona. España.
- FURCHGOTT, R., J. ZAWADSKI. 1980. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 373-376.
- 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.
- 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.
- GRIFFIN, W.J., D.G. LIN. 1999. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 53: 623-636.
- GUERRERO, M.F., P. PUEBLA, R. CARRON, M.L. MARTIN, L. ARTEAGA, L.S. ROMAN. 2002. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 80: 37-42.

- GUIMARÃES, S., D. MOURA. 2001. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacol. Rev.* 53: 319-356.
- GUYTON, A., J.E. HALL. 1997. Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de Mexico. México.
- HARDMAN, J., L. LIMBIRD, A. GILMAN. 2001. The pharmacological basic of therapeutics. 10ªed., McGraw-Hill. New York. United States of America.
- HARTMANN, R., A. SAN MARTIN, O. MUÑOZ, BREITMAIER. 1996. Grahamine an unusual tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii*. *Angewandte. Chemie.* 29: 385-386.
- HATAKE, K., I. WAKABAYASHI, S. HISHIDA. 1993. Mechanism of inhibitory action of ethanol on endothelium dependent relaxation in rat aorta. *European journal of pharmacology* 238:441-444.
- HOLMAN, M.E., A. McLEAN. 1967. The innervation of sheep mesenteric veins. *J. Physiol. (Lond)* 190:55-69.
- HU, C.M., H.W. CHENG, Y.W. CHENG, J.J. KAN. 2001. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. *Jpn. J. Pharmacol.* 85:47-53.
- HULME, E.C., N.J. BIRDSALL, N.J. BUCKLEY. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30: 73-633.
- ITURRIAGA, P. 2001. Análogos simplificados de alcaloides bisbencilisoquinolinicos como posibles relajantes musculares. Tesis para Doctorado. 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.
- KIM, H., J. TAI, A.G. GREENBURG. 2001. Alpha adrenergic activation and hemoglobin mediated contraction in the isolated rat thoracic aorta. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*29:367-80.
- KNYCH, E. 1992. Endothelium dependent tolerance to ethanol induced contractions of rat aorta: Effect of inhibition of EDRF action and Nitric Oxide syntesis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 16: 58.63.
- KNYCH, E., C. GUIMARÃES, S. BOIVIN. 1984. Tolerance to ethanol induced contractions of vascular smooth muscle: role of endothelium. *Life Sci.* 35:611-617.

- 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., Y.Y. CHEN, M.F. MA, E.E. DANIEL, S.C. HUI. 1996. Tetrandrine, a calcium antagonist of Chinese herbal origin, interacts with vascular muscle alpha 1-adrenoceptor. *Life Sci.* 59: 359-364.
- LABORATORIOS HOCHSTETTER. 1996. Manual de Consulta Homeopática y Fitoterapia. 8ªed. Santiago. Chile.
- LI, H., L. WANG, S. QU. 2004. Phytoestrogen genistein decreases contractile response of aortic artery in vitro and arterial blood pressure in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 313-318.
- 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.
- MARTIN, H.B., M. MCCALLUM, W.D. STOFER, M.R. EICHINGER. 2002. Kavain attenuates vascular contractility through inhibition of calcium channels. *Planta Med.* 68: 784-789.
- MONTECINOS, B.W. 2004. Efecto 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, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- MUÑOZ, O. 1992. Química de la flora de Chile Solanaceae. Departamento técnico de investigación. Universidad de Chile, Santiago, Chile, pp. 189-212.
- MUÑOZ, O., M. PIOVANO, J. GAMBARINO, V. HELLWING, E. BREIRMAIER. 1996. Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis*. *Phytochemistry.* 43: 709-713.
- 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.
- NOVELLY, A. 1959. Química orgánica. 2ª ed., El Ateneo S.A. Buenos Aires. Argentina.
- ORALLO, F. 2003. Pharmacological effects of (+)-nantenine, an alkaloid isolated from *Platycapnos spicata*, in several rat isolated tissues. *Planta Med.* 69: 135-142.

- PÉREZ, A., L. CARTAYA, V. VALENCIA, V. SANJURJO, T. ILISÁSTIGUI. 1998. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev. Cub. Estomatol.* 35:56-61.
- PÉREZ, F., A. COGOLLUDO, J. LÓPEZ, F. ZARAGOZÁ, M. IBARRA. 2002. Respuesta de las arterias pulmonares de lechón al óxido nítrico y a dadores de óxido nítrico: Evolución con la edad postnatal y modulación por el estrés oxidativo. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 68:58-100.
- 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.
- RAMOS, M., C. ROVIRA, L. UMFUHRER, E. URBINA. 2001. Sistema nervioso autónomo. *Rev. de Postg. de la Cát. Via Med.* 101: 1-7.
- 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.
- SAN MARTIN, A., J. ROVIROSA, V. GAMBARO, M. CASTILLO. 1980. Tropane alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry.* 19: 2007-2009.
- 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.
- SHINOURA, H., G. TSUJIMOTO, Y. TERANISHI, H. TSURU. 2002. Antagonistic effects of antimuscarinic drugs on α_1 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 366: 368-371.
- SPIEGEL, M. 1991. Estadística. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España.
- 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. 1999. Fisiología Humana. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España.
- VILLALOBOS, R., J. LOPEZ, M. IBARRA. 1998. Chloroethylclonidine is a partial alpha1 adrenoceptor agonist in aorta and caudal arteries of the Wistar Kyoto rat. *Eur. J. Pharmacol.* 351:49-52.

- WANG, G.J., X.C. WU, C.F. CHEN, L.C. LIN, Y.T. HUANG, J. SHAN, P.K. PANG. 1999. Vasorelaxing Action of Rutaecarpine: Effects of Rutaecarpine on Calcium Channel Activities in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289:1237-1244.
- YU, S.M., S.S. LEE, Y.S. HOU, C.M. TENG. 1994. Mechanisms of vasorelaxation induced by N-allylsecoboldine in rat thoracic aorta. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 349:637-643.
- ZAMORA, M.A. 2004. Efecto de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la presión arterial sistólica, en ratas normotensas e hipertensas renovasculares. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- ZAR, H. 1999. Biostatistical Analysis. 4^a ed., Plentice-Hall International Inc. New Jersey. United States of America.
- ZHANG, L., D. DYER. 1991. Characterization of α -adrenoceptors mediating contraction in isolated ovine umbilical vein. *European J. Pharmacol.* 197: 63-67.
- ZIEHLMANN, C.A. 2003. Efecto de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus tricolor* sobre la presión arterial en ratas normotensas e hipertensas renovasculares. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- ZIYYAT, A., H. MEKHFI, M. BNOUHAM, A. TAHRI, A. LEGSSYER, J. HOERTER, R. FISCHMEISTER. 2002. Arbutus unedo induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytother. Res.* 16:572-575.

8. ANEXOS.

ANEXO 1:



Figura 1: *Schizanthus grahamii*⁶



Figura 2: *Schizanthus grahamii*⁷

⁶ **Figura 1:** Disponible en Internet: http://www.thompson-morgan.com/seeds/us/product_7429_1.html.

⁷ **Figura 2:** Disponible en Internet: http://www.anniesannuals.com/signs/S/Schizanthus_grahamii.htm.

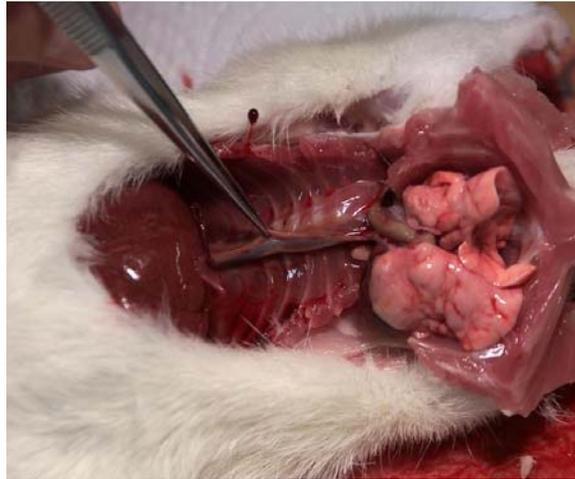
ANEXO 2:

Figura 3: Extracción del segmento de aorta de rata.



Figura 4: Aorta con grasa y adherencias.

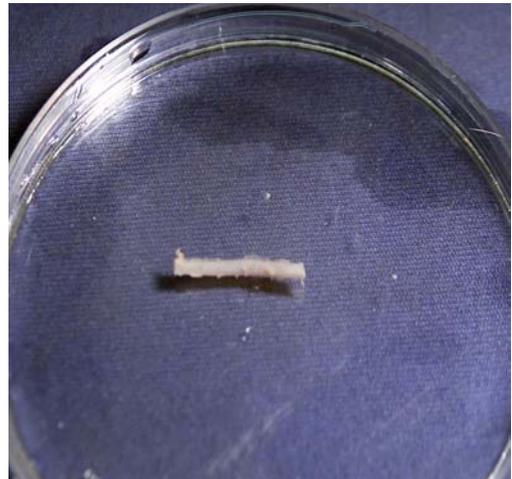


Figura 5: Aorta Limpia.

ANEXO 3:

Figura 6: Baño de órgano aislado.

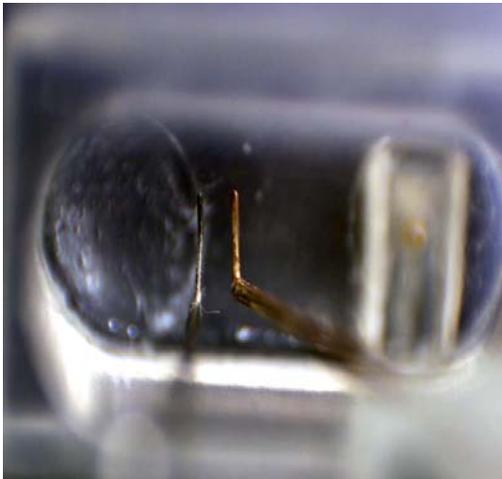


Figura 7: Ganchos metálicos.

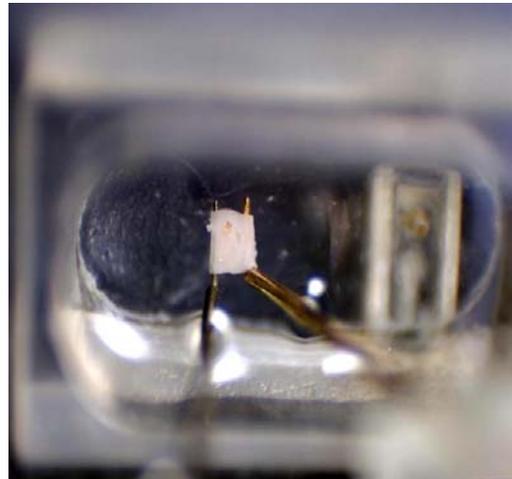


Figura 8: Anillo de aorta en el baño.

ANEXO 4:

Tabla 4: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $1 \times 10^{-8} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	0	0
Control Etanol (Etanol 0,25%)	0	0
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0	0

ANEXO 5:

Tabla 5: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-8} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	7,69	2,52
Control Etanol (Etanol 0,25%)	4,89	0,87
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	3,42	1,28

ANEXO 6:

Tabla 6: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $1 \times 10^{-7} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	36,52	6,35
Control Etanol (Etanol 0,25%)	26,20	3,26
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	7,11	1,56

ANEXO 7:

Tabla 7: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-7} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	66,60	5,06
Control Etanol (Etanol 0,25%)	57,89	1,37
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	10,09	2,21

ANEXO 8:

Tabla 8: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	75,95	3,63
Control Etanol (Etanol 0,25%)	78,44	2,01
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	30,74	3,19

ANEXO 9:

Tabla 9: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-6} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	82,81	2,15
Control Etanol (Etanol 0,25%)	85,17	1,18
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	58,79	4,77

ANEXO 10:

Tabla 10: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	85,93	1,96
Control Etanol (Etanol 0,25%)	87,98	1,43
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	79,24	2,14

ANEXO 11:

Tabla 11: Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$), en anillos de aorta con endotelio con una concentración de Acetilcolina de $3 \times 10^{-5} \text{M}$.

SERIE	%RM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	89,51	1,82
Control Etanol (Etanol 0,25%)	91,14	1,65
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	85,56	2,03

ANEXO 12:

Tabla 12: Valores de EC_{50} expresadas en $-\text{Log}_{10}$ y su error estándar (EE) para las series en estudio en una curva dosis respuesta dependiente de acetilcolina, previa contracción con Noradrenalina ($3 \times 10^{-7} \text{M}$).

SERIE	EC_{50}	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	6.82	0.10
Control Etanol (Etanol 0,25%)	6.68	0.01
Serie Acetilcolina (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	5.64	0.10

ANEXO 13:

Tabla 13: Contracción máxima promedio (CMP) expresado en gramos y su error estándar (EE) para las series en estudio sobre la actividad contráctil de aorta de rata con endotelio y sin endotelio estimulada con una concentración de Noradrenalina ($1 \times 10^{-8} \text{M}$).

SERIE	CMP	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	1,81	0,06
Control Etanol (Etanol 0,25%)	1,76	0,05
Serie con Endotelio (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	1,54	0,08
Serie sin Endotelio (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	1,22	0,06

ANEXO 14:

Tabla 14: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $1 \times 10^{-10} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	0	0
Control Etanol (Etanol 0,25%)	0	0
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0	0
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	0	0

ANEXO 15:

Tabla 15: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $3 \times 10^{-10} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	1,89	0,56
Control Etanol (Etanol 0,25%)	3,98	0,86
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	1,88	0,60
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	0,36	0,23

ANEXO 16:

Tabla 16: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de 1×10^{-9} M.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	13,71	4,00
Control Etanol (Etanol 0,25%)	16,44	3,26
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	3,62	0,87
Serie Fentolamina (Fentolamina 2×10^{-8} M)	1,65	0,12

ANEXO 17:

Tabla 17: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de 3×10^{-9} M.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	41,09	4,91
Control Etanol (Etanol 0,25%)	38,11	3,86
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	8,56	1,87
Serie Fentolamina (Fentolamina 2×10^{-8} M)	6,90	0,98

ANEXO 18:

Tabla 18: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de 1×10^{-8} M.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	71,04	1,58
Control Etanol (Etanol 0,25%)	70,32	1,11
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	45,31	1,89
Serie Fentolamina (Fentolamina 2×10^{-8} M)	42,75	1,74

ANEXO 19:

Tabla 19: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $3 \times 10^{-8} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	83,47	0,58
Control Etanol (Etanol 0,25%)	83,57	1,11
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	62,10	3,11
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	62,17	2,25

ANEXO 20:

Tabla 20: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $1 \times 10^{-7} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	92,61	0,48
Control Etanol (Etanol 0,25%)	92,99	0,46
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	73,94	3,26
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	75,57	3,62

ANEXO 21:

Tabla 21: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $3 \times 10^{-7} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	95,87	0,29
Control Etanol (Etanol 0,25%)	95,55	0,26
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	79,01	4,11
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	80,24	3,94

ANEXO 22:

Tabla 22: Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio, con una concentración de Noradrenalina de $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

SERIE	%CM	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	100	0
Control Etanol (Etanol 0,25%)	100	0
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	83,89	4,51
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	83,76	4,47

ANEXO 23:

Tabla 23: Valores de EC_{50} expresadas en $-\text{Log}_{10}$ y su error estándar (EE) para las series en estudio en la comparación de curvas dosis respuesta de noradrenalina en anillos de aorta sin endotelio.

SERIE	EC_{50}	EE
Control Krebs (Solución de Krebs)	8.37	0.07
Control Etanol (Etanol 0,25%)	8.27	0.03
Serie Alcaloides (<i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	7.96	0.01
Serie Fentolamina (Fentolamina $2 \times 10^{-8} \text{M}$)	7.93	0.04

9. AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma ayudaron a la realización de este Memoria de Título, en forma especial:

- Dra. Viviana Bustos S., Profesor patrocinante, por su ayuda, orientación y preocupación en la realización de esta Memoria.
- Dr. Marcos Moreira E., Profesor copatrocinante, por gestionar la realización de esta Memoria, por sus consejos y ayuda en su corrección.
- Dr. Luis Améstica G., por su ayuda fundamental en la realización de los análisis estadísticos de este trabajo.
- Dr. Frédérick Ahumada, Dr. Rafael Burgos, y Dr. Juan Hancke, por su excelente disposición y ayuda en la realización de este trabajo.
- Dr. Felipe Gottschalk R., por su ayuda en el montaje los baños de órgano aislado y los consejos entregados.
- Sra. Nury Sánchez, por su ayuda en la preparación de las soluciones.
- Sr. Raúl Vela V., por su gran ayuda y aporte en la realización de esta Memoria.
- Srta. Marcela Ortega y Sr. Raúl Cristi, por su ayuda en la revisión de los cálculos y manejo de las soluciones utilizadas.
- Sr. Dario Salazar, por su ayuda en el manejo de las ratas.