

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evaluación del efecto diurético de *Hibiscussabdariffa*L. como
antagonista de la aldosterona**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. en C. JAVIER ALARCÓN ALONSO

Directores de tesis:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer

Asesor de tesis:

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

México, D.F.

Enero del 2012

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

Investigador Asociado "D", Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESOR

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ

Investigador Titular, Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

Miembros del jurado

Los miembros del jurado designado por la comisión del doctorado en Ciencias biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "**Evaluación del efecto diurético de *Hibiscussabdariffa*Linn. como antagonista de la aldosterona**", que presentó el M en C. Alarcón Alonso Javier el día 31 de enero del 2012.

Presidente

Dr. Rubén Román Ramos _____
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretario

Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer _____
Instituto Mexicano del Seguro Social



Vocal 1

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez _____
Instituto Mexicano del Seguro Social



Vocal 2

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar _____
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal 3

Dr. José Federico Rivas Vilchis _____
Universidad Autónoma Metropolitana.



El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93..

El alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, **Javier Alarcón Alonso**, recibió beca del CONACYT de septiembre del 2007 a septiembre del 2010, con Número de registro **92241**

La presente investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT- CB-2007-01 82635) y Fondo para el Fomento a la investigación del IMSS con el número FIS/IMSS/PROT/611.

El presente trabajo se llevó a cabo en:



Laboratorio de Fitofarmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.

1.	Resumen.....	1
2.	Abstract.....	3
3.	Introducción.....	5
4.	Antecedentes.....	10
4.1.	La hipertensión arterial sistémica HAS.....	10
4.2.	Diagnóstico clínico de HAS.....	11
4.3.	Tratamiento de la HAS.....	11
4.3.1.	Los diuréticos como agentes antihipertensivos... ..	12
4.3.2.	Clasificación de los diuréticos por su mecanismo de acción.....	13
4.4.	Aldosterona.....	15
4.4.1.	Biosíntesis de aldosterona.....	16
4.4.2.	Regulación de la biosíntesis de aldosterona	18
4.4.2.1.	Sistema Renina-Angiotensina.....	19
4.4.2.2.	Iones potasio K ⁺	21
4.4.2.3.	ACTH.....	22
4.4.2.4.	Factores derivados de tejido adiposo.....	23
4.4.3.	Mecanismo de acción de aldosterona.....	24
4.5.	Estrategias para el tratamiento de la HAS.....	26
4.5.1.	Fisiología de la señalización por aldosterona y sobre activación de RAAS.....	29
4.6.	<i>Hibiscussabdariffa</i>	32
4.6.1.	Antecedentes botánicos.....	32
4.6.2.	Antecedentes etnomédicos.....	33
4.6.3.	Antecedentes farmacológicos.....	34

4.6.4. Antecedentes químicos.....	36
5. Planteamiento del problema.....	39
6. Preguntas de investigación.....	40
7. Hipótesis.....	41
8. Objetivos.....	41
9. Metodología.....	43
9.1. Identificación de la planta.....	43
9.2. Obtención del extracto acuoso.....	43
9.3. Fraccionamiento del extracto acuoso de <i>Hibiscussabdariffa</i>	44
9.4. Determinación de la concentración de antocianinas.....	44
9.5. Determinación de la concentración de flavonoides.....	45
9.6. Modelos de actividad diurética en ratas adrenalectomizadas.	45
9.7. Modelo de diuresis en riñón <i>in situ</i>	47
9.8. Modelo de expresión de la ENaC en ratas adrenalectomizadas por RT-PCR.....	49
9.8.1. Estandarización de está técnica.....	49
9.8.2. Extracción del acido ribonucleico mensajero...	50
9.8.3. Conversión del ARN o acido desoxirribonucleico complementario ADNc.....	51
9.8.4. Amplificación de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	52
9.8.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	53
9.8.6. Diseño de oligos específicos.....	53
9.9. Análisis estadísticos.....	54
10. Resultados.....	55

10.1.	Composición de los extractos de <i>Hibiscussabdariffa</i>	55
10.2.	Efecto diurético del extracto de <i>Hibiscussabdariffa</i> como antagonista de AZD en rata ADX.....	57
10.3.	Fracciones de <i>Hibiscussabdariffa</i> como diurético antagonista de ALDO en rata adrenalectomizada.....	60
10.4.	Efecto de fracciones de <i>Hibiscussabdariffa</i> en filtración renal en riñón <i>in situ</i> de ratas ADX.....	61
10.5.	Efecto del tratamiento con espiranolactona sobre la expresión de α ENaC.....	63
10.6.	Efecto de fracción de <i>Hibiscussabdariffa</i> en la expresión de α ENaC	64
11.	Discusión.....	67
12.	Conclusiones.....	75
13.	Perspectivas.....	77
14.	Referencias.....	78

Figura 1. Cromatogramas de los extractos de AqHs, la línea roja extracto HsAq, línea verde extracto HsMeCN5:5MeOH, línea azul extracto HsMeCN9:1MeOH y línea púrpura extracto HsMeCN. En el panel a) se muestra la detección a 520 nm, delphinidin-3-sambubiosido, cyanidin-3-sambubiosido. En el panel b) se muestra la detección a 350 nm, ácido clorogénico, rutina quercetina _____ 56

Figura 2. Efecto diurético producido por la administración oral del extracto acuoso de AqHs y las fracciones en ratas (ADX). Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de seis experimentos. * = $p < 0.05$ en prueba de ANOVA y se comparó con las condiciones basales. †. _____ 61

Figura 3. Filtración renal en el modelo de riñón in situ. Las ratas fueron tratadas con las condiciones indicadas en el eje "x". Todos los riñones fueron perfundidos con solución Ringer-Krebs. El número de animales por grupo fue $n = 6$, ANOVA *post hoc* Tukey. _____ 62

Figura 4. Efecto del tiempo de tratamiento diario con espironolactona (9 mg/kg v.o.) sobre la expresión de la subunidad α ENaC. Se reporta el índice de expresión de la expresión del transportador sobre la expresión de un gen constitutivo (β -actina). (*) ANOVA $p < 0.05$ y *post hoc* Tukey. _____ 63

Figura 5. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% revelado con bromuro de etidio y leído en UV, RT-PCR de riñones de ratas tratadas diariamente con espironolactona 9 mg/kg v.o. En el margen superior se indica el número de días de tratamiento. El segmento amplificado resultó de 600 bp, lo cual correspondió al segmento que se propuso amplificar. El segmento que expresa actina tuvo alrededor de 450 bp. _____ 64

Figura 6. Fotografía del gel de agarosa revelado con bromuro de etidio. Expresión de α ENaC, los carriles corresponden a: 1) Vehículo, 2) Espironolactona 9 mg/kg v.o.), 3) Extracto HsAq 1000 mg/kg v.o., 4) Fracción HsMeCN 1000 mg/kg v.o. 5) Fracción HsMeCN9:1MeOH 1000 mg/kg v.o., 6) Fracción HsMeCN5:5MeOH 1000 mg/kg v.o. El segmento amplificado de la subunidad ENaC α tuvo una longitud de 600 pb. _____ 65

Figura 7. Expresión de ENaC α respecto al tratamiento con extracto completo y fracciones de *Hibiscussabdariffa* (1000 mg/kg v.o.). Se representa el índice de expresión de ENaC α respecto a la expresión de β -actina. (*) ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey. $n = 5$. _____ 66

Abreviaturas

α ENaC	Subunidad alfa de canales epiteliales de sodio
ACTH	Hormona adrenocorticotropina
ADX	Rata adrenalectomizada
AGII	Angiotensina II
Aldo	Aldosterona
ARN	Acido ribonucleico
ATF	Factor activante de la transcripción
ATPasa	Enzima adenosina trifosfato
bp	Pares de bases
°C	Grados centígrados
Ca ⁺⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
CCD	Condiciones colectivas distales
Cl	Cloro
Cm	Centímetros
CYP450	Hemoproteína citocromo p 450
DAG	Diacil glicerol
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
ENaC	Canales epiteliales de sodio
FR	Filtración glomerular
Fw	Forward (adelante)
HsAq	Extracto acuoso de <i>H.sabdariffa</i>
g	Gramos
GC	Gasto cardiaco
HAS	Hipertensión arterial sistémica
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (inglés)
HsMeCN	Extracto acuoso con acetonitrilo
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Ip	Intraperitoneal
K ⁺	Potasio
kg	Kilogramo
KRB	Buffer Ringer Krebs
L	Litro
MeOH	Metanol
μ l	Microlitros
mg	Miligramos
mmHg	Milímetros de mercurio
MR	Receptor mineralocorticoide
Na ⁺	Sodio
Nadd4.2	Ubiquitinaligasa
NO	Oxido nítrico

NOS	Oxido nítrico sintetasa
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	Proteínas inducidas por aldosterona
PKC	Proteína cinasa C
RAS	Sistema renina angiotensina
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa
RVP	Resistencia vaso periférica
rAT	Receptor a angiotensina
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Segundos
Sgk	Sérica regulado por glucocorticoide
Spr	Espiranolactona
SSI	Solución salina isotónica
STAR	Proteína reguladora esteroideogénica aguada
TCD	Túbulo contorneado distal
TCP	Túbulo contorneado proximal
VO	Vía oral
Zg	Zona glomerulosa

1. RESUMEN.

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un problema de salud pública en México por su alta prevalencia. Por otro lado, la HAS es factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades con altos índices de mortalidad como: cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. Por lo que todas éstas representan una carga para los pacientes, así como para las instituciones que prestan servicios de salud.

Los tratamientos de la HAS están dirigidos a modificar ya sea el gasto cardiaco (GC) o la resistencia vascular periférica (RVP) para disminuir la tensión arterial (TA). Así que se propone evaluar la actividad diurética de un extracto estandarizado de *Hibiscus sabdariffa* como antagonista de aldosterona.

Para ello se realizaron evaluaciones de actividad farmacológica: a) diuresis “*in vivo*” en un modelo de rata adrenalectomizada con DOCA-Sal, b) riñón “*in situ*” de ratas adrenalectomizadas y c) modulación de la expresión genética del transportador de la subunidad α ENaC.

Se estableció la estandarización del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* (HsAq) con la siguiente concentración de compuestos fue: 32.4 mg/gExto de 3-O-sambubiósido de delphinidina, 19.9 mg/gExto de 3-O-sambubiósido de cianidina, y en el extracto de acetonitrilo:metanol fueron 30.5 mg/gExto y 20.3 mg/gExto. Los ácidos clorogénicos presentaron 11.5 mg/gExto en el HsAq y 16.9 mg/gExto en el de acetonitrilo:metanol. También se

determinó la concentración de quercetina que presentó 2.71 mg/gExto y 19.69 mg/gExto en los extractos acuoso y de acetonitrilo:metanol, respectivamente. El efecto diurético fue mayor en el extracto íntegro comparado con sus correspondientes fracciones. De manera similar en el modelo de riñón *in situse* presentó un comportamiento parecido a lo observado en la diuresis en rata adrenalectomizada, salvo que se observó un efecto igual entre el extracto acuoso y el acetonitrilo:metanol.

También se caracterizó el efecto del tiempo de tratamiento con espironolactona sobre la disminución de la expresión de la subunidad α ENaC, la cual es fundamental para la reabsorción de sal y agua de las células del epitelio tubular de la nefrona. Con ello se pudo determinar que HsAq presenta un efecto similar en cuanto a la disminución de la expresión de α ENaC para el mismo tiempo de tratamiento. Además, se observó que los extractos de acetonitrilo y acetonitrilo:metanol 5:5 tuvieron una magnitud de efecto similar aunque ligeramente menor a lo mostrado por el extracto acuoso.

Se puede concluir que el efecto diurético de *Hibiscus sabdariffa* se debe en parte a una acción antagónica sobre la aldosterona, debido probablemente a la presencia de compuestos activos del tipo de la quercetina (flavonoide), derivados de ácido cafeoil quínico y antocinianas.

2. ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a public health problem in Mexico because of its high prevalence. Otherwise, the HAS is a risk factor for the development of diseases with high mortality such as cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases. So all these have a high burden to p

atients, as well as institutions that provide health services.

The treatments of hypertension are aimed to change both the cardiac output (CO) and peripheral vascular resistance (PVR) to decrease blood pressure (BP). So, it intends to evaluate the diuretic activity of a standardized extract of *Hibiscus sabdariffa* as an antagonist of aldosterone.

To study this pharmacological activity the following experiments were performed: a) diuresis *in vivo* in an adrenalectomized rat model with DOCA-salt, b) kidney *in situ* of adrenalectomized rats c) modulation of gene expression subunit transporter α ENaC were done.

In the standard of the aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* (HsAq) the concentration of compounds was: 32.4 mg/g of delphinidin 3-O-sambubioside, 19.9 mg/g, cyanidin of 3-O-sambubioside, and acetonitrile:methanol extract were 30.5 mg/g and 20.3 mg/g. The concentration of follows chlorogenic acids were as follows 11.5 mg/g and 16.9 mg/g in HsAq and acetonititol:methanol extracts. Was also determined the

concentration of 2.71 mg/g quercetin and 19.69 mg/g in aqueous and acetonitrile:methanol extracts, respectively. The diuretic effect was greater in the whole extract compared with the fractions of different polarities. Similarly, in the kidney *in situ* model presented similar behavior to that observed in the adrenalectomized, however an similar effect between the aqueous and acetonitrile:methanol extract was observed.

The effect of the duration of spironolactone treatment on the reduction of the expression of α ENaC subunit, which is essential for the reabsorption of salt and water from tubular epithelial cells of the nephronHsAq, was also performed. It was found that had a similar effect to spironolactone, for decreasing expression of α ENaC for the same treatment time. A similar effect was found with both the acetone extract as acetonitrile:methanol.

It can be concluded that the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* is partially due to the effect of aldosterone antagonism and that the active compounds likely are quercetin (flavonoid) and caffeoylquinic acid like.

3. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un padecimiento crónico degenerativo con una alta incidencia en los países industrializados. En México representa un problema de salud pública en tanto que la tercera parte de la población la padece. Sin embargo, su principal consecuencia deletérea es que la HAS es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de alta morbimortalidad, como infarto cardiaco, accidentes cerebro vasculares e insuficiencia renal.

Los tratamientos institucionalizados para la HAS se dirigen para contrarrestar los dos componentes que determinan la presión arterial, el gasto cardiaco y la resistencia periférica. En el primer caso se utilizan fármacos con actividad diurética que disminuyen el volumen plasmático. Para la resistencia periférica se utilizan relajantes de músculo liso vascular como calcio antagonistas y sustancias que estimulan la liberación de óxido nítrico; por otro lado, se utilizan sustancias que disminuyen la señalización asociada a la angiotensina II (AGII), como son inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) o antagonista de AGII.

Un extracto acuoso estandarizado en el contenido de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* ha demostrado actividad

antihipertensiva en ensayos clínicos (Onyenekwe *et al.*, 1999; Odigie *et al.*, 2003; Herrera-Arellano *et al.*, 2004; Herrera-Arellano *et al.*, 2007; McKay *et al.*, 2010) y se ha propuesto que este efecto se debe a una acción farmacológica múltiple: inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (Jonadet *et al.*, 1990; Ojeda *et al.*, 2010), efecto vasorelajante por antagonismo al calcio (Ali *et al.*, 1991; Adegunloye *et al.*, 1996; Onyenekwe *et al.*, 1999; Ajay *et al.*, 2007) y activación endotelial de la vía del óxido nítrico/cGMP (Ajay *et al.*, 2007). También antagoniza directamente la señalización de AG II (Jimenez-Ferrer *et al.*, 2009).

El efecto diurético de *Hibiscus sabdariffa* ha sido caracterizado farmacológicamente por algunos grupos de investigación, en ensayos clínicos (Kirdpon *et al.*, 1994; Mijiminiyi *et al.*, 2000, Prasongwatana *et al.*, 2008) y en experimentos preclínicos en rata (Aguwa *et al.*, 2004) y la actividad diurética ha sido también reportada como un efecto colateral benéfico en algunos ensayos clínicos (Herrera-Arellano *et al.*, 2004). A pesar de estas evidencias, el efecto diurético de *Hibiscus sabdariffa* aún es controversial. Algunos autores han reportado un incremento en la diuresis (Cáceres *et al.*, 1987; Mojiminiyi *et al.*, 2000; Aguawa *et al.*, 2004), mientras que otros grupos de investigación no han observado un incremento en el volumen urinario (Odigie *et al.*, 2003; Prasongwatana *et al.*, 2008). La controversia se extiende a la excreción urinaria de sodio; ya que algunos grupos de

investigación observan un incremento en este parámetro (Caceres *et al.*, 1987; Herrera-Arellano *et al.*, 2004). Otros investigadores no observan ninguna modificación en la natriuresis (Prasongwatana *et al.*, 2008). Aunque, también otros grupos de investigación reportaron un disminución en la eliminación urinaria de sodio (Aguwa *et al.*, 2004; Kirdpon *et al.*, 1994 y Mojiminiyi, 2004) e hiponatremia. Respecto a la eliminación urinaria de potasio, este también es un tema sujeto a controversia; algunos autores observan que hay un ligero incremento (Aguwa *et al.*, 2004), otros no observaron cambio en la excreción urinaria de potasio (Prasongwatana *et al.*, 2008) mientras que otros demostraron una disminución en este parámetro (Kirdonpon *et al.*, 1994).

Por lo anterior este trabajo pretende contribuir a determinar las características del efecto diurético de *Hibiscus sabdariffa*. Este trabajo se centra en abordar la actividad diurética del extracto de *Hibiscus sabdariffa* como antagonista de aldosterona; con ello se busca demostrar que puede modificar el gasto cardiaco y de manera paralela la resistencia vascular periférica. Para ello se utilizaron modelos farmacológicos como: diuresis en ratas adrenalectomizadas, filtración renal en riñón "*in situ*" y expresión genética de la subunidad α ENaC.

La estrategia experimental fue concebida alrededor de la consideración de que la adrenalectomía elimina a la aldosterona

presente en la condición homeostática. Después de ello se trató de restablecer el efecto de aldosterona por la administración del acetato de desoxicorticosterona (DOCA). Si bien éste es un procedimiento ampliamente utilizado para establecer un modelo de hipertensión arterial, en este trabajo se utilizó para caracterizar el efecto farmacológico de antagonismo a la DOCA, y con ello el antagonismo a la aldosterona, del extracto y las fracciones de *Hibiscus sabdariffa*.

Para la identificación de los compuestos activos o el grupo de ellos, se realizó una extracción exhaustiva en condiciones de alta polaridad. Se realizó una extracción acuosa a temperatura elevada y se denominó extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* (HsAq). Posterior a ello, se fraccionó en orden ascendente de polaridad. Inicialmente se extrajo el HsAq con acetonitrilo obteniendo el extracto HsMeCN, posteriormente se elevó la polaridad extrayendo con una mezcla de acetonitrilo y metanol en una proporción de 9:1 y se definió como extracto HsMeCN9:1MeOH; finalmente se incrementó la polaridad con un sistema 5:5 de acetonitrilo y metanol y se obtuvo el extracto HsMeCN5:5MeOH.

Para la evaluación farmacológica del antagonismo a aldosterona de los compuestos activos de *Hibiscus sabdariffa* se determinó la diuresis *in vivo*, la filtración renal *in situ* y la expresión genética de la subunidad α ENaC.

Este trabajo se inscribe en el desarrollo de nuevos fármacos utilizando extractos estandarizados de plantas. En el cual el Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS) tiene un rol de vanguardia en Latinoamérica; siendo la HAS un problema de salud pública en México, como ya se mencionó, se considera de gran importancia el desarrollo de un fitomedicamento antihipertensivo con base en el extracto estandarizado de *Hibiscus sabdariffa*. El paradigma que sustenta dicho desarrollo del fitomedicamento es el diseño de un recurso terapéutico que contiene una mezcla de compuestos activos, los cuales pueden contrarrestar un cuadro fisiopatológico complejo como el que representa la HAS. Aunado a la interacción farmacológica que potencialmente se puede establecer entre los activos de un extracto, de tal forma que el efecto farmacológico resulte de la sinergia que se establezca entre los componentes.

4. ANTECEDENTES

4.1. La Hipertensión arterial sistémica (HAS)

La HAS es una enfermedad asintomática, fácil de detectar y presenta complicaciones fatales si no recibe tratamiento; es uno de los problemas de salud pública más frecuentes de los países desarrollados (Atkins, 2005). Se caracteriza por incrementos sostenidos en la presión arterial sistólica (PAS) >140 mmHg y en la presión arterial diastólica (PAD) >90 mmHg (**tabla 1**) (Chobanian, 2003).

Tabla 1. Niveles de presión e hipertensión arterial. Clasificación de la gravedad de la HAS dependiendo de los valores de presión arterial.

Tabla de clasificación de la presión arterial		
Categoría	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Normal	Inferior a 120	Inferior a 80
Prehipertensión	120-139	80-89
Hipertensión		
Grado I	140-159	90-99
Grado II	160 o más	100 o más

La HAS es ocasionada por aumento del gasto cardiaco (GC) o por incremento de la resistencia vascular periférica (RVP). Esta última resulta de un estrechamiento de arterias de pequeño calibre, denominadas arteriolas, que regulan el flujo sanguíneo en el organismo. A medida que estas arteriolas se estrechan (o contraen), el corazón tiene que esforzarse más por bombear la sangre a través de un espacio más reducido y la presión dentro de los vasos sanguíneos aumenta (Patel y Mitsnefes, 2005).

4.2. Diagnóstico clínico de HAS

La HAS es asintomática hasta etapas avanzadas cuando ya hay complicaciones en órganos (corazón, cerebro, riñones, etcétera.), sin embargo, pueden presentarse algunos síntomas y complicaciones como: cefalea, acufenos (zumbido de oídos), fosfenos (ver manchas oscuras), enrojecimiento facial, insuficiencia cardíaca, hemorragia cerebral, insuficiencia renal, problemas en la retina que pueden disminuir considerablemente la agudeza visual, condicionando ceguera en etapas avanzadas(Picketing, 1998), fatiga, epistaxis(sangrado nasal), mareo y nerviosismo. Un paciente hipertenso sin tratamiento está en gran riesgo de presentar insuficiencia cardíaca incapacitante o fatal.

4.3. Tratamiento de la HAS.

La HAS es un cuadro fisiopatológico múltiple, cuyo tratamiento de elección es la terapéutica farmacológica con medicamentos sintéticos, que si bien ejercen su efecto benéfico al disminuir la presión arterial, también es cierto que provocan efectos colaterales.

El tratamiento debe ser individualizado y puede modificarse con el tiempo de acuerdo con la respuesta del paciente. Uno de los inconvenientes en el tratamiento farmacológico de la HAS, como

en muchos otros padecimientos, es que no existe un antihipertensivo ideal, de tal forma que cualquier tratamiento se debe adaptar a las condiciones particulares de cada paciente (Gerber y Nies, 1992). Existen seis categorías de fármacos antihipertensivos, clasificados de acuerdo con su sitio de acción, que son: alfa y beta bloqueadores, calcio antagonistas, antagonistas de AGII, inhibidores de la ECA (IECA) y diuréticos. Los diuréticos se pueden clasificar de acuerdo con su sitio acción y mecanismo, como: inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos de asa y ahorradores de K⁺.

4.3.1. Los diuréticos como agentes antihipertensivos

Los diuréticos han sido utilizados de manera eficaz para el tratamiento de millones de pacientes hipertensos en los últimos cuarenta años (Shah *et al.*, 2004). Estos reducen tanto la PAS como la PAD en la gran mayoría de los pacientes hipertensos. Por ello se les puede considerar como los fármacos antihipertensivos de mayor efectividad (Bimbaum *et al.*, 1993; Gou *et al.*, 2000; Shah *et al.* 2004; Birnbaum 1993; Guo 2000). Los diuréticos pueden ser administrados solos o en combinación con otros agentes como base de la terapéutica del paciente hipertenso (Materson *et al.* 1995). Los tiazídicos son los diuréticos de primera elección, generalmente en combinación con otros fármacos antihipertensivos (Frishman *et al.* 1994). Los diuréticos de asa son

utilizados generalmente en pacientes con insuficiencia renal, pacientes con hipertensión resistente o con insuficiencia cardíaca. Los diuréticos son prescritos en pacientes con HAS, en primer lugar por su eficacia, bajo costo y bajos efectos adversos; en segundo término por su efecto sinérgico con otros agentes antihipertensivos; en tercer lugar el efecto farmacológico puede contrarrestar la retención de sal y de agua causada por otros agentes antihipertensivos y finalmente los diuréticos son muy útiles en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca.

4.3.2. Clasificación de los diuréticos por mecanismo de acción

Los diuréticos se dividen en cuatro grupos principales de acuerdo a su sitio primario de acción dentro de los túbulos renales, iniciando en la porción proximal y desplazándose a los túbulos colectores (Shah *et al.*, 2004). Los diuréticos que actúan sobre el túbulo contorneado proximal (TCP) son del tipo de inhibidores de la anhidrasa carbónica, los cuales presentan una eficacia limitada antihipertensiva; los diuréticos de asa; tiazidas y compuestos relacionados con la sulfonamida y los diuréticos ahorradores de potasio. La característica común de todos los diuréticos es su acción natriurética, la cual permite la disminución del sodio corporal. Los diuréticos más potentes (furosemida, bumetanida y ácido etacrínico) disminuyen la reabsorción de sodio en el segmento ascendente del asa de Henle al bloquear el

contransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$, localizado en la membrana apical de las células epiteliales de los túbulos renales. Estos diuréticos actúan en el sitio donde normalmente es reabsorbido una gran cantidad de sodio. Entonces, la excreción de sodio urinario es paralelo a la eliminación de fluido urinario. Las tiazidas, metolazona e indapamida, inhiben la reabsorción de sodio en la primera porción de los túbulos contorneados distales (TCD). Estos fármacos diuréticos inhiben al sistema de contransportadores apicales Na^+Cl^- . Una pequeña fracción del sodio filtrado es normalmente reabsorbido en este sitio, lo cual explica la limitada actividad natriurética de esta clase de diuréticos. Los diuréticos ahorradores de potasio (amilorida) actúan en las células epiteliales de la parte final de los TCD y los conductos colectores distales (CCD), los cuales presentan canales de Na^+ en la membrana luminal de estas células. Este tipo de medicamento provoca un bloqueo de los canales de sodio por lo cual el gradiente de sodio en la luz del túbulo aumenta, provocando así el efecto diurético (Shah *et al.*, 2004).

Los CCD juegan un papel muy importante en la absorción de Na^+ ; el control de la reabsorción de este electrolito en los CCD involucra la entrada coordinada a través de la membrana apical por canales específicos de Na^+ y la salida del ión a través de la membrana basolateral por una $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ (Rossier *et al.*, 1992). Los diuréticos ahorradores de potasio antagonistas de la

aldosterona (espironolactona), ejercen su efecto en las células epiteliales de la parte final de los TCD y de los CCD, las cuales tienen receptores de aldosterona en la membrana basolateral. Esta hormona favorece la reabsorción de Na^+ por la formación de proteínas inducidas por la aldosterona (PIA), que provocan aumento de la conductancia neta de Na^+ . La espironolactona antagoniza el efecto de la aldosterona, por lo cual se inhibe la formación de PIA y disminuye la reabsorción de Na^+ , incrementando su concentración en la luz del túbulo e induciendo el efecto diurético.

4.4. Aldosterona

En el año 2004 se cumplieron 50 años desde que Sylvia y James Tait, en colaboración con Tadeusz Reichstein, aislaron y caracterizaron la aldosterona, una hormona esteroidea (Tait *et al.* 2004). Desde entonces se pudo establecer que la hormona es sintetizada en las glándulas adrenales y se une a un receptor específico a mineralocorticoide (MR) localizado en el citosol de las células blanco. Este complejo receptor/hormona-esteroidea entonces se transloca al núcleo de la célula en donde modula la expresión genética de proteínas específicas inducidas por aldosterona. Que regulan el equilibrio hidroelectrolítico y la consecuente homeostasis de la presión arterial. También se ha descrito que la aldosterona tiene un marcado efecto en una amplia gama de tejidos no epiteliales como, el corazón.

4.4.1. Biosíntesis de aldosterona

La aldosterona es sintetizada a partir de colesterol en la zona glomerulosa (ZG) de la corteza adrenal por una serie de reacciones enzimáticas específicas. En principio, el colesterol puede cruzar la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna, en donde se localiza la primera enzima de la ruta esteroideogénica. Este proceso está mediado por una proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR), la cual forma un núcleo en la membrana. StAR está presente en todos los tejidos esteroideogénicos y juega un papel central en la esteroideogénesis (Stocco, 2001). En pacientes con hiperplasia adrenal congénita, las mutaciones del gen StAR resultan en una incapacidad para sintetizar esteroides y acumular colesterol en las glándulas adrenales (Lin *et al.*, 1995). De manera similar, ratones *knockout* para el gen StAR presentan una deposición elevada de lípidos en la corteza adrenal y niveles extremadamente bajos de esteroides, a pesar de elevados niveles de hormona adrenocorticotropina (ACTH) y hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Caron *et al.*, 1997).

Después de la translocación a la mitocondria, el colesterol es convertido a aldosterona por una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por deshidrogenasas-oxidadas, muchas de las cuales forman parte de la superfamilia de hemoproteínas citocromo P450

(CYP). Estas proteínas requieren de un sistema de coenzimas acopladas (adrenodoxina/adrenodoxina reductasa), el cual transfiere electrones a la enzima P450, actuado como equivalentes reductores para las reacciones de hidroxilación (Lambeth *et al.*, 1982). La primera reacción es la conversión de colesterol a pregnololona, catalizada por la enzima que rompe la cadena lateral P450 (CYP11A1), codificado por el gen CYP11A1 presente en el cromosoma 15 de humano. Esta enzima se consideró que era la etapa limitante de la ruta de síntesis hasta que se descubrió la proteína StAR; esta enzima cataliza tres reacciones: una 20 α -hidroxilación, una 22 α -hidroxilación y una escisión en la unión entre C-20 y C-22 para producir pregnolona y ácido isocaproico (Lieberman y Lin 2001). La pregnolona es liberada en el citosol y es convertida a progesterona por la deshidrogenación del grupo 3 β -hidroxilo e isomerización del doble enlace en C-5 a Δ 4 por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), la cual se localiza en la membrana del retículo endoplásmico liso. Dos isoenzimas de 3 β -HSD han sido identificadas en humanos y algunas más en rata y ratón (Mason 1993; Simard *et al.*, 1993). Las enzimas HSD3B1 y HSD3B2 están codificadas por los genes *HSD17B1* y *HSD17B2*, respectivamente, los cuales se encuentran formando un tandem en el cromosoma 1p13.1 (Berube *et al.*, 1989; Lachance *et al.*, 1991). La progesterona sufre una 21-hidroxilación por la enzima CYP21A localizada en la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático, produciendo 11-desoxicorticosterona (DOC)

(Shinzawa *et al.*, 1988). El gene *CYP21A* que codifica a esta enzima se encuentra en el cromosoma humano 6p21·3 (White *et al.*, 1986). La conversión de DOC a aldosterona involucra tres reacciones consecutivas: 11 β -hidroxilación de DOC para formar corticosterona, 18-hidroxilación para producir 18-hidroxilación (18-OH-B) y finalmente una 18-metiloxidación para formar aldosterona. Estas reacciones son catalizadas por la aldosterona sintetasa, la cual se localiza en la membrana interna de la mitocondria y es codificada por el gen *CYP11B2*, el cual es expresado en la ZG.

La aldosterona sintasa es altamente homóloga (aproximadamente en un 93%) a 11 β -hidroxilasa (el producto del gen *CYP11B1*), que sintetiza la conversión de 11-desoxicortisol al cortisol (glucocorticoide). Ambos genes están localizados en tándem en el cromosoma humano 8q21-22 (Chua *et al.*, 1987; Mornet *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1991).

4.4.2. Regulación de la biosíntesis de aldosterona

Algunos factores han demostrado que estimulan o inhiben la producción de aldosterona, incluyendo adrenalina, polipéptido intestinal vasoactivo, serotonina, ouabanina, péptido auricular natriurético, dopamina, heparina y adrenomedulina. También se ha descrito que algunos factores secretados por el tejido adiposo estimulan la síntesis de aldosterona *in vitro*. Sin embargo, los principales reguladores de la síntesis y secreción de aldosterona

son la AGII y la concentración extracelular de K^+ y la ACTH (Müller 1987; Quinn y Williams 1988).

4.4.2.1. Sistema renina – angiotensina RAS

La biosíntesis de aldosterona es regulada principalmente por RAS. La renina es sintetizada y liberada por la células yuxtaglomerulares en las arteriolas eferentes de los riñones en respuesta a la disminución del volumen intracelular detectada por los barorreceptores (mediados por la activación de α -adrenoreceptores) y por reducción de la concentración de sodio de la mácula densa. La renina cataliza la hidrólisis del angiotensinógeno en angiotensina I (AGI) la cual es convertida a AGII por la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) que se encuentra en los pulmones y en el endotelio vascular. El RAS completo se ha descrito en otros tejidos, incluyendo al cerebro, la vasculatura y la corteza adrenal (Samani, 1994; MacKenzie *et al.*, 2002). La AGII actúa en el músculo liso de la vasculatura para causar vasoconstricción y en la zona ZG adrenal para estimular la producción de aldosterona. La respuesta adrenal a la AGII ocurre en pocos minutos, un periodo de tiempo tal que implica que no se requiere la síntesis de nuevas proteínas. Esta liberación aguda de aldosterona mediada por AGII, puede involucrar la síntesis rápida de compuestos intermediarios en la ruta esteroideogénica o la síntesis *de novo* de colesterol, posiblemente como una consecuencia de la activación de la proteína StAR, provocando el

incremento del transporte de colesterol en la membrana interna de la mitocondria. La estimulación crónica por AGII resulta en una hipertrofia de la ZG e hiperplasia, incrementando la expresión de *CYP11B2* y la subsecuente secreción de aldosterona. Se sabe que la AGII actúa sobre su receptor específico (AT1), el cual está acoplado a una proteína G, causando la activación de la fosfolipasa C para estimular la producción intracelular de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG), el cual activa entonces a la proteína cinasa C (PKC). El IP_3 incrementa la concentración intracelular de calcio libre ($[Ca^{++}]$), causando la activación de proteína cinasas dependientes de Ca^{++} /calmodulina (CaM cinasa) para fosforilar y activar factores de transcripción como el factor de transcripción activante (ATF)-1, ATF-2 y la proteína unidora de los elementos de respuesta a cAMP (CREB) (Spat & Hunyady 2004). También se ha descrito el factor de transcripción NURR-1 como un factor clave para la regulación de la transcripción de *CYP11B2* que responde a AGII; su expresión es sobrerregulada en tumores secretores de aldosterona (Bassett *et al.*, 2004).

4.4.2.2. Iones potasio (K^+)

La concentración extracelular de K^+ es otro de los factores claves y determinantes para la secreción de aldosterona. Lo anterior debido a que la producción de aldosterona es muy sensible a pequeños cambios de la concentración extracelular de K^+ . Los efectos de la concentración extracelular K^+ y de AGII son sinérgicos, así que la concentración de K^+ prevaleciente determina la relación concentración/efecto de la producción de aldosterona mediada por AGII (Spat, 2004). El incremento de la concentración extracelular de K^+ causa despolarización de la membrana celular de la ZG, provocando la apertura de canales Ca^{++} dependiente de voltaje tipo L y T lo que provoca un incremento de la concentración intracelular de Ca^{++} . Esto provoca la activación de calmodulina y cinasas dependientes de CaM, produciendo la fosforilación de factores de transcripción que estimulan al gen *CYP11B2* (Spat y Hunyady 2004). AGII y K^+ entonces regulan la transcripción de *CYP11B2* a través de una vía de señalización en común dependiente de Ca^{++} y de los mismos factores transcripcionales (Clyne *et al.*, 1997).

4.4.2.3. ACTH

El eje hipotálamo/pituitaria adrenal controla primariamente la producción de glucocorticoides. Sin embargo, su péptido efector, ACTH, también puede contribuir a la regulación de la biosíntesis de aldosterona. La ACTH interactúa con sus receptores específicos en la corteza adrenal para estimular la producción de glucocorticoides. También estimula al flujo sanguíneo adrenal y el incremento crónico resulta en la hiperplasia y la hipertrofia de la zona adrenal fasciculada (Quinn y Williams 1988). En la modalidad aguda, la ACTH estimula la producción de aldosterona a través de una vía de señalización mediada por cAMP (Cozza *et al.*, 1990; Cooke 1999). En contraste, el exceso crónico de ACTH suprime los niveles plasmáticos de aldosterona, tanto en modelos humanos y animales (Fuchs-Hammoser *et al.*, 1980; Holland y Carr 1993; Aguilera *et al.*, 1996).

Es probable que el cAMP pueda regular a la baja la expresión de rAT1 en las células adrenocorticales (Yoshida *et al.*, 1991; Bird *et al.*, 1994). Alternativamente, la ACTH puede transformar las células proliferantes de la ZG en células de la zona fasciculada o convertir los precursores de la vía de mineralocorticoides a glucocorticoides (McAllister y Hornsby 1988; Bird *et al.*, 1996; Vinson, 2003). Debido a los efectos opuestos de la ACTH aguda y crónica, no hay duda que esta hormona está involucrada en la regulación fisiológica normal de la producción de aldosterona. Por

ejemplo, la secreción de aldosterona muestra una variación diurna con altos niveles en la mañana y niveles más bajos por la tarde; esto es generado por la ACTH (Richards *et al.*, 1986). Además, se ha demostrado que ratones *knockout* para pro-opiomelanocortina (POMC) tiene una morfología anormal adrenocortical y tiene reducida los niveles de aldosterona, por lo que se piensa que la ACTH es requerida para la secreción normal de aldosterona (Coll *et al.*, 2004).

4.4.2.4. Factores derivados de tejido adiposo

Se ha generado evidencia que indica que factores derivados de lípidos pueden estimular la síntesis de aldosterona (Goodfriend *et al.*, 2002). Una variedad de moléculas de ácidos grasos se han propuesto como candidatos y existe evidencia que sugieren que sus propiedades estimulantes de aldosterona son dependientes de su oxidación hepática (Goodfriend *et al.*, 2002). Por otro lado, experimentos *in vitro* han identificado proteínas de alto peso molecular relacionadas a los adipocitos puede estimular la síntesis de aldosterona por las células adrenocorticales; no se ha podido establecer la relevancia fisiológica de este hecho (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2003). Sin embargo, se sabe que existe un incremento en la producción de aldosterona que es característica de la hipertensión asociada a obesidad (Paula *et al.*, 2004). No obstante, un incremento en la obesidad visceral está también asociada con la hiperinsulinemia; la insulina se sabe que

incrementa la síntesis de aldosterona *in vitro* y provoca el incremento de la reabsorción renal de sodio, posiblemente por la activación de la vía fosfoinositida-3-cinasa (PI3K)/cinsa-1 sérica regulada por glucocorticoides (Sgk1), en sinergia con aldosterona (Pearce 2003; Goodfriend y Calhoun 2004).

4.4.3. Mecanismo de acción de la aldosterona

La aldosterona es la hormona reguladora del transporte de sodio esencial para el control del volumen circulatorio, la presión sanguínea y la composición del líquido extracelular en vertebrados. Dentro de las proteínas inducidas por aldosterona (PIA), los canales epiteliales de sodio (por sus siglas en inglés ENaC) constituyen el mecanismo más importante para el transporte de este electrólito; este mineralocorticoide controla la expresión y distribución de ENaC, los cuales están formados por tres subunidades (α , β y γ). El control de la expresión genética de aldosterona se realiza al incidir en la transcripción de genes blanco. Se han identificado principalmente dos clases de este tipo de genes: los de respuesta temprana y respuesta tardía. Los genes de respuesta temprana parecen ser requeridos para el inicio de la regulación de la absorción de Na^+ , mientras que los de respuesta tardía participan en la consolidación del mecanismo. Los genes tardíos incluyen componentes de la maquinaria del transporte de iones (por ejemplo, subunidades ENaC y subunidades ATPasa Na^+/K^+) y también genes que codifican proteínas reguladoras que

actúan limitando el grado de respuesta de aldosterona (por ejemplo los activadores de la cascada mitogénica activada por una cinasa proteínica, factor de crecimiento epidérmico o receptor del factor de crecimiento epidérmico). El blanco metabólico mejor caracterizado de la señalización temprana de aldosterona, es la cinasa de proteínas dirigida a treonina o serina y la proteína-kinasa-1 inducida por glucocorticoides (SGK1), la cual actúa incrementando α ENaC en la membrana apical, modulada a su vez por la ubiquitina ligasa (Nedd4-2) que controla la distribución y degradación de α ENaC. También se ha observado que existen otros mediadores para la regulación de aldosterona además del SGK1, ya que ratas que no expresan SGK-1 presentan resistencia a la aldosterona, pero su fenotipo no es tan grave como aquellos modelos que no expresan la subunidad α ENaC o ratas silvestres adrenalectomizadas, apoyando la idea de la función renal del ENaC y la acción del mineralocorticoide no depende completamente de SGK1 (Brickley, 2002). Lo anterior debido a que se ha observado que hay una acumulación de SGK1 dependiente de aldosterona en un tratamiento a corto plazo; sin embargo, existe la expresión de ENaC en el túbulo colector que no ocurre en el mismo sitio donde se lleva a cabo el incremento de la concentración de SGK1, indicando que hay otros factores requeridos para dirigir la expresión y la actividad en la superficie apical de la célula que determina la reabsorción de Na^+ . Los inhibidores de la cinasa de fosfatidilinositol-3' (el cual es

responsable de la activación de SGK1) no eliminan totalmente el transporte de Na^+ dependiente de aldosterona. Por lo que, se propone que la aldosterona puede actuar a través de múltiples vías para estimular la reabsorción de Na^+ , una de las cuales depende de SGK1 y fosfatidilinositol-cinasa y otras son independientes (Rama, 2005).

4.5. Estrategias para el tratamiento de la HAS

La presión arterial se mantiene constante mediante la regulación del GC y la RVP, ejercida en tres sitios anatómicos: arteriolas, vénulas poscapilares y corazón. Los riñones son un cuarto sitio de control que contribuye al mantenimiento de la presión arterial, al regular el volumen del líquido intravascular, detectando y regulando la concentración de Na^+ por medio del sistema renina- angiotensina – aldosterona (RAAS) (Vogt *et al.*, 2004). Debido a la capacidad regulatoria de los riñones sobre la HAS y a que el volumen plasmático es uno de los parámetros susceptibles de ser controlados para modificar la evolución de este padecimiento, los diuréticos son considerados actualmente, por la gran mayoría de los consejos de salud de diferentes países (JNC-V, WHO/ISH, Mexicano, Canadiense), como los medicamentos de primera elección para el tratamiento de la HAS.

Se ha observado que la reducción dietética de Na^+ disminuye la PA y además modifica las complicaciones asociadas a HAS

(Cohen y Alderman, 2002). Pero por otro lado, la disminución de la PA debido a la restricción en la ingesta de Na^+ , se asocia con un incremento de otros factores de riesgo como el aumento de la actividad simpática, sobre-activación de RAAS, aumento en los niveles de colesterol, triglicéridos y resistencia a la insulina (Graudal et al 1998). Por lo tanto, los efectos benéficos de la disminución de la PA, por la restricción en la ingesta de Na^+ , deben ser sopesados contra el incremento de estos factores de riesgo cardiovascular (Hollenberg, 1980; Chobanian y Hill, 2000). Además de la sobre activación de RAAS por la restricción de la ingesta de Na^+ , también el bajo nivel de Na^+ *per se* se puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que es considerado como el mecanismo más importante de daño orgánico (Aviv , 2002).

Los diuréticos son los fármacos de primera elección para tratar la hipertensión arterial leve al disminuir los niveles de Na^+ y volumen plasmático. Sin embargo, se ha observado que la administración aguda del diurético de asa furosemida, causa un incremento en los niveles de actividad de renina (van Zwieten, 1994; Noda *et al.*, 1982; Dzau *et al.*, 1981; Anand *et al.*, 1991; He *et al.*, 1995; Barden *et al.*, 1984) angiotensina II (Collier y Robinson, 1974; Passmore *et al.*, 1989) y aldosterona (Cody *et al.*, 1986; Cataliotti *et al.*, 2004), por lo que su uso se limita a casos de hipertensión grave. No sucede así con los diuréticos ahorradores de potasio, en especial los antagonistas de aldosterona, éstos

también son utilizados para tratar los síntomas congestivos del infarto al corazón, en donde los diuréticos de asa no pueden ser utilizados, al provocar la sobreactivación de RAAS, limitando su uso en este tratamiento (Ikram *et al.*, 1980; Francis *et al.*, 1985; Kubo *et al.*, 1987; Bayliss *et al.*, 1987; Francis *et al.*, 1990; van Zwieten, 1994; Dormans *et al.*, 1996; van Kraaij *et al.*, 2003). Bayliss y colaboradores en 1987 sugirieron que la activación de RAAS en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva es el resultado del tratamiento, más que el proceso patológico en sí mismo. También se ha observado que la terapéutica intensiva con diuréticos provoca hiperaldosterismo, con pérdida de potasio (Knight *et al.*, 1979). A su vez, la terapéutica con diuréticos no está asociada con kaliuresis en pacientes adrenalectomizados. Esto sugiere que la respuesta de hiperaldosteronismo a la terapia con diuréticos es la que induce kaliuresis y no en sí los diuréticos (Laragh *et al.*, 1966). Este hallazgo fisiopatológico sugiere que para contrarrestar kaliuresis es preferible la opción terapéutica de bloquear la aldosterona más que la administración suplementaria de potasio (Laragh y Sealey, 2001) o el uso de diuréticos ahorradores de potasio y no bloqueadores de aldosterona.

Por otro lado, los diuréticos que provocan la caída de las concentraciones de potasio y magnesio están asociados con arritmias cardiacas de pronóstico adverso (Lisenberg *et al.*, 1992; Dreifus *et al.*, 1974; Cohen *et al.*, 2003). En pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva, las acciones de la aldosterona

pueden ser tratadas con antagonistas a receptores de aldosterona (Dyckner y Wester, 1987), mientras que el incremento de potasio en la dieta no parece corregir las deficiencias extra e intracelular de este electrólito en los pacientes (Laragh y Sealey, 2001; Down *et al.*, 1972). Los antagonistas de aldosterona fueron más efectivos que la administración dietética de potasio para la corrección de largo plazo de las pérdidas de potasio tisular (Croxson *et al.*, 1972; Davidson y Gillebrand, 1973; Kremer *et al.*, 1977). Los antagonistas de aldosterona también corrigen la deficiencia celular de magnesio (Lim y Jacob, 1972; Dyckner y Wester, 1987).

4.5.1. Fisiopatología de la señalización por aldosterona y sobre-activación de RAAS

Las acciones neurohormonales de la aldosterona influyen en el pronóstico de los pacientes con insuficiencia cardiaca y enfermedad isquémica cardiaca a través de dos efectos sobre la concentración del nivel de electrólitos. En primer lugar, la sobreproducción de aldosterona provoca que se alcancen niveles inapropiados de Na⁺ y retención de agua, lo cual tiene importantes consecuencias adversas hemodinámicas. El volumen extracelular expandido incrementa la precarga, generando un deterioro funcional y provocando regurgitación mitral, con reducción del flujo de desplazamiento, induciendo constricción vascular generalizada, comprometiendo el flujo sanguíneo renal. Esto da lugar a un círculo vicioso, donde el riñón genera la compensación de la función cardiaca dañada por la liberación de AG II, lo que provoca

la liberación de aldosterona y la sobrecarga de volumen. En segundo lugar, la aldosterona incrementa la excreción urinaria de magnesio y potasio dando lugar a un desequilibrio electrolítico, incrementando el riesgo de arritmias cardiacas (Tsuji *et al.*, 1994).

Lo anterior se identifica como la sobre-activación de RAAS por aldosterona, que conduce al remodelamiento cardiaco, disfunción ventricular izquierda, arteriosclerosis y disfunción endotelial (Heitzer *et al.*, 2001; Struthers, 2002). La producción local de aldosterona, al igual que la ECA, se incrementa en humanos con insuficiencia ventricular en proporción a la gravedad de la insuficiencia (Mizuno *et al.*, 2001). Los antagonistas a los receptores de aldosterona suprimen los efectos de ésta, por lo cual también se disminuye la retroalimentación que activa RAAS.

Como ya se ha mencionado, la sobreactivación de RAAS es un factor desencadenante de distintas patologías cardiovasculares. La disminución del remodelamiento cardiaco por el uso de IECA provoca una disminución importante de la morbimortalidad (Brilla, 1989; Pfeffer *et al.*, 1992; Kober *et al.*, 1995; Dargie, 2001). Es importante señalar que el efecto terapéutico del uso de los IECA puede ser parcialmente independiente de la inhibición de la ECA sérica, ya que los niveles de la ECA plasmática pueden estar elevados aún durante el tratamiento con IECA (Van Katset *et al.*, 2000; Jorde *et al.*, 2002). Por otro lado, la reducción de Na⁺

inducida por diuréticos puede incrementar los efectos benéficos de los IECA en el tratamiento renoprotector y antihipertensivo (Navis *et al.*, 1987; Heeg *et al.*, 1989; Gansevoort *et al.*, 1992; Buter *et al.*, 1998). Los mecanismos que subyacen al incremento de la eficacia de los IECA inducida por diuréticos son desconocidos, pero es probable que una interacción farmacocinética pueda jugar un papel importante Westendorp *et al.*, 2005).

La inhibición de RAAS por la terapia con IECA se asocia con la reducción de patologías cardiovasculares en pacientes con infarto al miocardio (Yusuf *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2003), implicando que la sobreactivación de RAAS afecte de manera adversa la integridad vascular. El pretratamiento con eplerenona ha demostrado que atenúa la inflamación vascular inducida con AG II (Rocha *et al.*, 2002) en roedores hipertensos. La espiranolactona fue protectora contra el desarrollo de nefroesclerosis y lesiones cerebro vasculares (Rocha *et al.*, 1998). La disfunción endotelial está presente en las etapas tempranas del desarrollo de la aterosclerosis y es predictiva de los subsecuentes eventos coronarios (Heitzer *et al.*, 2001). Algunos estudios clínicos han demostrado que la aldosterona es proaterogénica y promueve la disfunción endotelial en estadios de enfermedad cardiovascular (Keidar *et al.*, 2004). En un estudio clínico controlado con placebo de pacientes con insuficiencia cardíaca que recibieron terapia de espiranolactona e IECA se incrementó significativamente el flujo sanguíneo como respuesta a acetil colina (Ach), aproximadamente

al doble ($p < 0.001$) (Farquharson y Struthers, 2000). Este aumento está asociado con la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Previamente se había demostrado la inhibición de óxido nítrico sintetasa (NOS) por aldosterona en cultivo de tejidos (Ikeda *et al.*, 1995), lo que indica que el bloqueo de aldosterona provoca vasodilatación porque no hay supresión de los niveles de NO.

La aldosterona también está involucrada en la modificación del funcionamiento vascular a partir del efecto que ésta tiene sobre la función endotelial, incrementado la generación de ROS (Rajagopalan *et al.*, 2002), de tal forma que el antagonismo a la aldosterona puede favorecer la función endotelial al reducir la cantidad de oxidantes.

4.6. *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)

4.6.1. Antecedentes botánicos

La familia *Malvaceae* está representada por 80 géneros y 1000 especies; al género de *Hibiscus* pertenecen 11 especies en donde se encuentra *Hibiscus sabdariffa*. Se trata de un arbusto perenne con hojas palmeadas y con borde aserrado, sus flores son axilares, el cáliz es acampanado con cinco lóbulos, la corola tiene cinco pétalos, el fruto es capsular (www.arbolesornamentales.es/Hibiscus.htm, visitada 12 diciembre de 2011).

4.6.2. Antecedentes etnomédicos

El uso más reconocido de la flor de jamaica es alimentario, sin embargo, también se le reconocen importantes propiedades medicinales, especialmente por su aplicación diurética, diaforética y colagoga. En Taiwán se usa la semilla como diurética, laxante y tónica. En Filipinas utilizan la raíz amarga como aperitivo y tónico. La infusión acuosa de jamaica se le reconoce como diurética y mencionan los curanderos que “aumenta la cantidad de orina excretada, por lo que ayuda a la limpieza interna y a eliminar el exceso de agua en el cuerpo”. La jamaica es un remedio popular para tratar abscesos, bilis, cáncer, tos, debilidad, indigestión, dolor al orinar, fiebre, resaca, dolencias del corazón, presión alta, afecciones nerviosas, escorbuto y también se usa como purgante (Argueta *et al.*, 1994).

4.6.3. Antecedentes farmacológicos

En estudios *in vitro* indican que el extracto hidroalcohólico de *Hibiscus sabdariffa* induce una inhibición apreciable de la enzima convertidora de angiotensina, cuyo efecto se atribuyó a los flavonoides (Jonadet *et al.*, 1990). Al extracto acuoso se le ha comprobado efecto hepatoprotector en ratas hipercolesterolémicas (Saadany *et al.*, 1991), así como inhibidor del tono muscular de

varias preparaciones de músculo aislado (Ali *et al.*, 1991). También presenta actividad antioxidante en hepatocitos de rata sometidos a estrés oxidativo (Tseng *et al.*, 1997). La infusión *Hibiscus sabdariffa* se ha evaluado en personas con hipertensión esencial lográndose disminuir la presión sistólica un 11.2% y la diastólica en un 10.7%(Ají y Haji 1999).

Un pretratamiento con *Hibiscus sabdariffa* por cinco días disminuyó los marcadores hepáticos, lesiones en el hígado y necrosis inducidas por hidroperóxido de terbutilo (Chau-Jong *et al.*, 2000).

El extracto metanólico de *Hibiscus sabdariffa* ha demostrado un efecto relajante dosis dependiente en íleon aislado de rata Salah *et al.*, 2002.

El extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* atenúa la hipertensión y revierte la hipertrofia cardiaca en ratas (Odigie *et al.*, 2003). También el extracto tiene actividad hipolipidémica y efectos antiateroscleróticos en conejos (Chen *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la administración de 4.6g/kg de este extracto en ratas induce toxicidad testicular (Orisakwe *et al.*, 2004). Algunos polisacáridos aislados de las flores de *Hibiscus sabdariffa* causan fuerte inducción de proliferación de queratinocitos humanos (Brunold *et al.*, 2004).

El ácido protocatéquico es un compuesto fenólico de *Hibiscus sabdariffa* que reduce la incidencia de lesiones en el

hígado provocadas por hidroperóxido de terbutilo, además de tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Liu *et al.*, 2002). El ácido protocatéquico aislado de *Hibiscus sabdariffa* demostró que provoca inducción de apoptosis en células de leucemia humana vía reducción de retinoblastoma (Tseng *et al.*, 2000).

En nuestro grupo de investigación (CIBIS) *H. sabdariffa* ha sido aplicada en un ensayo clínico a personas hipertensas, demostrando que presenta efecto antihipertensivo (Herrera-Arellano *et al.*, 2004). La decocción de *Hibiscus sabdariffa* provee una fuente alternativa de minerales y ayuda a establecer a los glóbulos rojos de daño por estrés (Falade *et al.*, 2005). Se ha encontrado que la semilla contiene metales pesados como níquel, cobalto, estaño, zinc, manganeso y cadmio, los cuales a concentraciones muy bajas reducen la actividad ATPasa Na^+/K^+ en embriones de peces (Boiko *et al.*, 2004) y en riñón se probó que el extracto tiene efecto inhibitorio (Alarcón, 2006). Se ha demostrado que compuestos fenólicos glucosilados tienen efecto inhibitorio en la ATPasa de Na^+/K^+ *in vitro* (Uday *et al.*, 2002). Se tiene reportado que la DL_{50} del extracto de *Hibiscus sabdariffa* en ratas fue mayor de 5000 mg/kg.

La presencia de quercetina en *Hibiscus sabdariffa* podría ser responsable de parte del mecanismo de acción del efecto diurético, ya que se ha observado que este flavonoide bloquea la expresión de αENaC de manera secundaria a la señalización por aldosterona,

por un incremento de la concentración intracelular de Cl^- (Fujimoto *et al.*, 2005).

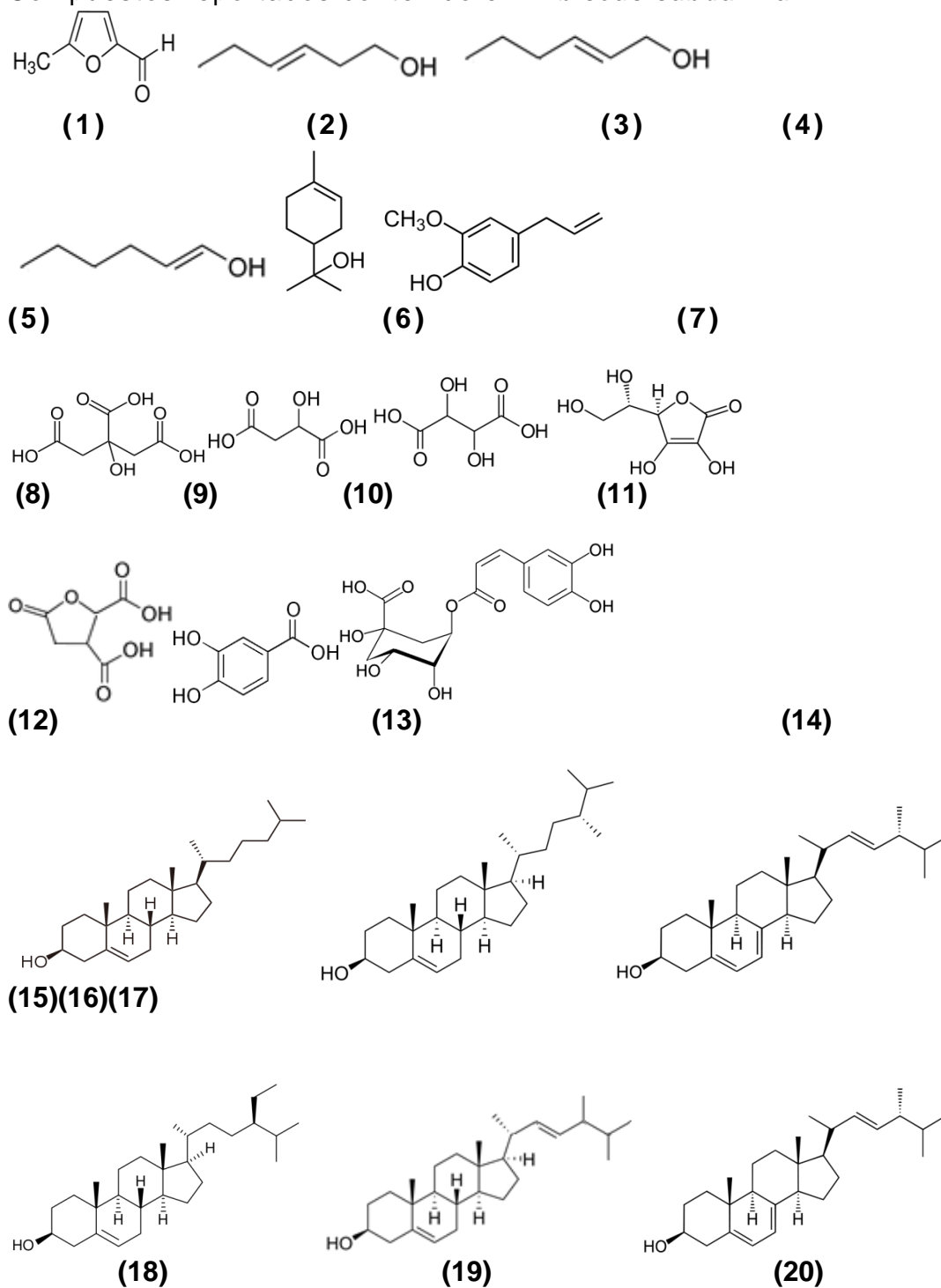
4.6.4. Antecedentes químicos

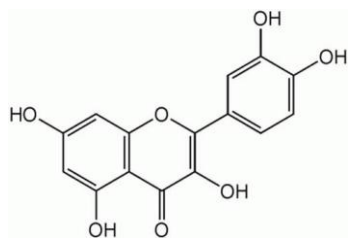
Existen muchos reportes acerca de los constituyentes de *Hibiscus sabdariffa* en las diferentes partes de la planta. Del aceite de la semilla se han identificado numerosos compuestos del tipo de los hidrocarburos, algunos de ellos de características volátiles como: furfural **(1)**, 5-metil-2-furfural **(2)**, (Z)-3-hexenol **(3)**, 2-hexenol **(4)**, 1-hexenol **(5)**, α -terpinol **(6)** y eugenol **(7)** como los compuestos más abundantes (**tabla 1**). Los cálices de la planta presentan una alta concentración de ácidos orgánicos, pudiendo alcanzar hasta un 30% de sólidos extractables. De éstos se han reportado: ácido cítrico **(8)**, ácido málico **(9)**, ácido tartárico **(10)**, ácido ascórbico **(11)**, ácido hibísico **(12)**, ácido protocatéquico **(13)** y ácido clorogénico **(14)**. También se ha reportado esteroides como: colesterol **(15)**, campesterol **(16)**, estigmasterol **(17)**, β -sitosterol **(18)**, α -espinasterol **(19)** y ergosterol **(20)**. Se han obtenido compuestos como: Mn, Mg, Ca, K, Zn, Cu, Cr, Ni y Fe (Babalola *et al.*, 2001). Además, se ha descrito una importante presencia de moléculas del tipo flavonoide, destacando la presencia de: hibiscetina **(21)**, gossipetina **(22)**, luteolina **(23)** y quercetina **(24)**. El color característico de la planta y de los cálices se debe a la presencia de antocianos, como los glucósidos y

sambubiosidos de cianindina **(25)** y definidina **(26)**(Ali *et al.*, 2004; Bradelin *et al.*, 2005; Falade *et al.*, 2005).

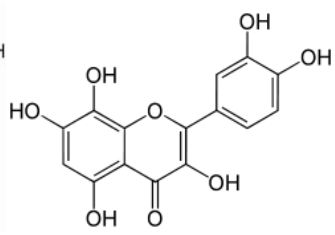
Tabla 1.

Compuestos reportados contenido en *Hibiscus sabdariffa*.

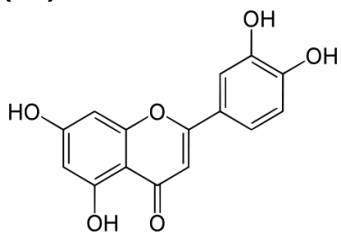




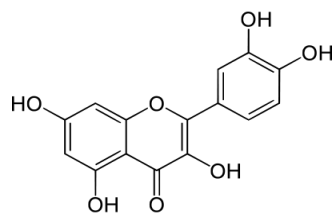
(21)



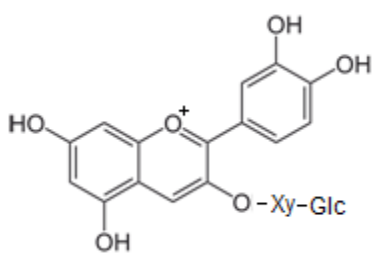
(22)



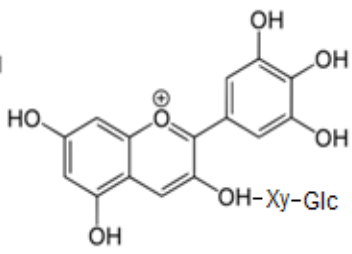
(23)



(24)



(25)



(26)

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La HAS es un problema de salud pública en México de importancia fundamental, para la cual las instituciones de salud requieren disponer de recursos terapéuticos que permitan enfrentarlo. Además, la HAS es un padecimiento que tiene un origen multifactorial, el cual requiere ser atacado en sus diversas causas, siendo los fitofármacos una alternativa terapéutica muy interesante. A diferencia de los fármacos provenientes de síntesis química, los cuales constan de sustancias puras, los fitofármacos presentan una mezcla de compuestos que pueden tener diferentes actividades biológicas, resultando en distintas interacciones farmacológicas entre compuestos que potencian el efecto farmacológico (sinergismo).

Al extracto de *Hibiscus sabdariffa* se le ha atribuido efecto antihipertensivo relacionado con diversas actividades: antagonista de calcio, relajante de músculo liso vascular y visceral, antagonista de la angiotensina II (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2009) e inhibidor de la ECA. Aunado a lo anterior, se ha demostrado en ensayos clínicos que presenta actividad diurética (Herrera-Arellano *et al.*, 2004). Previamente hemos determinado *in vivo* *in situ* el efecto diurético y natriurético con ahorro de potasio (Alarcón, 2006).

Por todo lo anterior, en este proyecto de investigación se pretende identificar al grupo de compuestos responsables del

efecto diurético y caracterizar el mecanismo de acción diurética de *Hibiscus sabdariffa* como antagonista de aldosterona.

6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

¿En el extracto de *H. sabdariffa* están presentes compuestos que producen diuresis al antagonizar a la aldosterona?

¿Los compuestos aislados o fracciones con supuesta actividad antagónica a aldosterona pueden modificar la expresión de la subunidad alfa de canales epiteliales de sodio (ENaC α) *in vivo*?

7. HIPÓTESIS

El extracto de *H. sabdariffa* presenta efecto diurético ahorrador de potasio, por lo que están presentes compuestos que antagonizan a un análogo de aldosterona.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Determinar el antagonismo de la aldosterona provocado por los compuestos aislados y fracciones menos complejas de *H. sabdariffa* en modelos *in vivo* e *in situ*.

8.2. Objetivos específicos

8.2.1. Determinar el efecto antagónico a desoxicorticosterona (DOCA) un análogo de aldosterona en ratas adrenalectomizadas evaluando la capacidad diurética de los extractos en coadministración de DOCA.

8.2.2. Determinar el efecto antagónico a DOCA en ratas adrenalectomizadas evaluando la filtración renal en el modelo de riñón *in situ*.

8.2.3. Determinar si existe antagonismo a la DOCA de los compuestos aislados de *H. sabdariffa* midiendo niveles de expresión de la subunidad alfa de canales epiteliales de sodio (ENaC α) por RT-PC

9. METODOLOGÍA

9.1. Identificación de la planta

La identificación de la planta se llevó a cabo por la directora del Herbario IMSSM del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, M en C. Abigail Aguilar. Dejando depositado un espécimen para posterior referencia (**IMSSM-014290**).

9.2. Obtención del extracto acuoso

El material vegetal se obtuvo de cultivos establecidos en la zona de Xochitepec, Morelos. Los cálices de la planta fueron secados a temperatura ambiente en oscuridad para posteriormente ser molidos. Para la obtención del extracto acuoso se colocaron 2000 g de cálices molidos en infusión en 18 L de agua a temperatura de 55°C durante 2 horas, al extracto se le denominó (HsAq). El disolvente se eliminó con evaporador rotatorio a presión reducida y fue liofilizado (Hetodrywinner mod. DW3) para eliminar completamente el agua y se mantuvo a – 20°C hasta la utilización.

9.3. Fraccionamiento del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*.

Se tomaron 300 g del extracto acuoso liofilizado el cual se sometió a un proceso de maceración cada 24 h, con acetonitrilo 100% (HsMeCN), mezclas acetonitrilo:metanol 90:10 (HsMeCN9:1MeOH) y 50:50 (HsMeCN5:5MeOH). Cada una de las fracciones se concentró con rotavapor a presión reducida para ser cuantificado el contenido de compuestos y ser evaluados en los modelos.

9.4. Determinación de la concentración de antocianinas.

La determinación y cuantificación de compuestos presentes en cada una de las fracciones de *Hibiscus sabdariffa* (HsAq, HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH, HsMeCN5:5MeOH) se realizó por cromatografía líquida de alta resolución HPLC por sus siglas en inglés en un equipo Merck-Hitachi. Se utilizó un sistema de detección de arreglo de diodos, ajustado la absorbancia a 520 nm, con una fase móvil compuesta 15:85 acetonitrilo:ácido trifluoracético 1.1% en agua, a un flujo de 1 ml/min, en una columna de RP-18, 0.45 x 20 cm (Supersphere Merck). Se evaluó contra una curva de calibración de sambubiósido de delphinidina y sambubiósido de cianidina, compuestos mayoritarios del extracto.

9.5. Determinación de la concentración de flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó por HPLC en un equipo Merck-Hitachi, en el cual un sistema de detección de

arreglo de diodos, ajustando la absorbancia a 360 nm, con una fase móvil compuesta de un gradiente de acetonitrilo:agua, a un flujo de 1 ml/min, en una columna de RP-18, 0.45 x 20 cm (Supersphere Merck). Se evaluó contra curva de calibración de quercetina, quercitrina, luteolina y cianidina.

9.6. Modelo de actividad diurética en ratas adrenalectomizadas.

Los animales que se utilizaron fueron ratas macho cepa Sprague-Dawley de 280 – 300 g (Harlan, México D.F.). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de laboratorio a 25°C con un fotoperiodo de 12 h:12 h de luz oscuridad; la luz se encendió a las 7:00 a.m. Con libre acceso a agua y alimento (*Harlan Roden Lab Diet*). Los animales fueron adaptados a las condiciones del laboratorio por tres semanas. Todos los estudios fueron llevados a cabo bajo la normatividad oficial mexicana especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (*Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio*). El protocolo de investigación fue sometido y aceptado por el Comité Institucional de Investigación Científica y Condiciones Éticas y registrado con el número: R-2006-1701-5. Las ratas se adrenalectomizaron de la siguiente forma: bajo anestesia quirúrgica, pentobarbital sódico 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.), se rasuró dorsalmente. Se colocó la rata en un bloque de 20 x 153 x 2 cm, para elevar las vísceras. Se realizó

una incisión de 2 cm en línea media del ángulo costovertebral; para eliminar la glándula adrenal izquierda se separaron los músculos lumbares y se retrajeron sobre la sombra esplénica. De esta manera aparece sobre la incisión la glándula sin exponer el riñón. La glándula junto con la grasa adyacente y la unión al mesenterio se eliminaron totalmente. Para la eliminación de la glándula adrenal derecha se levantaron y retrajeron los músculos lumbares cerca de la arteria lumbocostal. Las incisiones sobre los músculos lumbares no requirieron de sutura y la piel se sujetó con 3 ó 4 puntos de sutura (Grollman, 1941). Posteriormente se mantuvo con alimentación normal y se administró una solución salina al 1% de NaCl para ingesta. Se formaron grupos de 6 animales (n=6) y a partir del cuarto día del postoperatorio, se les administraron por otros cuatro días los siguientes tratamientos vía oral (v.o.): grupo 1 control basal, recibió 300 µl de solución salina isotónica (SSI); grupo 2, se les administró 30 mg/kg de acetato de desoxicorticosterona (DOCA; Sigma-Aldrich); grupo 3, se le administró espironolactona 9 mg/kg; grupo 4, se le administró 1000 mg/kg de HsAq; grupo 5, se les administró el tratamiento combinado, espironolactona y DOCA; grupo 6, se le administró HsAq yDOCA; grupo 7, se le administró espironolactona y HsAq. El día de la prueba de diuresis se les administró a cada rata 3 ml de agua v.o. Se colocaron los animales en cajas metabólicas y se midió por 24 h la eliminación de orina, a la orina obtenida se le determinó sodio y potasio.

También se determinó el efecto diurético de las fracciones de *Hibiscus sabdariffa* (HsAq, HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH, HsMeCN5:5MeOH), siguiendo el esquema de tratamiento anteriormente planteado.

9.7. Modelo de diuresis en riñón *in situ*

Se utilizaron ratas macho adrenalectomizadas cepa Sprague-Dawley de 280 – 300 g, al cuarto día del postoperatorio fueron sometidas a 10 días de tratamiento con HsAq, HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH, HsMeCN5:5MeOH a una misma dosis de 1000 mg/kg/día v.o. Además, al grupo de control positivo que se administró espiranolactona (9 mg/kg/d v.o). A los 10 días de tratamiento las ratas fueron anestesiadas y se llevó a cabo el modelo de riñón *in situ*. El cual se efectuó de la siguiente forma: las ratas fueron anestesiadas por administración de uretano 1.5g/kg i.p., los animales fueron colocados en posición ventral en una plataforma de cirugía; se practicó una incisión lateral izquierda para exponer el riñón. La arteria renal fue ligada a nivel de la bifurcación de la aorta; tanto la arterial como la vena renal y el uréter fueron canalizados con un catéter. El catéter insertado en el uréter fue utilizado para coleccionar las muestras. Por arteria renal canalizada se perfundió el *buffer* Ringer-Krebs para riñón (KRB) que contenía: 123.3 mM NaCl; 6.17 mM KCl; 3.29 mM CaCl₂ · 7H₂O; 0.78 mM MgSO₄ · 7H₂O; 32.14 mM NaHCO₃; 1.54 mM

KH_2PO_4 ; 6.4 mM piruvato de sodio; 6.4 mM glutamato de sodio; 7 mM fumarato de sodio y 11.1 mM glucosa a pH 7.4; la perfusión se realizó a una velocidad de 5 ml/min por 10 minutos. Posterior a ello la tasa de velocidad de perfusión se disminuyó a 0.7ml/min por 30 min, el cual correspondió al periodo de prueba; durante el mismo los tratamientosse perfundieron y se colectaron las muestras. Después de realizado el ensayo, el riñón fue removido, pesado y homogenizado para determinar el contenido de proteínas por el método de Bradford (Sigma Aldrich). De esta forma, la tasa de filtración glomerular (FR) de cada riñón fue calculada aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{FR} = \text{volumen excretado en 30 min/mg proteína}$$

9.8. Modelo de expresión de la sub unidad alfa de canales piteliales de sodio (α ENaC) en ratas adrenalectomizadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

9.8.1. Estandarización de la técnica

Para establecer las condiciones óptimas para la detección de la expresión de la subunidad α ENaC por RT-PCR, se utilizaron ratas adrenalectomizadas de 300 g las cuales fueron sometidas a tratamiento con espironolactona a una dosis de 9mg/kg por diferentes periodos: 0, 2, 5 y 10 días. Lo anterior para establecer el tiempo más conveniente al cual debían mantenerse los tratamientos hasta lograr una mayor disminución en la expresión de la subunidad α ENaC. Una vez establecida la duración del tratamiento en el que se observó el mayor efecto de la espironolactona sobre la expresión de la subunidad α ENaC, se formaron los grupos de animales (n=8) adrenalectomizados, los cuales fueron tratados con el extracto y las fracciones: HsAq, HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH, HsMeCN5:5MeOH a una misma dosis de 1000 mg/kg/día v.o. durante 10 días, debido a que fue el periodo de tiempo de tratamiento óptimo que se determinó con espironolactona. Una vez concluido el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y sus riñones extraídos colocándolos en 500 μ l trizol (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD), congelados con nitrógeno líquido y almacenados a menos -70°C (Revco) hasta su utilización.

9.8.2. Extracción del ácido ribonucleico mensajero (mARN).

La extracción del ARNm en riñón se realizó de acuerdo al método del trizol (Chomczynsky y Sacchi 1987)(Gibco, BRL, Gaithersburg, MD). Se colocaron 200 mg de tejido del riñón en 1 ml de trizol, seguido de una cuidadosa homogenización con un (Ultra-Turrax Mod T18), posteriormente se centrifugó a 14000 rpm, por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó en un nuevo tubo y se le agregaron 200 µl de cloroformo por cada mililitro de trizol utilizado; se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos, para volver a centrifugar la muestra a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez terminada se separó la fase superior, la cual contenía el ARN y se colocó en un nuevo tubo al cual se le agregó el mismo volumen de isopropanol al 70%. Todo el volumen fue pasado a través de una columna Qiagen MinElute spin column, después en la columna se llevó a cabo la digestión del ADN con la DNAasa(Sigma) y se dejóincubar 15 minutos. Posteriormente se lavó la columna con 700µl del amortiguador 1 del kit de Qiagen y se centrifugó 15 s a 14000 rpm; posteriormente se hicieron dos lavados de 500 µl con el buffer 2 centrifugando por 15 s a 14000 rpm. La columna se secó,por centrifugación a 14000 rpm por 2 min. Una vez seca la columna se eluyó el ARN de la columna con 60 µl de agua con dietil pirocarbonato (DEPC) y se almacenaron las muestras a -20°C

hasta su utilización. Para la cuantificación del ARN se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elemer lamda 25), a longitudes de onda de 260 a 280 nm. Para determinar la pureza se utilizó la siguiente relación:

$$(D.O._{260nm} * 40 / D.O._{260nm} * ml) (\text{factor de dilución}) (0.1ml) = \mu\text{g RNA/ml}$$

9.8.3. Conversión de ARN a ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

Se colocó 1µg ARN en un tubo de reacción, se le agregó 0.5 µl de oligoDT hasta aforar a 6.5 µl colocándose en el termociclador (BIORAT) por 10 minutos a 65°C, una vez ocurrido el tiempo se completó la reacción con 2 µl de buffer 5X, 0.25 µl de protector, 1µl de nucleótidos y finalmente 0.5 µl de transcriptasa reversa (MultiScribe®), alcanzando un volumen de 10 µl los cuales se colocaron a 25°C durante 10 minutos y a 50°C a 60 minutos.

9.8.4. Amplificación del cDNA por reacción en cadena de la polimerasa PCR

A 2 μ l del ADNc obtenido, se le agregaron 2.5 μ l de amortiguador de Taq, 0.75 μ l de magnesio, 0.5 μ l de dinucleótidos (QIAGEN), 0.5 μ l del oligo 1 (forward) (5TGCACCCTTATTCCTTACAGATAC3'), 0.5 μ l del oligo 2 (reverso) (RVCAGTGTCAGGGACAAACCATT) y 0.5 μ l de la polimerasa Taq (PLATINIUM) y se aforó a 25 μ l con agua miliQ, se colocó en el termociclador a 94°C/5 minutos, 94°C/1 minuto, 47°C/1 minuto, 72°C/1 minuto por 35 ciclos y a 72°C/10 minutos y se almacenaron a 4°C.

9.8.5. Electroforesis en gel de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa al 1.5% con solución TAE al cual se le agregó 3 μ l de bromuro de etidio y se dejó solidificar 30 minutos. Se colocó en la cámara electroforética y se cubrió el gel en una solución TAE. Se colocaron 10 μ l del producto de PCR en el *buffer* de carga (azul de ginol) y se dejó correr durante 30 minutos a 95 milivoltio. Una vez transcurrido el tiempo se expuso el gel a un trans-iluminador de luz ultravioleta y se realizó una toma una fotográfica. La cuantificación de la concentración del producto de la amplificación de PCR se utilizó una *software* para manejo de imágenes (Collage 3.0 ®), lo que permitió digitalizar las imágenes y medir la intensidad de las bandas en pixeles.

9.8.6. Diseño de oligonucleótidos específicos.

Los oligonucleótidos empleados para α ENaC se diseñaron con base en la secuencia reportada en el *Gen Bank*. Los fragmentos que corresponden a estos fragmentos son: del nucleótido 840-863 para *forward* (Fw) y del nucleótido 1445-1425 *reverso* (Rv), amplificando para un fragmento de 606 pb para α ENaC. El control de actina amplificó para un fragmento de 432 pb que corresponde del nucleótido *Forward* de 575-594 y del *Reverso* de 1007-1026. Se utilizó el programa *DNA works* para la determinación de temperatura media de alineamiento (T_m) de cada uno de los oligonucleótidos.

9.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) y subsecuentemente se aplicó una prueba de Tukey para establecer la significación estadística entre los grupos de tratamiento. El valor de $p < 0.05$ fue considerado para establecer significancia estadística. Se utilizó el programa SPSS 11.0 para la aplicación del ANOVA.

10. RESULTADOS

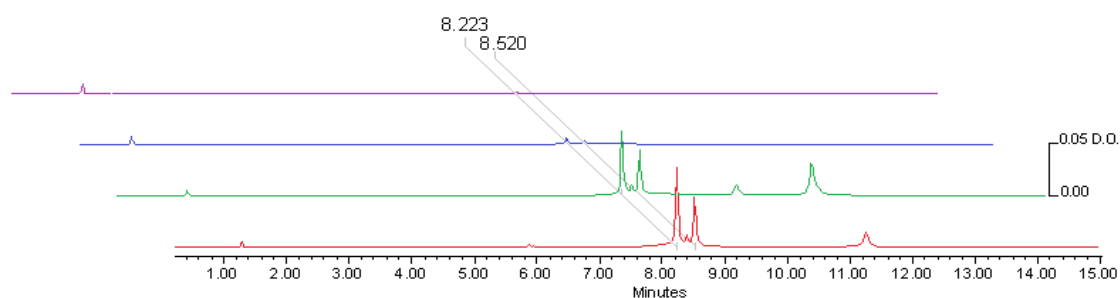
10.1. Composición de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*.

El fraccionamiento del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* (HsAq) mostró que, conforme disminuye la polaridad del extracto, la concentración de las antocianinas también disminuyó hasta desaparecer. Esto es, las concentraciones del 3-O-sambubiósido de delphinidina ($R_t = 8.22$ min) y el 3-O-sambubiósido de cianidina ($R_t = 8.52$ min) en el HsAq fueron 32.4 mg/g y 19.9 mg/g, respectivamente; en el extracto HsMeCN5:5MeOH, las concentraciones detectadas fueron: 30.5 mg/g y 20.3 mg/g, respectivamente. En los extractos de menor polaridad HsMeCN9:1MeOH y HsMeCN la concentración de antocianinas es despreciable (**figura 1, panel “a”**).

Respecto a los otros compuestos identificados: ácido 3-O-cafeoilquínico ($R_t = 7.35$ min), ácido 5-O-cafeoilquínico ($R_t = 8.14$ min), ácido 4-O-cafeoilquínico ($R_t = 8.59$ min), rutina ($R_t = 10.02$ min) y quercetina ($R_t = 11.40$ min) mostraron una tendencia en general de incrementar su concentración en el extracto, conforme disminuyó la polaridad del sistema de disolventes para la extracción. La concentración del *pool* de los ácidos clorogénicos cambió de 11.5 mg/g a 16.9 mg/g; la primera concentración correspondió a lo detectado en el HsAq y el otro valor fue detectado en el HsMeCN. Lo anterior se observa en el **panel “b”** de la **figura 1**. Del total de la concentración de los ácidos

clorogénicos entre un 55 a 59% correspondió al compuesto mayoritario ácido 5-O-cafeoilquínico ($R_t = 8.14$). En la misma **figura 1**, se observa, como ya se mencionó, que los compuestos del tipo flavonoide también mostraron una tendencia a disminuir su concentración conforme disminuyó la polaridad del sistema. De tal forma, que rutina pasó de una concentración no cuantificable a 0.12 mg/g y quercetina cambió de 2.71 mg/g a 19.69 mg/g que correspondieron al extracto de mayor polaridad HsAq y al extracto de menor polaridad HsMeCN, respectivamente.

A)



B)

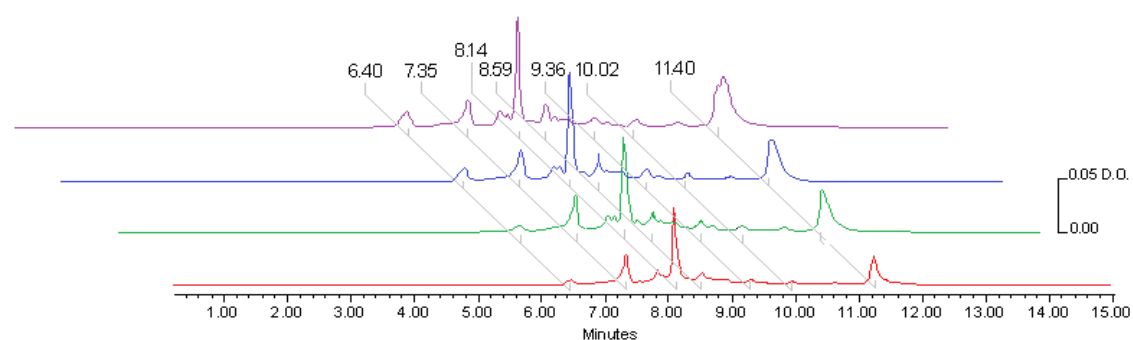


Figura 1. Cromatogramas de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*, la línea roja extracto HsAq, línea verde extracto HsMeCN5:5MeOH, línea azul extracto HsMeCN9:1MeOH y línea púrpura extracto HsMeCN. En el panel a) se muestra la detección a 520 nm, delphinidina-3-sambubiósido ($R_t=8.22$ min), cianidin-3-sambubiósido ($R_t = 8.52$ min). En el panel b) se muestra la detección a 350 nm, ácido clorogénico ($R_t=8.14$ min), rutina ($R_t=10.02$ min), quercetina ($R_t=11.40$ min).

10.2. Efecto diurético del extracto de *Hibiscus sabdariffa* como antagonista de aldosterona en rata adrenalectomizada.

En la **tabla 2** se muestra que la adrenalectomización de las ratas incrementó la diuresis en 5 horas, ésta pasó de 8.4 ± 1.5 ml a 16.2 ± 2.2 ml lo cual resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y representó un 92.8% de incremento en la diuresis, respecto del nivel de diuresis de ratas íntegras. Lo mismo ocurrió con la eliminación de sodio, ya que la concentración, medida en mEq por 100 g del peso de la rata en un periodo de 24 h, pasó de 0.57 ± 0.16 a 1.29 ± 0.37 , que fue significativamente diferente respecto a las condiciones basales ($p < 0.05$). En el caso del potasio hubo también un incremento, la eliminación cambió de 0.29 ± 0.05 a 0.45 ± 0.08 mEq/100g/24h, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativas. El índice salurético (S.i.), corroboró dichos incrementos respecto a las condiciones basales (2.25 Na^+ y 1.55 K^+). El efecto natriurético fue mayor respecto al efecto kaliurético, puesto que en condiciones basales la relación Na^+/K^+ pasó de 1.96 a 2.85.

Tratamiento	Diuresis Volumen (ml/24h) \pm S.D.	Na ⁺ (mEq/100g/24h) \pm S.D.	K ⁺ (mEq/100g/24h) \pm S.D.	S.i.		
				Na ⁺	K ⁺	Na ⁺ /K ⁺
Control	8.4 ± 1.5 ‡	0.57 ± 0.16 ‡	0.29 ± 0.05			1.96
ADX	$16.2 \pm 2.2^*$	$1.29 \pm 0.37^*$	0.45 ± 0.08	2.25	1.55	2.85
ADX / DOCA	10.0 ± 1.5 ‡	0.45 ± 0.19 ‡	0.28 ± 0.08	0.80	0.96	1.60
ADX / Spr	$29.6 \pm 2.1^*$ ‡	$3.39 \pm 0.39^*$ ‡	$0.85 \pm 0.07^*$ ‡	5.94	2.93	3.99
ADX / HsAq	$24.3 \pm 7.6^*$ ‡	$2.73 \pm 0.64^*$ ‡	$0.79 \pm 0.17^*$	4.78	2.72	3.45
ADX / DOCA + Spr	$39.8 \pm 5.3^*$ ‡	$2.28 \pm 0.28^*$ ‡	$1.02 \pm 0.17^*$ ‡	3.99	3.52	2.23
ADX / DOCA + HsAq	$19.5 \pm 4.0^*$	$2.04 \pm 0.18^*$ ‡	$0.95 \pm 0.14^*$ ‡	3.57	3.27	2.14
ADX / HsAq + Spr	$27.5 \pm 7.3^*$ ‡	$1.64 \pm 0.35^*$ ‡	$0.87 \pm 0.23^*$ ‡	2.56	3.00	1.88

Tabla 2. Efecto producido por diferentes tratamientos sobre la diuresis en ratas adrenalectomizadas y excreción urinaria de electrolitos. ADX: rata adrenalectomizada; DOCA: acetato de desoxicorticosterona 30 mg/kg; Spr: espironolactona 9 mg/kg; HsAq: Extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* 1000 mg/kg. Cada valor es el promedio \pm desviación estándar (n= 8); (S.i.) Índice salurético = mEq excretados grupo problema / mEq excretados grupo control.

ANOVA *post hoc* Tukey. * = $p < 0.05$ con respecto a las condiciones basales ‡ = $p < 0.05$ con respecto a ADX.

La administración de DOCA revirtió el efecto de supresión de la aldosterona derivada de la eliminación de las glándulas adrenales. Lo anterior se observa a partir de la diuresis alcanzada en el grupo de ratas adrenalectomizadas y tratadas con DOCA (ADX / DOCA), en el cual se observó una disminución de la excreción urinaria (10.0 ± 1.5 ml/5h) de un 61.7% respecto al grupo control negativo (ADX); además al comparar con el grupo basal no se observó diferencia significativa. De la misma manera se observó una reversión en natriuresis y en kaliuresis, puesto que no se observó diferencia estadística entre los mismos tratamientos, lo que es corroborado con el valor alcanzado de la relación Na^+/K^+ . Los tratamientos con la espironolactona y HsAq en rata adrenalectomizada (ADX/Spr) y (ADX/HsAq) incrementaron de manera notable los valores de diuresis, alcanzando valores de 29.6 ± 2.1 y 24.3 ± 7.6 ml/24h, respectivamente; mostrando diferencias significativas en el control basal como el control negativo representado por el grupo ADX ($p < 0.05$). Los valores de natriuresis fueron significativamente mayores, respecto al grupo control basal y el grupo control negativo (ADX), de los dos tratamientos ADX/Spr y ADX/HsAq, 3.39 ± 0.39 y 2.73 ± 0.64 mEq/100g/24h respectivamente. En relación con los valores de kaliuresis, con el tratamiento ADX/Spr también se observó un incremento significativo respecto al control basal y el grupo ADX, alcanzando un valor de 0.85 ± 0.07 ; el tratamiento con el extracto

de *Hibiscus sabdariffa* (ADX/HsAq) sólo mostró diferencias significativas contra el grupo control basal y no se observó diferencia en la significación estadística al comparar contra el grupo ADX.

En la coadministración de DOCA espironolactona (ADX/DOCA + Spr) se obtuvo un efecto paradójico, ya que se observó que el tratamiento con el diurético no contrarrestó el efecto de la DOCA, sino por el contrario aumentó el nivel de la diuresis (39.8 ± 5.3 ml/5h). Mostrando un comportamiento diferente en la coadministración del extracto de *H. sabdariffa*, ya que con el tratamiento ADX/ DOCA + HsAq sólo se alcanzó un nivel de diuresis de 19.5 ± 4.0 , el cual no fue significativamente diferente respecto al control negativo (ADX). Los valores de natriuresis y kaliuresis de los tratamientos combinados de DOCA con espironolactona como de extracto de jamaica presentaron incrementos significativos, 2.28 ± 0.28 y 2.04 ± 0.18 mEq/100g/24h, respectivamente, para la excreción de sodio. Para la eliminación de potasio, los valores fueron 1.02 ± 0.17 y 0.95 ± 0.14 mEq/100g/24h mostrando correspondencia con los valores del índice salurético, para sodio 3.99 y 3.57 en el mismo orden y para potasio 3.52 y 3.27, respectivamente. La coadministración de espironolactona y HsAq no mostró un efecto aditivo.

10.3. Fracciones de *Hibiscus sabdariffa* como diurético antagonista de aldosterona en rata adrenalectomizada.

La determinación del efecto diurético de las fracciones del extracto de jamaica (HsAq, HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH y HsMeCN5:5MeOH) en el modelo de diuresis en rata adrenalectomizada se presenta en la **figura 1**. Fue evidente, el efecto antagónico del extracto acuoso (HsAq) sobre la disminución de diuresis provocada por DOCA en rata adrenalectomizada, representada por la barra del grupo ADX- HsAq + DOCA. Este nivel de efecto no fue alcanzado por alguno de los tratamientos con las fracciones del extracto, representados por las barras de los grupos (ADX-HsMeCN + DOCA), (ADX MeCN9:1MeOH + DOCA) y (ADX HsMeCN5:5MeOH + DOCA); no obstante, el tratamiento (ADX MeCN5:5MeOH + DOCA) presentó el mayor efecto de las fracciones y al compararlo con el efecto del extracto HsAq, no mostró diferencia significativa. El grupo ADX HsMeCN + DOCA presentó un nivel de diuresis igual al grupo basal y al del grupo ADX + DOCA.

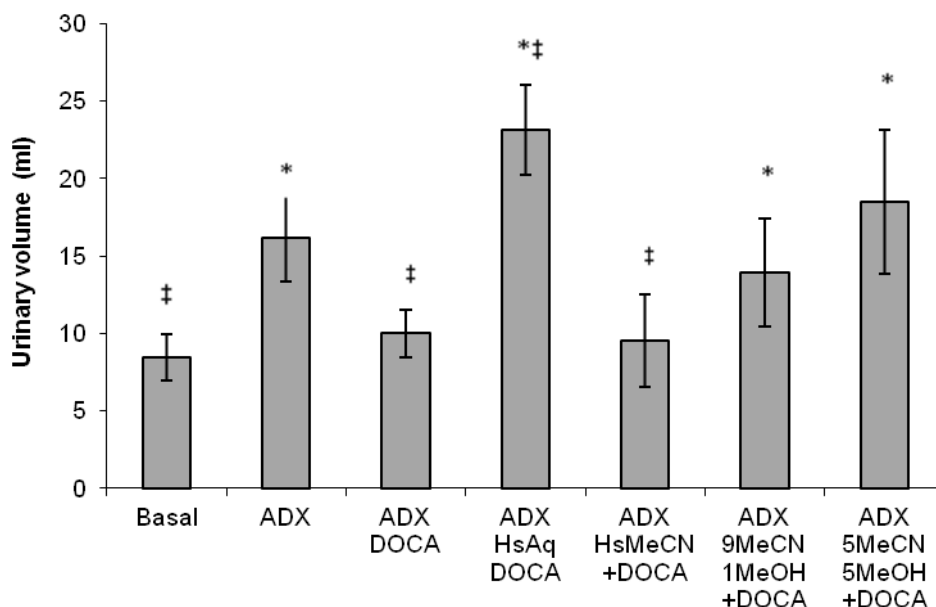


Figura 2. Efecto diurético producido por la administración oral del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* y las fracciones en ratas adrenalectomizadas (ADX). Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de seis experimentos. * = $p < 0.05$ en prueba de ANOVA y se comparó con las condiciones basales. ‡ = $p < 0.05$ en prueba de ANOVA comparado contra grupo control negativo ADX.

10.4. Efecto de fracciones de *Hibiscus sabdariffa* en filtración renal en riñón *in situ* de ratas adrenalectomizadas.

Para consolidar las evidencias del efecto diurético de HsAq y de las fracciones del extracto de jamaica (HsMeCN, HsMeCN9:1MeOH y HsMeCN5:5MeOH) se realizó un ensayo de filtración renal de riñón *in situ*. Como se observa en la **figura 2**, la supresión del estímulo de aldosterona por la adrenalectomía provocó que los riñones disminuyeran su capacidad de reabsorción de fluido. Lo que se muestra en la barra que representa el tratamiento ADX, pues el valor pasó de 41.6 ± 11.1 a 101.6 ± 10.4 $\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína y nuevamente el tratamiento con DOCA revirtió

el efecto de la adrenalectomía restableciendo la señalización de aldosterona por su análogo. De igual manera que en el ensayo de diuresis del extracto íntegro y de las fracciones presentadas en la sección anterior (10.3), el tratamiento con el extracto HsAq antagonizó el efecto de la DOCA de manera significativa respecto a las condiciones basales, aunque no mostró diferencia significativa respecto al tratamiento de ratas adrenalectomizadas. Pero a diferencia del ensayo de diuresis, el tratamiento con la fracción de mayor polaridad (HsMeCN5:5MeOH) originó un incremento significativo del nivel de filtración renal respecto a los grupos basal y el de ratas adrenalectomizadas.

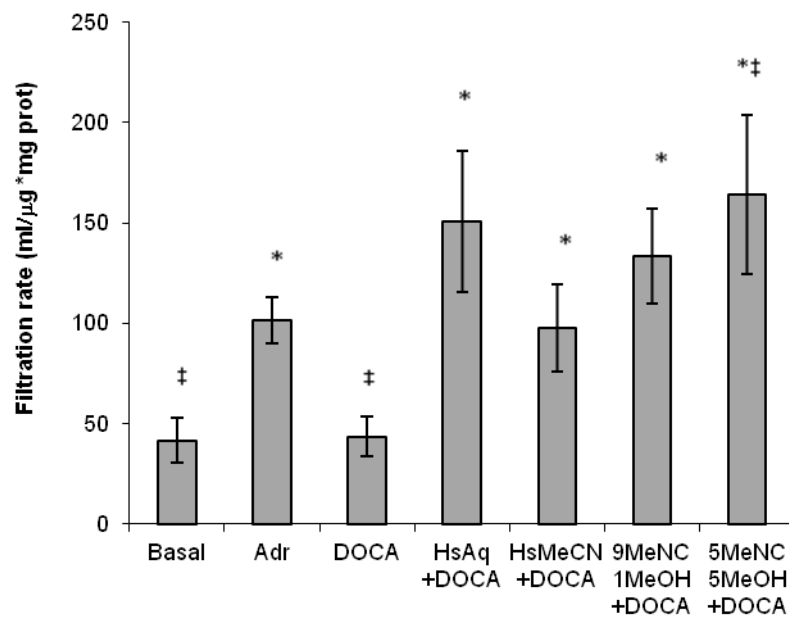


Figure 3. Filtración renal en el modelo de riñón *in situ*. Las ratas fueron tratadas con las condiciones indicadas en el eje "x". Todos los riñones fueron perfundidos con solución Ringer-Krebs. El número de animales por grupo fue n = 6, ANOVA *post hoc* Tukey. * = p < 0.05 respecto a las condiciones control[‡] = p < 0.05 respecto al tratamiento control negativo ratas adrenalectomizadas ADX.

10.5. Efecto del tratamiento con espironolactona sobre la expresión de la subunidad alfa del transportador de Na⁺ (α ENaC)

En las figuras 3 y 4 se muestra el efecto de la administración de espironolactona, sobre la expresión de la proteína α ENaC. En la gráfica se muestra el índice de expresión de α ENaC/ β actina, todo ello medido por la densidad de la banda de expresión (de aproximadamente 600 bp según el ensayo diseñado) obtenida en el gel de agarosa revelado con bromuro de etidio (figura 4). El comportamiento mostró una tendencia de decaimiento de la expresión, desde el día 5 ya es diferente significativamente respecto a la expresión basal. Esta disminución de la expresión se percibe que se estabiliza a partir del día 10 de tratamiento con espironolactona (9 mg/kg v.o.) y la disminución llegó a menos de la mitad de la expresión basal.

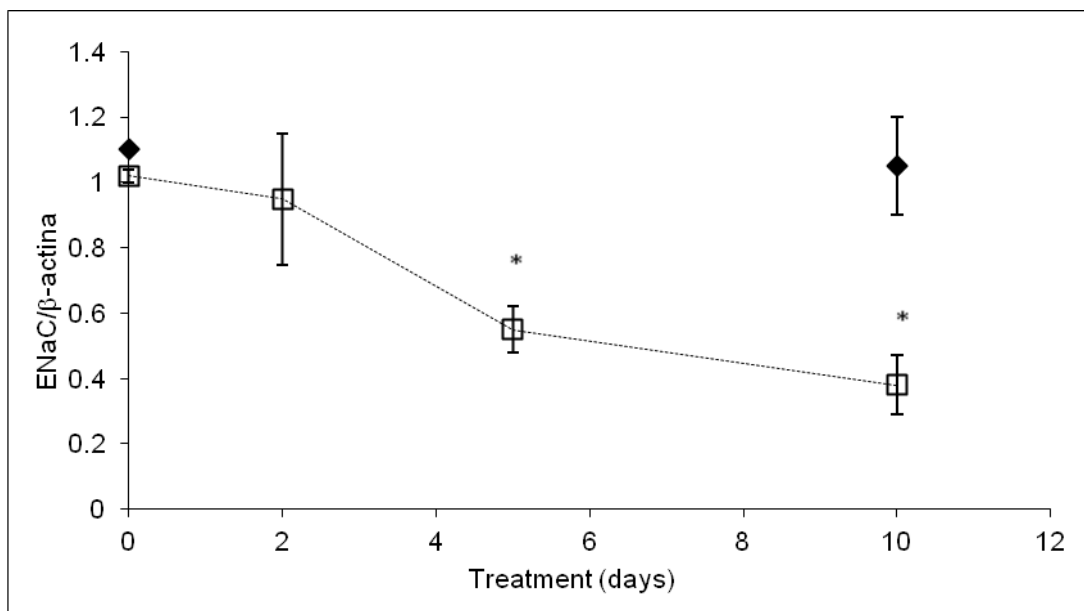


Figura 4. Efecto del tiempo de tratamiento diario con espironolactona (9 mg/kg v.o.) sobre la expresión de la subunidad α ENaC. Se reporta el índice de expresión de la expresión del transportador sobre la expresión de un gen constitutivo (β -actina). (*) ANOVA $p < 0.05$ y *post hoc* Tukey.

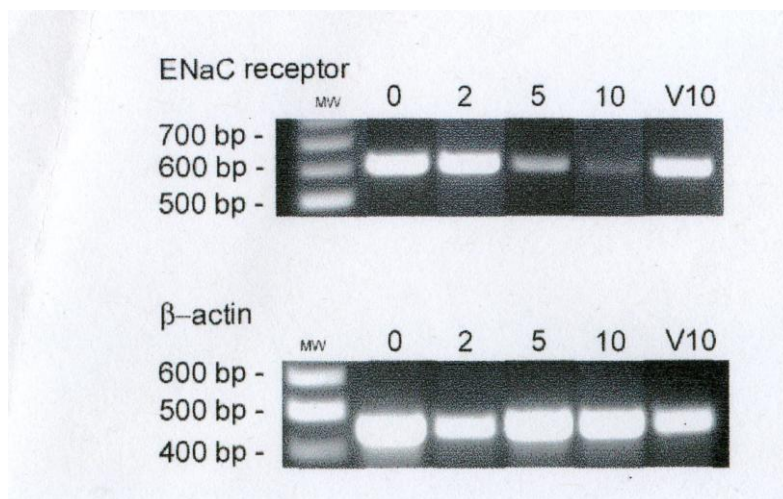


Figura 5. Fotografía del gel de agarosa revelado con bromuro de etidio y leído en UV, RT-PCR de riñones de ratas tratadas diariamente con espironolactona 9 mg/kg v.o. En el margen superior se indica el número de días de tratamiento. El segmento amplificado resultó de 600 bp, lo cual correspondió al segmento que se propuso amplificar. El segmento que expresa actina tuvo alrededor de 450 bp.

10.6. Efecto de fracciones de *Hibiscus sabdariffa* en la expresión de la subunidad α ENaC de rata adrenalectomizada

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de disminución de la expresión de la subunidad α ENaC, en donde se pudo establecer que el tiempo de tratamiento de 10 días fue el más conveniente para favorecer una disminución de la expresión de la subunidad alfa por administración de espironolactona o de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*. La figura 5 muestra el gel de agarosa que permitió evidenciar el segmento amplificado y fue medido por densitometría. La gráfica que se muestra en la figura 6 se construyó con el índice de los valores de densidad de la banda del segmento α ENaC inducido sobre la expresión de β -actina, el cual es constitutivo y no es afectado por la administración de los tratamientos. Se pudo observar que los tratamientos con

espironolactona, HsAq, HsMeCN5:5MeOH y HsMeCN, disminuyeron la expresión de α ENaC de manera significativa (* $p < 0.5$) respecto al tratamiento con el vehículo. Aunque no se pudo establecer diferencias entre los tratamientos, la administración de espironolactona fue la que se percibió como la más eficaz en la disminución de la expresión de α ENaC. El tratamiento con HsAq fue el tratamiento que le siguió en efectividad y los tratamientos con HsMeCN5:5MeOH y HsMeCN tuvieron una eficacia equivalente para disminuir la expresión de α ENaC.

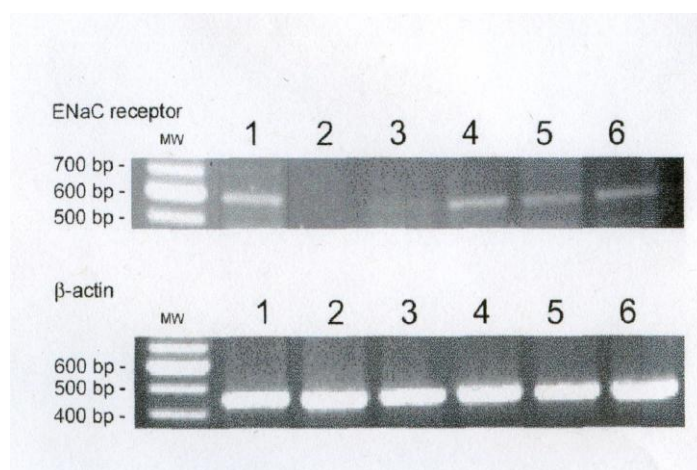


Figura 6. Fotografía del gel de agarosa revelado con bromuro de etidio. Expresión de α ENaC, los carriles corresponden a: 1) Vehículo, 2) Espironolactona 9 mg/kg v.o.), 3) Extracto HsAq 1000 mg/kg v.o., 4) Fracción HsMeCN 1000 mg/kg v.o. 5) Fracción HsMeCN9:1MeOH 1000 mg/kg v.o., 6) Fracción HsMeCN5:5MeOH 1000 mg/kg v.o. El segmento amplificado de la subunidad α ENaC tuvo una longitud de 600 pb.

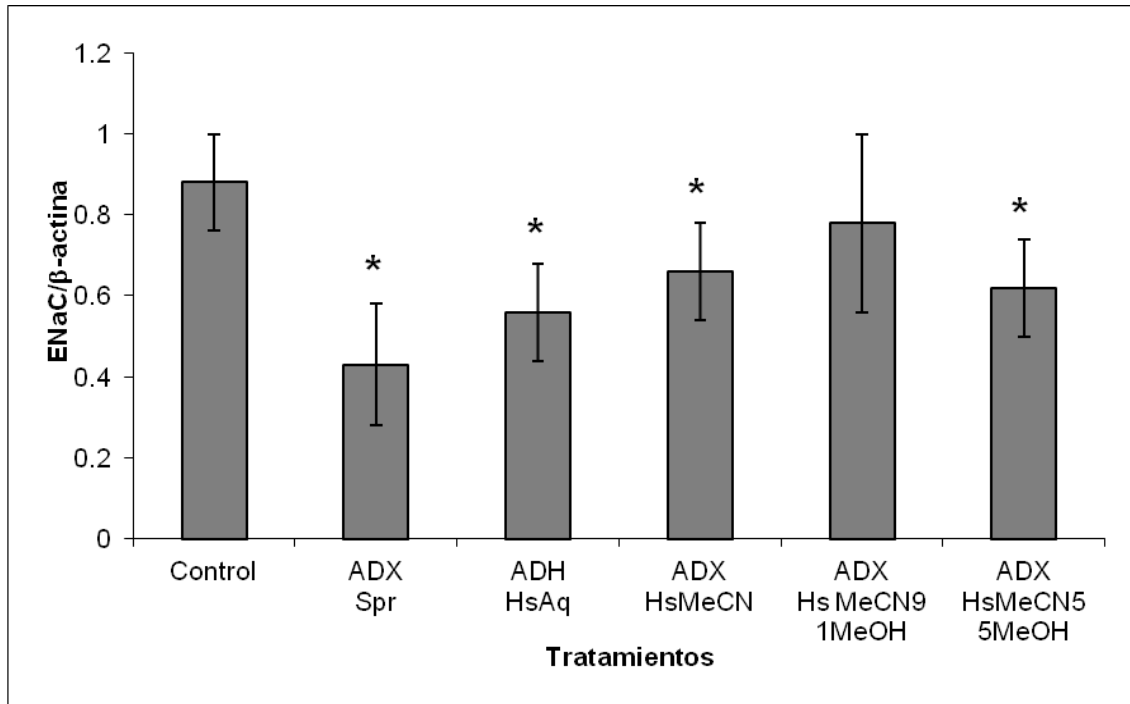


Figura 7. Expresión de α ENaC respecto al tratamiento con extracto completo y fracciones de *Hibiscus sabdariffa* (100 mg/kg v.o.). Se representa el índice de expresión de α ENaC respecto a la expresión de β -actina. (*) ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey. $n = 5$.

11. DISCUSIÓN

La HAS es un problema de salud pública en México con altos costos sociales y económicos (Rojas *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2002) por lo que este trabajo es una propuesta para la búsqueda de procesos terapéuticos que respondan a la demanda. Lo anterior, debido a que la HAS es factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de alta morbimortalidad, tales como infarto cardiaco, accidentes cerebro vasculares e insuficiencia renal.

La ventaja del uso del extracto estandarizado de *Hibiscus sabdariffa* para el desarrollo de un fitomedicamento que proponga un manejo integral de la HAS, radica en la eficacia terapéutica que se ha demostrado para el tratamiento de la HAS del fitomedicamento experimental que se ha desarrollado en el grupo de investigación del CIBIS-IMSS (Herrera-Arellano *et al.*, 2004; Herrera-Arellano *et al.*, 2007). No obstante que había antecedentes de uso clínico del extracto sin estandarizar (Onyenekwe *et al.*, 1999; Odigie *et al.*, 2003). Además, se contaba con las evidencias de que *Hibiscus sabdariffa* era capaz de modificar la resistencia periférica, como componente de la HAS, por su efecto inhibidor de la ECA (Jonadet *et al.*, 1990; Ojeda *et al.*, 2010); efecto vasorrelajante por acción calcio antagonista (Ali *et al.*, 1991; Adegunloye *et al.*, 1996; Onyenekwe *et al.*, 1999; Ajay *et al.*, 2007) y activación endotelial de la vía del óxido nítrico/cGMP (Ajay *et al.*,

2007); aunado al antagonismo directo a la señalización de AGII (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2009).

El efecto diurético de esta planta ya había sido evaluado farmacológicamente, por diferentes grupos de investigación, en ensayos clínicos (Kirdpon *et al.*, 1994; Mijiminiyi *et al.*, 2000, Prasongwatana *et al.*, 2008) como en experimentos preclínicos en rata (Aguwa *et al.*, 2004). Además, la actividad diurética había sido observada de manera indirecta, como un efecto colateral benéfico del uso del extracto estandarizado de *Hibiscus sabariffa* en algunos ensayos clínicos (Herrera-Arellano *et al.*, 2004). No obstante estos hechos experimentales, el efecto diurético del extracto de *Hibiscus sabdariffa* su caracterización farmacológica se habían mantenido como materia de controversia. Puesto que algunos grupos de investigación han descrito un incremento en la diuresis (Caceres *et al.*, 1987; Mojiminiyi *et al.*, 2000; Aguawa *et al.*, 2004), mientras que ha habido grupos de investigación que no habían encontrado un incremento en la excreción urinaria (Odigie *et al.*, 2003; Prasongwatana *et al.*, 2008). De igual manera, otros grupos pudieron determinar un efecto natriurético neto (Caceres *et al.*, 1987; Herrera-Arellano *et al.*, 2004). En cambio, otros reportaron una disminución en la eliminación urinaria de sodio (Aguwa *et al.*, 2004; Kirdpon *et al.*, 1994 y Mojiminiyi, 2004). Por otro lado, la eliminación de potasio presenta posiciones encontradas, puesto que algunos autores reportaron un ligero

incremento (Aguwa *et al.*, 2004), algunos otros no observaron cambio en la excreción urinaria de potasio (Prasongwatana *et al.*, 2008) y otros encontraron que disminuye los valores de kaliuresis (Kirdonpon *et al.*, 1994).

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo aporta al campo de la investigación farmacológica la capacidad diurética de un fitomedicamento antihipertensivo con base en el extracto estandarizado de *Hibiscus sabdariffa*. Como se observa en la **Tabla 2**, la administración del extracto HsAq, provocó un incremento significativo en la diuresis y en la natriuresis, con un efecto kaliurético moderado. Para realizar el análisis del efecto diurético de los diferentes tratamientos se utilizó el parámetro de la proporción de eliminación urinaria de sodio respecto a la del potasio (Na^+/K^+); estas cifras representaron un valor consolidado del efecto natriurético y kaliurético, comprobándola con los demás parámetros estudiados. Comparando contra el grupo control y el grupo de animales adrenalectomizados (ADX), se destacó que la proporción de eliminación de sodio respecto a la de potasio (Na^+/K^+) tuvo un valor de aproximadamente 2:1. El tratamiento con HsAq provocó que se alcanzara un valor de 3.45 para este parámetro, lo cual es comparable con el tratamiento con el fármaco control espironolactona (Spr), el cual es un diurético ahorrador de potasio antagonista de aldosterona. Por lo que podemos suponer que el extracto de *Hibiscus sabdariffa* pudo actuar con un

mecanismo similar al fármaco control. Otro hecho destacable es que, en el grupo control (ADX), animales adrenalectomizados sin algún otro tratamiento, la eliminación de sodio fue mayor sólo en un 45% respecto al grupo control basal, lo cual fue el efecto provocado por la supresión del estímulo de aldosterona. La administración del fármaco análogo de aldosterona, el acetato de desoxicorticosterona (DOCA), al restablecer el control de la reabsorción de sodio y agua en los animales adrenalectomizados redujo el valor de la relación de eliminación Na^+/K^+ , comparable a lo observado en los animales íntegros. El tratamiento con el extracto de HsAq en las ratas adrenalectomizadas y administradas con DOCA, disminuyó el valor Na^+/K^+ hasta el nivel comparable con las condiciones basales por lo que se pudo plantear que dicho extracto antagonizó a la aldosterona de manera efectiva. Al observar el comportamiento de la espironolactona en el grupo de tratamiento (ADX/DOCA + Spr), el fármaco también antagonizó el efecto de DOCA, como lo hizo el HsAq, aunque con una potencia farmacológica equivalente, puesto que el valor de la relación Na^+/K^+ fue similar, aunque ligeramente más elevado a favor del efecto natriurético. La interacción farmacológica entre el extracto de *Hibiscus sabdariffa* y la espironolactona, el grupo (ADX/HsAq + Spr) presentó un efecto menor a lo que se esperaba, respecto a la relación Na^+/K^+ .

Para tratar de explicar los resultados hasta aquí obtenidos a partir de los compuestos químicos presentes en el extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*, habrá que considerar que los compuestos activos presentes en mayor concentración fueron el 3-O-sambubiósido de delphinidina (**26**) y el 3-O-sambubiósido de cianidina (**25**) en el HsAq fueron 32.4 mg/g y 19.9 mg/g; ácidos clorogénicos 11.5 mg/g, de dicha concentración entre un 55 a 59% (aproximadamente 6.55 mg/g) correspondió al ácido 5-O-cafeoilquínico (**14**); quercetina (**24**) 2.71 mg/g. Se sabe que los extractos polares de *Hibiscus sabdariffa* son capaces de actuar como relajantes del músculo liso vascular por estimulación de la vía endotelial de NO/cGMP (Ajay *et al.*, 2007). También la L-arginina, al producir vasodilatación sistémica y renal, incrementa la tasa de velocidad de filtración glomerular (Garcia-Robles *et al.*, 1996; Napathorn *et al.*, 1992), debido a la generación de NO dependiente de la administración de L-arginina. Por lo que, en parte, el efecto diurético del HsAq puede ser debido a una acción hemodinámica renal, resultado tanto del incremento de la tasa de filtración glomerular (Shaul *et al.*, 1996) como de un incremento de la filtración renal (Ruiz *et al.*, 2008). Lo anterior puede ser explicado por la presencia de 3.2 mg/g quercetina en el HsAq, ya que en principio este flavonoide ha demostrado que tiene un efecto de liberación de NO del endotelio vascular (Lodi *et al.*, 2009). Así que, el efecto diurético de HsAq puede ser mediado por la liberación de NO, el cual es crítico para establecer el efecto

diurético, pero particularmente, el efecto natriurético (Perez-Rojas *et al.*, 2010). Además, la administración crónica de quercetina ha sido reportada que es capaz de inhibir la actividad de ATPasa en ratas (Mezesova *et al.*, 2010), lo cual impacta en el gradiente de concentración de Na^+/K^+ en las células epiteliales del segmento tubular de la nefrona. Lo anterior puede contribuir al efecto diurético del extracto HsAq.

Por otro lado, el HsAq también ha sido caracterizado en el control de la HAS, por su efecto inhibidor de la ECA (Jonadet *et al.*, 1990; Herrera-Arellano *et al.*, 2007, Ojeda *et al.*, 2010), con lo que consecuentemente disminuye el nivel de AG II; también por su capacidad de antagonizar directamente la señalización de AG II (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2009). Con lo anterior, se puede esperar que disminuya la acción de AG II sobre la zona ZG adrenal, decreciendo con ello la producción de aldosterona. La respuesta adrenal a la AGII ocurre en pocos minutos, un periodo de tiempo tal que implica que no se requiere la síntesis de nuevas proteínas. Esta liberación aguda de aldosterona mediada por AGII puede involucrar la síntesis rápida de compuestos intermediarios en la ruta esteroideogénica o la síntesis *de novo* partir del colesterol, posiblemente como una consecuencia de la activación de la proteína StAR, provocando el incremento del transporte de colesterol en la membrana interna de la mitocondria. Sin embargo, la inhibición de la ECA y con ello una disminución en la estimulación crónica por AGII, resulta en una disminución de

lahipertrofia de la ZG con disminución también en la hiperplasia. Lo anterior se relaciona con la disminución de la expresión de *CYP11B2* y el subsecuente decremento de la secreción de aldosterona. Ello ocurre cuando la AGII actúa sobre su receptor específico (AT1), el cual está acoplado a una proteína G, activando a la fosfolipasa C (PLC) estimulando la producción intracelular de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG), el cual activa entonces a la proteína cinasa C (PKC). El IP_3 , es reconocido por un receptor sensible a rianodina (RyR), el cual actúa como canal de calcio, en las cisternas intracelulares de este ión divalente, incrementando la concentración intracelular de calcio libre ($[Ca^{++}]$). Esto causa la activación de cinasas de proteína dependientes de Ca^{++} /calmodulina (CaMcinasa) para fosforilar y activar factores de transcripción como el factor activante de la transcripción (ATF)-1, ATF-2 y la proteína unidora a los elementos de respuesta a cAMP (CREB) (Spat y Hunyady 2004). Otro factor de transcripción involucrado en la producción y liberación de aldosterona dependiente de AGII es NURR-1, el cual es un factor clave para la regulación de la transcripción de *CYP11B2*; su expresión es sobrerregulada en tumores secretores de aldosterona (Bassett *et al.*, 2004).

Para tratar de rastrear los compuestos activos responsables del efecto diurético se probaron fracciones obtenidas con sistemas de disolventes de diferentes polaridades. Fue notable que el

extracto íntegro provocó el mayor efecto diurético antagonista de aldosterona, en segundo lugar, en cuanto a la diuresis, se alcanzó con el tratamiento HsMeCN5:5MeOH + DOCA, lo que nos indica que tuvo una menor potencia farmacológica en comparación con el extracto HsAq; esta menor efectividad lo podemos considerar como una tendencia. Se pudo establecer, en cuanto a la concentración de antocianinas, que prácticamente se mantuvieron las mismas concentraciones 3-O-sambubiósido de delphinidina (**26**), ya que en el HsAq se detectó 32.4 mg/g y en el HsMeCN5:5MeOH 30.5 mg/g; del 3-O-sambubiósido de cianidina (**25**) se cuantificó en el HsAq 19.9 mg/g y en el HsMeCN5:5MeOH 20.3 mg/g. Los ácidos clorogénicos y la quercetina incrementaron su concentración ligeramente en el HsMeCN5:5MeOH. La tendencia antes mencionada se revierte en el ensayo de filtración renal en el modelo de riñón *in situ*, en la rata adrenalectomizada. Lo anterior debido a que el efecto con los tratamientos con HsAq y HsMeCN5:5MeOH mostraron el mismo efecto sobre la tasa de filtración. Lo que es notable es la disminución en el efecto diurético antagonista de aldosterona en los modelos de rata ADX y de riñón *in situ* de rata ADX de los extractos HsMeCN9:1MeOH y HsMeCN, en los cuales la menor polaridad del sistema de extracción provocó la disminución hasta la desaparición total de las antocianinas (**25**, **26**) y tanto los ácidos clorogénicos como la quercetina incrementaron su concentración. Por lo que se puede suponer que el efecto diurético tanto en el modelo *in vivo* como *in*

situ, puede ser explicado por el efecto de la eliminación de la señalización de AG II. Ya que el principal efecto de las antocianinas, como ya se expuso, se considera a nivel de inhibición de la ECA o antagonismo de AGII.

Para establecer si el efecto del extracto de *Hibiscus sabdariffa*, así como de sus fracciones eran capaces de actuar como antagonistas de aldosterona, se realizó un ensayo para determinar el nivel de expresión de la subunidad α ENaC en presencia de dichos fitofármacos y comparando con la expresión de la misma subunidad del transportador epitelial de Na^+ en presencia de espironolactona. En primer término fue posible determinar que el periodo de tratamiento óptimo fue de 10 días para la espironolactona. Con ello se estableció este periodo de tiempo para el tratamiento con los extractos y fracciones de *Hibiscus sabdariffa*. Se pudo establecer que el extracto HsAq o completo fue el que tuvo mayor capacidad para disminuir la expresión de α ENaC, de manera similar a como lo hizo la espironolactona; y los extractos de acetonitrilo (HsMeCN) y el de acetonitrilo metanol 50% (HsMeCN5:MeOH) fueron los que siguieron en efectividad para disminuir la expresión del gen inducible de la subunidad α ENaC. Por lo que se puede considerar que el antagonismo de aldosterona se estableció, en principio, por la presencia de antocianinas, por un lado, pero también como se esperaba por la presencia de quercetina.

12. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* L. es un diurético ahorrador de potasio.
- El mecanismo de acción de algunos de sus componentes es que actúan como antagonistas de aldosterona.
- Las antocianinas disminuyen la expresión de la subunidad α ENaC, al disminuir la disponibilidad de AG II, por el efecto de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina.

13. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto sobre la diuresis de los compuestos individuales y en proporciones definidas.
- Determinar el efecto sobre la administración de compuestos aislados en el modelo de expresión de α ENaC en ratones adrenalectomizados.

14. REFERENCIAS

- Adegunloye, B.J., Omoniyi, J.O., Owolabi, O.A., Ajagbonna, O.P., Sofola, O.A., Coker, H.A. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *African Journal of Medicine and Medical Science*. **1996**. 25, 235–238.
- Aguilera G, Kiss A, Lu A & Camacho C Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocrine Research*. **1996**. 22: 433–443.
- Aguwa, C.N. Ndu, O.O., Nwanma, C.C., Udeogaranya, P.O., Akwara, N.O., Verification of the folkloric diuretic claim of *Hibiscus sabdariffa* L. petal extract. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Research*, **2004**. Research, 3.
- Ajay, M., Chai, H.J., Mustafa, A.M., Gilani, A.H., Mustafa, M.R. Mechanism of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**. 109: 388–393.
- Alarcón Alonso Javier. Evaluación del efecto diurético del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* L. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México, **2006**.
- Ali BH, Wabel NA, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: a review. *Phytotherapeutic Res*. **2005**. 19: 369-375.
- Ali, M.B., Salih, W.M., Mohamed, A.H., Homeida, A.M., . Investigation of the antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *Journal of Ethnopharmacology*. **1991**. 31: 249–257
- Anand IS, Kalra GS, Harris P, Anand IS, Kalra GS, Harris P, Poole-Wilson PA, Panzali A, De Giuli F, Ferrari R. Diuretics as initial and sole treatment in chronic cardiac failure. *Cardioscience*. **1991**. 2: 273–278.
- Argueta VA, Cano AL, Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la Medicinal Tradicional Mexicana. *Instituto Nacional Indigenista*. **1994**. 1: 274-275.
- Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl*. **2005**. 94: S14-18.
- Aviv A. Salt consumption, reactive oxygen species and cardiovascular ageing: A hypothetical link. *J. Hypertension*. **2002**. 20: 555–559.
- Babalola SO, Babalola AO, Awort OC. Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) *Journal of Food Technology Africa*. **2001**. 6: 133-134.
- Barden AE, Mahoney DP, Tunney AM, Vandongen R. Frusemide releases renin in the rat kidney when prostacyclin synthesis is suppressed. *Br. J. Pharmacol*. **1984**. 82: 493 – 499.

- Bassett MH, White PC & Rainey WE The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*.**2004**.217: 67–74.
- Bayliss J, Norell M, Canepa-Anson R, Sutton G, Poole-Wilson P. Untreated heart failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics. *Br. Heart J*. **1987**. 57:17–22.
- Berube D, Luu-The V, Lachance Y, Gagne R & Labrie F. Assignment of the human 3-hydroxysteroid dehydrogenase gene to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenetics and Cell Genetics*.**1989**.52: 199–200.
- Bird IM, Mason JI & Rainey WE Regulation of type 1 angiotensin II receptor messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical carcinoma H295 cells. *Endocrinology*.**1994**.134; 2468–2474.
- Bird IM, Pasquarrette MM, Rainey WE & Mason JI. Differential control of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells.*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.**1996**.81: 2171–2178.
- Birnbaum Y, Sclarvosky S, Ben-Ami R, et al. Polymorphous ventricular tachycardia early after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **1993**.71:745–9.
- Boiko NM, Tselevych MV, sanahurs Kyi DI. Effect of heavy metal cations on the activity of membrane Na⁺, K⁺ - ATPase in embryos of loach (*Misgurnus fossilis* L.).]. *Ukr Biokhim Zh*. **2004**. 76:2:59-63.
- Bradelin HA, Nase AI W, Bluden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Reseach*. **2005**.21, 360-375.
- Brickley D.R., Mikosz C.A., Hagan C.R., Conzen S.D. Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced Protein Kinase-1 (SGK1). *The Journal of Biological Chemistry*.**2002**. 277(45):43064-43070.
- Brilla C.G., Kramer B., Hoffmesietr H.M., Muller-Schauenburg W., Risler T., Sepel L. Low-dose enalapril in severe chronic heart failure. *Cardiovascular Drtugs and Theraphy***1989**. 3:211-218.
- Brunold C, Deters A, Knoepfel-sidler F, Hafner J, Muller B, Hensel A. Polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* flowers stimulate proliferation and differentiation of human keratinocytes. *Planta medica*.**2004**. 70:4:370-3.
- Buter H, Hemmelder MH, Navis G, de Jong PE, de Zeeuw D. The blunting of the antiproteinuric efficacy of ACE inhibition by high sodium intake can be restored by hydrochlorothiazide. *Nephrol. Dial. Transplant*.**1998**.13:1682–1685.

- Cáceres, A., Giron, L., Martinez, A. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. **1987**. 19:233–245.
- Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ & Parker KL Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *PNAS*. **1997**. 94 11540–11545
- Cataliotti A, Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Schirger JA, Tsuruda T, Heublein DM, Chen HH, Malatino LS, Burnett JC Jr. Brain natriuretic peptide enhances renal actions of furosemide and suppresses furosemide-induced aldosterone activation in experimental heart Failure. *Circulation*. **2004**. 109:1680–1685.
- Chau-jong W, Jin-ming W, Wea-lung L, Chia-Yih C, Fen-pi C, Tsui-Hwa T. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. **2000**. 38:411-416.
- Chen C, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, et al. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal Agric. Food Chem.* **2003**. 51:18:2472-7.
- Chobanian AV, Hill M. National Heart, Lung, and Blood Institute workshop on sodium and blood pressure. *Hypertension*. **2000**. 35:858–863.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. **2003**. 289:19:2560-72.
- Chomczynski P y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. **1987**. 162(1):156-159.
- Chua SC, Szabo P, Vitek A, Grzeschik KH, John M & White PC. Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *PNAS*. **1987**. 84: 7193–7197.
- Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM, White PC & Rainey WE Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Molecular Endocrinology*. **1997**. 11: 638 - 649.
- Cody RJ, Covit AB, Schaer GL, Laragh JH, Sealey JE, Feldschuh J. Sodium and water balance in chronic congestive heart failure. *J. Clin. Invest.* **1986**. 77:1441–1452.
- Cohen HW, Alderman MH. Low sodium diet after DASH: Has the situation changed? Dietary approaches to stop hypertension. *Curr Hypertens Rep*. **2002**. 4:329–332.
- Cohen N, Almoznino-Sarafian D, Zaidenstein R, Alon I, Gorelik O. Serum magnesium aberrations in furosemide

- (frusemide) treated patients with congestive heart failure: pathophysiological correlates and prognostic evaluation. *Heart*.**2003**. 89:411– 6.
- Coll AP, Challis BG, Yeo GS, Snell K, Piper SJ, Halsall D, Thresher RR & O’Rahilly S The effects of POMC deficiency on murine adrenal development and responsiveness to ACTH. *Endocrinology*.**2004**.145: 4721–4727.
- Collier JG, Robinson BF. Comparison of effects of locally infused angiotensin I and II on hand veins and forearm arteries in man: evidence for converting enzyme activity in limb vessels. *Clin. Sci. Mol. Med.* **1974**.47:189–192.
- Cooke BA. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*.**1999**.151: 25–35.
- Cozza EN, Vila MC, Acevedo-Duncan M, Farese RV & Gomez-Sanchez CE Treatment of primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells with adrenocorticotropin (ACTH) and phorbol esters: a comparative study of the effects on aldosterone production and ACTH signaling system. *Endocrinology*.**1990**. 126: 2169–2176.
- Croxson MS, Neutze JM, John MB. Exchangeable potassium in heart disease: long-term effects of potassium supplements and amiloride. *Am. Heart J.* **1972**.84:53 – 60.
- Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet*. **2001**. 357:1385–1390.
- Davidson C, Gillebrand IM. Use of amiloride as a potassium conserving agent in severe heart disease. *Br. Heart J.* **1973**. 35:456 – 461.
- Dormans TP, Pickkers P, Russel FG, Smits P. Vascular effects of loop diuretics. *Cardiovasc Res*.**1996**.32:988– 997.
- Down PF, Polak A, Rao R, Mead JA. Fate of potassium supplements in six outpatients receiving long-term diuretics for oedematous disease. *Lancet*.**1972**. 2:721–724.
- Dreifus LS, de Azevedo I, Watanabe Y. Electrolyte and antiarrhythmic drug interaction. *Am. Heart J.* **1974**. 88:95–107.
- Dyckner T, Wester PO. Plasma and skeletal muscle electrolytes in patients on long-term diuretic therapy for arterial hypertension and/or congestive heart failure. *Acta Med. Scand.* **1987**.222:231–236.
- Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, Williams GH. Relation of the renin– angiotensin–aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation*.**1981**. 63:645–651.

- Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA & Bornstein SR Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *PNAS*. **2003**.100: 14211–14216
- Falade OS, Otemuyiwa IO, Oladipo A, Oyedapo OO, Akinpelu BAA. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. *Journal ethnopharmacology*.**2005**. 102:15-22.
- Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin 1/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*.**2000**. 101:594–597.
- Fox KM. The European trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebocontrolled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*.**2003**.362: 782– 8.
- Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirilin PC, Nicklas J, Liang CS. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*.**1990**. 82:1724 – 1729.
- Francis G, Siegel M, Goldsmith S, Olivari M, Levine TB. Acute vasoconstrictor response to intravenous furosemide in patients with chronic congestive heart failure. *Ann Int. Med*. **1985**.103:1– 6.
- Frishman WH, Bryzinski BS, Coulson LR, et al. A multifactorial trial design to assess combination therapy in hypertension: treatment with bisoprolol and hydrochlorothiazide. *Arch Intern Med* **1994**.154:1461–8.
- Fuchs-Hammoser R, Schweiger M & Oelkers W. The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1–24) on renin, renin substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete man. *Acta Endocrinology (Copenhagen)* .**1980**. 95:198–206.
- Fujimoto S, Niisato N, Sugimoto T, Marunaka Y. Quercetin and NPPB-induced diminution of aldosterone action on Na⁺ absorption and ENaC expression in renal epithelium. *Biochem and Biophys Res. Comm*. **2005**.336: 401–407.
- Gansevoort RT, Wapstra FH, Weening JJ, de Jong PE, de Zeeuw D. Sodium depletion enhances the antiproteinuric effect of ACE inhibition in established experimental nephrosis. *Nephron*.**1992**.60.:246–247.
- Garcia-Robles, R., Villa, E., Serrano, J., Escobar-Morreale, H.F., Piedrola, G., Ruilope, L.M., Effects of L-arginine

- infusion on renal hemodynamics and sodium excretion during hypo-normo-, and hyperinsulinemia, as studied in dogs. *American Journal of Hypertension*. **1996**.9: 681–686.
- Gerber JG, Nies AS. Antihypertensive agents and the drugs therapy of hypertension. In: Goodman, GA Rall, TW Nies, AS Tylor, (Eds.) Goodman Gilman's. The pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-hill international Editions, Singapore **1992**.784-813.
- Goodfriend TL, Ball DL, Raff H, Bruder ED, Gardner HW & Spitteller G Oxidized products of linoleic acid stimulate adrenal steroidogenesis. *Endocrine Research*. **2002**.28: 325–330.
- Goodfriend TL & Calhoun DA Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy. *Hipertensión*. **2004**.43: 518–524.
- Graudal NA, Galløe AM, Garred P: Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterols and triglyceride. *JAMA*. **1998**. 279: 1383–1391.
- Grollman A. Biological assay of adrenal cortical activity. *Endocrinology*. **1941**. 9:855–861.
- Guo XH, Yap YG, Chen LJ, et al. Correlation of coronary angiography with “tombstoning” electrocardiographic pattern in patients after acute myocardial infarction. *Clin Cardio*. **2000**.23:347–52
- Haji Faraji M, Haji Tarkhani A. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**. 65(3):231-6.
- He XR, Greenberg SG, Briggs JP, et al. Effects of furosemide and verapamil on the NaCl dependency of macula densa-mediated rennin secretion. *Hypertension*. **1995**. 26:137–142.
- Heeg JE, de Jong PE, van der Hem GK, de Zeeuw D. Efficacy and variability of the antiproteinuric effect of ACE inhibition by lisinopril. *Kidney Int*. **1989**.36: 272–279.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. **2001**. 104:2673–2678.
- Herrera A.A., Flores R. S., Chavez S. MA., Tortoriello J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*. **2004**. 11:375-382.
- Herrera-Arellano, A., Miranda-Sánchez, J., Ávila-Castro, P., Herrera-Álvarez, S., Jiménez-Ferrer, J.E., Zamilpa, A., Román-Ramos, R., Ponce-Monter, H., Tortoriello, J.,. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with

- hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Medica*. **2007**:73, 6–12.
- Holland OB & Carr B Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology*. **1993**.132 :2666–2673.
- Hollenberg NK. Set point for sodium homeostasis: Surfeit, deficit, and their implications. *Kidney Int.* **1980**.17: 423–429.
- Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1g. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**. 290:69– 73.
- Ikram H, Chan W, Espiner EA, Nicholls MG. Hemodynamic and hormone responses to acute and chronic furosemide therapy in congestive heart failure. *Clin.Sci.***1980**. 59:443–9.
- Jorde UP, Vittorio T, Katz SD, Colombo PC, Latif F, Le Jemtel TH. Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. *Circulation*.**2002**.106:1055–1057.
- Jonadet M, Bastide J, Bastide P, Boyer B, Carnat AP, Lamaison JL. [In vitro enzyme inhibitory and in vivo cardioprotective activities of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.)]. *Journal Pharm. Belg.* **1990**. 45:2:120-4.
- Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*.**2004**. 109:2213–2220.
- Kirdpon, S., Nakorn, S.N., Kirdpon, W., Changes in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) juice. *Journal of the Medical Association of Thailand*.**1994**.77: 314–321.
- Knight RK, Miall PA, Hawkins LA, Dacombe J, Edwards CR. Relation of plasma aldosterone concentration to diuretic treatment in patients with severe heart disease. *Br. Heart J.***1979**. 42:316–325.
- Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group.N Engl J. Med.***1995**. 333:1670–1676.
- Kremer D, Boddy K, Brown JJ, Davies DL, Fraser R, Lever AF, Morton JJ. Amiloride in the treatment of primary

- hyperaldosteronism and essential hypertension. *Clin. Endocrinol.* **1977**. 7:151 – 157.
- Kubo SH, Clark M, Laragh JH, Borer JS, Cody RJ. Identification of normal neuroendocrine activity in mild congestive heart failure: a stimulating effect of upright posture and diuretics. *Am. J. Cardiol.* **1987**. 60: 1322–1328.
- Lachance Y, Luu-The V, Verrault H, Dumont M, Berube E, Lablanc G & Labrie F. Structure of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5,4 isomerase (3_HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA Cell Biology.* **1991**.10: 701–711.
- Lambeth JD, Seybert DW, Lancaster JR, Jr., Salerno JC & Kamin H Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **1982**. 45: 13–31.
- Laragh JH, Cannon PJ, Strason WB, et al. Physiologic and clinical observations on furosemide and ethacrynic acid. *Ann. NY Acad. Sci.* **1966**.139:453 – 465.
- Laragh JH, Sealey JE. K⁺ depletion and the progression of hypertensive disease or heart failure. The pathogenic role of diuretic-induced aldosterone secretion. *Hypertension.* **2001**. 37: 806 – 810.
- Lieberman S & Lin YY Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* **2001**.78: 1–14.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A & Miller WL Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* **1995**. 267,1828–1831.
- Lim P, Jacob E. Magnesium deficiency in patients on long-term diuretic therapy for heart failure. *Br. Med. J.* **1972**. 3:620 – 622.
- Lisenberg MJ. Magnesium deficiency and sudden death. *Am. Heart J.* **1992**. 124:544– 9.
- Liu CL, Wang JM, Chu CY, Cheng MT, Tseng TH. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* **2002** 40:635 - 641.
- MacKenzie SM, Fraser R, Connell JMC & Davies E a Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *Journal of the Renin – Angiotensin –Aldosterone System.* **2002**. 3:214–221.
- Mason JI The 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzymes. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* **1993**.4: 199–203

- Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC. Department of Veterans Affairs singledrug therapy of hypertension study. Revised figures and new data. *Am J Hypertens* **1995**.8:189–92.
- McAllister JM & Hornsby PJ Dual regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 alpha-hydroxylase, and dehydroepiandrosterone sulfotransferase by adenosine 3',5'-monophosphate and activators of protein kinase C in cultured human adrenocortical cells. *Endocrinology* **1988**.122: 2012–2018
- McKay, D.L., Chen, C.Y., Saltzman, E., Blumberg, J.B., *Hibiscus sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *Journal of Nutrition*. **2010**.140: 298–303.
- Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation*. **2001**.103:72–77.
- Mojiminiyi, F.B.O., Adegunloye, B.J., Egbeniyi, Y.A., Okolo, R.U.,. An Investigation of the diuretic effect of an aqueous extract of the petals of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. **2000**.2:, 77–80.
- Mornet E, Dupont J, Vitek A & White PC Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *Journal of Biological Chemistry*. **1989**. 264: 20961–20967.
- Napathorn, S., Chaiyabutr, N., Buranakarl, C., Pansin, P., Pochanugool, C., Sridama, V., Sitprija, V., . Effects of acute arginine loading on renal and systemic hemodynamics in dogs. *Nephron* **1992**.60: 220–225.
- Navis G, Jong P, Donker AJ, Van der Hem GK, de Zeeuw D. Diuretic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition: comparison of low and liberal sodium diet in hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1987**.9:743 – 748.
- Noda Y, Fukiyama K, Kumamoto K, Takishita S, Eto T, Kawasaki T, Omae T. Renin response to furosemide differs with the routes of administration in healthy men. *Jpn. J. Circ.* **1982**. 46:552–558.
- Odigie IP, Ettarh R, Adigun S. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa*. attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of ethnopharmacology*. **2003**. 86:181-185.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Alvarez, L., . Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by anthocyanins dephinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**.128: 7L 10.

- Onyenekwe, P.C., Ajani, E.O., Ameh, D.A., Gamaniel, K.S.,. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*.**1999**.17: 199–206.
- Orisakwe OE, Husaini DC,Afonne OJ. Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. *Reprod. Toxicol*.**2004**.18:(2): 295-8.
- Passmore AP, Whitehead EM. Comparison of the acute renal and peripheral vascular responses to frusemide and bumetanide at low and high dose.*Br. J. Clin Pharmacol*. **1989**. 27:305–12.
- Patel HP, Mitsnefes M. Advances in the pathogenesis and management of hypertensive crisis.*Curr Opin Pediatr*. **2005**.17:210-214.
- Paula RB, da Silva AA & Hall JE. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension*.**2004**.43: 41–47.
- Pearce D SGK1 regulation of epithelial sodium transport.*Cellular Physiology and Biochemistry*. **2003**.13:13–20.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N. Engl J. Med*. **1992**. 327: 669 – 677.
- Picketing TG.Optimal blood pressure levels.*Am. J. Hypertension*.**1998**. 11:877-878.
- Prasongwatana, V., Woottisin, S., Sriboonlue, P., Kukongviriyapan, V. Uricosuric effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal-stone former subjects. *Journal of Ethnopharmacology*.**2008**.117: 491–495.
- Quinn SJ & Williams GH.Regulation of aldosterone secretion.*Annual Review of Physiology*.**1988**. 50: 409–426.
- Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*.**2002**. 105:2212 – 2216.
- Rama, Ting Zhang, J. Wang, A Vandewalle, David Pearce. A Novel Role for Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Protein in Epithelial Sodium Channel-mediated Sodium Transport. *J. Biol. Chem*. **2005**. 2: 280(48):39970-81.
- Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Cullens M & Hinton D. Diurnal patterns of blood pressure, heart rate and vasoactive hormones in normal man.*Clinical and Experimental Hipertensi3n*.**1986**.8: 153–166.
- Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in

- stroke-prone hypertensive rats. *Hipertensión*.**1998**. 31:451– 8.
- Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*.**2002**. 143:4828– 4836.
- Rojas R, Palma O, Quintana I). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Ed: Olaiz G, Rivera J, Shamah R, Rojas R, Villalpando S, Hernández M. y Seppulveda J. *Instituto Nacional de Salud Pública*.**2006**. Pp. 80-82; México.
- Rossier BC, Palmey LG. Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by D. W. Seldin and G. Giebisch. Raven. **1992**. 1373–1409.
- Ruiz, M., Singh, P., Thomson, S.C., Munger, K., Blantz, R.C., Gabbai, F.B.,. I-Arginine-induced glomerular hyperfiltration response: the roles of insulin and ANG II. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.*American Journal of Physiology*.**2008**.294: R1744–R1751.
- Saadany SS, Sitohy MZ, Labib SM, el-Massry RA. Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Nahrung*.**1991**. 35(6):567-76.
- Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G.T.,. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasma membrane caveolae. *Journal of Biological Chemistry*.**1996**.271: 6518–6522.
- Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* in Rats. *Phytotherapy research*.**2002**. 16:283-285.
- Samani NJ Extrarenal renin-angiotensin systems. In *Textbook of Hypertension*.**1994**.pp 253–272. Ed JD Swales. Oxford: Blackwell Scientific Publications.;
- Shah SU, Anjum S, Littler WA Use of diuretics in cardiovascular disease: (2) *hypertension*. *Postgrad, Med. J*; **2004**.80:271-276.
- Shinzawa K, Ishibashi S, Murakoshi M, Watanabe K, Kominami S, Kawahara A & Takemori S. Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450(17)alpha, lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. *Journal of Endocrinology*.**1988**.119: 191–200.
- Simard J, Couet J, Durocher F, Labrie Y, Sanchez R, Breton N, Turgeon C & Labrie F. Structure and tissue-specific expression of a novel member of the rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta- HSD) family. The exclusive 3 beta-HSD gene expression in the skin. *Journal of Biological Chemistry*.**1993**. 268: 19659–19668.

- Spat A & Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiological Reviews*. **2004**. 84: 489–539
- Spat A. Glomerulosa cell—a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2004**. 217: 23–26.
- Stocco DM a StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology* **2001**. 63: 193–213.
- Struthers AD. Aldosterone: cardiovascular assault. *Am. Heart J.* **2002**. 144:2–7.
- Tait SA, Tait JF & Coghlan JP. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2004**. 217: 1–21.
- Tseng E, Kao C, Chu F, Wu L, Wang J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. **1997**. 35: 1159-1164.
- Tseng TH, Kao TW, Chu CY, Chou FP, Lin WL, Wang CJ. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol.* **2000**. 60:307-315.
- Tsuji H, Venditti FJ, Evan JC, Larson MG, Levy D. The association of levels of serum potassium and magnesium with ventricular premature complexes (the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **1994**. 74:232–235.
- Uday B, Kausik B, Ratna C, Debashis B, Ishita C, Chayan Kumar G. Gastroprotective effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract: Possible involvement of H⁺-K⁺-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. *Life Sciences*. **2002**. 71: 2845–2865.
- Van Kats JP, Duncker DJ, Haitsma DB, Schuijt MP, Niebuur R, Stubenitsky R, Boomsma F, Schalekamp MA, Verdouw PD, Danser AH. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation*. **2000**. 102:1556–1563.
- Van Kraaij DJ, Jansen RW, Sweep FC, Hoefnagels WH. Neurohormonal effects of furosemide withdrawal in elderly heart failure patients with normal systolic function. *Eur. J. Heart Fail.* **2003**. 5:47– 53.
- Van Zwieten PA. Neuroendocrine effects of diuretics in heart failure. *Br. Heart J.* **1994**. 72:51 – 53
- Villarreal E, Mathew A, garza ME, Nuñez G, Salinas AM, Gallegos Costo de la atención de la hipertensión arterial por su impacto en el presupuesto destinado a salud en México. *Salud Pública de México.* **2002**: 44:7-13)

- Vinson GP Adrenocortical zonation and ACTH. *Microscopy Research and Technique*.**2003**.61: 227–239.
- Vogt L, Kocks MJA, Laverman GD. Renoprotection by blockade of renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic and non-diabetic chronic kidney disease. *Minerva Med*. **2004**. 95:395-409.
- Wagner M, Ge Y & Siciliano Wells D A hybrid cell mapping panel for regional localisation of probes to human chromosome 8. *Genomics*.**1991**.10:114–125.
- Westendorp B, Schoemaker RG, van Gilst WH, vanVeldhuisen D J, Buikema H. Hydrochlorothiazide increases plasma or tissue angiotensin-convertingenzyme-inhibitor drug levels in rats with myocardial infarction:Differential effects on lisinopril and zofenopril. *Eur. J. Pharm*. **2005**. 527:141–149.
- White PC, New MI & Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes.PNAS.**1986**; 83 5111–5115.
- Yoshida A, Nishikawa T, Tamura Y & Yoshida S ACTH-induced inhibition of the action of angiotensin II in bovine zona glomerulosa cells. A modulatory effect of cyclic AMP on the angiotensin II receptor.*Journal of Biological Chemistry*.**1991**. 266: 4288–4294.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients.The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med*. **2000**.342: 145– 153.