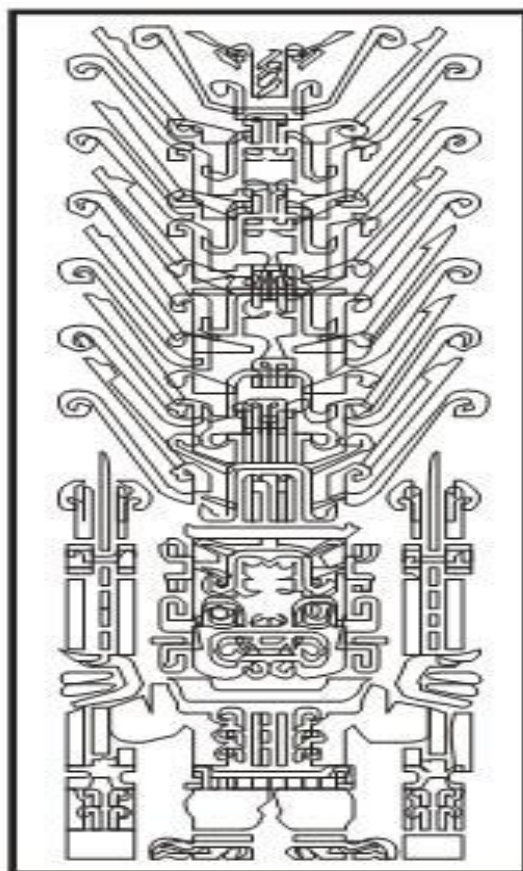


UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLAREAL
ESCUELA UNIVERSITARIA DE POST GRADO



TESIS

**“EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y TÓXICO DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE CALCEOLARIA MYRIOPHYLLA KRAENZ EN
RATONES HIPERTENSOS INDUCIDOS POR L-NAME”**

PRESENTADO POR:

YOVANI MARTIN CONDORHUAMÁN FIGUEROA

PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN MEDICINA

LIMA – PERU

2012

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1 Antecedentes	2
1.2 Planteamiento del problema y formulación del problema	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación	5
1.5 Hipótesis	6
1.5.1 Hipótesis general	6
1.5.2 Hipótesis específicas	6
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1 Fisiología de la presión arterial	7
2.2 Epidemiología de la hipertensión arterial	7
2.3 Fisiopatología de la hipertensión arterial	8
2.4 Clínica de la hipertensión arterial	11
2.5 Tratamiento de la hipertensión arterial	14
2.6 Aspectos botánicos y etnobotánicos de <i>Calceolaria myriophylla</i>	17
2.7 Investigación y desarrollo de nuevos fármacos	18
2.8 Etapas de investigación de un producto farmacéutico	19
2.8.1 Estudios pre clínicos	19
2.8.2 Estudios clínicos	20

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño metodológico	21
3.2 Tipo de estudio	21
3.3 Población de estudio	21
3.4 VARIABLES	21
3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS	21
3.4.1.1. Variable Independiente	21
3.4.1.2. Variables Dependientes	21
3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS	22
3.4.2.1. De la especie vegetal	22
3.4.2.2. De los animales de experimentación	22
3.5 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	22
3.5.1. Obtención del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz y realización del análisis fitoquímico cualitativo	22
3.5.1.1. Recolección de la muestra vegetal	22
3.5.1.2. Secado y molienda de la planta	23
3.5.1.3. Preparación del extracto	23
3.5.1.4. Estudio fitoquímico	23
3.5.2. Determinación del efecto antihipertensivo del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz en ratones	24
3.5.2.1. Evaluación del efecto antihipertensivo	24
3.5.3. Determinación del efecto tóxico del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz	25
3.5.3.1. Determinación de la toxicidad aguda del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz en ratones	25
3.5.3.2. Determinación de la toxicidad crónica del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz en ratas	26
3.5.4. Determinación de los niveles séricos de óxido nítrico y de malondialdehído	27
3.5.4.1. Determinación de óxido nítrico	27
3.5.4.2. Determinación del malondialdehído	27
3.5.5 Análisis estadístico	27

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Del análisis fitoquímico cualitativo	28
4.2 De la determinación del efecto antihipertensivo del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i>	28
4.2.1 De la determinación del efecto antihipertensivo del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz	29
4.2.1.1 Sobre la presión arterial sistólica	29
4.2.1.2 Sobre la presión arterial diastólica	30
4.2.1.3 Sobre la presión arterial media	31
4.2.1.4 Eficacia antihipertensiva sobre la presión arterial sistólica	32
4.2.1.5 Eficacia antihipertensiva sobre la presión arterial diastólica	33
4.2.1.6 Eficacia antihipertensiva sobre la presión arterial media	34
4.3 Determinación del óxido nítrico y malondialdehido	35
4.4 De la toxicidad aguda del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> en ratones normotensos	37
4.5 De la toxicidad crónica del extracto metanólico de <i>Calceolaria myriophylla</i> en ratas normotensas	37
4.6 De la evaluación del efecto toxico a nivel anatomopatológico	42

CAPITULO V

DISCUSIÓN

46

CONCLUSIONES

52

RECOMENDACIONES

52

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1.** Clasificación de la presión arterial para adultos (18 años o mayores).
- TABLA 2.** Cambios en el estilo de vida y efecto sobre la presión arterial.
- TABLA 3.** Determinación de metabolitos secundarios del extracto metanólico.
- TABLA 4.** Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz.
- TABLA 5.** Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial sistólica del extracto metanólico en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- TABLA 6.** Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial diastólica del extracto metanólico a ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- TABLA 7.** Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial diastólica del extracto metanólico a ratones hipertensos inducidas por L-NAME.
- TABLA 8.** Niveles de oxido nítrico (nmol/mL) al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- TABLA 9.** Niveles de malondialdehido (nmol/mL) al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- TABLA 10.** Niveles de los datos hematológicos y bioquímicos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.
- TABLA 11.** Niveles de los datos hematológicos y bioquímicos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Evolución en el manejo de la hipertensión arterial.
- FIGURA 2.** Algoritmo para el tratamiento de la hipertensión arterial. Las interrogantes son las que se podrían plantear para el JNC VIII.
- FIGURA 3.** *Calceolaria myriophylla* Kraenz: “Zapatilla”, “Ayac Zapatilla”.
- FIGURA 4.** Etapas de la investigación de un nuevo medicamento.
- FIGURA 5.** Proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de drogas.
- FIGURA 6.** Comparaciones de los niveles de porcentajes de la elevación de la presión arterial basal y presión arterial post inducción por L-NAME.
- FIGURA 7.** Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- FIGURA 8.** Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 9. Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial media en ratones hipertensos Inducidos por L-NAME.

FIGURA 10. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 11. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 12. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 13. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 14. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial media en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 15. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial media en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 16. Niveles de Óxido Nítrico al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 17. Niveles de Malondialdehído al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

FIGURA 18. Nivel de glucosa al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 19. Nivel de colesterol total al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 20. Nivel de HDL-colesterol al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 21. Nivel de triglicéridos al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 22. Nivel de urea al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 23. Nivel de TGP al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 24. Nivel de fosfatasa alcalina al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 25. Nivel de leucocitos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días.

FIGURA 26. Grupo control se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 27. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 28. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 29. Grupo control se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 30. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 31. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 32. Grupo control se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 33. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 34. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 35. Grupo control se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 36. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

FIGURA 37. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

“EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y TÓXICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE CALCEOLARIA MYRIOPHYLLA KRAENZ EN RATONES HIPERTENSOS INDUCIDOS POR L-NAME”

YOVANI MARTIN CONDORHUAMAN FIGUEROA

RESUMEN

El objetivo de este estudio experimental ha sido evaluar el efecto antihipertensivo y tóxico del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla). Metodología: se utilizó ratones albinos machos para la determinación del efecto antihipertensivo, a quienes después de una semana de adaptación se les midió la presión arterial basal sistólica, diastólica y media. Para la determinación del efecto antihipertensivo se realizó la inducción con la administración de N-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) a dosis de 130 mg/kg/día por vía oral durante 07 días y nuevamente se les midió la presión arterial postinducción, se dividió en 06 grupos de 10 animales; grupo control positivo (L-NAME) y control negativo (agua destilada), grupos experimentales a dosis de 200 mg/kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg y enalapril a dosis de 75 mg/kg. El tratamiento fue durante 30 días midiéndose la presión arterial cada 5 días. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó a los grupos determinados en el efecto antihipertensivo. El estudio de toxicidad aguda se determinó en ratones normotensos (48 animales) a diferentes dosis y el estudio toxicidad crónica se determinó a dosis repetidas por 60 días a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico en ratas normotensas distribuidas en 03 grupos de 06 animales; utilizando dosis de 400 mg/kg, 600 mg/kg y un grupo control. Resultados: El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presentó mejor efecto antihipertensivo a la dosis de 600 mg/kg por vía oral. El extracto metanólico elevó los niveles séricos de óxido nítrico y disminuyó los niveles séricos de malondialdehído. No presentó toxicidad aguda y toxicidad crónica a dosis repetidas por 60 días. Conclusiones: Se demostró que el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presenta efecto antihipertensivo sin efectos tóxicos.

Palabras clave: *Calceolaria myriophylla*, antihipertensivo, toxicidad aguda y crónica.

“ANTIHYPERTENSIVE AND TOXIC EFFECT OF THE EXTRACT METANÓLICO OF CALCEOLARIA MYRIOPHYLLA KRAENZ IN HYPERTENSE MICE INDUCED BY L-NAME”

YOVANI MARTIN CONDORHUAMAN FIGUEROA

ABSTRACT

The objective of this experimental study has been to evaluate the antihypertensive and toxic effect of the metanólico extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla). Material and Methods: used albino mice males for the determination of the antihypertensive effect, after a week of adaptation were measured basal systolic, diastólica and mean arterial pressure. For the determination of the antihypertensive effect the induction was realized with the administration of N-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) to dose of 130 mg/ kg/day for oral administration for 07 days and again the arterial pressure was measured postinduction, was divided in 06 groups of 10 animals; group positive control (L-NAME) and negative control (distilled water), experimental groups to dose of 200 mg/kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg and enalapril to dose of 75 mg/kg. The treatment was during 30 days being measuring the arterial pressure every 5 days. The evaluation of the antioxidant activity was realised to the groups determined in the antihypertensive effect. The study of acute toxicity was realised in mice normotensos (48 animals) to different doses and the study chronic toxicity was determined to doses repeated by 60 days to hematologic, biochemical and anatomopatológico level in rates normotensas distributed in 03 groups of 06 animals; using dose of 400 mg/kg, 600 mg/kg and a group control. Results: The metanólico extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz presented better antihypertensive effect is to the dose of 600 mg/kg for oral administration. The extract metanólico increased the serum levels nitric oxide and decreased serum levels of malondialdehido. In the acute toxicity study in mice, none of the doses used induced mortality. In the chronic toxicity to doses repeated by 60 days, no haematological and biochemical changes were observed. Histologically did no show any alteration. Conclusions: These results suggest that oral administration of metanólico extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz exhibited antihypertensive effect without toxic effects.

Key words: *Calceolaria myriophylla*, antihypertensive, acute and chronic toxicity.

“EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y TÓXICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE CALCEOLARIA MYRIOPHYLLA KRAENZ EN RATONES HIPERTENSOS INDUCIDOS POR L-NAME”

YOVANI MARTIN CONDORHUAMAN FIGUEROA

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y causa directa de gran parte de la mortalidad y de la morbilidad en los países desarrollados. La HTA está implicada en la enfermedad isquémica cardíaca (directamente, e indirectamente por las alteraciones hipertróficas del músculo cardíaco), en la insuficiencia cardíaca, en la enfermedad vascular cerebral, en las nefropatías y en un sinnúmero de alteraciones orgánicas y funcionales originadas por las lesiones microvasculares que provoca (Vega et al, 2008). Por lo tanto el tratamiento antihipertensivo constituye la prevención de complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y daño renal. El tratamiento debe incluir el control de los factores de riesgo y de enfermedades asociadas que generen mayor riesgo. En la actualidad existe una diversidad de esquemas de tratamiento pero la mayor parte presentan efectos(s) secundario(s) y los costes del tratamiento determinan que el paciente generalmente no continúe con su terapia (Rivas et al, 2007).

A nivel mundial se investigan y reportan numerosos estudios de plantas medicinales con actividad farmacológica, como a la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* Kraenz utilizada en la medicina tradicional de la región del Cusco a la que atribuyen propiedades “curativas” en diversas enfermedades como reumatismo, regulador menstrual, infecciones, úlceras gástricas, dolores estomacales, como diurético y enfermedades renales. La presente investigación farmacológica tuvo el interés de validar su efecto antihipertensivo para su posible uso como terapia alternativa o coadyuvante al tratamiento de la hipertensión arterial, así mismo evaluar sus posibles efectos tóxicos durante la administración por vía oral en forma aguda y crónica, debido a que en la actualidad no se reportan estudios farmacológicos ni toxicológicos de la mencionada especie vegetal.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 ANTECEDENTES

- El ayac zapatilla o zapatilla identificada como *Calceolaria myriophylla* Kraenz es una hierba anual de 20 m a 30 cm. de altura, cuyas flores amarillas son parecidas a los zapatos, de ahí su nombre; de hojas pequeñas. Se encuentra en laderas y cercas de piedra hasta los 4000 m.s.n.m. La infusión de las flores, hojas y tallo se toma en afecciones renales (Olazábal, 2001).
- Se evaluó la actividad insecticida de dos naftoquinonas extraído de la *Calceolaria andina* en donde se concluye que son altamente efectivos para las especies de Homóptera y Acari. Además demostraron la baja toxicidad oral y dérmica en mamíferos (Khambay, Batty, Cahill, Denhlm, 1999).
- La familia Scrophulariaceae tiene 220 géneros y una 3000 especies; son herbáceas anuales o perennes o bien subfruticosas. Entre los géneros de la Familia están Digitales, Verbascum, Linaria, Scrophularia, Calceolaria y otras. Son drogas importantes las hojas de Digitales purpúrea y Digitalis lanata y sus Heterósidos cardiacos. Otros componentes de la familia son Cardenólidos, Saponinas esteroidales, Saponinas triterpenoides, Heterósidos cianogenéticos, Naftaquinonas, Antraquinonas, Auronas e Iridoides. Los Alcaloides no son muy comunes, pero se encuentran algunas especies de los tipos Monoterpenoides, Quinazolina y Quinolizidina (Trearce, 1991).
- Tomás, Grayer, Gil, Harbone, (1988) reportaron la presencia de flavonoides comunes en algunas especies de la Familia Scrophulariaceae como son la Luteolina, Crysoeriol y Apigenina 7-glucoronido.
- Tupayachi Herrera Alfredo docente de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco refiere que la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* es una especie oriunda de nuestro país, de ahí la gran dificultad de

obtener estudios farmacológicos y/o toxicológicos en revistas internacionales de estudios sobre plantas medicinales.

- Luna (1960) describe que esta planta es muy buscada por toda clase de gente, sus flores muy amarillas, color canario, tienen la forma de zapato. Es una de las plantas más útiles en la medicina casera. Con el cocimiento de unas cuantas ramitas y flores, una cucharada de garbanzo tostado y molido, una regular porción de cola de caballo y otra de pelo de choclo, se obtiene la curación de todas las enfermedades de las vías urinarias.
- Sus hojas y flores son utilizadas como antivenéreo, descensos vaginales, diurético, afecciones uterinas y quita las manchas de la cara (Muñiz, 1992).
- Roersch (1994) concluye que todas las especies de *Calceolaria* existentes en la zona sur andina del Perú tiene una preferencia clara en afecciones uterinas, vaginales y en el post parto. Sólo en el Cusco los usos no coinciden con los usos indicados anteriormente y el uso parece dirigirse hacia afecciones de las vías respiratorias.
- Reportes etnobotánicos por Olazábal (2001) describen el uso como anticonceptivo, colerina, tos, dolor de estomago, para los riñones, post parto y úlceras gástricas.
- Ríos (2002) reporta su uso en el Distrito de Colquepata –Paucartambo contra las afecciones renales reposando los tallos, hojas y flores; igualmente es utilizado contra las úlceras gástricas y el dolor de estomago.
- Lastra (2004) demostró el efecto gastroprotector sobre lesiones gástricas inducidas por Indometacina en ratas al utilizar el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*. También determino la presencia de metabolitos secundarios como azúcares reductores, glucósidos, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas.
- Tomás, Arroyo, Rojas, Chenguayen, Huamán, Guerrero, (2004) han demostrado que el extracto acuoso de *Calceolaria tripartita* mejora la función hepática en ratas

con inducción de hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono al reducir los niveles de TGO y TGP en condiciones experimentales.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y causa directa de gran parte de la mortalidad y de la morbilidad en los países desarrollados. La HTA está implicada en la enfermedad isquémica cardíaca (directamente, e indirectamente por las alteraciones hipertróficas del músculo cardíaco), en la insuficiencia cardíaca, en la enfermedad vascular cerebral, en las nefropatías y en un sinnúmero de alteraciones orgánicas y funcionales originadas por las lesiones microvasculares que provoca.

A nivel mundial se investigan y reportan numerosos estudios de plantas medicinales con actividad farmacológica, como a la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* Kraenz utilizada en la medicina tradicional de la Región Cusco a la que atribuyen propiedades “curativas” en diversas enfermedades como reumatismo, regulador menstrual, infecciones, úlceras gástricas, dolores estomacales y enfermedades renales (Olazábal, 2001 y Roesch, 1994). La presente investigación farmacológica tiene el interés de validar el efecto antihipertensivo y sus posibles efectos tóxicos.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz efecto antihipertensivo administrado por vía oral a ratones hipertensos inducidos por L-NAME sin efectos tóxicos agudo y crónico?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz al ser administrado por vía oral a ratones hipertensos inducidos por L-NAME y sin efectos tóxicos.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz y conocer el (los) grupo(s) de metabolitos secundarios presentes con el análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico.
- Evaluar el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz al ser administrado por vía oral a ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- Evaluar los niveles séricos de óxido nítrico y malondialdehído en ratones hipertensos inducidos con L-NAME al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla*.
- Realizar la prueba de toxicidad aguda del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz al ser administrado por vía oral a ratones normotensos.
- Realizar la prueba de toxicidad crónica observando los efectos tóxicos a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico, al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz por vía oral a ratas normotensas por vía oral durante 60 días.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial es una enfermedad que afecta la salud de las personas en todas partes del mundo y, por lo tanto, quizás una de las más costosas para el individuo, la familia y el país (Llópiz, Ávila, Kimdelán, 2002). Por lo tanto el tratamiento hipotensor constituye la prevención de complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y daño renal (García, Urrego, D'Achiardi, Delgado, 2004). En la actualidad existe una diversidad de esquemas de tratamiento pero la mayor parte presentan efectos(s) secundario(s) y los costes del tratamiento determinan que el paciente generalmente no continúe con su terapia (Rivas, Gutiérrez, Rivas, 2007).

La presente investigación farmacológica tiene el interés de Validar el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, para su posible uso como terapia alternativa o coadyuvante al tratamiento de la hipertensión arterial y así mismo evaluar sus posibles efectos tóxicos durante la administración por vía oral en forma continua, debido a que en la actualidad no se reportan estudios farmacológicos ni toxicológicos de la mencionada especie vegetal.

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 HIPÓTESIS GENERAL

H1: Existe efecto antihipertensivo sin efectos tóxicos al administrar por vía oral el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratones hipertensos inducidos con L-NAME.

H0: No existe efecto antihipertensivo sin efectos tóxicos al administrar por vía oral el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratones hipertensos inducidos con L-NAME.

1.5.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

H1: Existe en el análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz metabolitos secundarios.

H2: Existe efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz al ser administrado por vía oral a ratones hipertensos inducidos por L-NAME.

H3: Existe toxicidad aguda del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz al ser administrado por vía oral a ratones normotensos.

H4: Existe toxicidad crónica a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico, al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz por vía oral a ratas normotensas por vía oral durante 60 días.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 FISIOLÓGÍA DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La regulación de la presión arterial (PA) es un proceso fisiológico complejo, en el que intervienen factores genéticos y ambientales (Quiroga, 2010). La presión sanguínea es el producto del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos cuando es impulsada por el corazón (Ganong, 1998). El mantenimiento de la presión arterial normal se debe a un sistema de control complejo y multifactorial, que involucra en forma integrada, al sistema nervioso central y periférico autónomo, al corazón, al riñón, a la glándula suprarrenal y al propio vaso sanguíneo entre otros de tal manera que las anomalías de la presión arterial ocurren por una alteración funcional de la integración de múltiples vías (Rondón, 2002).

2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La Hipertensión Arterial (HTA) es una Enfermedad No Transmisible de tipo crónico que se caracteriza por el aumento anormal de la presión arterial, la misma que es el resultado de dos fuerzas; una la crea el corazón cuando bombea la sangre y esta avanza empujando las paredes de las arterias; la otra es la que crean las paredes de las arterias resistiéndose al flujo de la sangre (INEI, 2010). En la enorme mayoría de los casos (95 %), la hipertensión arterial no depende de una causa única, sino que es de origen poligénico y multifactorial. Solo 5 % de los casos de hipertensión arterial tiene como causa la mutación de un gen único, que se transmite en la familia siguiendo un modelo mendeliano (Quiroga, 2010).

En Estados Unidos se estima que un cuarto de su población presenta hipertensión arterial (60 millones) (Goldman, 2008). En España entre el 20 y el 25 % de los adultos de más de 18 años presentan cifras de presión arterial superiores a 140/90 mmHg (Farreras, 2000) y entre 60 % y 70 % de las personas en la séptima década de la vida (Ramírez, 2006). En nuestro país la prevalencia de la HTA es mayor entre los residentes de la región Costa, en particular en Lima Metropolitana (28,0 %) y menor entre los residentes de la selva (21,5 %). En la Sierra la prevalencia de la HTA asume un valor intermedio (23,5 %). Por lo tanto a nivel nacional, la HTA afecta a una de cada cuatro

personas de 50 y más años de edad que en términos absolutos ascienden a un millón 193 mil personas, 604 mil hombres y 589 mil mujeres. La prevalencia de la HTA es mayor en el área urbana (26,4 %) que en el área rural (23,1 %) (INEI, 2010). Estos datos no difieren mucho de lo hallado por la Sociedad Peruana de Cardiología (2005), en donde la prevalencia hallada fue de 27,3 % en la costa, 22,1 % en la sierra alta y 22,7 % en la selva (MINSA, 2007).

Es importante tener presente que cuando la HTA es diagnosticada entre los 30 a 50 años la presentación más común es el aumento de la presión arterial diastólica con una presión arterial sistólica normal o un aumento de ambas presiones. Después de los 60 años, se presenta con mayor frecuencia la hipertensión sistólica aislada (presiones >140/90 mmHg) (Libby, 2007). Antes de los 50 años, la prevalencia de la hipertensión es menor en mujeres que en varones, después de la menopausia la prevalencia de hipertensión incrementa rápidamente en mujeres. Así mismo la raza es un factor de prevalencia de la enfermedad, en Estados Unidos uno de cada tres Afroamericanos presenta hipertensión comparado con uno de cada cuatro o cinco personas de raza blanca americana o mexicano-americano. Sin embargo en Europa la prevalencia es mayor en la población de raza blanca de muchos países europeos (Finlandia, Alemania y España) que en los afroamericanos (Goldman, 2008).

2.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA es una enfermedad muy prevalente donde un 90% de su etiología es desconocida denominándose hipertensión arterial esencial y en un 5 a 10% esta la denominada hipertensión secundaria que se debe a causas conocidas (Taler, 2008).

Diversos mecanismos fisiológicos están implicados en el mantenimiento de la presión arterial y su alteración juega un rol muy importante en el desarrollo de la hipertensión arterial esencial. Existe múltiples factores que han sido muy estudiados como la relación del aumento de la presión arterial por la ingesta de sal, obesidad, resistencia a la insulina; alteración del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS) (Beavers, 2001). El nuevo concepto de que las anomalías funcionales y estructurales, incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la deficiencia de vasodilatadores, tales como la Prostaciclina, el Óxido Nítrico (NO); la remodelación vascular y la reducción de la

complacencia, pueden anteceder a la hipertensión y contribuir a su patogénesis que ha ganado soporte en los últimos años (Gamboa, 2006), es así que la HTA se caracteriza básicamente por la existencia de una disfunción endotelial (DE), con ruptura del equilibrio entre los factores relajantes del vaso sanguíneo (óxido nítrico –NO-, factor hiperpolarizante del endotelio -EDHF) y los factores vasoconstrictores (principalmente endotelinas). Es conocida la disminución a nivel del endotelio de la prostaciclina-PGI₂ vasodepresora y el aumento relativo del tromboxano-TXA₂ intracelular vasoconstrictor (Wagner, 2010).

Ingesta de sal, obesidad y resistencia a la insulina: La ingesta excesiva de sodio produce aumento del volumen sanguíneo por retención renal de sodio y agua, que como consecuencia incrementa la precarga y produce la elevación de la presión arterial (Maicas, 2003). En la obesidad el mecanismo de producción de la hipertensión es complejo e involucra a múltiples sistemas, como incremento del SRAA, aumento del SNS y resistencia a la insulina. En suma la obesidad esta asociada con un incremento de la reabsorción de sodio y expansión del volumen plasmático (Romayne, 2008). La insulina favorece la retención renal de sodio por tanto aumento del volumen intravascular, incrementa la actividad del SNS aumentando las resistencias periféricas y el gasto cardíaco (Maicas, 2003).

Reactividad vascular y estrés: El estrés intermitente se puede traducir en hipertensión sostenida. La adrenalina secretada en la médula suprarrenal induce cambios mucho más importantes estimula los nervios simpáticos y además actúa sobre el receptor beta 2 presináptico, para facilitar la liberación de más noradrenalina (NA). Además puede haber una alteración en la recaptación neuronal de NA en individuos con hipertensión esencial que dejaría expuestas las células vulnerables a niveles más elevados de NA (Maicas, 2003).

Remodelamiento vascular y endurecimiento arterial: La remodelación vascular es un proceso de cambios estructurales que involucra alteraciones en el proceso celular incluyendo crecimiento, apoptosis, migración, inflamación y producción de matriz extracelular, resultando en un incremento del tono arteriolar, engrosamiento de la intima e hiperplasia de la media (Heilpern, 2008). Fisiológicamente la remodelación es un cambio de respuesta adaptativa que ocurre en respuesta a cambios hemodinámicos y

envejecimiento. Estos cambios estructurales pueden incrementar la reactividad vascular, con un aumento de la resistencia vascular periférica que es característico de la hipertensión (Touyz, 2007).

Endotelinas: El endotelio es la principal fuente de ET1, pero no es la única. ET1 es sintetizada por las células epiteliales, las células musculares lisas vasculares, los macrófagos y en el seno de numerosos tejidos en los que se liga a sus receptores para ejercer su efecto. Las endotelinas son factores vasoconstrictores locales muy potentes, cerca de 10 a 100 veces más poderosos que la angiotensina II. Se sabe actualmente que se trata de un sistema complejo: pre-proendotelina → proendotelina → ET1. A nivel de la proendotelina actúa una enzima convertidora de la endotelinas (ECE), formándose principalmente ET1, pero también en menor proporción, ET2 y ET3. Solo la ET1 parece poseer acción vasoconstrictora sistémica. La ET1 es de vida media muy breve, a causa de la captura por su receptor, no por su degradación. La ET1 está implicada, de modo importante, en el proceso de remodelamiento vascular y de regulación de la proliferación celular, que produce hiperplasia e hipertrofia del músculo liso vascular (Wagner, 2010).

El sistema renina – angiotensina – aldosterona (SRAA): Se trata de un sistema sumamente complejo, que comprende una serie de proteínas y 4 angiotensinas (I, II, III y IV) con actividades propias y específicas. El SRAA, además de sus acciones propiamente vasculares, induce estrés oxidativo a nivel tisular, el que produce tanto cambios estructurales como funcionales, especialmente disfunción endotelial, que configuran la patología hipertensiva. Las acciones de la angiotensina II incluyen: contracción del músculo liso vascular arterial y venoso, estimulación de la síntesis y secreción de aldosterona, liberación de noradrenalina en las terminaciones simpáticas, modulación del transporte del sodio (Na) por las células tubulares renales, aumento del estrés oxidativo por activación de oxidasas NADH y NADPH dependientes, estimulación de la vasopresina/ADH, incremento de la producción de endotelina (ET1) y de prostaglandinas vasoconstrictoras (TXA₂, PgF_{2α}). La AII y la aldosterona poseen, asimismo, acciones no hemodinámicas: aumento del VEGF con actividad proinflamatoria, estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) nefrotóxicas, incremento de la proliferación celular y de la remodelación tisular, con aumento de la síntesis de citoquinas profibróticas y factores de crecimiento y reducción

de la síntesis del NO. Se ha descrito dos enzimas convertidoras de angiotensina (ECAs): la ECA1, que es la enzima fisiológica clásica, y la ECA2, que es la enzima que lleva a la formación de la A1-7, deprimida en algunos pacientes con HTA (Wagner, 2010).

Óxido nítrico: Es un radical libre gaseoso con múltiples acciones biológicas; entre las mejores definidas se encuentran la regulación del tono vascular, la regulación de la neurotransmisión y la participación en la inmunidad no específica (Rondon, 2002). El óxido nítrico es un radical libre fisiológico producido por el endotelio vascular como un factor de relajación, tiene efectos citoprotectores, es débilmente reactivo, pero bajo ciertas circunstancias genera productos tóxicos fuertemente oxidantes como el peroxinitrito (Chavez, 2001). El ON es enzimáticamente sintetizado a partir de la L-arginina, un proceso que puede ser inhibido por componentes análogos de la L-arginina como la N-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) quien compite por la ON Sintasa (ONS). La inhibición de la ONS disminuye la producción de ON ocasionando vasoconstricción, aumento de la liberación de renina e hipertensión arterial (Sharifi, 2005).

Radicales libres: Los radicales libres son compuestos de existencia independiente que contienen uno o más electrones impares. Estos radicales libres son extremadamente reactivos, es decir, fuertemente oxidantes que pueden causar daño oxidativo a macromoléculas biológicas, producir daño a la membrana celular y lipoproteínas por un proceso denominado peroxidación lipídica (Lipoperoxidación) que produce la formación de ciertos productos de degradación tales como aldehídos, entre los cuales está el malondialdehído, que constituye un marcador de la oxidación lipídica (Chavez, 2001).

2.4 CLINICA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Las normas para la clasificación clínica de la hipertensión arterial publicadas recientemente y casi conjuntamente por el NIH americano (Joint National Committee VII) y las Sociedades Europeas de Hipertensión Arterial y Cardiología (SEH-C) coinciden en considerar como hipertensión arterial al promedio de dos o tres mediciones consecutivas iguales o superiores a 140/90 mmHg, en posición sentada. La presión normal es definida por el JNC VII como inferior a 120/80 mmHg, siendo considerados los valores

intermedios como estadio prehipertensivo (Tabla 1) (Baglivo, 2003). La relación entre la presión arterial y la enfermedad cardiovascular es continua, consistente e independiente de otros factores de riesgo. Por lo tanto, la definición de HTA es numéricamente arbitraria e incluso en el rango normotensivo las personas con menos niveles de PA poseen tasas más bajas de enfermedad cardiovascular (Vidalón, 2010).

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos (18 años o mayores)

Clasificación PA	PAS mmHg	PAD mmHg
Normal	<120	y <80
Pre hipertensión	120-139	u 80-89
Estadio 1 hipertensión	140-159	o 90-99
Estadio 2 hipertensión	>160	o >100

PA: presión arterial, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica. The JNC 7 Report, 2003 ⁽²⁾.

Fuente: Vidalón A. (2010).

Evaluación clínica (Vidalón, 2010)

La evaluación clínica del paciente se realiza de la siguiente manera:

- Revisar la historia clínica y familiar.
- Interrogar sobre síntomas de daño en órgano blanco, estilos de vida e identificar los factores de riesgo cardiovascular y enfermedades concomitantes.
- Además de la correcta medición de la PA, palpar los pulsos arteriales centrales y periféricos, evaluar soplos en el cuello y abdominales, palpación de glándula tiroidea, examen de corazón y pulmones, examen de abdomen que incluya riñones, detección de tumoraciones y pulsaciones aórticas, verificar edema de miembros inferiores y valoración neurológica.
- Calcular el índice de masa corporal (peso (kg)/talla al cuadrado (m²)); medida de la circunferencia de la cintura.
- Examen del fondo de ojo.

Exámenes de laboratorio

Los análisis rutinarios incluyen un electrocardiograma (ECG), examen de orina (para sangre, glucosa, proteínas, sedimento), glicemia, hematocrito, potasio y calcio séricos, ácido úrico, creatinina (o filtrado glomerular), además de colesterol total, colesterol LDL y HDL, triglicéridos (tras 9 a 12 horas de ayuno). El ECG permite la detección de hipertrofia ventricular izquierda, arritmias y enfermedad coronaria. Se solicita pruebas complementarias en situaciones especiales: ecocardiograma, ultrasonido carotídeo y femoral, proteína C reactiva ultrasensible, microalbuminuria (esencial en diabéticos); se reserva pruebas específicas en la investigación de la hipertensión secundaria (Vidalón, 2010).

Factores de riesgo vascular

Los factores de riesgo vascular son los siguientes: hipertensión arterial, tabaquismo, obesidad, sedentarismo, dislipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y/o colesterol HDL bajo), diabetes mellitus, microalbuminuria o tasa de filtración glomerular estimada <60 mL/min, edad (varones >55 años, mujeres >65 años), historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura (varones <55 años, mujeres <65 años). (Vidalón, 2010).

Lesión en órgano blanco

Las lesiones en órgano blanco pueden estar relacionadas con los siguientes problemas:

- Cardíaco: hipertrofia ventricular izquierda, angina o infarto miocárdico previo, revascularización coronaria previa, insuficiencia cardíaca.
- Cerebral: evento cerebrovascular o ataque isquémico transitorio.
- Enfermedad renal crónica.
- Vasculopatía periférica.
- Retinopatía.
- La estratificación del riesgo con fines de manejo y pronóstico se establece en base a los niveles de PA, factores de riesgo, daño de órgano blanco y condiciones clínicas asociadas. (Vidalón, 2010)

2.5 TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La evolución en el manejo de la hipertensión arterial ha sido cambiante, desde la monoterapia con alta dosis de diuréticos, recomendada por el "Joint National Committee I" (JNC), en 1977, hasta la terapia combinada a dosis bajas de medicamentos, recomendada por el JNC VII, en el año 2003. Se espera para el próximo año las recomendaciones del JNC VIII (Figura 1). El desarrollo de las terapias antihipertensivas ha progresado, siendo los últimos medicamentos registrados los bloqueadores del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (Bryce, 2010).

JNC I 1977	JNC II 1980	JNC III 1984	JNC IV 1988	JNC V 1993	JNC VI 1997	JNC VII
Diuréticos Dosis altas	Diuréticos Dosis altas	Diuréticos Dosis bajas o β-Bloq.	Diuréticos o β-Bloq. o IECA o BCC	Diuréticos o β-Bloq. o IECA o BCC o α-Bloq. o (α/β -Bloq.) Solo un agente titulación preferida	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia individualizada • Solo un agente, titulación preferida • Dosis bajas de terapia combo como opción secundaria 	<ul style="list-style-type: none"> • Enfoque sobre control de HTA sistólica • Énfasis en terapia combinada
Dosis altas Monoterapia						Dosis bajas Tx Combinada

Figura 1. Evolución en el manejo de la hipertensión arterial (Bryce, 2010).

El objetivo primordial del tratamiento del paciente hipertenso debe ser lograr la máxima reducción en el riesgo global de morbilidad y mortalidad cardiovasculares, según indica el Protocolo de Tratamiento de la Hipertensión de la OMS-Sociedad Internacional de Hipertensión (Rivas, 2007). El mejor cumplimiento con medicamentos antihipertensivos lleva a un menor riesgo de hospitalización, y está demostrado en diversos estudios que los pacientes con un alto cumplimiento tienen mayor probabilidad de lograr la presión arterial objetivo. Además, los principales efectos benéficos del tratamiento antihipertensivo se deben a la reducción de la presión arterial en sí y son independientes de los fármacos utilizados (Baglivo, 2003).

A todos los pacientes hipertensos debe recomendárseles modificaciones del estilo de vida, con estrategias como limitar el consumo de sal y alcohol, conseguir el peso

adecuado, realizar ejercicios aeróbicos, incentivar el consumo de frutas, verduras y productos lácteos descremados (Sosa, 2010).

Tabla 2. Cambios en el estilo de vida y efecto sobre la presión arterial

Cambio	Recomendación	Reducción estimada de la PAS
Reducción del peso	Mantener el peso ideal (IMC 20-25 kg/m ²)	Entre 5 y 20 mmHg por una reducción de 10 kg de peso
Restricción del consumo de sal	Reducir la ingesta a cifras por debajo de 100 mmol/día (6 g de sal; una cucharada de café)	2-8 mmHg
Moderación en el consumo de alcohol	Limitar el consumo por debajo de 210 g semanales (30 g/día) en hombres y 140 g semanales (20 g/día) en mujeres	2-4 mmHg
Adopción de la dieta DASH*	Dieta rica en frutas, verduras y productos lácteos desnatados con reducción de la grasa total y especialmente saturada	8-14 mmHg
Ejercicio físico	Práctica habitual (al menos 5 días a la semana) de ejercicio aeróbico (por ejemplo, caminar deprisa durante al menos 30-45 minutos)	4-9 mmHg

* Los efectos de la dieta DASH sólo se han probado en EE.UU. y son comparados con los de la dieta típica americana. Las características de la dieta DASH son similares aunque no idénticas a la dieta mediterránea que está asociada con una protección frente a la enfermedad cardiovascular. Adaptada de Chobanian AV. et al.

Fuente: Sosa J. (2010).

De acuerdo al JNC VII, el algoritmo (Figura 2) para el tratamiento de hipertensión arterial, primero es la modificación del estilo de vida y, luego, de acuerdo a la estratificación del riesgo y estadio de hipertensión, el tratamiento es farmacológico.

El JNC VII tiene preferencia por los diuréticos. En la Figura 2 se muestra las combinaciones de los diferentes fármacos utilizados actualmente. La combinación de los betabloqueadores con diuréticos predispone a la aparición de nuevos casos de diabetes y/o dislipidemia, por lo que no debería utilizarse en pacientes con síndrome metabólico o predisposición para la diabetes. Se debe asociar a fármacos considerados “protectores”, como los bloqueadores del sistema renina angiotensina en estos casos (Bryce, 2010).

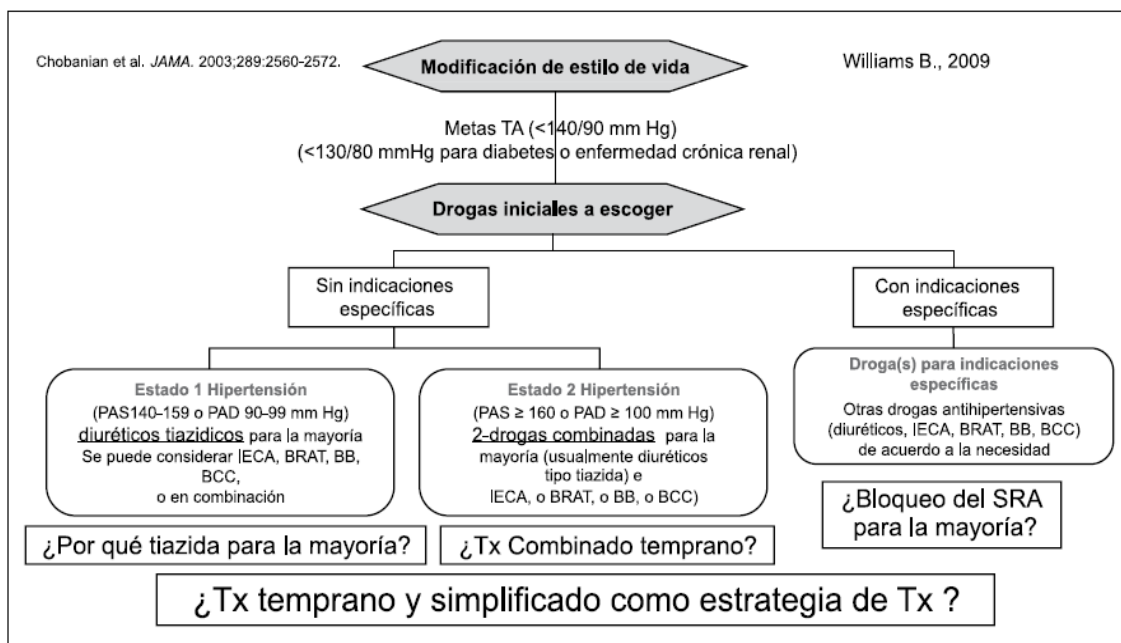


Figura 2. Algoritmo para el tratamiento de la hipertensión arterial. Las interrogantes son las que se podrían plantear para el JNC VIII (Bryce, 2010).

El antihipertensivo ideal debe: tener un buen perfil hemodinámico, evitar el daño del órgano blanco, tener pocos efectos adversos, ser eficaz en monoterapia, tener índice pico-valle mayor de 0.5, permitir buena adherencia al tratamiento, bajo costo e idealmente duración mayor de 24 horas, que mantenga al paciente protegido si olvida tomar una dosis (García, 2004; Molina, 2003). En un estudio realizado en un hospital nacional se reportó que la monoterapia era utilizada en 55%; dos fármacos, en 38% y tres o más fármacos, en 7%. El fármaco más prescrito en monoterapia fue enalapril (62%); la combinación de dos fármacos más frecuente fue IECA con calcio antagonistas (32%) seguido de IECA con diurético tiazidico (18%); y en tres o más fármacos la combinación más frecuente fue IECA con Calcio Antagonista y diurético tiazidico. Una reciente publicación nacional pone de manifiesto que 45% de los pacientes que reciben fármacos antihipertensivos se encuentran compensados y que el fármaco más utilizado es el enalapril (82%) seguido de calcio antagonista (12%) (Rivas, 2007). Los hipertensos que presentan ciertas patologías asociadas requieren de tratamiento especial que además de controlar la HTA, disminuya el riesgo cardiovascular, cerebrovascular y detenga la aparición o progresión de la enfermedad renal crónica, entre otras. El VII JNC hace algunas recomendaciones mandatorias o imperativas con base en estudios realizados en los últimos años, con fármacos específicos según la enfermedad asociada (García, 2004).

2.6 ASPECTOS BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz

La *Calceolaria myriophylla* Kraenz es una hierba anual de 20 a 30 cm. de altura, cuyas flores amarillas son parecidas a los zapatos, de ahí su nombre; de hojas pequeñas. Se encuentra en laderas y cercos de piedra hasta los 4000 m.s.n.m. (Olazábal, 2001). Las flores tiene corola bilabiada, cuya parte inferior está hinchada y tiene forma de zapato, la inflorescencia 3 – 10 flores, las ramas son blancas, las hojas son pequeñas, elípticas a ovaladas (Roesrch, 1994).

De acuerdo al sistema de clasificación de Judd, Campbel, Kellogg y Stevens (1999), la especie en estudio pertenece a la siguiente clasificación taxonómica.

División	: Magnoliophyta (=Angiospermas)
Clase	: Magnoliopsida (=Dicotiledoneas)
Subclase	: Asteridae
Orden	: Labiales
Familia	: Scrophulariaceae
Género	: <i>Calceolaria</i>
Especies	: <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz
Nombre común:	“Zapatilla”, “Ayac Zapatilla”.

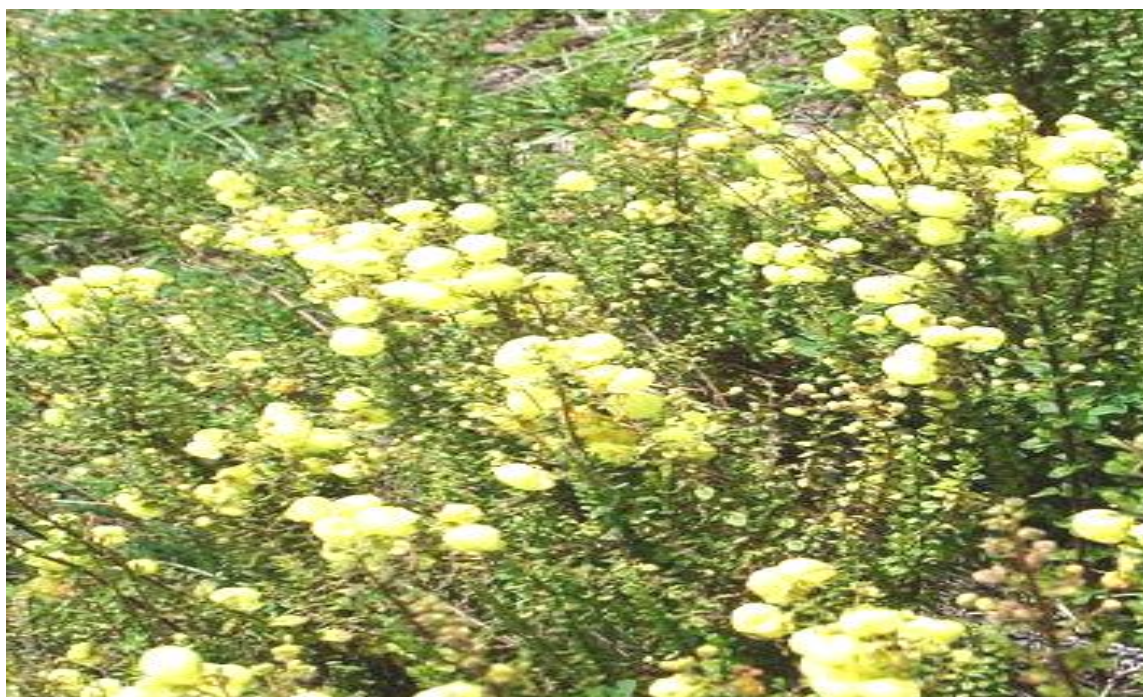


Figura 3. *Calceolaria myriophylla* Kraenz: “Zapatilla”, “Ayac Zapatilla”.

Alrededor de 200 géneros pertenecen a la familia Scrofulariaceae y alrededor de 4900 especies están distribuidas a nivel mundial, especialmente en las regiones de temperatura templada. Sólo la tercera parte de este género estudiados químicamente presentan iridoides, fenilpropanoides, saponinas, heterósidos cardiotónicos, flavonoides, alcaloides y terpenos han sido aislados. Muchos de estos compuestos tienen actividades biológicas interesantes (Garbarino, 2001).

La familia Scrofulariaceae es reconocida en el Perú por presentar dos géneros y 121 especies, principalmente arbustos y hierbas. Los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones mesoandina, puna húmeda y seca y páramo, entre los 300 y 4500 m de altitud. La *Calceolaria myriophylla* Kraenz se conoce en más de 10 localidades en el centro-sur del país, es localmente común y podría estar representada en los Santuarios Machu Picchu y Ampay (Salinas, 2006).

Se reporto la presencia de flavonoides comunes en algunas especies de la familia Scrophulariaceae como son la luteolina, crysoeriol y apigenina 7-glucosido (Tomás, 1988). Se describe que esta planta es muy buscada por sus flores muy amarillas, color canario, tienen la forma de zapato. Es una de las plantas más útiles en la medicina casera. Con el cocimiento de unas cuantas ramitas y flores, una cucharada de garbanzo tostado y molido, una regular porción de cola de caballo y otra de estigmas de maíz, se obtiene la curación de todas las enfermedades de las vías urinarias (Luna, 1960). Sus hojas y flores son utilizadas como antivenéreo, descensos vaginales, diurético, afecciones uterinas y manchas de rostro (Muñiz, 1992).

Finalmente existen múltiples reportes etnobotánicos de las propiedades terapéuticas de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, entre las que destacan el tratamiento de afecciones renales y vías urinarias, así como reumatismos, regulaciones menstruales, infecciones, úlceras gástricas y dolores estomacales; sin embargo no existen estudios científicos que validen estas aplicaciones terapéuticas. (Olazábal, 2001; Roesrch, 1994; Luna, 1960; Muñiz, 1992; Ríos, 2002; Lastra, 2004; Aldave, 1988; Alvarado, 1987; De Lucca, 1992; Durand, 1999; Girault, 1987; Valdizan, 1992).

2.7 INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS

En la práctica de la medicina clínica, la mayoría de las atenciones culmina en la prescripción de un medicamento. Pocas veces uno se detiene a pensar en los pasos que están involucrados en el desarrollo de este fármaco, que una vez fue sólo una molécula, y damos por hecho la existencia de estos comprimidos, inyecciones, cremas, etc. El proceso de investigación y desarrollo es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias, siendo desechadas la mayoría en distintas etapas del proceso. La complejidad del proceso es manejada por una diversidad de disciplinas científicas que incluye químicos orgánicos, biólogos moleculares, toxicólogos, médicos, farmacólogos, bioquímicos y científicos de la computación. Todos participan en alguna etapa del proceso, lo que en parte explica los enormes costos involucrados. En promedio, el proceso de estudiar y ensayar una nueva droga dura 12-15 años y significa una inversión cercana a los US\$ 600 millones antes que ésta sea aprobada para su comercialización (Marovac, 2001).

2.8 ETAPAS DE INVESTIGACIÓN DE UN PRODUCTO FARMACÉUTICO

2.8.1 ESTUDIOS PRECLÍNICOS

Los estudios pre-clínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto in vivo e in vitro. El propósito primario sigue siendo la evaluación de la actividad biológica. En esta etapa, las moléculas se ensayan en dos o más especies de animales, debido a que una droga puede afectarlas en forma diferente. Estos estudios pre-clínicos evalúan un gran rango de parámetros de la molécula, e incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. Se realizan estudios de toxicidad aguda y crónica y sobre el efecto en la reproducción y su progenie.

Estos estudios duran un promedio de 3,5 años para un compuesto exitoso, pero sólo 1 de 1.000 compuestos avanza a la siguiente etapa, que comprende a los estudios clínicos en seres humanos (Figura 4).

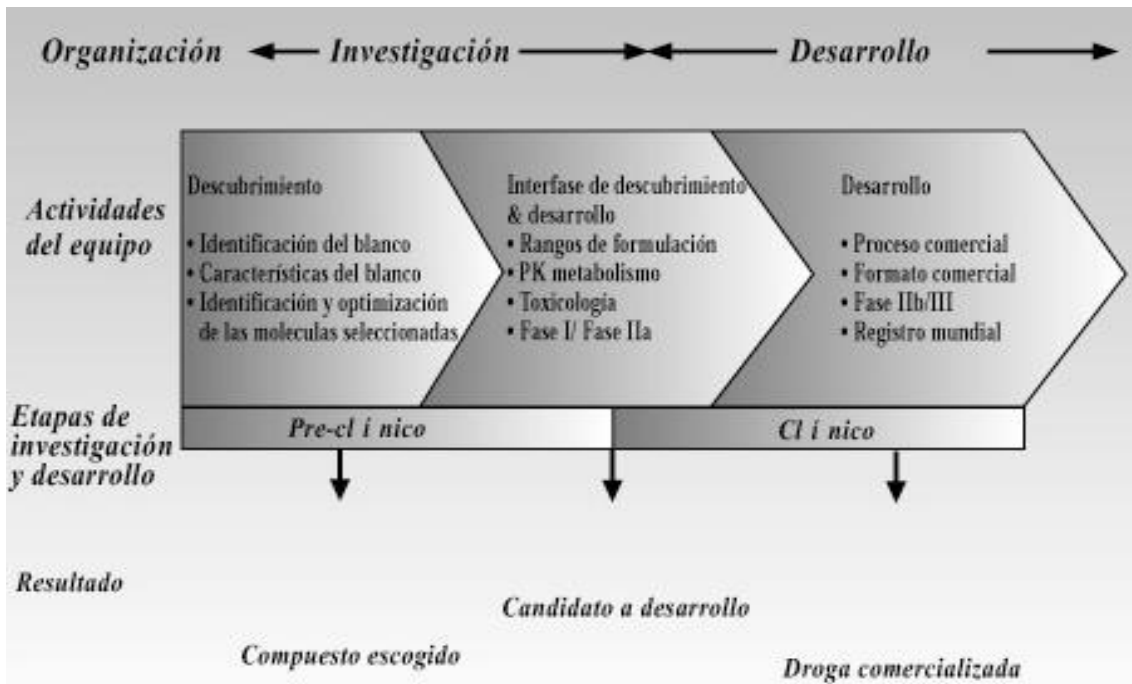


Figura 4. Etapas de la investigación de un nuevo medicamento.

2.8.2 ESTUDIOS CLINICOS

Estos estudios tienen que ser realizados de acuerdo con las llamadas Buenas Prácticas Clínicas. Los estudios clínicos son randomizados (pacientes asignados en forma aleatoria al grupo de tratamiento o al de control), eliminando la posibilidad de sesgo. El diseño doble ciego (donde ni el investigador ni el paciente saben en que grupo están) permite obviar la subjetividad en la evaluación de la respuesta. (Figura 5), (Marovac, 2001).



Figura 5. Proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de drogas.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo es un estudio de investigación experimental debido a que se manipularon deliberadamente una o más variables independientes para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre estas variables dependientes. (Hernández, 1998).

3.2 TIPO DE ESTUDIO

Observacional, Prospectivo y longitudinal para validar el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz. (ayaq zapatilla).

3.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se utilizó ratones albinos machos de 2 meses de edad con peso que fluctuó entre 30 y 35 gramos y ratas albinas machos de raza Holtzmann de 2 meses de edad con peso que fluctuó entre 180 a 200 gramos, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud ubicado en el Distrito de Chorrillos de la Ciudad de Lima.

3.4 VARIABLES

3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS

3.4.1.1. Variable Independiente

- Extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* K. (ayaq zapatilla)

3.4.1.2. Variables Dependientes

- Efecto antihipertensivo del extracto metanólico
- Toxicidad Aguda del extracto metanólico
- Toxicidad Crónica del extracto metanólico

3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

3.4.2.1. De la especie vegetal: Se tomó en cuenta

Estadío de crecimiento: Se recolectó de la *Calceolaria myriophylla* Kraenz (ayaq zapatilla) las flores, hojas y tallos en el momento de máxima floración.

Altitud de recolección: Se recolectó la *Calceolaria myriophylla* Kraenz (ayaq zapatilla) en la comunidad de Q'orao, Provincia del Cusco, Región del Cusco (3500 m.s.n.m.).

Temporada de recolección: La recolección de *Calceolaria myriophylla* K. fue en el mes de Marzo – Abril, época de máxima floración.

3.4.2.2. De los animales de experimentación: Se tomó en cuenta

Edad: Se obtuvo ratones albinos de 2 meses de edad al momento del experimento, certificados por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

Sexo: Se obtuvo ratones machos certificados por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

Peso: Se tomó en cuenta ratones albinos con pesos con un margen de variación de más/menos 5 gramos.

Alimentación: Se obtuvo del Departamento de Nutrición de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.5 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

3.5.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz Y REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.

3.5.1.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

La planta en estudio fue recolectada en el Distrito de Q'orao (3500 m.s.n.m.), Provincia del Cusco, Región del Cusco. Se recolectó la planta entera en su estado silvestre (hojas, tallos y flores), sin raíz con tijera podadora, en un día soleado, que se fue colocando en una bolsa de papel previamente la colocación de alcohol al 96 % (Sharapin, 2000).

3.5.1.2. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

Se sometió la muestra recolectada a secado en un horno a temperatura constante de 35 °C hasta que esté completamente seco. Se seleccionó la muestra y se realizó la molienda en un molino eléctrico, teniendo cuidado del sobrecalentamiento del molino para evitar la descomposición de algunos metabolitos secundarios. Se tamizó con malla para la uniformización del pulverizado y finalmente se procedió al pesado de la muestra.

3.5.1.3. PREPARACIÓN DEL EXTRACTOS

El extracto metanólico se obtuvo en una proporción del 20% (P/V) para lo cual se procedió a la maceración de la muestra seca por un periodo de 15 días hasta agotamiento de extracción, luego se pasó por un proceso de secado hasta obtener un extracto seco que fue la que se ensayó en la investigación (Sharapin, 2000). El extracto metanólico fue conservado a una temperatura de 4 a 8 °C.

3.5.1.4. ESTUDIO FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico se realizó en forma cualitativa, se usó para la detección inicial de los diferentes metabolitos secundarios del extracto metanólico de la especie vegetal, pruebas basadas en la aplicación de reacciones fisicoquímicas de coloración y/o precipitación según Lock de Ugaz, 1988 (ver Tabla 3).

Tabla 3. Determinación de metabolitos secundarios del extracto metanólico

REACTIVOS	METABOLITOS SECUNDARIOS
Shinoda	Flavonoídes
Tricloruro férrico 1%	Compuestos fenólicos
Gelatina – sal 1%	Taninos
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Hidroxido de sodio	Quinonas
Ninhidrina 1%	Aminoácidos
Molish	Glicósidos

3.5.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz EN RATONES.

3.5.2.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO:

La inducción fue mediante el método descrito por Sharifi, 2005 que consistió en la administración de L-NAME a todos los ratones a dosis de 130 mg/kg (Obst M, 2003) por día vía oral, tiempo que será controlado diariamente para lograr el incremento de la presión arterial en forma constante.

DETERMINACIÓN DE LA MEDIDA DE LA PRESION ARTERIAL

Para la medición de la presión arterial se utilizó el medidor de presión arterial incruenta LETICA 5001 (Panlab), un instrumento con memoria basado en un microprocesador específico diseñado para realizar la medición indirecta de la presión sanguínea en animales de experimentación.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de crianza acondicionados al ambiente de laboratorio con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente, de igual manera recibieron su alimento y agua a demanda. El día del ensayo se empezó privando de agua y alimentos 12 horas antes del ensayo experimental para la determinación del efecto antihipertensivo. Se utilizó 60 ratones divididos al azar en 06 grupos de 10 animales a quienes se les tomó la presión basal antes de la inducción con L-NAME. Los animales marcados, pesados y distribuidos al azar se identificaron en los siguientes grupos:

- Grupo 1:** Agua destilada
- Grupo 2:** L-NAME (130 mg/kg) en solución
- Grupo 3:** L-NAME + Extracto Metanólico dosis de 200 mg/kg en solución
- Grupo 4:** L-NAME + Extracto Metanólico dosis de 400 mg/kg en solución
- Grupo 5:** L-NAME + Extracto Metanólico dosis de 600 mg/kg en solución
- Grupo 6:** L-NAME + Enalapril a dosis de 75 mg/kg en solución

Se realizó la medición en la cola del animal con dilatación previa a una temperatura de 35 °C, se colocó el sensor que presenta el instrumento y se realizó 3 (tres) medidas y el promedio de estos datos fue el resultado de la medición de cada ratón. Los datos de presión arterial sistólica y diastólica fueron expresados en mmHg. La medición se realizó cada 5 días por un periodo de 30 días.

3.5.3. DETERMINACION DEL EFECTO TÓXICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz.

3.5.3.1. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz EN RATONES. (Ramirez, 2007; Atsamo, 2011; Qin, 2009)

Los animales de experimentación fueron adaptados a las condiciones de laboratorio. Los animales fueron marcados y pesados el día del ensayo experimental para el cálculo de las dosis respectivas por grupo experimental. Se utilizó 48 ratones divididos al azar en 06 grupos de 08 animales (04 machos y 04 hembras). Los animales de experimentación fueron distribuidos en los siguientes grupos:

- Grupo 1:** Agua destilada
- Grupo 2:** Extracto Metanólico a dosis de 0,5 g/kg en solución
- Grupo 3:** Extracto Metanólico a dosis de 1 g/kg en solución
- Grupo 4:** Extracto Metanólico a dosis de 1,5 g/kg en solución
- Grupo 5:** Extracto Metanólico a dosis de 2,0 g/kg en solución
- Grupo 6:** Extracto Metanólico a dosis de 3,0 g/kg en solución

Se administró a las dosis determinadas de los extractos en forma respectiva por vía oral por una sola vez y se realizó la observación de los animales por un tiempo de 72 horas, en donde se contó el número de muertes a las 24 horas, 48 horas y 72 horas y esta fue la definitiva para hallar la dosis letal tóxica del extracto metanólico.

3.5.3.2. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz EN RATAS. (Ramirez, 2007; Atsamo, 2011; Qin, 2009)

Los animales de experimentación fueron adaptados a las condiciones de laboratorio. Los animales fueron marcados y pesados periódicamente hasta la culminación del ensayo experimental. Se utilizaron 24 ratas divididos al azar en 03 grupos de 08 animales (04 machos y 04 hembras). Los animales de experimentación fueron distribuidos en los siguientes grupos:

Grupo 1: Agua destilada

Grupo 2: Extracto Metanólico a dosis de 400 mg/kg en solución

Grupo 3: Extracto Metanólico a dosis de 600 mg/kg en solución

Se administró a las dosis determinadas de los extractos en forma respectiva por vía oral diariamente hasta la culminación del ensayo experimental (60 días) y al grupo control agua destilada.

Concluido el ensayo de toxicidad crónica se procedió a la obtención de sangre por punción cardiaca para la realización de los análisis:

Hematológico: Hemograma Completo

Bioquímicos: Glucosa, Urea, Transaminasas, Fosfatasa alcalina, Colesterol total, HDL-Colesterol y Triglicéridos.

Luego se sacrificaron a los animales de experimentación con Pentobarbital a dosis de 100 mg/kg según Normas internacionales del cuidado de animales de experimentación (Arroyo, 2004, Ramírez, 2007, Close, 1986). Todos los órganos fueron conservados en formol al 10% para posteriormente realizar el examen anatomopatológico de dichos órganos para determinar la presencia de cambios histológicos, en relación al grupo control.

3.5.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y DE MALONDIALDEHIDO (MDA) (Chávez et al, 2003)

La determinación del óxido nítrico y de malondialdehido se realizó en el día 30 a todos los grupos de animales que se usaron para la determinación del efecto antihipertensivo.

3.5.4.1. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico se determinó a través de su producto de degradación, los nitritos mediante diazotización. El suero fue homogeneizado con HCL 2N, luego centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos con ácido sulfanílico 1% para la desproteinización, se agregó N-1-naftil-etilendiamina 0,1% y se incubó durante 30 minutos más. La absorbancia fue medida a 548 nm por espectrofotometría.

3.5.4.2. DETERMINACIÓN DEL MALODIALDEHIDO (MDA)

La determinación del MDA (producto final de lipoperoxidación) (53) fue a través de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico. Se realizó la precipitación de las proteínas séricas con ácido tricloroacético al 20% para la liberación del MDA unido a las proteínas, se añadió el ácido tiobarbitúrico 0,67% para producir el complejo MD - Acido tiobarbitúrico y la absorbancia fue medida a 535 nm por espectrofotometría.

3.5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La diferencia entre los grupos tratados fue determinada mediante el análisis de varianza ANOVA y test de Student en el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Socials Sciences), versión 15.0 en español, siendo considerado estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

En los resultados del efecto antihipertensivo, las concentraciones de óxido nítrico y malondialdehido se determinó la media y el error estándar de los valores individuales obtenidos para los animales de cada grupo. Se aplicó el análisis de varianza a los valores obtenidos así como el análisis multivariado para determinar la significancia estadística con un $p < 0,05$.

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1 DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz

REACTIVOS	METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCIÓN
Tricloruro férrico 1%	Compuestos fenólicos	+++
Shinoda	Flavonoides	++
Gelatina – sal 1%	Taninos	+
Dragendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	+
Hidroxido de sodio	Quinonas	+
Ninhidrina 1%	Aminoácidos	-
Molish	Glicósidos	-

Leyenda: (+++) Abundante cantidad, (++) Regular cantidad, (+) Poca cantidad, (-) Ausente. (Arroyo, et al, 2007)

4.2 DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz

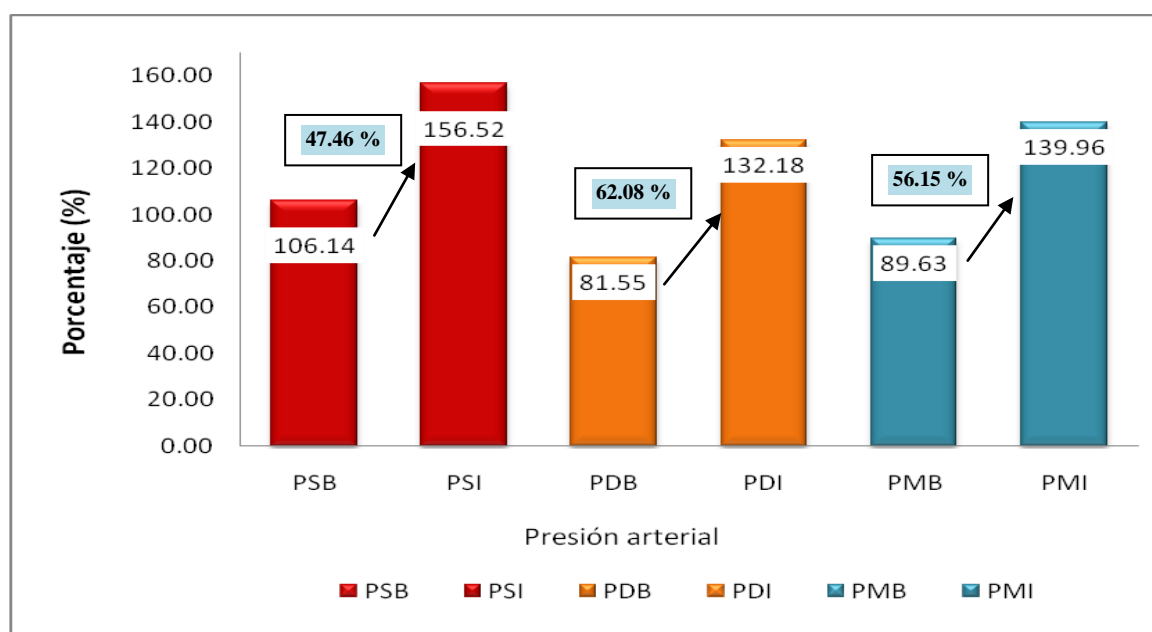


Figura 6. Comparaciones de los niveles de porcentajes de la elevación de la presión arterial basal y presión arterial post inducción por L-NAME.

4.2.1 DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz

4.2.1.1 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (PS)

Tabla 5. Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial sistólica del extracto metanólico en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

Tratamiento	PB	PPI	PS1	PS5	PS10	PS15	PS20
Control sin L-NAME	106.24 ± 1.23	105.34 ± 0.66 ^a	104.7 ± 1.76	106.17 ± 1.21	108.86 ± 1.83	110.83 ± 1.47	110.93 ± 1.10
Control con L-NAME	107.07 ± 1.09	161 ± 1.33	161.7 ± 1.40 ^b	154.9 ± 0.72 ^b	147.56 ± 1.33 ^b	139.84 ± 1.51 ^b	126.66 ± 1.19 ^b
Extracto 200 mg/kg	105.47 ± 1.89	159.39 ± 1.24	154.9 ± 0.72	147.56 ± 1.33	139.84 ± 1.51	126.66 ± 1.19	113.63 ± 0.42
Extracto 400 mg/kg	103.53 ± 2.23	159.89 ± 1.14	147.56 ± 1.33	139.84 ± 1.51	126.66 ± 1.19	126.66 ± 1.19	109.43 ± 1.58
Extracto 600 mg/kg	107.06 ± 1.64	162.74 ± 1.87	137.77 ± 1.28 ^c	124.34 ± 1.12 ^c	113.63 ± 0.42 ^c	106.51 ± 1.92 ^c	109.43 ± 1.58
Enalapril 75 mg/kg	107.78 ± 1.36	153.19 ± 1.12	144.57 ± 0.71	133.62 ± 0.58	124.34 ± 1.12	113.63 ± 0.42	106.51 ± 1.92

Los valores son expresados como media ± error estándar. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PS=Presión Sistólica según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20).

Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control sin L-NAME ($p < 0.05$) (^a), con respecto al grupo control con L-NAME ($p < 0.05$) (^b), Existe diferencia significativa entre las medias con respecto a los grupos 200 mg/kg, 400 mg/kg y enalapril ($p < 0.05$) (^c).

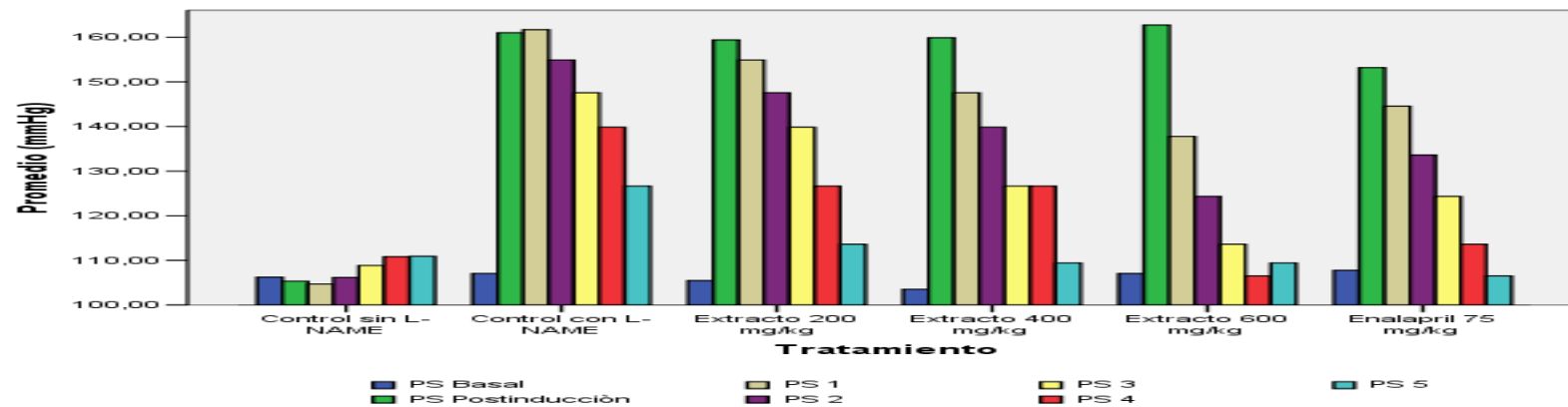


Figura 7. Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.2.1.2 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (PD)

Tabla 6. Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial diastólica del extracto metanólico a ratones hipertensos inducidos por L-NAME

Tratamiento	PB	PPI	PD1	PD5	PD10	PD15	PD20
Control sin L-NAME	85.11 ± 1.81	83.9 ± 1.67 ^a	79.57 ± 1.70	78.81 ± 1.58	79.45 ± 2.27	81.99 ± 1.09	81.6 ± 1.32
Control con L-NAME	84.14 ± 2.3	134.74 ± 2.72	136.16 ± 4.10 ^b	125.4 ± 1.94 ^b	127.09 ± 2.55 ^b	119.17 ± 1.53 ^b	103 ± 1.08 ^b
Extracto 200 mg/kg	81.59 ± 2.01	133.63 ± 2.48	125.4 ± 1.94	127.09 ± 2.55	119.17 ± 1.53	103 ± 1.08	87.14 ± 3.24
Extracto 400 mg/kg	79.53 ± 1.96	138.34 ± 2.09	127.09 ± 2.55	119.17 ± 1.53	103 ± 1.08	103 ± 1.08	82.6 ± 2.2
Extracto 600 mg/kg	83.46 ± 2.45	135.25 ± 1.39	96.94 ± 1.69 ^c	85.64 ± 2.06 ^c	87.14 ± 3.24 ^c	79.62 ± 2.78 ^c	82.6 ± 2.2
Enalapril 75 mg/kg	80.76 ± 1.84	129.28 ± 4.71	119.87 ± 1.90	95.06 ± 1.99	85.64 ± 2.06	87.14 ± 3.24	79.62 ± 2.78

Los valores son expresados como media ± error estándar. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PD=Presión Diastólica según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20).

Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control sin L-NAME ($p < 0.05$) (^a), con respecto al grupo control con L-NAME ($p < 0.05$) (^b), Existe diferencia significativa entre las medias con respecto a los grupos 200 mg/kg, 400 mg/kg y enalapril ($p < 0.05$) (^c).

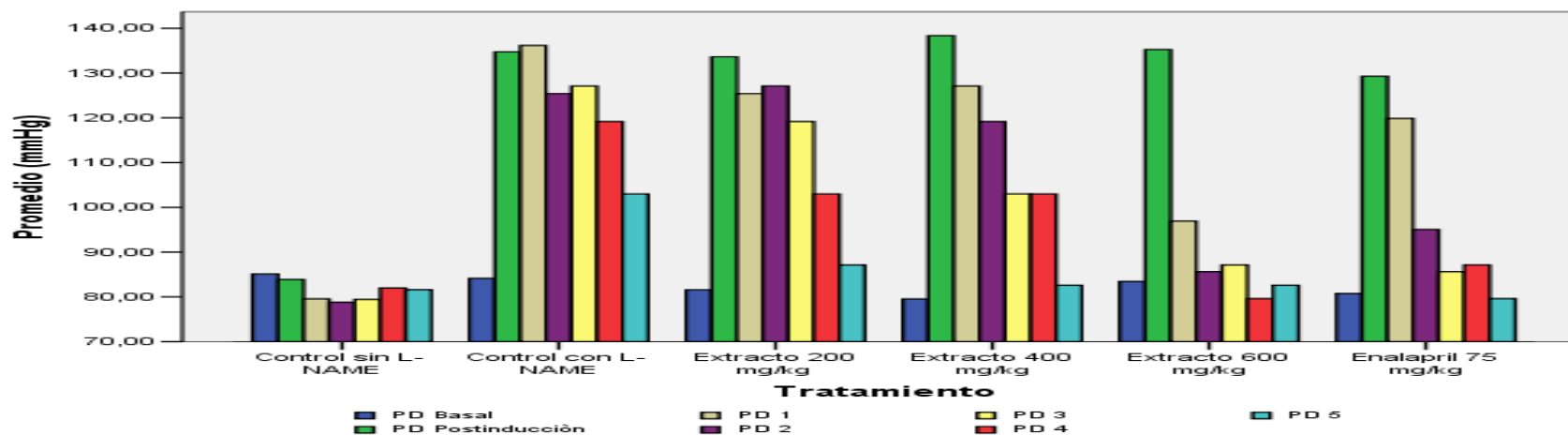


Figura 8. Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.2.1.3 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (PM)

Tabla 7. Efecto antihipertensivo sobre la presión arterial diastólica del extracto metanólico a ratones hipertensos inducidas por L-NAME.

Tratamiento	PB	PPI	PM1	PM5	PM10	PM15	PM20
Control sin L-NAME	92.33 ± 1.45	91.35 ± 1.39 ^a	88.1 ± 1.51	87.94 ± 1.33	89.32 ± 1.67	91.9 ± 0.92	90.94 ± 1.05
Control con L-NAME	91.76 ± 1.83	143.62 ± 1.92	143.79 ± 3.09 ^b	135.68 ± 1.27	134.69 ± 3.74	126.16 ± 1.28	110.72 ± 0.87
Extracto 200 mg/kg	89.6 ± 1.86	142.2 ± 1.48	135.68 ± 1.27	134.69 ± 3.74	126.16 ± 1.28	110.72 ± 0.87	93.7 ± 1.03
Extracto 400 mg/kg	87.55 ± 1.79	144.8 ± 3.30	134.69 ± 3.74	126.16 ± 1.28	110.72 ± 0.87	110.72 ± 0.87	91.39 ± 1.96
Extracto 600 mg/kg	91 ± 2.22	141.82 ± 1.68	110.19 ± 1.16 ^c	98.57 ± 1.49 ^c	93.7 ± 1.03 ^c	88.87 ± 2.23 ^c	91.39 ± 1.96
Enalapril 75 mg/kg	89.64 ± 1.54	139.32 ± 4.13	125.51 ± 1.74	107.62 ± 1.27	98.57 ± 1.49	93.7 ± 1.03	88.87 ± 2.23

Los valores son expresados como media ± error estándar. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PM=Presión Media según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20).

Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control sin L-NAME ($p < 0.05$) (^a), con respecto al grupo control con L-NAME ($p < 0.05$) (^b), Existe diferencia significativa entre las medias con respecto a los grupos 200 mg/kg, 400 mg/kg y enalapril ($p < 0.05$) (^c).

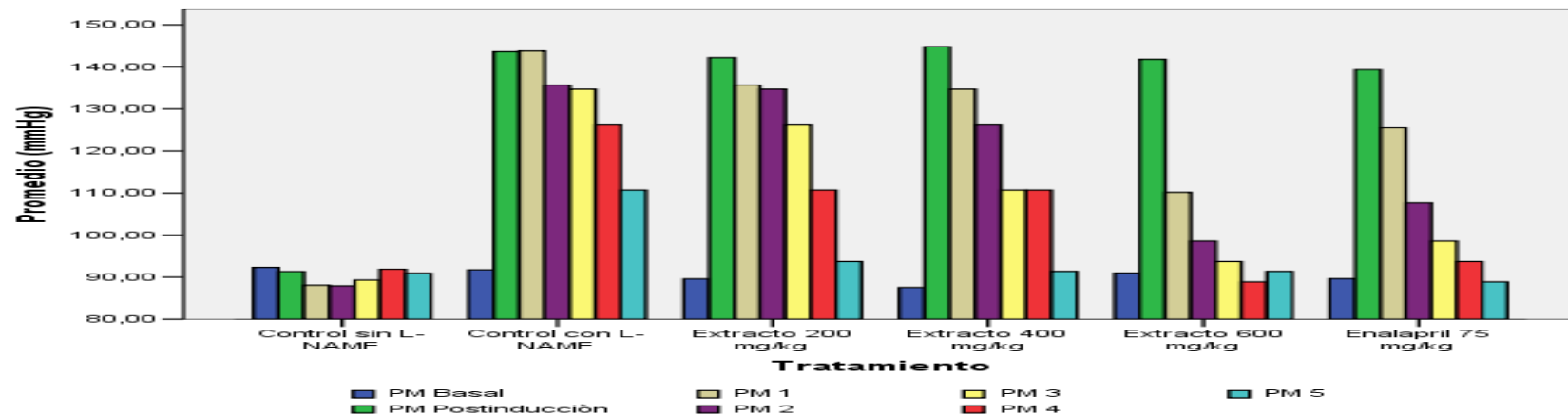


Figura 9. Efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial media en ratones hipertensos Inducidos por L-NAME

4.2.1.4 EFICACIA ANTIHIPERTENSIVA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

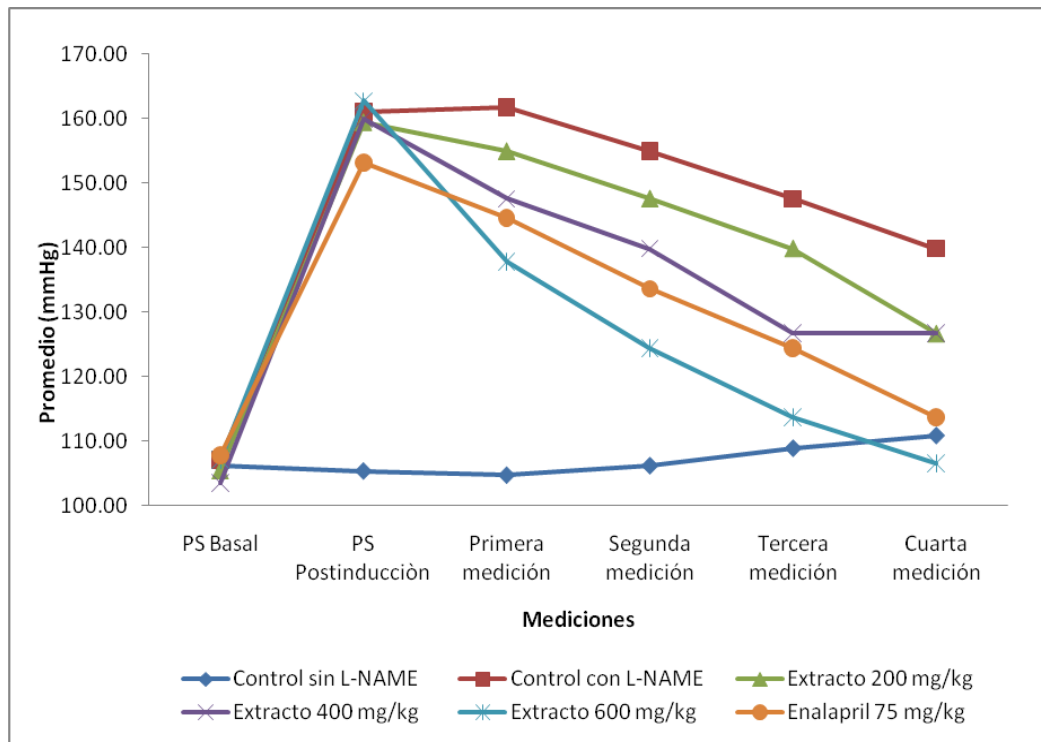


Figura 10. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

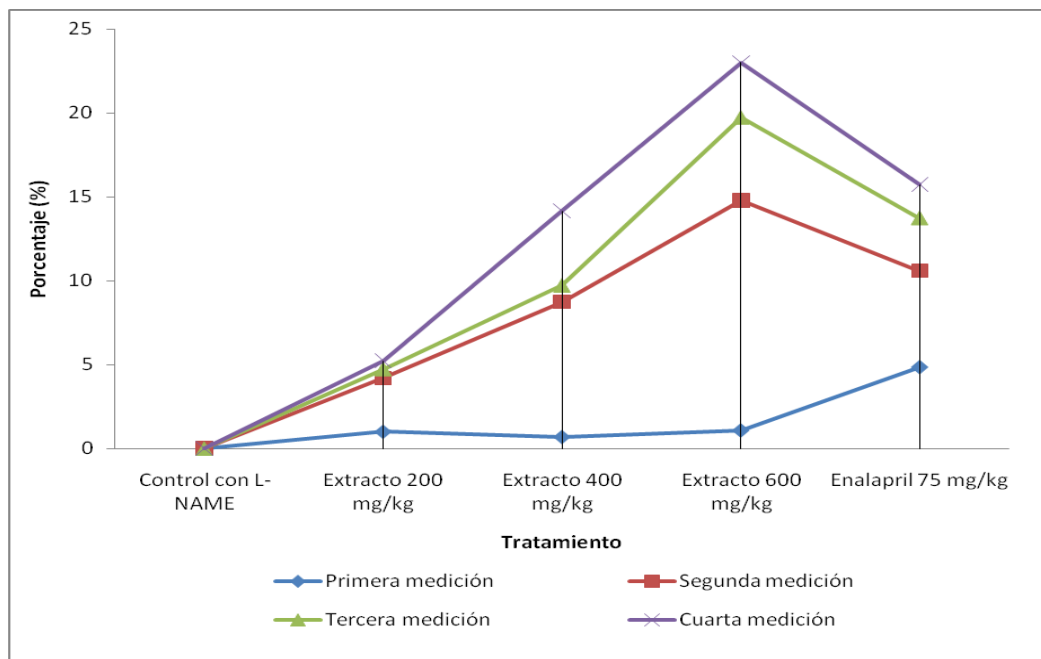


Figura 11. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial sistólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.2.1.5 EFICACIA ANTIHIPERTENSIVA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA

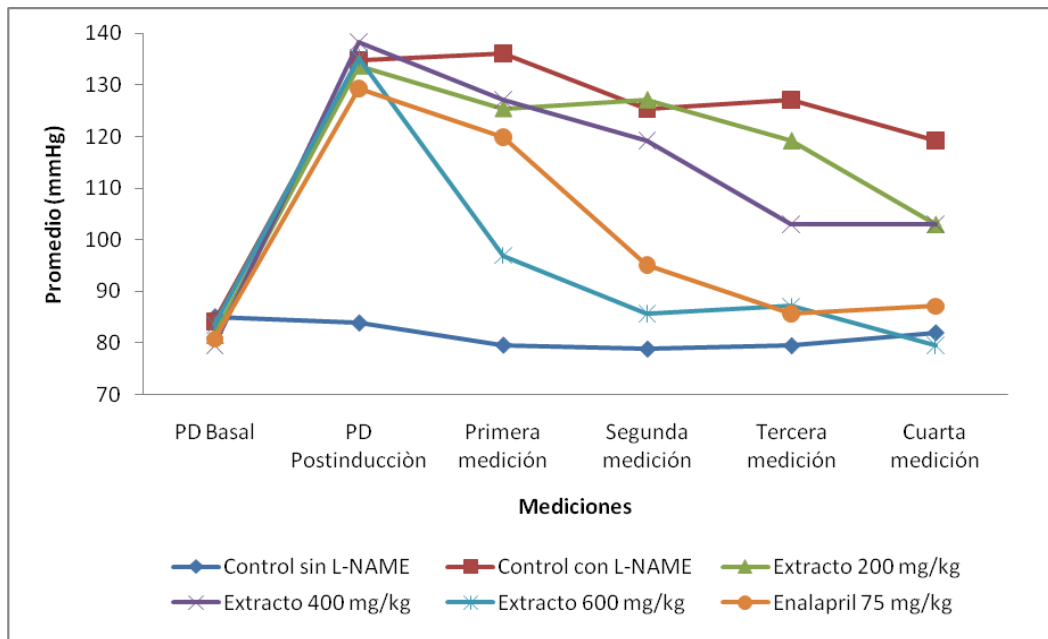


Figura 12. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

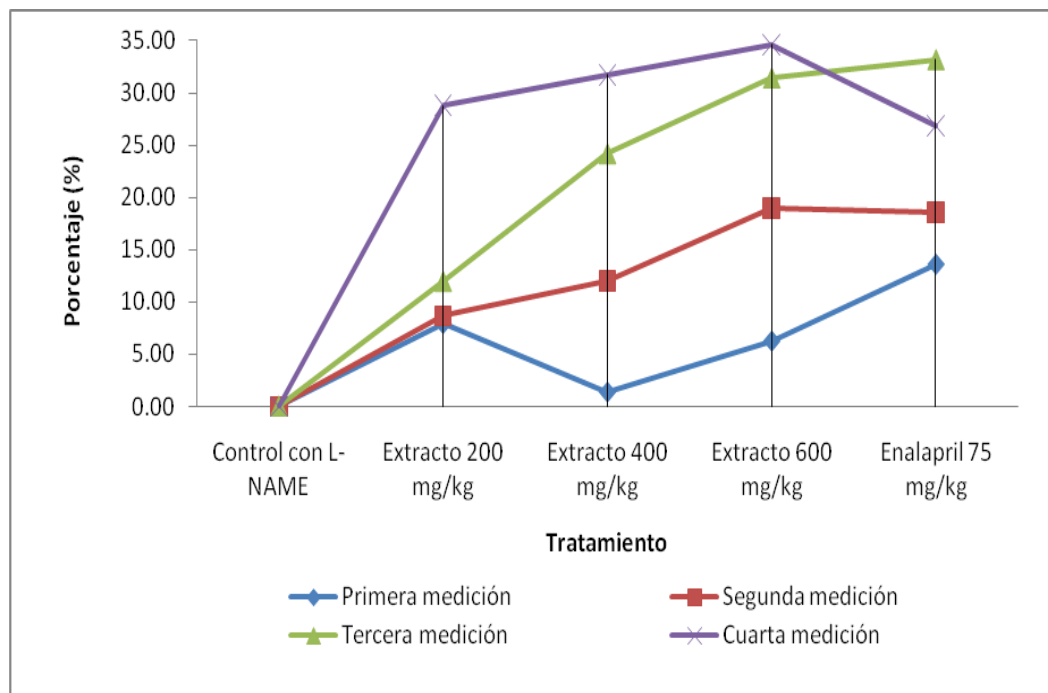


Figura 13. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial diastólica en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.2.1.6 EFICACIA ANTIHIPERTENSIVA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

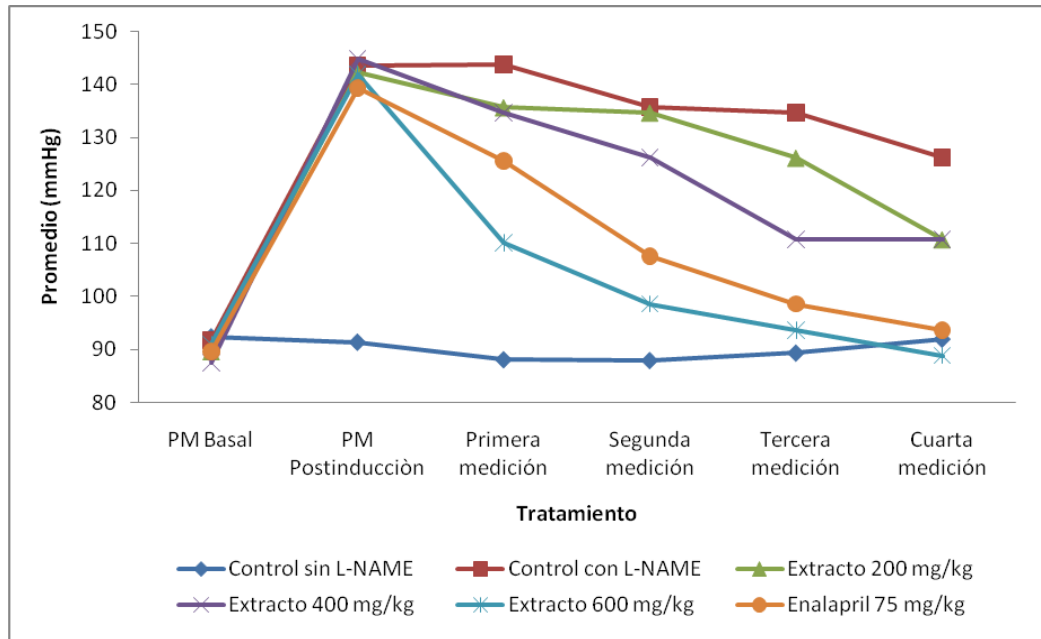


Figura 14. Evolución temporal del efecto antihipertensivo del extracto metanólico sobre la presión arterial media en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

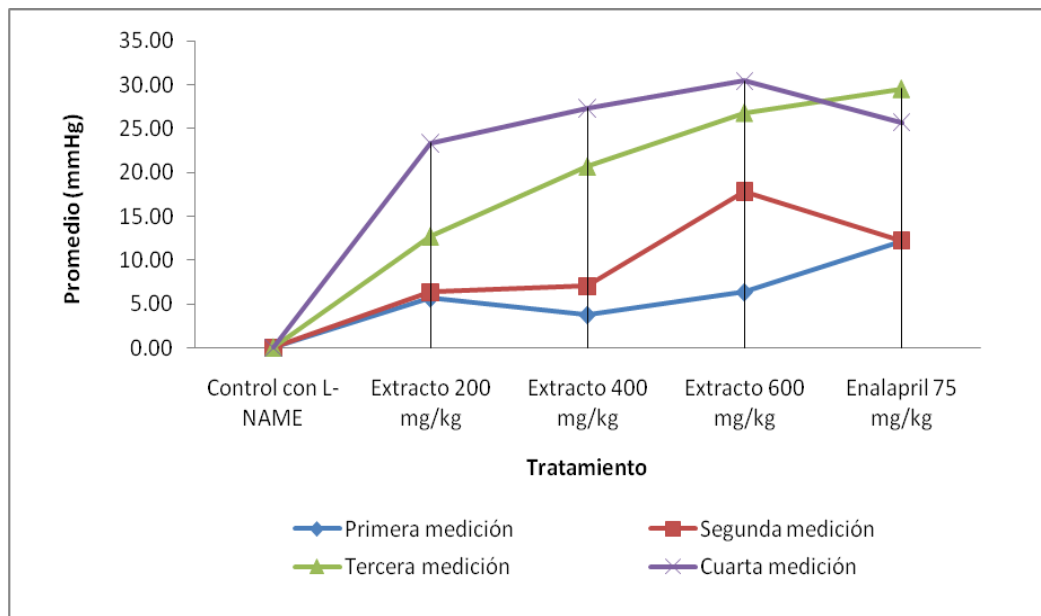


Figura 15. Eficacia antihipertensiva del extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* sobre la presión arterial media en ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.3 DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y MALONDIALDEHIDO

Tabla 8. Niveles de oxido nítrico (nmol/mL) al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME

Tratamiento	N	Media ± Error estándar	Mínimo	Máximo
Control sin L-NAME	10	1.37200 ± 0.08506	0.00704	0.00862
Control con L-NAME	10	1.08617 ± 0.08040	0.00991	0.03842
Extracto 200 mg/kg	10	2.28383 ± 0.07973 ^a	0.01192	0.01641
Extracto 400 mg/kg	10	2.47600 ± 0.07246 ^a	0.01112	0.01488
Extracto 600 mg/kg	10	2.80383 ± 0.24587 ^a	0.01161	0.01406
Enalapril 75 mg/kg	10	2.43017 ± 0.21521 ^a	0.01125	0.01342

(^a) Existe diferencia significativa entre las medias del grupo control con L-NAME y los grupos tratamiento. (p < 0.05).

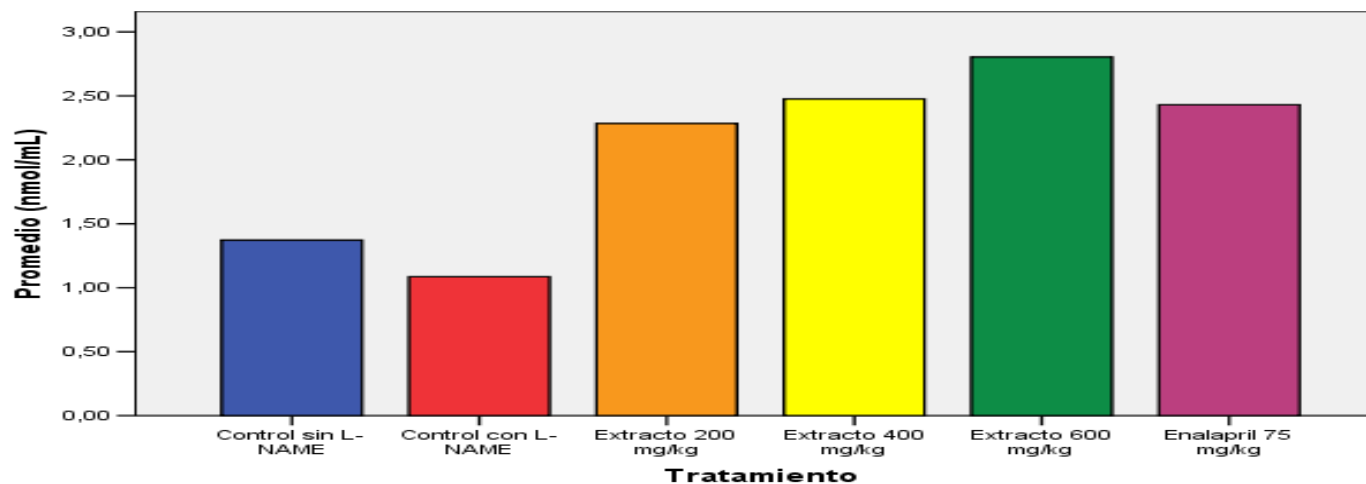


Figura 16. Niveles de Óxido Nítrico al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME

Tabla 9. Niveles de malondialdehido (nmol/mL) al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME

Tratamiento	N	Media \pm Error estándar	Mínimo	Máximo
Control sin L-NAME	10	0.00783 \pm 0.00031	0.00704	0.00862
Control con L-NAME	10	0.02417 \pm 0.00555 ^a	0.00991	0.03842
Extracto 200 mg/kg	10	0.01417 \pm 0.00087	0.01192	0.01641
Extracto 400 mg/kg	10	0.01300 \pm 0.00073	0.01112	0.01488
Extracto 600 mg/kg	10	0.01283 \pm 0.00048	0.01161	0.01406
Enalapril 75 mg/kg	10	0.01233 \pm 0.00042	0.01125	0.01342

(^a) Existe diferencia significativa entre las medias del grupo control con L-NAME y los grupos tratamiento. ($p < 0.05$).

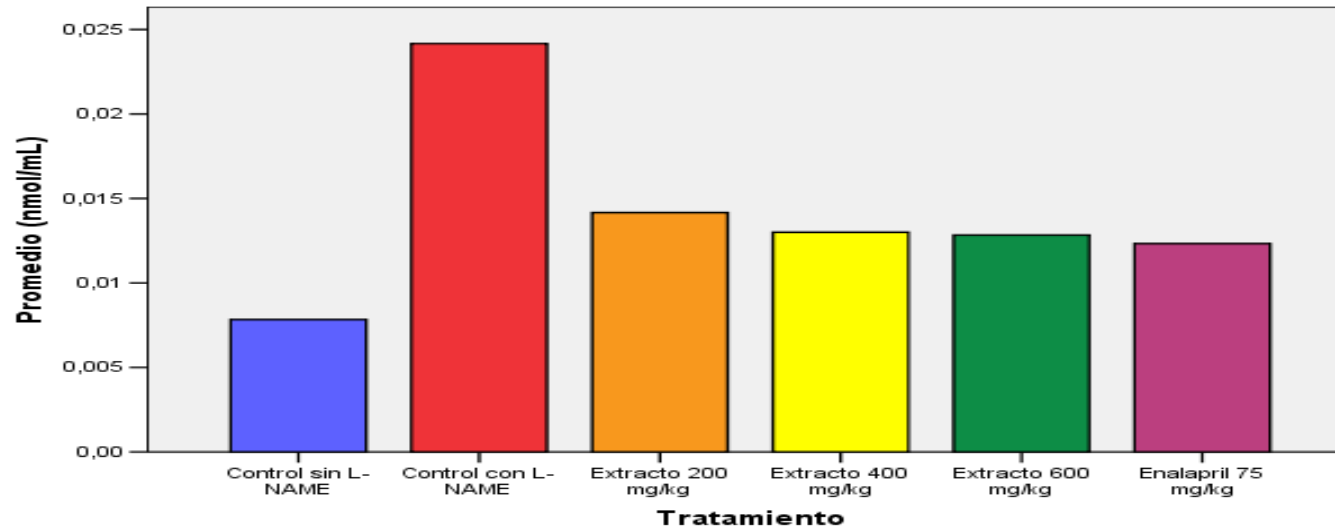


Figura 17. Niveles de Malondialdehido al día 30 en suero de ratones hipertensos inducidos por L-NAME

4.4 DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* EN RATONES NORMOTENSOS

La administración oral de una dosis límite de 3000 mg/kg (3 g/kg) de peso no provocó muerte de los animales o síntomas indicativos de toxicidad, durante las 72 horas de observación. Siempre se registró una conducta normal en los animales, con reflejo postural normal y respuesta habitual a los estímulos, así como el consumo de alimentos y agua fue con normalidad en comparación al grupo control. Las dosis fueron superiores a lo categorizado por el Acuerdo de Cartagena (2002), en animales de experimentación.

Como objetivo de este ensayo experimental fue que la toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50 (DL50), que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

4.5 DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* EN RATAS NORMOTENSAS

Tabla 10. Niveles de los datos hematológicos y bioquímicos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días

Tratamiento	Glucosa	Colesterol total	HDL - Colesterol	Trigliceridos
Control	87.5 ± 2.2	158.75 ± 10.2	39 ± 1.3	147.25 ± 11.7
Extracto 400 mg/kg	91.62 ± 3.8 ^a	179.75 ± 6.9 ^b	37.75 ± 2.7 ^b	145.62 ± 7.6 ^a
Extracto 600 mg/kg	89.75 ± 3.3 ^a	161.37 ± 7.8	46 ± 2.8	131.75 ± 13.6 ^a

Los valores son expresados como media ± error estándar. (^a) No Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control ($p > 0.05$). Existe diferencia significativa entre la media con respecto al grupo control y grupo de 600 mg/kg ($p < 0.05$). (^b)

Tabla 11. Niveles de los datos hematológicos y bioquímicos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días

Tratamiento	Urea	TGP	Fosfatasa alcalina	Leucocitos
Control	19.5 ± 2.8 ^a	17.25 ± 3.7 ^a	143.75 ± 10.7 ^a	7872.5 ± 840 ^a
Extracto 400 mg/kg	20.87 ± 2.1	22.5 ± 5.3	139 ± 4.2	6776.25 ± 524
Extracto 600 mg/kg	16.75 ± 1.2	24.12 ± 5.2	119.5 ± 8.8	7103.75 ± 778.1

Los valores son expresados como media ± error estándar. (^a) No Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control ($p > 0.05$).

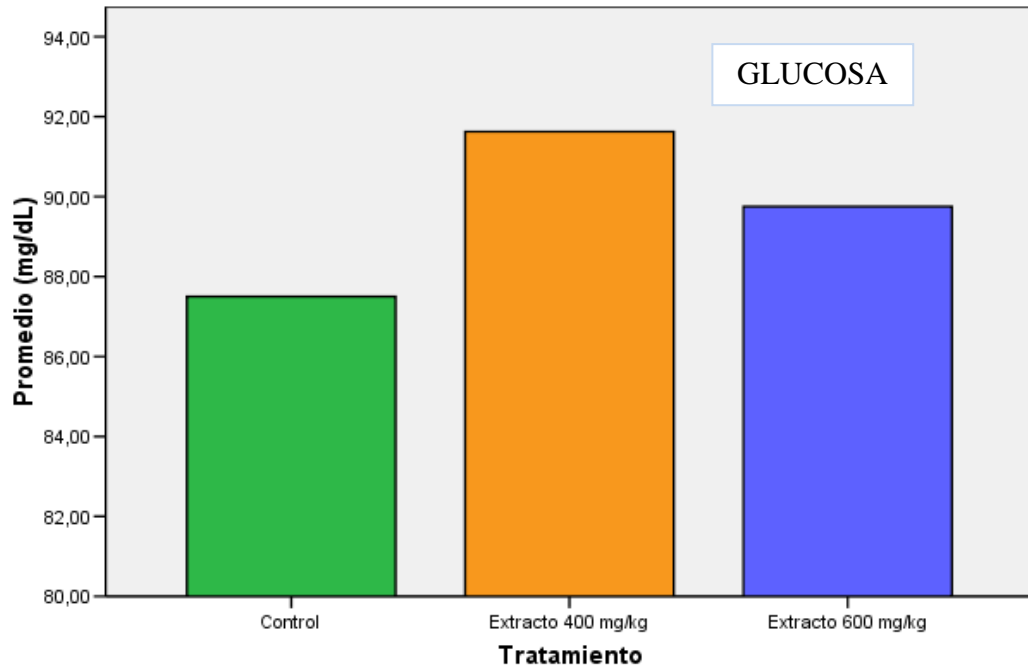


Figura 18. Nivel de glucosa al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 85 - 132). (Arroyo, et al 2004)

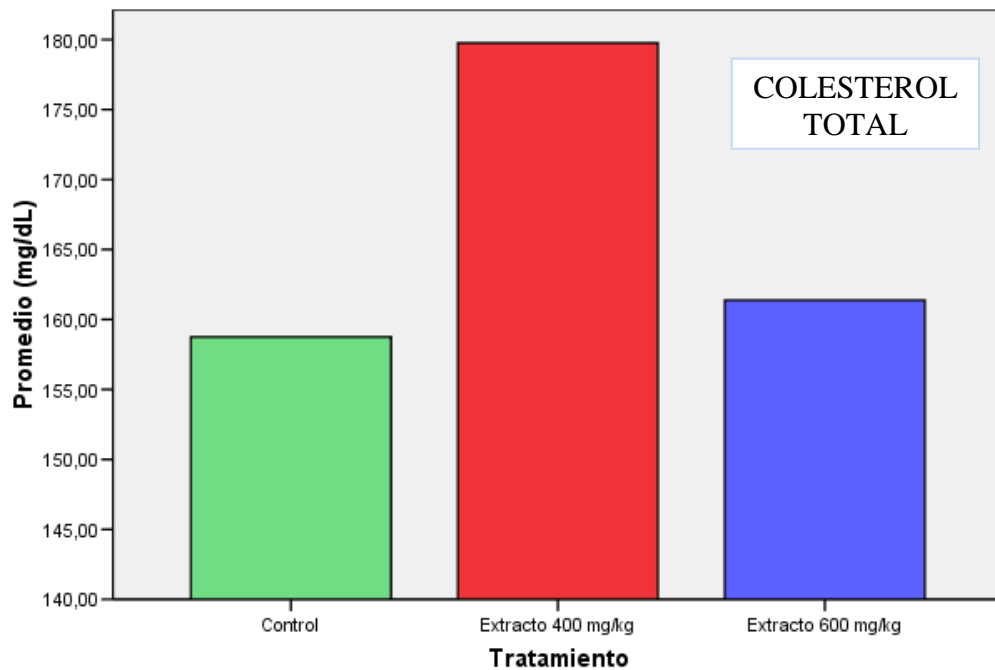


Figura 19. Nivel de colesterol total al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 46 - 92). (Arroyo, et al 2004)

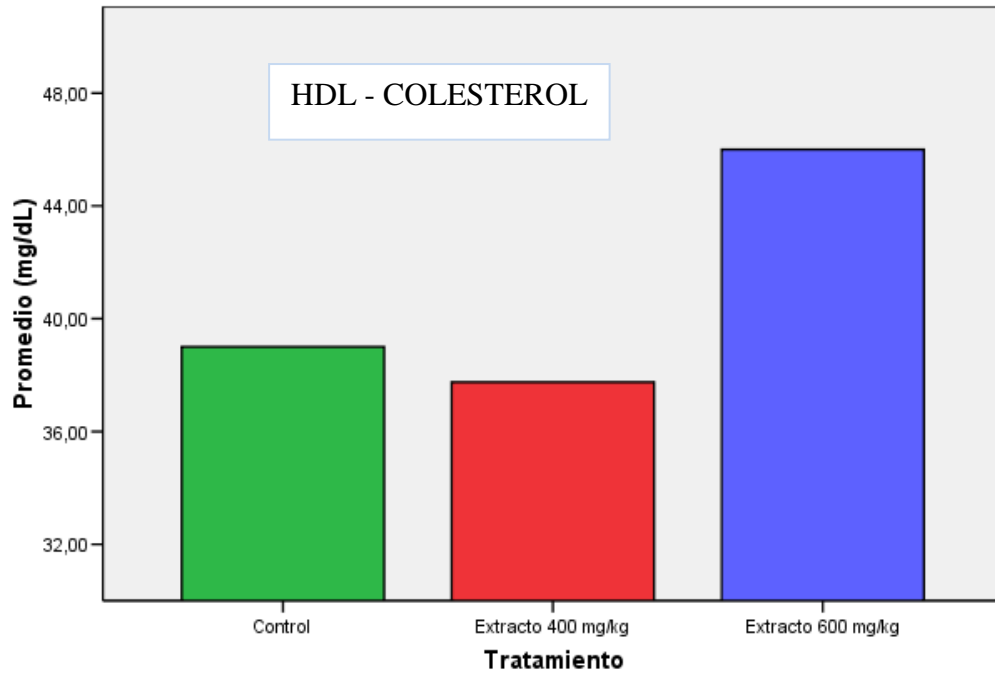


Figura 20. Nivel de HDL-colesterol al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

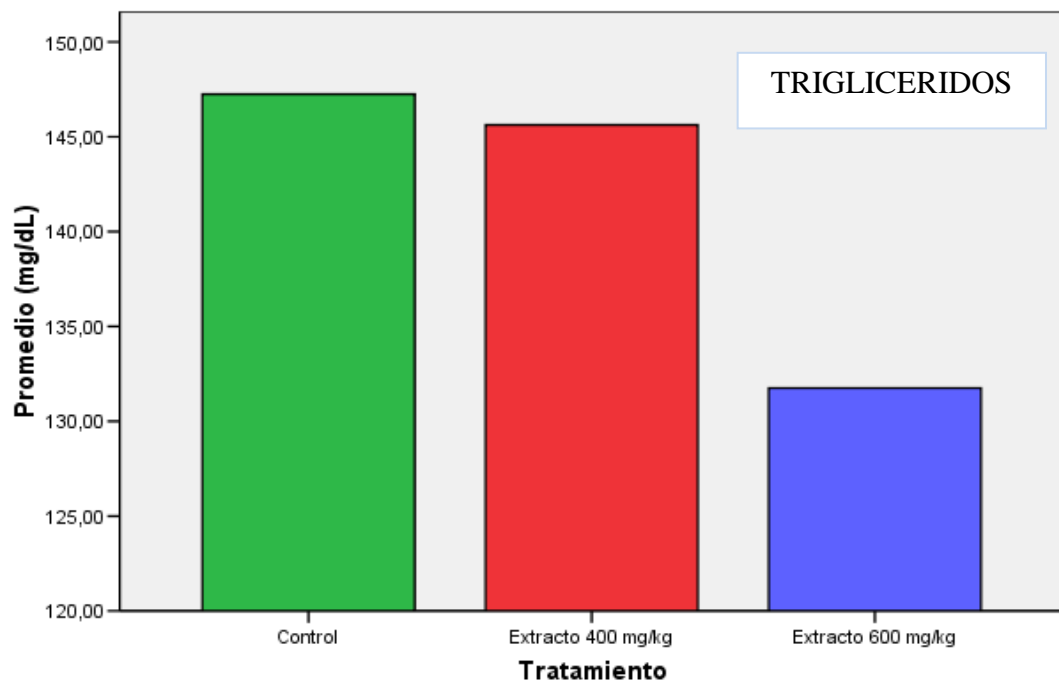


Figura 21. Nivel de triglicéridos al administrar el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

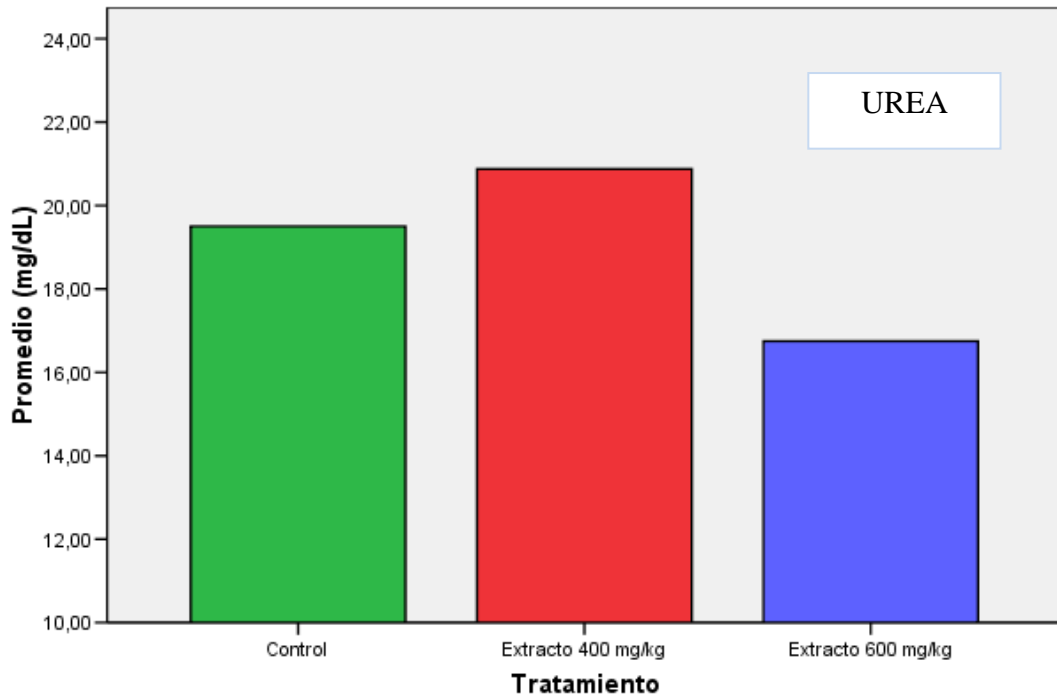


Figura 22. Nivel de urea al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 20 - 40). (Arroyo, et al 2004).

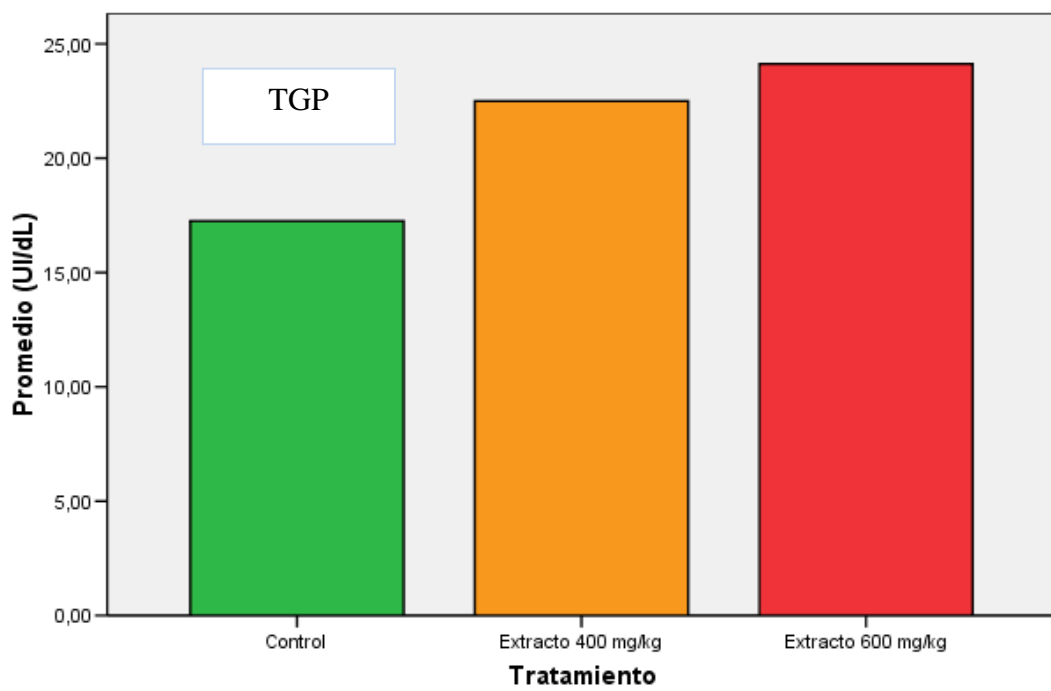


Figura 23. Nivel de TGP al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 17 - 50). (Arroyo, et al 2004).

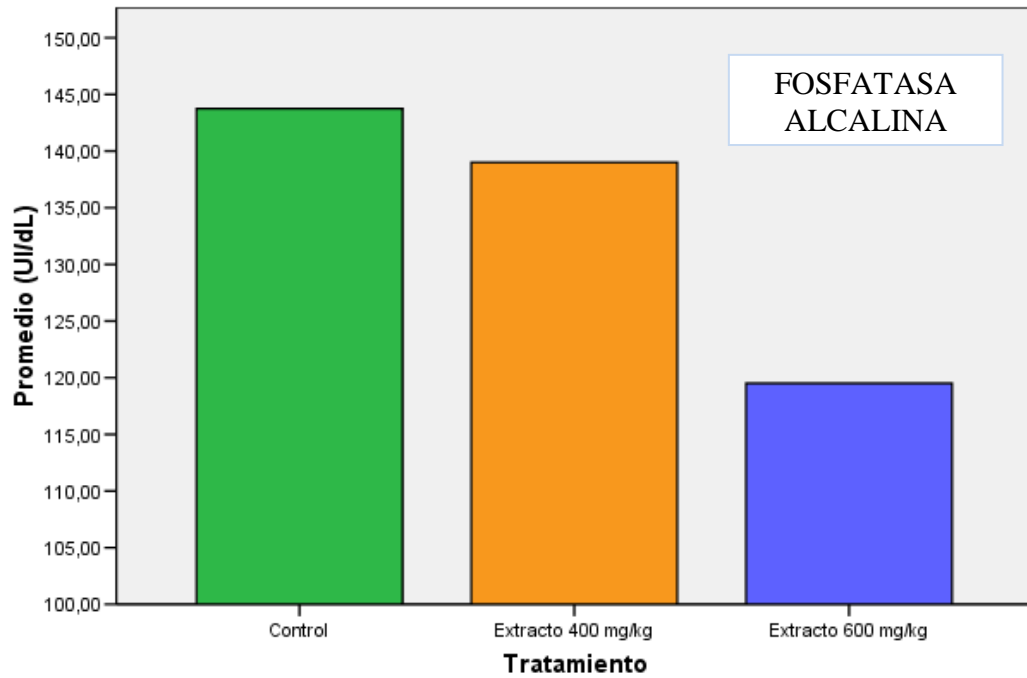


Figura 24. Nivel de fosfatasa alcalina al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 39 - 216). (Arroyo, et al 2004).

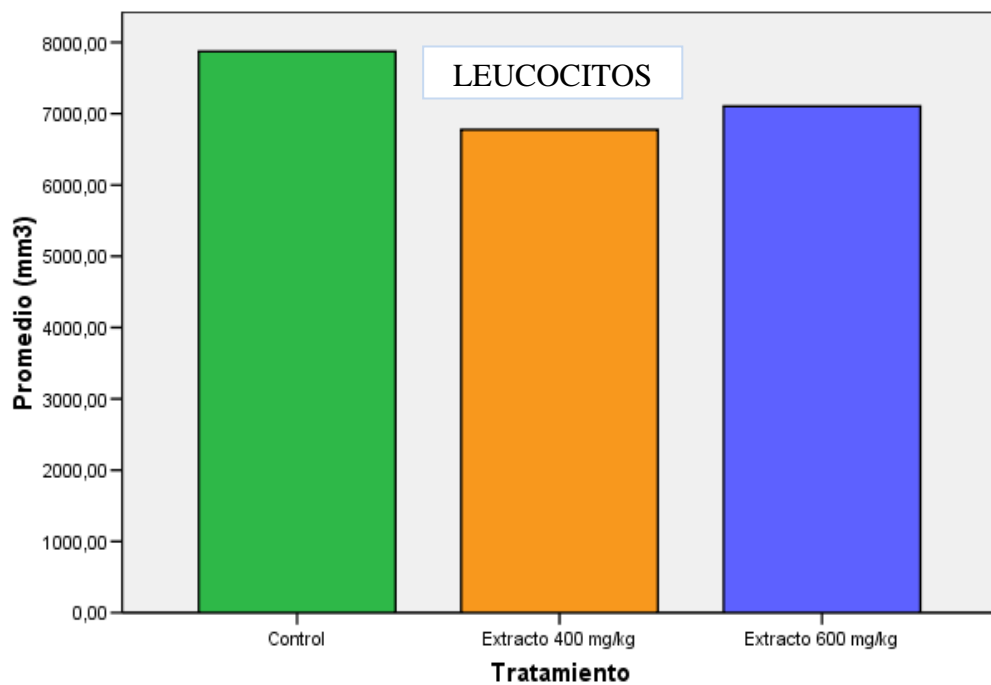


Figura 25. Nivel de leucocitos al administrar el extracto metanólico a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 4000 – 10200). (Arroyo, et al 2004).

4.6 DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICO A NIVEL ANATOMOPATOLOGICO

RIÑÓN

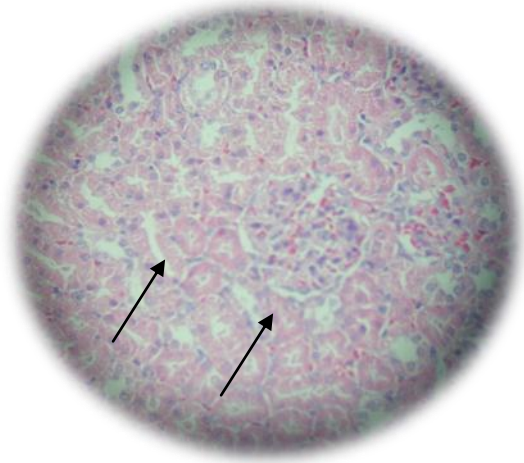


Figura 26. Grupo control se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

Figura 27. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

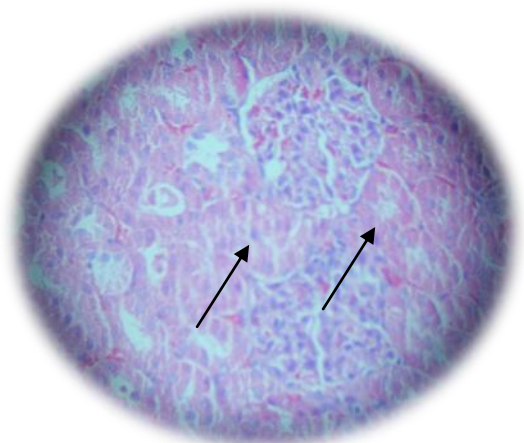
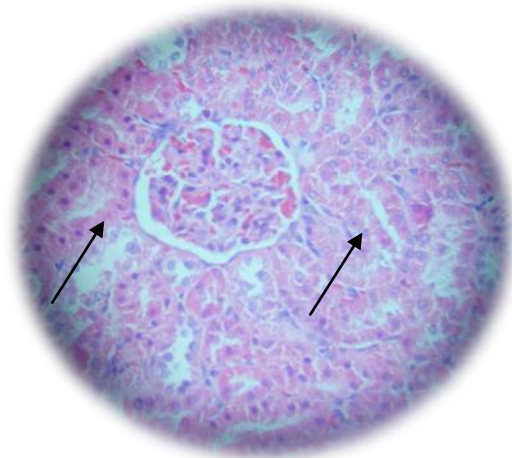


Figura 28. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológico del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

CORAZÓN

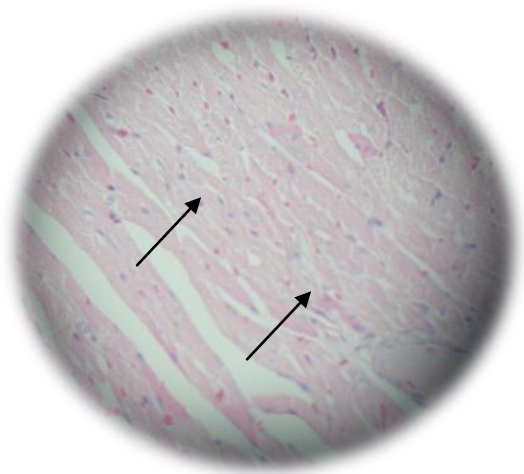


Figura 29. Grupo control se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

Figura 30. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

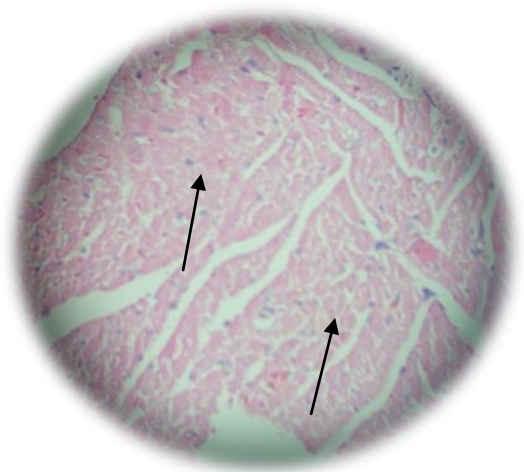
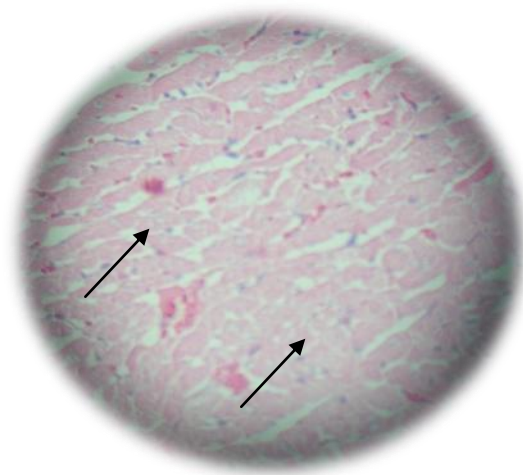


Figura 31. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológico (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

HÍGADO

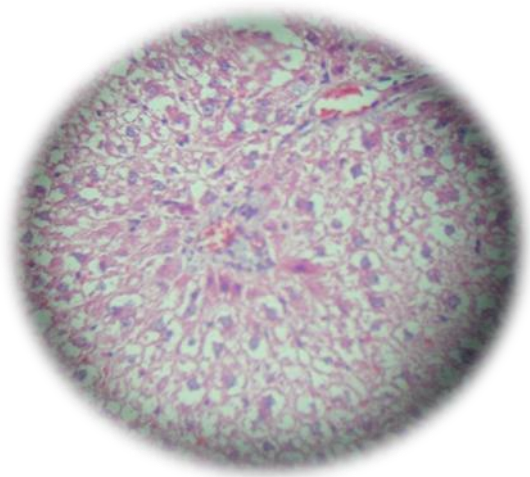


Figura 32. Grupo control se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.

Figura 33. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.

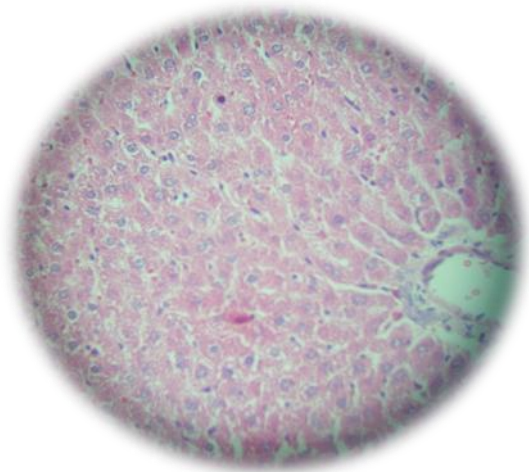
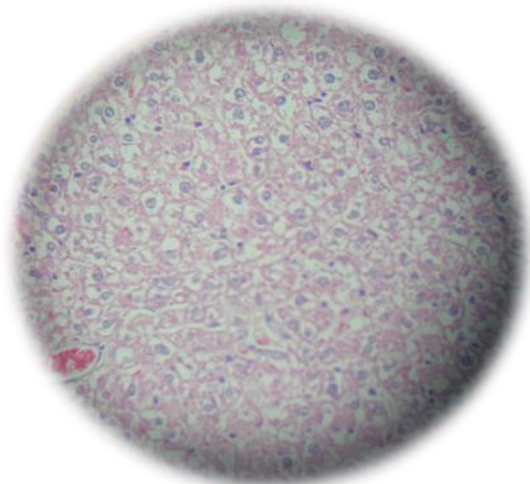


Figura 34. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido hepático en donde no hay alteración del parénquima hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X100.



PULMÓN

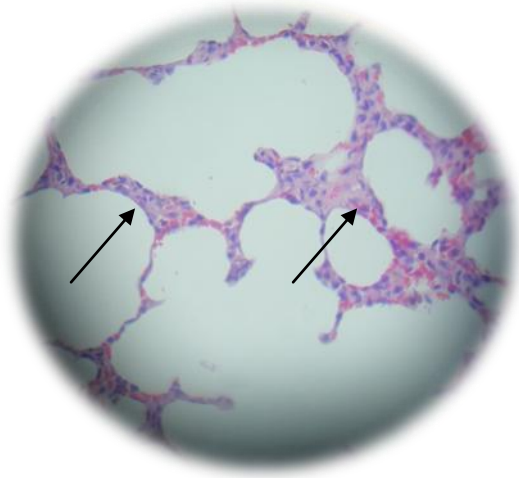


Figura 35. Grupo control se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

Figura 36. Grupo a dosis de 400 mg/kg se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

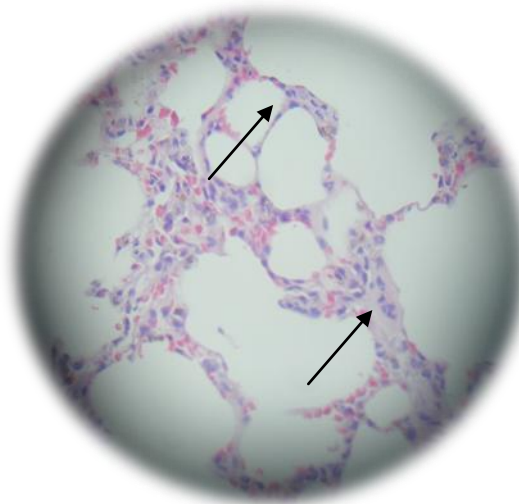
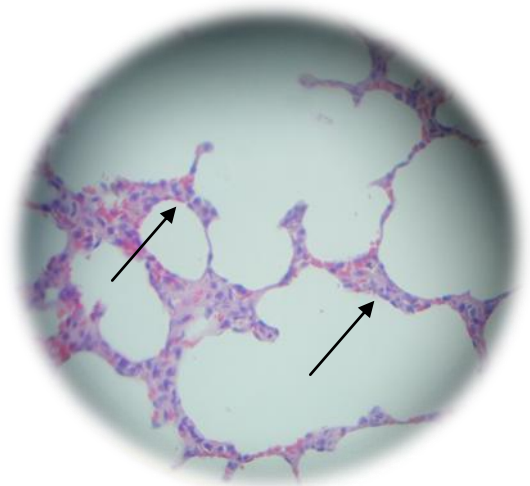


Figura 37. Grupo a dosis de 600 mg/kg se observa tejido pulmonar sin alteración anatomopatológico de las paredes de los alveolos pulmonares (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

Los objetivos de este estudio fueron investigar si ratones hipertensos inducidos por L-NAME podrían reducir los niveles de presión arterial al recibir el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz; determinar los niveles de óxido nítrico y malondialdehído; así como evaluar los efectos de la toxicidad aguda y toxicidad crónica a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico al administrar el extracto metanólico por vía oral durante 60 días en ratas normales. A continuación se busca explicar los hallazgos encontrados.

En el estudio fitoquímico cualitativo (Tabla 4) el extracto metanólico mostró la presencia de abundante cantidad de compuestos fenólicos, regular cantidad de flavonoides, seguido de poca cantidad taninos, alcaloides y quinonas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Lastra y Yañez (Lastra, 2004) en donde se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y taninos en el extracto seco hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*. Asimismo en otra especie vegetal del mismo género, *Calceolaria tripartita*, Tomas et al, 2004; determinó la presencia de diterpenos, cumarinas y alcaloides en un extracto acuoso, que concuerda en la presencia de alcaloides y triterpenoides. En una tesis realizada Condorhuamán y Laquihuanaco, (2006), determinaron la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en la *Calceolaria tripartita* concordando con la presencia de estos constituyentes químicos en el género *Calceolaria*.

Se debe señalar que la especie vegetal del presente estudio pertenece a la familia de las Scrofulariaceae y en esta misma familia se encuentra las especies vegetales de la *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea* que en su composición fitoquímica presentan heterósidos cardiotónicos (Kuklinski, 2003).

Se ha buscado validar el efecto antihipertensivo de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, utilizando el método de inducción de hipertensión por N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Obst, 2003), en donde se demuestra que la administración durante 07 días consecutivos de L-NAME a dosis de 130 mg/kg por vía oral produce un aumento de la presión arterial (Obst, 2003). El L-NAME es un inhibidor irreversible de la enzima

óxido nítrico sintetasa (NOS) encargada de la producción de óxido nítrico en el endotelio a partir de la L-arginina. La inhibición de la NOS disminuye la producción de óxido nítrico (NO) ocasiona vasoconstricción, aumento de la liberación de renina e hipertensión arterial (Maicas, 2003; Hodge, 2009; Cosgrove, 2005; Zhou, 2002).

El porcentaje de elevación de la presión arterial post inducción en relación a la presión basal (Figura 6) se debe indicar que en promedio (expresado en porcentaje) la presión sistólica se elevó en un 47,46 %, la presión diastólica en un 62,08 % y la presión arterial media en un 56,15 %. Estos resultados son comparables según lo indicado por Peotta, et al, 2001, quién señala que la presión sistólica y diastólica se elevo en aproximadamente 60 %. Por otro lado Sharifi et al, (2005), Rodríguez et al (2003), reportan elevaciones de la presión de arterial sistólica en un 90 a 100%. Así mismo Ramírez et al, 2006; señala que el L-NAME produce un mayor aumento de la presión diastólica.

Según los resultados de la presente investigación el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en dosis de 200 mg/kg, 400 mg/kg y 600 mg/kg presentó efecto antihipertensivo a nivel de presión arterial sistólica, diastólica y media a lo largo del tratamiento durante 30 días, como se indica en la Tabla 5, Tabla 6 y Tabla 7 (Figuras 7, 8 y 9). El efecto antihipertensivo se hizo sostenible a partir del día 10 de tratamiento a lo largo del experimento. Durante el tratamiento hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales en relación al grupo control con L-NAME, un dato importante que resaltar es que el grupo experimental a dosis de 600 mg/kg presentó mejor efecto antihipertensivo en relación a todos grupos incluyendo al grupo de enalapril - que es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II (Katzung, 2001) - hasta los 25 días, luego del cual ya no hubo diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento, indicándonos que los animales expuestos a hipertensión reducirán sus cifras de presión arterial tanto al recibir enalapril o el extracto de la planta, pero que la eficacia antihipertensiva será mejor al recibir una dosis de 600 mg/kg ($p < 0.05$).

En relación a la eficacia antihipertensiva, se observa en la Figura 11 que el extracto metanólico a dosis de 600 mg/kg presentó la mayor eficacia antihipertensiva sobre la presión arterial sistólica durante la evolución del tratamiento administrado (Figura 10) en forma diaria durante 30 días, incluyendo la eficacia antihipertensiva mejor que el

enalapril usado como medicamento estándar. Del mismo modo se observa que el extracto metanólico a dosis de 600 mg/kg presentó mejor eficacia antihipertensiva sobre la presión arterial diastólica y presión arterial media (Figuras 13 y 15) durante la evolución del tratamiento (Figuras 12 y 14). De las figuras mencionadas anteriormente el enalapril presentó mejor eficacia antihipertensiva sobre las dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg durante la evolución del tratamiento.

El estudio de las plantas medicinales con efecto antihipertensivo desarrollado en modelos preclínicos y clínicos muestran constituyentes químicos responsables del efecto antihipertensivo como son los flavonoides (Kuklinski, 2003; Martínez, 2002) y compuestos fenólicos (Kuklinski, 2003; Rojas, 2006; Fatehi, 2005), saponinas esteroidales (Phillips, 2006), los dos primeros metabolitos secundarios se encuentran en abundante cantidad y regular cantidad en la especie vegetal ensayada, determinado en el análisis fitoquímico cualitativo (Tabla 4). El mecanismo de acción antihipertensivo de los 2 compuestos aludidos sería por un efecto vasodilatador (Rojas et al, 2006) e inhibición del sistema renina angiotensina (Fatehi et al, 2005), asimismo el efecto diurético atribuido por la medicina tradicional puede tener como responsable a la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y compuestos fenólicos tal como lo reportan Kuklinski (2003), Maghrani (2005), Valencia (1995), Benjumea (2005), Somova (2003), Lahlou (2007), los que explican que el efecto diurético se debería a la acción vasodilatadora, osmótica, inhibidores de la angiotensina aldosterona e inhibición de la reabsorción de sodio (Maghrani et al, 2005), que a su vez contribuiría al efecto antihipertensivo de acuerdo a lo señalado anteriormente.

Recientemente, se ha considerado que la hipertensión arterial esencial es un síndrome de anormalidades metabólicas y estructurales (genéticas y adquiridas); dentro de las alteraciones metabólicas han surgido evidencias que indican que las Especies Reactivas derivadas del Oxígeno (EROs) juegan un papel fisiopatológico preponderante en el desarrollo de la hipertensión (Cosgrove et al, 2005). Esto se debe al exceso de O_2^- y a la disminución de la liberación de óxido nítrico (ON) en la remodelación cardiovascular y en la vasculatura del riñón, mediado por los EROs (Fortuño et al, 2005). Investigaciones recientes en pacientes con hipertensión esencial evidencian una situación de estrés oxidativo, con incremento de la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de peroxidación lipídica (Oré et al, 2007).

En la Tabla 8 y Figura 14 se observa que los niveles de óxido nítrico presentaron un aumento con respecto al grupo control con L-NAME que es estadísticamente significativa para todos los grupos experimentales incluyendo al grupo del enalapril, también se debe indicar que a cualquiera de las dosis evaluadas se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con relación al grupo control sin L-NAME.

En la Tabla 9 y Figura 15 se observa que los niveles de malondialdehído presentan una disminución con relación al grupo control con L-NAME que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para todos los grupos experimentales incluyendo al grupo del enalapril.

De ambas tablas se indica que el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presentó el aumento de los niveles séricos de óxido nítrico y la disminución de los niveles séricos de malondialdehído que va a favorecer su efecto antihipertensivo, que podría deberse a los constituyentes químicos presentes, principalmente a los compuestos fenólicos como los flavonoides (Somova et al, 2003).

Los flavonoides y taninos principalmente presentan actividad antioxidante, pero principalmente a los flavonoides se les atribuye actividad antioxidante de acuerdo a reportes de Gorduza (2000), Gonzáles (2003), Torok (2008) Ren (2003), Kuskoski (2004), Dragsted (2003), Akdemir (2003), Silva (2002) y Pérez (2003). Estos flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, que les confiere una gran capacidad antioxidante, desempeñando un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer (Maghrani et al, 2005). Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son: presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C41-42; Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante (Fortuño et al, 2005; Gorduza et al, 2000).

Durante el decenio pasado aumentó significativamente el empleo de plantas medicinales a consecuencia de las actividades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la promoción de la medicina tradicional, los países han solicitado su ayuda en la identificación de medicamentos herbarios inocuos y eficaces para utilizarlos en los sistemas nacionales de asistencia sanitaria. En países desarrollados y en desarrollo, la población y el personal que lleva a cabo los servicios primarios de salud necesitan disponer de información actualizada y autorizada sobre las propiedades beneficiosas y los posibles efectos nocivos que conlleva el uso de todos los medicamentos de origen natural (Pérez, 2003). En este trabajo se muestran los resultados de un estudio toxicológico realizado con la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* Kraenz proveniente de la región del Cusco que se utiliza en la medicina tradicional. El estudio brinda aspectos relacionados con las propiedades tóxicas que han sido poco estudiadas.

En la evaluación de la toxicidad aguda se determinó que el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* estaría categorizado como prácticamente no tóxico de acuerdo al manual técnico andino para el registro y control de sustancias químicas (2002) del Acuerdo de Cartagena, debido a que no se presentó mortalidad en ninguno de los géneros (macho y hembra) a una dosis mayor de 3 g/kg de peso corporal de cada ratón ensayado y observado durante 72 horas.

En la evaluación de la toxicidad crónica a nivel hematológico y bioquímico que se evaluó en el ensayo a dosis repetidas por vía oral por 60 días (Tabla 10 y Tabla 11), se ha determinado que el extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz no presentó cambios estadísticamente significativo ($p > 0.05$), en los niveles hematológicos y bioquímicos a las dosis de 400 mg/kg y 600 mg/kg comparados con el grupo control; a excepción de los niveles de HDL-Colesterol que presentó un aumento que fue estadísticamente significativo a las dosis de 600 mg/kg, asimismo hubo una disminución de nivel del colesterol sérico a esta misma dosis pero que no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control, pero sí al grupo de la dosis de 400 mg/kg (Tabla 10), es decir al administrar dosis de 400 mg/kg hubo un aumento del colesterol sérico con respecto a ambos grupos.

Existen múltiples reportes sobre el estudio de las plantas medicinales sobre la dislipidemia, se debe señalar que el *Plantago ovata* (ispágula), *Allium sativum* (ajo) y

Cynara scolimus (alcachofa) entre otros, son reportados por presentar efecto hipocolesterolemizante (López, 2002); la actividad hipocolesterolemizante de la hoja de alcachofa se atribuye a diferentes compuestos, como las lactonas sesquiterpénicas (cinaropicrina, grosheimina), y los flavonoides (luteolina, glucósidos de luteolina) (Villar, 2004). La administración del extracto acuoso de Aloe vera en conejos durante 6 semanas causó una disminución significativa de los lípidos en suero y un aumento del HDL-colesterol que es considerado como un efecto beneficioso asociado a la disminución de infarto (Tedesco et al, 2004).

En la evaluación anatomopatológica del riñón, corazón, hígado y pulmón (figuras del 25 al 37) no se muestra evidencia de cambios histopatológicos anormales con relación al grupo control durante todo el experimento, este dato nos indica que existe un margen de seguridad tanto a nivel de toxicidad aguda y toxicidad crónica, pero debería ser confirmado con otros estudios de toxicidad, debido a que la hipertensión arterial es una enfermedad crónica y que la administración de medicamentos alopáticos o fitoterapéuticos son utilizados por tiempo indefinido.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) contiene en abundante cantidad compuestos fenólicos y en regular cantidad flavonoides.
- El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) presentó efecto antihipertensivo sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media en ratones hipertensos inducidos por L-NAME.
- El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) incrementó los niveles séricos de óxido nítrico y disminuyó los niveles séricos de malondialdehído.
- El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) es categorizado como prácticamente no tóxico (dosis superior a 3 g/kg).
- El extracto metanólico de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) no ha inducido efecto tóxico a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico.

RECOMENDACIONES

- Identificar y purificar el o los componentes responsables del efecto antihipertensivo y del efecto antioxidante del extracto metanólico.
- Continuar los estudios para determinar el mecanismo de acción de los principios activos responsables del efecto antihipertensivo.
- Realizar estudios de genotoxicidad y mutagenicidad del extracto metanólico.
- Realizar fases de ensayos clínicos en pacientes debidamente controlados para corroborar los ensayos preclínicos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuerdo de Cartagena. 2002. Manual técnico andino para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola. Gaceta oficial. Año XVIII – Número 80.
- Agusti R. (2006). Epidemiología de la hipertensión arterial en el Perú. Acta Medica Peruana. 23 (2): 69 – 75.
- Akdemir Z, Tatli C, Bed E, Khan I, Fabad J. (2003). Antioxidant Flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. Pharm. Sci. 28: 71-75.
- Aldave A. (1988). Botánica Farmacéutica. Primera Edición. Perú. Editorial Libertad EIRL – CONCYTEC.
- Alvarado E. (1987). Especies de la Flora Altoandina de la Provincia de Acomayo – Cusco. Tesis para optar al título de Biólogo. Cusco-Perú. Facultad de Biología – Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.
- Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. (2004). Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Primera Edición. Lima-Perú. Publicaciones ASDIMOR.
- Arroyo J, Barreda A, Ráez E, Jurado B, Moral G, Martínez J, et al. (2007). El extracto etanólico de las flores de *Laccopetalum giganteum* (pacra-pacra) aumenta la fertilidad en ratas. An Fac Med. 68 (3): 238-243.
- Atsamo A, Nguielefack T, Datté, Kamanyi A. (2011). Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. Journal of Ethnopharmacology. Artículo en prensa.
- Baglivo H. (2003). Clasificación de la hipertensión arterial en base a la definición del JNC VII y las guías de las Sociedades Europeas de Hipertensión Arterial y Cardiología. Revista Argentina de Anestesiología. 61 (6): 341-45.
- Beevers G, Lip G, O'Brien E. (2001). ABC of hypertension. The pathophysiology of hypertension. British Medical Journal. 322: 912-916.
- Benjumea D, Abdala S, Hernández F, Pérez F, Martín D. (2005). Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species. Journal of Ethnopharmacology. 100: 205–209.
- Bories PN, Bories C. (1995). Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. Clin Chem. 41: 904-907.

- Bryce A. (2010). Actualización y raciocinio del mejor tratamiento antihipertensivo. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(4):251-5.
- Carretero M. (2001). Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides (III). *Panorama Actual Med.* 25 (243): 442-449.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E, Bromage N, Bunyan J, et al (1986). Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 1. Comisión Europea.
- Colom Y, Azcue M, Pérez R, Respall M, Ruiz R, Quesada W. (2005). Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388. *10 (2): 85-89.*
- Condorhuamán M, Laquihuanaco R. (2006). Efecto diurético y toxicidad de *Calceolaria tripartita* Ruiz & Pavón “zapatilla de agua”. Tesis para Optar al Título Profesional de Médico Cirujano. Cusco –Perú. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.
- Cosgrove T, Nwachukwu C, Olakanmi O. (2005). The nitric oxide inhibitor L-NAME prolongs synaptic facilitation. *Pioneering Neuroscience.* 6: 27-29.
- Chávez J, Suárez G, Gonzáles Z, Nuñez R, Socarras E, Amel A, et al. (2001) Determinación de Malondialdehído y Oxido Nítrico en Individuos Fumadores. *Sociedad Venezolana de Medicina Interna.* 17 (2): 1 – 7.
- CYTED. (1995). Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el desarrollo. Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región.
- Debenetti S, Miño J, Rojo A, Acevedo C. (2000). Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. Ex Hicken, *Bauhinia Candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb. *Acta Farmacéutica Bonaerense.* 19 (1): 17-20.
- De Lucca M.; Zalles J. (1992). *Flora Medicinal Boliviana: Diccionario Enciclopédico.* Primera Edición. Cochabamba – Bolivia. Editorial Las Amigas del Libro.
- Dragsted L. (2003). Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam.Nutr.Res.* 73: 112-119.
- Durand A. (1999). *Flora Medicinal del Distrito de Vilcabamba entre las localidades de Paltaybamba y Oyara Provincia de la Convención – Cusco.*

Cusco-Perú. Tesis para optar al Título de Biólogo. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

- Farreras P, Rozman C. (2000). Medicina Interna. Decimocuarta Edición. Tomo I. Madrid –España. Harcourt.
- Fatehi M, Saleh T, Fatehi Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. (2005). A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 46–52.
- Fortuño A, San José G, Moreno M, Díez J, Zalba G. (2005). Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol*. 90: 457-462.
- Gamboa R. (2006). Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Medica Peruana*. 23 (2): 76-82.
- Ganong W. (1998). Fisiología Médica. 16a Edición. Ciudad de México. El Manual Moderno, SA.
- Garbarino J, Fraga B, Hernandez M, Chamy M, Piovano M. (2001). Chemistry and biotransformations in the Scrophulariaceae family. *Pure Appl. Chem*. 73 (3): 579–582.
- García P, Urrego J, D’Achiardi R, Delgado V. (2004). Hipertensión arterial: diagnóstico y manejo. *Universitas Médica*. 45 (2): 77 – 84.
- Girault L. (1987). Curanderos itinerantes de los Andes. Investigaciones sobre plantas medicinales y mágicas. Primera Edición. La Paz-Bolivia. Editorial UNICEF – OPS – OMS.
- Goldman L, Ausiello D. (2008). Cecil Medicine. Twenty–Third Edition. Philadelphia. Elsevier.
- González M, Soto M, Kite G. (2003). Flavonoides contenidos en tallos de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. f. *Berlandieri* Schauer.) con propiedades antiinflamatorias. Instituto Politécnico Nacional. UK.
- Gorduza V, Tarabasanu C, Gorduza A, Cernatescu C, Rusu M. (2000). Structure-reactivity relationships of antioxidant flavonoides. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 11 (1): 56-59.
- Haller C. (2005). The kidney and hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 352 (22): 2362.
- Heilpern K. (2008). Pathophysiology of Hypertension. *Annals of Emergency Medicine*. 51 (3): S5-S6.

- Hernández R. (1998). Metodología de la Investigación. México. Mc Graw – Hill Interamericana.
- Hodge G, Ye V, Duggan K. (2009). Salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthase inhibition is associated with loss of regulation of angiotensin II in the rat. *Exp. Physiol.* 87 (1): 2322 – 2329.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). (2010). Informe Técnico N° 1. Salud Familiar. ENDES 2010 – I Semestre.
- Jaimes G, De Castro, Ancizar F, Riveros T, Torrenegra R, Téllez A. (2006). Principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 16(2): 140-145.
- Katzung B. (2001). Farmacología básica y clínica. México. Editorial El Manual Moderno.
- Khambay B, Batty D, Cahill M, Denholm I. (1999). Isolation, Characterization, and Biological Activity of Naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 47: 770 – 775.
- Kuklinski C. (2003). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Primera Edición. Barcelona – España. Editorial Omega S.A.
- Kuskoski E, Asuero A, García C, Troncoso A, Fett R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24 (4): 691-693.
- Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B. (2007). Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 110: 458-463.
- Lapa A, Monteiro de Lima T. (1991). Métodos farmacológicos para a validação de plantas medicinais. Sao Paulo – Brasil. Programa Iberoamericano de Ciencia e Tecnología para o Desenvolvimento.
- Lastra Y, Yáñez B. (2004). Efecto Gastroprotector de *Gamochaeta americana* (Mill) Wedell (*K'eto K'eto*) y *Calceolaria myriophylla* Kraenz (*Ayaq Zapatilla*) sobre Lesiones Gástricas Inducidas por Indometacina en Ratas. Cusco. Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias

Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

- León M, Tillan J, Hernández A, Cárdenas J, Calzada S. (1996). Efecto diurético y toxicidad aguda del *Orthosiphon aristatus* Blume (té de riñón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Libby P, Bonow R, Mann D, Zipes D. (2007). *Braunwald's heart disease : A textbook of cardiovascular medicine*. Eighth Edition. Philadelphia. Elsevier.
- Llópiz S, Ávila Y, Kindelán O. (2002). Control de la hipertensión arterial con fitoterapia–uricoloterapia en pacientes del consultorio médico Paraíso 1 durante julio–diciembre del 2001. *Medisan*. 6 (3): 8-13.
- Lock de Ugaz O. (1988). *Investigación Fitoquímica – Métodos en el estudio de Productos Naturales*. Lima-Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López T. (2002). Plantas medicinales para el tratamiento de la hipercolesterolemia. *Fitoterapia*. 21 (6): 138-144.
- Luna G. (1960). *Manual del Herbolario. Remedios Caseros*. Tomo I. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú.
- Maicas C, Lázaro E, Alcalá J, Hernández P, Rodríguez L. (2003). Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio*. (3): 141-160.
- Maghrani M, Zeggwagh A, Haloui M, Eddouks M. (2005). Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 31-35.
- Marovac J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista médica chilena*. 129 (1): 99 – 106.
- Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. XVII (6): 271-278.
- MINSA. (2005). *Guía de Hipertensión Arterial*. Ministerio de Salud del Perú. [www.minsa.gob.pe/portal/03Estrategias-Nacionales/06ESN-NoTransmisibles/Archivos/ Guía de HTA2005.pdf](http://www.minsa.gob.pe/portal/03Estrategias-Nacionales/06ESN-NoTransmisibles/Archivos/Guía%20de%20HTA2005.pdf). 19 de Julio 2007.
- Miranda M, Huacuja L, Lorena A, Panduro A. (2005). Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. *Investigación en salud*. VII: 64-70.

- Molina R, Martí J. (2003). Traducción del Jonit National Committee - 7º Informe. Grupos de HTA de semFYC y SAMFyC. España.
- Muñiz M. (1992). Etnobotánica de la Flora Medicinal de la Provincia de Paruro. Tesis para Optar al Título Profesional de Biólogo. Cusco – Perú. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 1992.
- Obst M, Gross V, Janke J, Wellner M, Scheneider W, Luft F. (2003). Pressure natriuresis in AT2 Receptor–Deficient mice with L-NAME hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14: 303 -310.
- Olazábal C, Mantillas J. (2001). Las Plantas Medicinales de Nuestra Tierra. Primera Edición. Cusco – Perú. Instituto de Ecología y Plantas Medicinales – IEPLAM.
- Oré R, Valdivieso R, Suárez S, Huerta D, Nuñez M, Durand J. (2007). Marcadores de estrés oxidativo en hipertensión arterial leve. *An Fac Med*. 68 (4): 351-355.
- Ouviaña S, Palmer L, Sasseti B. (2004). Endotelina-1, Óxido nítrico y Factor Von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 38 (4): 471-476.
- Pérez G. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 22 (1): 48-57.
- Phillips O, Mathewb C, Oriowo M. (2006). Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 104: 351–355.
- Qin Y, Wu X, Huang W, Gong G, Li D, He Y, Zhao Y. (2009). Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 126: 543–50.
- Quiroga M. (2010). Hipertensión arterial - Aspectos genéticos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(4): 231-5.
- Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O. (2006). Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica*. Cali – Colombia. 37 (1): 53 – 60.
- Ramírez J, Palacios, M, Tamayo O, Jaramillo R, Gutierrez. (2007). Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 348–53.

- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*. 23 (4): 519-534.
- Ríos C. (2002). Evaluación de las Plantas de Interés Etnomedicinal en la Comunidad de Choccopía del Distrito de Colquepata – Paucartambo. Seminario Curricular. Cusco – Perú. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.
- Risler N, Miatello R, Cruzado M. (2002). La pared vascular en la hipertensión arterial. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*. 31: 315 – 320.
- Rivas J, Gutiérrez C, Rivas J. (2007). Tratamiento y costos farmacológicos de la hipertensión arterial no complicada. *Rev Soc Peru Med Interna*. 20 (4): 139-144.
- Rodríguez I, Wangenstein R, Atucha N, O'Valle F, Del Moral R, García J, et al. (2003). Effects of Omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L- NAME plus DOCA-treated rats. 16: 33-38.
- Rodríguez G, Pérez J, Mc Cook L, Perdomo M, Matos O. (2001) Actividad hepatoprotectora de las tinturas de 2 especies vegetales del género hypericum. *Rev Cubana Med Milit*. 30 (4): 241-244.
- Roesrch C. (1994). Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo 2. Cusco-Perú. Koeltz Scientific Books. Centro de Medicina Andina (CEMA).
- Rojas j, Ronceros S, Palomino R, Tomás G, Chenguayen J. (2006). Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Pasiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *An Fac Med*. 67 (3): 206-213.
- Romayne L, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers J. (2008). Hypertension in Obesity. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 37: 647–662.
- Rondón S, Cluet de Rodríguez I, Rossell M, Alvarez T. (2002). Niveles séricos de óxido nítrico en adolescentes con antecedentes hereditarios de hipertensión arterial sistémica. *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*. 65(4): 159-164.
- Salinas I, León B. (2006). Calceolariaceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* Número especial. 13 (2): 220s - 236s.
- Sandoval M, Ayala S, Oré R, Loli A, Huamán O, Valdivieso R, et al. (2006). Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. *An Fac Med*. 67 (3): 199-205.

- Sharapin N.(2000). Fundamento de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Primera Edición. Santa Fe de Bogotá. Publicación del programa de Andrés Bello – Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Sharifi A, Akbarloo N, Darabi R. (2005). Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME induced hypertension. *Pharmacological Research*. 52: 438 – 444.
- Silva M, Santos M, Caroc A, Rocha R, Justino A, Mira L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research*. 36 (11): 1219–1227.
- Somova L, Nadar A, Rammanan P, Shode F. (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*. 10 (2): 115-121.
- Sosa J. (2010). Tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(4):241-4.
- Sowers j. (2002). Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative Stress. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (25): 1999-2001.
- Tajer C, Doval H. (2003). Hipertensión arterial en debate. ¿Todos somos/seremos hipertensos?, ¿Las tiazidas son el primer tratamiento para la hipertensión arterial?. *Revista argentina de cardiología*. 71 (3): 161-163.
- Taler S. (2008). Secondary Causes of Hypertension. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 35: 489-500.
- Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pöğün S. (1997). Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. *Neuroreport*. 8: 881-884.
- Tedesco D, Tava A, Galletti S, Tameni M, Varisco G, Costa A, et al. (2004). Effects of Silymarin, a Natural Hepatoprotector, in Periparturient Dairy Cows. *American Dairy Science Association*. 87: 2239-2247.
- Tomás F, Grayer R, Gil M, Harborne J. (1988). Distribution of 6-Hydroxy, 6-Methoxy and 8-Hydroxyflavone Glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and Related Families. *Phytochemistry*. 27 (8): 2631 -2645.
- Tomas G, Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J, Huamán J, Guerrero M, et al. (2004). Influencia de *Calceolaria tripartita* (sachaberros) sobre la Función

Hepática en Ratas. Revista de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Torok J. (2008). Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. *Physiol. Res.* 57: 813-825.
- Touyz R. (2007). Vascular Remodeling, Retinal Arteries, and Hypertension. *Journal of the American heart. Hypertension.* 50: 603-604.
- Trearce F, Evans W, Cabo J. (1991). *Farmacognosia. Decimotercera Edición.* México. Mc Graw – Hill Interamericana.
- Valdizan H, Maldonado A. (1992). *La Medicina Popular Peruana. Lima-Perú.* Imprenta Torres Aguirre. Tomo II.
- Valencia C. (1995). *Fundamentos de fitoquímica. Primera Edición.* México. Editorial Trillas.
- Vega T, Lozano J, Álamo R, Lleras S. (2008). Prevalencia de la hipertensión arterial en la población de Castilla y León. *Gaceta Sanitaria.* 22 (04): 330-336.
- Vidalón A. (2010). Clínica de la hipertensión arterial, para el médico general. *Anales de la Facultad de Medicina,* 71(4): 237-9.
- Villar A, Abad M. (2004). Hojas de alcachofa: Indicaciones terapéuticas. *Farmacia Profesional.* 18 (11): 58-61.
- Wagner-Grau P. (2010). Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina,* 71(4): 225-5.
- Zavala D, Quispe A, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. (2006). Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *An Fac Med.* 67(4): 283-289.
- Zhou X, Vaziri N, Wang X, Silva F, Laszik Z. (2002). Nitric Oxide Synthase Expression in Hypertension Induced by Inhibition of Glutathione Synthase. 300 (3): 762-767.