



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

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

**Efecto de *Ocimum basilicum* y *Ocimum selloi* sobre el daño vascular cerebral
en un modelo de hipertensión arterial crónica**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud**

PRESENTA

M. en C. Elian Yuritzí Alegría Herrera

Comité tutorial:

Codirector Interno: Dr. Rubén Román Ramos

Codirector Externo: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Asesor: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

CIUDAD DE MÉXICO

21 Febrero, 2020



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

La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Elian Yuritzi Alegría Herrera, recibió beca CONACyT de septiembre 2015 a agosto del 2019, con número de registro **273527**



La presente investigación fue aprobada por la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro:

R-2016-1702-2

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis:

Efecto de *Ocimum basilicum* y *Ocimum selloi* sobre el daño vascular cerebral en un modelo de hipertensión arterial crónica

Que presentó:

M en C. Elian Yuritzi Alegria Herrera, el 21 febrero del 2020.

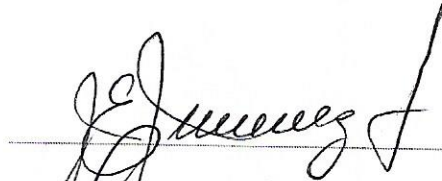
Jurado:

Firmas:

Codirector interno: Dr. Rubén Román Ramos.
Profesor-Investigador Titular C.
Depto. Ciencias de la Salud. DCBS, UAM-I



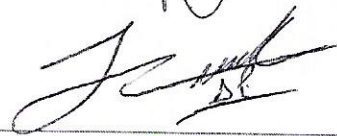
Codirector externo: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer.
Investigador Titular D. Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS.



Asesor: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz.
Investigador Titular B. Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS.



Sinodal: Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.
Profesor-Investigador Titular C.
Depto. Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I



Sinodal: Dr. Francisco Javier Alarcón. Aguilar.
Profesor-Investigador Titular C.
Depto. Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I.



DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A mis directores de Tesis: Dr. Rubén Román Ramos, Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer y a la Dra. Maribel L. Herrera Ruiz, por su apoyo y dedicación no sólo al proyecto de doctorado, sino que también por sus consejos y cariño.

Al Dr. Alejandro Flores Palacios, M. en C. Elizabeth Victoriano Romero y al Instituto Nacional de Ecología (INECOL), por el apoyo brindado en la obtención del material vegetal.

A mis amigos y compañeros del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS).

A todos los que participaron de manera directa o indirecta en este proyecto, por su tiempo y comentarios en cada seminario, que sin lugar a duda enriquecieron el presente trabajo.

“Las cuatro virtudes cardinales: prudencia, justicia, fortaleza y templanza. Se suponen tres ojos a la prudencia: con uno mira al pasado para sacar un recuerdo provechoso; con el otro al presente, para no equivocarse al tomar una determinación; y con el otro al porvenir, para evitar a tiempo el mal y prepararse para el bien” (Divina comedia; El Purgatorio, Dante Alighieri).

“Si sólo haces lo que ya sabes hacer, no vas a llegar a ser más de lo que eres hoy”.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Función endotelial en la regulación de la presión arterial	1
1.2 Presión arterial (PA)	2
1.2.1 Regulación local de la PA	2
1.2.2 Regulación extrínseca de la PA: Sistema nervioso simpático	3
1.3 Reflejo vascular	3
1.4 Regulación hormonal: Sistema renina angiotensina aldosterona	5
1.5 Angiotensina II y su papel en la fisiopatología vascular	9
1.6 Disfunción endotelial y generación de micropartículas endoteliales	10
1.7 Disfunción endotelial e hipertensión arterial	14
1.8 Tratamiento farmacológico para HTA	16
1.9 Tratamiento no farmacológico para HTA	19
1.10 Modelos animales experimentales de hipertensión	19
1.11 Modelos biológicos para evaluar deterioro cognitivo, exploración motora y ansiedad	22
1.11.1 Laberinto acuático de Morris	22
1.11.2 Ensayo de actividad exploratoria: Prueba de campo abierto	23
1.11.3 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)	23
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Plantas medicinales utilizadas para el control de la presión arterial: Género <i>Ocimum</i>	24
2.1.1 <i>Ocimum basilicum</i> Linn	26
2.1.2 Ácido fenólico: ácido rosmarínico	27
2.1.3 <i>Ocimum selloi</i> Benth	29
3. JUSTIFICACIÓN	30

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	31
5. HIPÓTESIS	31
6. OBJETIVO GENERAL	32
7. OBJETIVOS PARTICULARES	32
8. MATERIALES Y MÉTODOS	33
8.1 Obtención de material vegetal	33
8.2 Preparación de los extractos	33
8.3 Caracterización de extractos orgánicos	33
8.4 Animales de laboratorio	34
8.5 Modelo de daño vascular inducido por administración crónica de angII	35
8.6 Pruebas conductuales	36
8.6.1 Laberinto acuático de Morris (LAM)	36
8.6.2 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)	37
8.6.3 Prueba de campo abierto (CA)	38
8.7 Permeabilidad vascular por método de azul de Evans	38
8.8 Cuantificación de citocinas y corticosterona por método de ELISA	39
8.9 Aislamiento de micropartículas endoteliales	39
8.10 Tinción de micropartículas endoteliales (MPE)	39
8.11 Análisis estadístico	40
9. RESULTADOS	41
9.1 Rendimiento y análisis cromatográfico de los extractos orgánicos de <i>Ocimum basilicum</i> y <i>Ocimum selloi</i>	41
9.2 Pruebas biológicas	44
9.2.1 Modelo de HTA	44
9.3 Pruebas conductuales	46
9.3.1 Laberinto acuático de Morris	46

9.3.2 Laberinto elevado en forma de cruz	47
9.3.3 Campo abierto	49
9.4 Extravasación azul de Evans	50
9.5 Cuantificación por ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA)	50
9.5.1 Corticosterona	50
9.5.2 Citocinas (TNF α , IL1, IL6, IL4, IL10, TFG β) y quimiocina (MCP1)	51
9.6 Cuantificación de MPE por citometría de flujo	59
10. DISCUSIÓN	63
11. CONCLUSIONES	73
12. PERSPECTIVAS	74
13. LITERATURA CONSULTADA	75
14. ANEXOS.	
Glosario	VII
Abreviaturas	VIII
Tablas	XIV
Figuras	XV
Integración de resultados	87
Carta de comité de ética	89
Publicación	91

GLOSARIO

Caracterización: Acción y efecto de caracterizar o caracterizarse. Designar con una marca característica. Determinar los atributos peculiares de alguien o de algo, de modo que claramente se distinga de los demás.

Daño: Se entiende como a todos los posibles cambios en el estado de salud que son consecuencia de la exposición a factores de riesgo o de la manera en que es abordado un problema de salud (los más estudiados son la enfermedad y muerte).

Endotelio: Capa sencilla de células, de origen mesodérmico, estrechamente unidas, que recubre las superficies internas de un cuerpo como en el caso de los vasos sanguíneos y linfáticos, el corazón y otras cavidades llenas de líquido.

Estandarización de productos a base de hierbas: se define como el proceso de prescribir un conjunto de estándares o características inherentes, parámetros constantes, valores cualitativos y cuantitativos definitivos que llevan a un aseguramiento de la calidad, la eficacia, la seguridad y la reproducibilidad. Es el proceso de desarrollar y acordar estándares técnicos. Los estándares específicos se resuelven por la experimentación y observaciones. Por lo tanto, la estandarización es una herramienta clave en el proceso de control de calidad.

Estrés tangencial vascular (*shear stress*): se define como la fuerza, por unidad de área, que el flujo sanguíneo ejerce en la pared vascular, y depende de la viscosidad sanguínea y del perfil de velocidad del flujo sanguíneo.

Nootrópico: se deriva de la palabra griega para “mente”, que es “*nos*”. Los medicamentos nootrópicos están destinados a mejorar la función cognitiva, ya sea en individuos con trastornos neurológicos y psiquiátricos que incluyen síntomas como pérdida de memoria, o en individuos sanos que buscan aumentar su función cognitiva más allá del nivel normal.

Órgano blanco: todo órgano que sufre algún grado de deterioro a consecuencia de enfermedades crónicas no transmisibles, entre las que se encuentran la hipertensión arterial, en el corto, mediano o largo plazo (cerebro, corazón, riñón y el lecho arterial, incluido el de los ojos).

Reacción Adversa Medicamentosa: Según la Organización Mundial de la Salud es “cualquier efecto nocivo, no deseado, no intencional de una droga, que aparece a dosis utilizadas en humanos con fines profilácticos, diagnósticos o terapéuticos”.

ABREVIATURAS

%NA: Porcentaje de número de entrada a los brazos abiertos	LEC: Laberinto elevado en forma de cruz
%TA: Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos	MCP1: Proteína quimiotáctica de monocitos uno
AngII: Angiotensina II	Ob-AEt: Extracto de acetato de etilo de <i>Ocimum basilicum</i>
ANOVA: Análisis de varianza	Ob-HA: Extracto hidroalcohólico de <i>O. basilicum</i>
AR: ácido rosmarínico	Os-AEt: Extracto de acetato de etilo de <i>O. selloi</i>
CA: Campo abierto	Os-HA: Extracto hidroalcohólico de <i>O. selloi</i>
CT: Cruces totales	PAD: Presión arterial diastólica
DE: Desviación estándar	PAS: Presión arterial sistólica
DE50: Dosis efectiva cincuenta	Tel: Telmisartán
Dzp: Diazepam	TGF β : Factor de crecimiento transformante beta-1
EE: Error estándar	TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
ELISA: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas	UV: Ultravioleta
Emáx: Efecto máximo	Veh: Vehículo
EV: Elevamientos verticales	vo: vía oral
EVC: Enfermedad vascular cerebral	CLAR: Cromatografía líquida en alta resolución
Gal: Galantamina	UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México
HTA: Hipertensión arterial	INECOL: Instituto de ecología
IL10: Interleucina diez	RMN: Resonancia magnética nuclear
IL1 β : interleucina uno beta	
IL4: Interleucina cuatro	
IL6: Interleucina seis	
ip: intraperitoneal	
LAM: Laberinto acuático de Morris	

UNIDADES

cm: centímetros	mM: milimol
g: gramos	nm: nanometros
hr: hora	pg: picogramos
Kg: kilogramos	s: segundos
mg: miligramos	mmHg: milímetros de mercurio
min: minutos	xg: fuerza g (medida de aceleración)
mL: mililitro	

INDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Moléculas producidas por el endotelio.	1
Tabla 2. Receptores que regulan la respuesta a los cambios de la presión arterial.	4
Tabla 3. Marcadores endoteliales utilizados para identificar a las MPE.	13
Tabla 4. Valores de referencia para la presión arterial sistémica.	15
Tabla 5. Clasificación de tratamientos antihipertensivos y sus efectos adversos reportados.	18
Tabla 6. Clasificación de modelos animales para la investigación sobre hipertensión.	20
Tabla 7. Modelos experimentales de disfunción endotelial e hipertensión, utilizados en el Centro de Investigación Biomédica del Sur.	21
Tabla 8. Comparación de la presencia de aceites esenciales de especies del género <i>Ocimum</i> .	25
Tabla 9. Datos de la colecta de las especies del género <i>Ocimum</i> .	33
Tabla 10. Gradiente de elución utilizado en el CLAR.	34
Tabla 11. Fármacos utilizados en el modelo de HTA crónica inducida con angII 0.2 µg/Kg	35
Tabla 12. Rendimiento en la obtención de los extractos hidroalcohólicos y orgánicos de <i>O. basilicum</i> y de <i>O. selloi</i> .	41
Tabla 13. Tiempo de retención, longitud de onda máxima absorción en la región visible ($\lambda_{\text{máx}}$) e identificación tentativa de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de <i>O. basilicum</i> y <i>O. selloi</i> .	43
Tabla 14. Cuantificación de ácido rosmarínico en los extractos de las especies de <i>Ocimum</i> .	44
Tabla 15. $E_{\text{máx}}$ y DE_{50} de ácido rosmarínico en la prueba de LEC.	49
Tabla 16. Efecto de los diferentes tratamientos en la prueba de campo abierto.	49
Tabla 17. $E_{\text{máx}}$ y DE_{50} del AR en la prueba de campo abierto.	50
Tabla 18. Efecto de los tratamientos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.	50
Tabla 19. Parámetros de $E_{\text{máx}}$ y DE_{50} del AR en la concentración de corticosterona sérica.	51
Tabla 20. Concentración de TGF β (pg/mg de proteína) a nivel sistémico.	58
Tabla 21. Efecto máximo ($E_{\text{máx}}$) y dosis efectiva 50 (DE_{50}) del ácido rosmarínico en la modulación de las citocinas pro- y anti-inflamatorias a nivel sistémico.	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Renina Angiotensina aldosterona (SRAA). Modificado de Guyton 2016.	5
Figura 2. Receptor AT1.	6
Figura 3. Esquema cerebral de un mamífero en donde se muestran en zonas con alta concentración de AT1r.	7
Figura 4. Efectos de angII.	9
Figura 5. Papel propuesto por Harrison et al., 2012, de las células T y la inflamación en la hipertensión.	11
Figura 6. Mecanismos esquemáticos de la formación de micropartículas endoteliales (EMP) inducidas por toxinas urémicas.	12
Figura 7. a) Regulación neuroinmunoendocrina ante el estrés crónico. b) IL1 media los efectos perjudiciales del estrés en la memoria.	16
Figura 8. Clasificación taxonómica de <i>Ocimum basilicum</i> .	26
Figura 9. Estructura del ácido rosmarínico.	28
Figura 10. Clasificación taxonómica de <i>Ocimum selloi</i> .	29
Figura 11. Línea temporal del desarrollo del modelo de daño cerebrovascular asociado por HTA crónica-inducida con angII.	36
Figura 12. Protocolo para el Laberinto acuático de Morris.	37
Figura 13. Aparato de campo abierto.	38
Figura 14. Línea del tiempo en la evaluación de extravasación con azul de Evans.	38
Figura 15. Perfil cromatográfico de los extractos Oba-HA (3mg/mL), Oba-AEt (0.75mg/mL), Ose-HA (3 mg/mL) y Ose-AEt (3mg/mL).	41
Figura 16. Monitoreo de la presión arterial en el modelo de hipertensión crónica con angII.	45
Figura 17. Efecto de los tratamientos experimentales administrados en el modelo de hipertensión arterial.	45
Figura 18. Efecto de los tratamientos en la latencia hacia la plataforma en la prueba de laberinto acuático de Morris.	46
Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos, en el tiempo sobre la zona de la plataforma (A, B) y en el número de cruces sobre la zona de la plataforma (C, D) en LAM.	47
Figura 20. Evaluación de los tratamientos en LEC.	48
Figura 21. Evaluación de las diferentes dosis de AR (0.39 a 6.24 mg/Kg) en LEC.	48
Figura 22. Concentración de corticosterona al final del experimento 12 semanas.	51

Figura 23. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en riñón izquierdo (pg/mg de proteína).	53
Figura 24. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en riñón derecho (pg/mg de proteína)	55
Figura 25. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en cerebro (pg/mg de proteína).	57
Figura 26. Poblaciones de MPE analizadas por citometría de flujo.	59
Figura 27. Poblaciones de MPs marcadas con anexina V-FITC, CD105-PECy7 y CD31-APC.	61
Figura 28. Poblaciones de MPs marcadas con anexina V-FITC, CD105-PECy7 y CD146-APC.	62
Figura 29. Integración de resultados.	87

RESUMEN

Introducción: Existen estudios que demuestran que la disfunción endotelial (DE) es un posible mecanismo que produce hipertensión arterial (HTA), mientras que otros han demostrado que la HTA per se produce daño endotelial. Ante la existencia de varias condiciones clínicas asociadas a DE, la protección del endotelio ha cobrado gran interés para el desarrollo de fármacos antihipertensivos que mejoren la función endotelial, más allá de la reducción de la presión arterial (PA). Los niveles de micropartículas circulantes se elevan en diversas enfermedades cardiovasculares. Su mayor nivel en plasma se considera un biomarcador de alteración en la función vascular. Las micropartículas endoteliales (MPE), descritas como vesículas (0.1 a 1.0 μm), se liberan en respuesta a la activación o apoptosis de las células endoteliales. Las MPE poseen efectos fisiológicos y patológicos y pueden promover estrés oxidante e inflamación vascular. La liberación de MPE se desencadena por algún inductor, como la angiotensina II (angII), el lipopolisacárido o el peróxido de hidrógeno. En los modelos animales de HTA se ha encontrado que la relajación dependiente del endotelio está reducida, posiblemente por defectos en la síntesis, liberación, inactivación del óxido nítrico (NO), o por alteraciones de producción o expresión de factores constrictores de origen endotelial. El control a largo plazo de la PA está íntimamente relacionado con la homeostasis del volumen de líquido en el organismo, que está determinada por el balance entre la ingestión y la eliminación de líquidos, una función que es realizada por varios mecanismos de control como los nerviosos, hormonales y renales, que regulan la excreción de sal y agua.

Las características dominantes de la HTA en México requieren usualmente la aplicación de dos o más medicamentos y obligadamente la indicación de cambios en el estilo de vida. En la población general si la meta no se alcanza en un mes de tratamiento, se debe aumentar la dosis, o bien agregar un segundo fármaco. Si bien ayudan a controlar los síntomas relacionados con la enfermedad, también les generan efectos adversos, ya que al llegar al torrente sanguíneo éstos actúan en más de un sitio en el organismo; como consecuencia, los pacientes optan por abandonar el tratamiento, lo que deriva a una HTA resistente o incontrolada.

Se han buscado alternativas en diferentes áreas de investigación, cuyo fin es lograr la generación de fármacos capaces de actuar en la prevención, regresión y remediación de estas afecciones. Entre las distintas prácticas complementarias utilizadas y difundidas a través de la cultura popular, las plantas medicinales siempre ocupan lugar destacado y durante mucho

tiempo fue el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas. Tal es el caso de las especies contenidas en el género *Ocimum*, que han sido utilizadas tanto con fines culinarios como curativos. Además, reportes farmacológicos señalan que tienen efecto sobre el sistema cardiovascular, son fuente de agentes antioxidantes e incluso se les ha demostrado que inhiben enzimas relacionadas con la HTA, como la enzima convertidora de angII (ECA).

Objetivo general: Demostrar el efecto antihipertensivo de *Ocimum basilicum*, *Ocimum selloi* y del ácido rosmarínico, y su potencial efecto sobre las comorbilidades asociadas; daño a órgano blanco, inflamación, déficit cognitivo y estrés conductual.

Materiales y métodos: Con hojas secas de *O. basilicum* y *O. selloi* se obtuvieron dos extractos etanólicos (60%) que fueron separados con acetato de etilo (fracciones de *O. basilicum* (Ob-AEt) y *O. selloi*: Os-AEt). Dado que ambas contienen ácido rosmarínico (AR), este compuesto se utilizó como referencia.

Se utilizaron ratones ICR (n=12; 35 g. NOM-062-ZOO-1999). El modelo de hipertensión consistió en la administración de angII (0.2 µg/Kg ip n=12 por grupo) durante 12 semanas. En la semana 6 se inició la administración de los tratamientos; vehículo (tween20 1%), telmisartán (10 mg/Kg), diazepam (0.25 mg/Kg), galantamina (0.2 mg/Kg), Ob-AEt (25 mg/Kg), Os-AEt (25 mg/Kg) y AR (0.39, 0.78, 1.56, 3.12 y 6.24 mg/Kg). La PA se midió a las 0, 6 y 12 semanas del experimento. Posteriormente los animales se sometieron a pruebas conductuales: laberinto acuático de Morris (LAM; memoria,), laberinto elevado en cruz (LEC; ansiedad), campo abierto (CA; coordinación motora). Al finalizar las pruebas conductuales se sacrificaron por dislocación cervical para obtener: cerebro y riñones para cuantificación de citocinas, y muestras sanguíneas para la cuantificación corticosterona (ELISA) y MPE (citometría de flujo).

Resultados: En el presente trabajo, la administración de angII a 0.2 µg/kg ip durante 12 semanas activó la respuesta inflamatoria mediada por citocinas, principalmente por IL1β, IL6, TNFα y la quimiocina MCP1; a su vez disminuyó la actividad de citocinas antiinflamatorias como IL4, IL10 y TGFβ. La angII provocó hipertensión y ansiedad, actuando sobre receptores AT1 distribuidos a lo largo del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), incrementando los niveles de corticosterona. Al observar el comportamiento de los animales en los diferentes

modelos conductuales, se observó un efecto ansiogénico en el grupo que recibió vehículo, presentando disminución en el número de entradas y tiempo en brazos abiertos (NA y TA) en el LEC. Este efecto fue contrarrestado de forma dosis-dependiente con AR: Emáx=63.69%, DE50=0.23 mg/Kg, para NA; Emáx=59.17 %, DE50=0.15 mg/Kg para TA.

Al administrar Oba-AEt y Ose-AEt, y algunas dosis de AR, el daño causado por angII se detuvo al restablecer los niveles de corticosterona sérica y disminuir las citocinas proinflamatorias y MCP-1. Ob-AEt, Os-AEt y AR protegieron contra el incremento en el estrés tangencial vascular (shear stress) generado por angII, ya que se observó un decremento significativo de las poblaciones de MPE AnexinaV⁺/CD105⁺/CD31⁺ y AnexinaV⁺/CD105⁺/CD104⁺.

Conclusión: En el presente trabajo se reporta que los extractos obtenidos a partir de *O. basilicum* y *O. selloi* poseen efecto antiinflamatorio (cerebral y renal), antihipertensivo, ansiolítico, nootrópico, no modifican la conducta motora, además, previenen la disfunción endotelial generada por la administración crónica de angII.

El abordaje de la HTA es y será siempre multidisciplinario. La necesidad de controlar la PA, así como la inhibición de las acciones de la angII continúa siendo uno de los objetivos primordiales en la terapéutica cardiovascular, que intenta controlar las consecuencias a largo plazo de la HTA, lo que ha planteado una interesante evolución hacia la prevención en estos pacientes de alto riesgo, mediante el desarrollo de nuevos medicamentos, dispositivos y procedimientos que están diseñados para tratar la hipertensión y sus comorbilidades.

ABSTRACT

Introduction: There are studies that show that endothelial dysfunction (ED) is a possible mechanism that produces high blood pressure, while others have shown that HBP generates endothelial damage. Given the existence of several clinical conditions associated with ED, the protection of the endothelium has gained great interest in the development of antihypertensive drugs that improve endothelial function beyond the reduction of blood pressure (BP). Circulating microparticle levels rise in various cardiovascular diseases. Its highest level in plasma is considered a biomarker of alteration in vascular function. The endothelial microparticles (EMP) described as vesicles (0.1 to 1.0 μm), are released in response to the activation or apoptosis of the endothelial cells. EMPs have physiological and pathological effects and can promote oxidative stress and vascular inflammation. The release of EMP is triggered by inducers such as angiotensin II (angII), lipopolysaccharide or hydrogen peroxide. In animal models of hypertension, it has been found that endothelium-dependent relaxation is reduced, possibly due to defects in the synthesis, release, inactivation of nitric oxide (NO), or by alterations in the production or expression of constrictor factors of endothelial origin. The long-term control of BP is closely related to homeostasis of the volume of fluid in the body, which is determined by the balance between ingestion and elimination of fluids, a function that is performed by various control mechanisms such as nervous, hormonal and by the local systems in the kidneys, which regulate the excretion of salt and water.

The dominant characteristics of hypertension in Mexico usually require the application of two or more medications and the indication of changes in lifestyle. In the general population if the goal is not reached within a month of treatment, the dose should be increased, or a second drug added. Although they help control the symptoms related to the disease, they also generate adverse effects, since when they reach the bloodstream, they act in more than one place in the body; as a consequence, patients choose to abandon treatment, which leads to resistant or uncontrolled hypertension.

Alternatives have been sought in different areas of research, whose purpose is to achieve the generation of drugs capable of acting in the prevention, regression and remediation of these conditions. Among the different complementary practices used and disseminated through popular culture, medicinal plants always occupy a prominent place and for a long time it was the main therapeutic resource used to treat the health of people. Such is the case of the species

contained in the *Ocimum* genus, which have been used for both culinary and curative purposes. In addition, pharmacological reports indicate that they influence the cardiovascular system, are a source of antioxidant agents and have even been shown to inhibit hypertension-related enzymes (ACE; angII converting enzyme).

Main objective: Demonstrate the antihypertensive effect of *Ocimum basilicum*, *Ocimum Selloi* and rosmarinic acid, as well as its effect on the associated comorbidities; damage to target organ, inflammation, cognitive deficit and behavioral stress.

Materials and methods: With dry leaves of *O. basilicum* and *O. selloi*, two ethanolic extracts (60%) were obtained which were separated with ethyl acetate (fractions of *O. basilicum*: Ob-AEt, and *O. selloi*: Os-AEt), both containing rosmarinic acid (RA), so it was used as a reference.

ICR mice (n = 12; 35 g. NOM-062-ZOO-1999) were used. The hypertension model consisted in the administration of angII (0.2 µg/kg ip n = 12 per group) for 12 weeks, in the 6th week of the administration all of the treatments began; vehicle (tween20 1%), telmisartan (10 mg/kg), diazepam (0.25 mg/kg), galantamine (0.2 mg/kg), Ob-AEt (25 mg/kg), Os-AEt (25 mg/kg), RA (0.39, 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg/Kg). The BP was monitored at 0, 6 and 12 weeks of the model. Subsequently, the animals underwent behavioral tests: water Morris maze (WMM; memory), elevated plus maze (EPM; anxiety), and open field (OF; motor coordination). At the end of the behavioral tests, they were sacrificed by cervical dislocation to obtain brain and kidneys for cytokine quantification, blood samples for corticosterone quantification (ELISA, and EMP (flow cytometry).

Results: In the present work, the administration of angII at 0.2 µg/kg ip for 12 weeks, activated the inflammatory response mediated by cytokines, mainly by IL1β, IL6, TNFα and chemokine MCP1, in turn decreased the activity of anti-inflammatory cytokines like IL4, IL10 and TGFβ. The angII caused hypertension and anxiety, acting on AT1 receptors distributed along the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, generating increased corticosterone. In the different behavioral models, an anxiogenic effect was observed in the vehicle group, there was a decrease in the number of entries and time in open arms (EOA and TOA) in EPM. This effect was counteracted in a dose-dependent manner with RA: Emax = 63.69%, ED50 = 0.23 mg/Kg, for EOA; Emax = 59.17%, ED50 = 0.15 mg/Kg for TOA.

When administering Oba-AEt and Os-AEt, and some doses of RA, the damage caused by angII was stopped by restoring serum corticosterone levels and decreasing proinflammatory cytokines and MCP-1. Ob-AEt, Os-AEt and AR, protected against the increase in vascular tangential stress (shear stress) generated by angII, since a significant decrease was observed in the populations of MPE AnnexinV⁺/CD105⁺/CD31⁺ and AnnexinV⁺/CD105⁺/CD1046⁺.

Conclusion: In the present work we find that the extracts obtained from *O. basilicum* and *O. selloi* have anti-inflammatory (cerebral and renal), antihypertensive, anxiolytic, nootropic effect, and do not modify the motor behavior, in addition, they prevent the endothelial dysfunction generated by the chronic administration of angII.

The approach of hypertension is and will always be multidisciplinary. The need to control BP, as well as the inhibition of angII action, continue to being of the primary objectives in cardiovascular therapy, which attempts to control the long-term consequences of high blood pressure, which has raised an interesting evolution towards prevention in these high-risk patients, through the development of new medications, devices and procedures that are designed to treat hypertension and its comorbidities.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Función endotelial en la regulación de la presión arterial

El endotelio vascular es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo; está integrado por una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares [1]. Las células endoteliales realizan una serie de funciones que son fundamentales para la biología vascular, además de ser una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos. El endotelio vascular es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos [2]. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, secreta señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas (Tabla 1), que se encargan de la regulación del tono vasomotor, vasodilatación mediada por flujo, modulación de la coagulación sanguínea, promoción y prevención del crecimiento vascular, así como modulación de la inflamación por lo que se reconoce como blanco de fármacos [2, 3].

Tabla 1. Moléculas producidas por el endotelio.

Inmunológicos	
Selectina E, Selectina P, ICAM1, VCAM1, IL1, IL6, IL18, TNF, MCP1.	
Vasodilatadoras	Vasoconstrictoras
NO, PGI2, Factor hiperpolarizante dependiente del endotelio, PN-C, Angio (1-7).	ET1, AngII, TXA2, PGH2, O-
Antitrombóticas	Protrombóticas
TPA, PGI2, NO.	PAI-1, TXA2
Inhibidoras de crecimiento celular	Promotoras de crecimiento celular
NO, PGI2, PNC, Angio (1-7), Heparan-sulfatos, TGFβ	O-, TNF, AngII, ET-1, VEGF, PDGF, bFGF
Inhibidoras de inflamación	Proinflamatorias
NO	O-, TNF, AngII
Anti-hemostáticos	Hemostáticos
Trombomodulina, Proteína C, Proteína S, Activador tisular de plasminógeno, PGI2, NO, Heparansulfatos.	Factor de von Willebrand, Factor V Factor III (tisular), Inhibidor del activador de plasminógeno, TXA ₂

AngII: angiotensina II, bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico, ET-1: endotelina 1, ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1, IL1, IL6, IL18: interleucina 1, 6, 18. MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1. NO: óxido nítrico, O-: anión superóxido, PAI-1: inhibidor de plasminógeno, PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, PGH2: endoperóxido, PGI2: prostaciclina, PN-C: péptido natriurético C, TGFβ: factor de crecimiento transformante beta, TNF: Factor de necrosis tumoral. TPA: activador de plasminógeno tisular, TXA2: tromboxano A2, VCAM1: molécula de adhesión vascular 1, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

Modificado de Cobos S, 2014 [2].

La principal función del endotelio es la regulación del flujo sanguíneo sistémico y la perfusión tisular por medio de cambios en el diámetro de los vasos y en el tono vascular, ejecutado en conjunto con las células musculares adyacentes y los pericitos [1]. La circulación arterial está regulada por dos sistemas: uno central y otro local. El valor relativo de éstos depende del tipo de órgano. La regulación consiste básicamente en la modificación de las resistencias vasculares periféricas, que dependen a su vez de las arteriolas y de su vasomotricidad [4].

El *shear stress* o estrés tangencial vascular es el principal factor que determina la producción de diferentes agentes vasoactivos o con acción plaquetaria. Como consecuencia al aumento del flujo, los vasos se dilatan, autorregulándose, lo que depende en gran medida del óxido nítrico (NO) endotelial. Dependiendo de la duración del estímulo, las respuestas celulares fisiológicas del endotelio son diferentes: estímulos agudos de menos de 1 minuto producen la liberación de NO endotelial y prostaciclina. Este proceso ocurre por apertura de los canales de potasio activados por calcio, localizados en la membrana de la célula endotelial, con lo que la célula se hiperpolariza, aumenta la entrada de calcio y se activa la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que deriva en la producción de NO y vasodilatación [2].

Furchgott y Zawadzki (1980) [5], han puesto en evidencia el papel fisiológico del endotelio al demostrar que, para que se produzca la relajación de los anillos aislados de aorta de conejo mediante acetilcolina, se necesita la presencia de células endoteliales. En ausencia de éstas, la acetilcolina provoca una vasoconstricción por acción directa sobre el músculo liso.

1.2 Presión arterial (PA)

1.2.1 Regulación local de la PA

La presión arterial sistémica, el gasto cardíaco y el volumen sanguíneo circulante determinan el flujo sanguíneo de los tejidos y, como tal, la función de todos los órganos [6]. Uno de los principios de la función circulatoria es la capacidad de cada tejido de controlar su propio flujo sanguíneo local en proporción a sus necesidades metabólicas. El flujo sanguíneo de un órgano aumenta al incrementarse su actividad metabólica. El aumento de actividad induce modificaciones de los metabolitos locales, que provocan la relajación de los músculos lisos y, por tanto, vasodilatación. Este fenómeno se conoce como hiperemia activa. Numerosas sustancias son responsables de esta dilatación, como la disminución del O₂ y aumento de CO₂, ácido láctico, de los iones H⁺, K⁺, metabolitos de la adenosina, de la osmolaridad y bradicinina. La interrupción

del aporte de sangre a un tejido provoca un aumento considerable del flujo con un regreso progresivo al flujo basal. Este proceso compensador se denomina hiperemia reactiva [3, 4].

1.2.2 Regulación extrínseca de la PA: Sistema nervioso simpático

La regulación de la presión arterial (PA) es un proceso complejo que está determinado por la acción del sistema nervioso autónomo (SNA) y los centros de regulación cardiovascular del sistema nervioso central (SNC), los factores vasodilatadores y vasoconstrictores [6]. La regulación nerviosa intenta mantener un nivel adecuado de la presión arterial mediante la corrección y el reajuste instantáneo. La estimulación simpática produce efectos cardíacos; aceleración de la frecuencia cardíaca, aumento de la contractilidad, y efectos vasculares (vasoconstricción) [4]. Esta regulación se realiza a través de mecanismos reflejos que tienen sus receptores en diferentes zonas del sistema cardiovascular; la información es conducida al centro de regulación cardiovascular situado en el bulbo y la protuberancia, donde se elabora una respuesta, que se envía a través de las vías eferentes del SNA [6, 7].

1.3 Reflejo vascular

El reflejo barorreceptor es el mecanismo predominante de control a corto plazo de la presión arterial. Es un circuito de retroalimentación negativa, mediado por los sensores de presión especializados ubicados en los senos carotídeos, en el arco aórtico y en la bifurcación de las arterias carótidas internas y externas. Estos mecanorreceptores son terminaciones nerviosas de tipo aerosol, situadas en las paredes de los vasos sanguíneos que responden al estiramiento circunferencial y longitudinal; que median una respuesta rápida a cambios repentinos de presión a través de la interacción con el SNA (Tabla 2); disparan impulsos a una velocidad directamente proporcional a la presión sanguínea y son inactivos a presiones inferiores a 60 mmHg [4, 6].

Tabla 2. Receptores que regulan la respuesta a los cambios de la presión arterial.

Tipo de receptor	Función	Distribución
Quimiorreceptores periféricos	Responden a variaciones de la PO ₂ , PCO ₂ y del pH. Estos quimiorreceptores son estimulados por la hipoxia y provocan vasoconstricción.	Localizados en el arco aórtico y el seno carotídeo
Quimiorreceptores centrales.	Son estimulados por la hipercapnia, con el resultado de una vasoconstricción. También responden a las variaciones de pH mediante una vasoconstricción.	Centro vasomotor de la sustancia reticular del bulbo y del tercio inferior de la protuberancia
Neuronas osmoreceptoras	Detectar cambios en la osmolalidad del fluido extracelular y generar un punto de ajuste preestablecido, y codificar esta información en señales eléctricas.	Regiones del cerebro que carecen de BHE; OCV como: OVLT, el núcleo supraóptico, el órgano subfornical, el área medial y la parte caudal del NST, así como mNC.
Hipotálamo.	Zona anterior, cuya estimulación provoca hipotensión y bradicardia. Zona posterior, que provoca taquicardia e hipertensión. también existe un centro de regulación de la temperatura. La estimulación por el frío provoca vasoconstricción cutánea y, a la inversa, la debida al calor produce vasodilatación.	
Corteza cerebral	Ejerce un efecto en la regulación del flujo sanguíneo. Una emoción induce vasodilatación cutánea y mucosa, mientras que el miedo, por ejemplo, genera vasoconstricción.	

PO₂: presión parcial de oxígeno, PCO₂: presión parcial de dióxido de carbono, BHE: Barrera hematoencefálica, OCV: órganos circunventriculares, OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminal, NST: núcleo del tracto solitario, mNC: células neuro-secretoras mangocelulares. [4, 8–10].

Las señales aferentes se transmiten desde los barorreceptores a través de los nervios vago y glossofaríngeo hasta el núcleo del tracto solitario, parte del bulbo raquídeo y hacia los centros vasomotores. La inervación autónoma del corazón es tanto simpática como parasimpática, con receptores beta 1 como el adrenoreceptor predominante [11]. Además de los receptores de presión alta en el sistema arterial, se encuentran barorreceptores de presión baja en las venas cavas, las aurículas y las venas pulmonares. A menudo denominados "receptores de volumen", estas proteínas de estiramiento transmiten señales aferentes, también a través del vago, al hipotálamo [6].

El control de la presión arterial a corto plazo se produce principalmente a través de los efectos del sistema nervioso sobre la resistencia vascular periférica total, la capacitancia y sobre la capacidad de la bomba cardiaca [8]. Sin embargo, el organismo también dispone de mecanismos potentes

para regular la presión arterial a largo plazo. Este control está íntimamente relacionado con la homeostasis del volumen de líquido en el organismo, que está determinada por el balance entre la ingestión y la eliminación de líquidos, una función que es realizada por varios mecanismos de control como los nerviosos, hormonales y por los sistemas locales en los riñones, que regulan la excreción de sal y agua [4, 6].

1.4 Regulación hormonal: sistema renina angiotensina aldosterona

El riñón participa en la regulación de la presión arterial a largo plazo, a través del control del volumen y por tanto del gasto cardíaco, mediante la regulación de la excreción de iones y agua [12]. Los aumentos en el líquido extracelular causan un aumento en el volumen y la presión sanguínea con el tiempo. El aumento de la presión de perfusión renal resulta en el aumento de la excreción de sodio y la disminución de la reabsorción (natriuresis por presión) y el aumento de la producción de agua renal (diuresis por presión). Éste es un componente central en el control a largo plazo de la presión arterial [6].

Además de la capacidad de los riñones de controlar la presión arterial a través de los cambios de volumen del líquido extracelular, también tienen otro mecanismo potente para controlar la presión arterial. Cuando desciende la presión se producen una serie de reacciones intrínsecas de los riñones que provocan la liberación de la enzima renina del aparato yuxtaglomerular, y está disponible en la circulación sanguínea renal, para distribuirse después por todo el organismo (Figura 1) [3, 12].

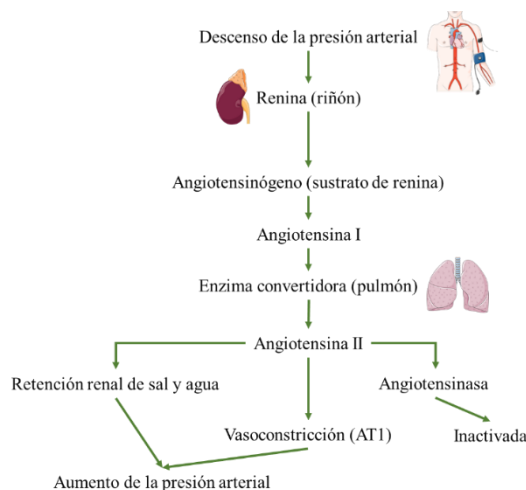


Figura 1. Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Modificado de Guyton 2016 [3].

Una vez secretada, la renina cataliza la conversión de angiotensinógeno (proteína plasmática) en angiotensina I (ang I, péptido de 10 aminoácidos), que tiene propiedades vasoconstrictoras discretas, no suficientes para provocar cambios en la función circulatoria. La renina persiste en la sangre durante 30 minutos hasta 1 hora. A través de la conversión catalizada en los vasos del pulmón por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se produce angiotensina II (péptido de 8 aminoácidos), que es un potente vasoconstrictor, persiste en sangre únicamente durante 1-2 minutos (se inactiva rápidamente por muchas enzimas tisulares y sanguíneas que se conocen colectivamente como angiotensinasas) [3, 13, 14], actuando directamente a través de receptores de angiotensina tipo 1 (AT1r, Figura 2), ampliamente expresados y también por interacción con receptores beta 2-adrenérgicos [8].

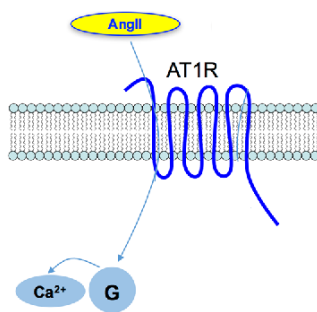


Figura 2. AT1 es un receptor acoplado a la proteína G de siete subunidades transmembranales, que desempeña un papel regulador en los procesos fisiológicos y patológicos del sistema cardiovascular. Especialmente, el acoplamiento de la proteína G provoca la activación del fosfolípido C, la generación de la señal de Ca^{2+} inducida por el fosfato de inositol (IP), la activación de la proteína quinasa C y las ERK. Modificado de Teixeira LB *et al.*, 2017 [15].

Los AT1r, son abundantes en el cerebro, se encuentran en varias regiones, como los núcleos paraventriculares y supraóptico hipotalámico, la lámina terminal, el núcleo parabraquial lateral, la médula ventrolateral y el núcleo del tracto solitario (NTS) (Figura 3), que se sabe que tienen funciones en la regulación del sistema cardiovascular y/o equilibrio de líquidos corporales y electrolitos [9, 10].

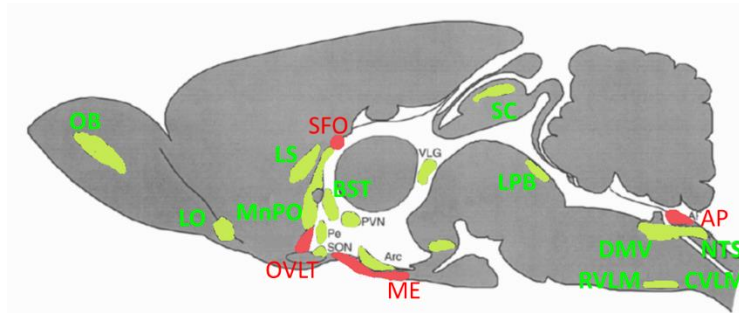


Figura 3. Esquema cerebral de un mamífero en donde se muestran en verde las zonas con alta concentración de AT1r; Arc, núcleo arqueado; BST, núcleo del lecho de la estría terminal; CVLM, médula ventrolateral caudal; DMV, núcleo motor dorsal del vago; LPB, núcleo parabraquial lateral; LO, núcleo del tracto olfativo lateral; LS, septum lateral; MnPO, núcleo preóptico mediano; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; Pe, núcleo periventricular; RVLm, médula ventrolateral rostral; SC, colículo superior; SNC, sustancia negra *pars compacta*; SON, núcleo supraóptico; VLG, núcleo geniculado ventrolateral. En rojo se muestran los OCV; AP, área postrema; ME, eminencia media; OVLT, órgano vascular de la lámina terminal; SFO, órgano subfornical. Modificado de McKinley MJ *et. al.*, 2003 [10].

La expresión de AT1r está regulada en regiones específicas del cerebro, dependiendo del estado fisiológico del animal. La deshidratación, la disminución de sodio o cloruro, la hipertensión y el estrés pueden influir en la densidad de receptores AT1 expresados en regiones cerebrales particulares [10]. Los AT1r en los OCV, la glándula pituitaria y suprarrenal son sensibles a la estimulación periférica de angII, mientras que los AT1r en el núcleo paraventricular y otras áreas dentro de la BHE responden a la estimulación endógena por angII [16]. El hipotálamo, de la mayoría de las especies, exhiben altas concentraciones de receptores AT1 en los núcleos supraóptico y paraventricular, aunque en la rata estos receptores solo se ven en la división parvocelular del PVN. La mayoría de los AT1r en el PVN están asociados con neuronas que contienen la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que proyectan a la eminencia media [10].

Por otro lado, existen otros tipos de receptores a angiotensina, en mamíferos como rata, conejo, oveja y en humanos, varias regiones del cerebro exhiben unión al receptor a angiotensina tipo 2 (AT2), especialmente en la capa molecular del cerebelo y en el tálamo [17, 18]. Al igual que el AT1r, el AT2r es un receptor acoplado a la proteína G (RAPG) que pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales. Comparte un 34% de homología con el AT1r, se denomina RAPG "atípico" porque, aunque señala a través de mecanismos dependientes de la proteína G, no afecta el cAMP clásico, la fosfolipasa C o la liberación de calcio. Los AT2r se expresan a niveles muy altos en los tejidos neonatales (cerebrales y no cerebrales), pero su expresión es mucho más limitada en adultos y el patrón de expresión en mamíferos es bastante

único y es distinto del de AT1r; se encontraron las mayores densidades de AT2r en el cerebro adulto en áreas tales como la aceituna inferior, *locus ceruleus*, tabique ventral, tabique lateral, núcleo talámico mediodorsal, amígdala medial, núcleo rojo y núcleo geniculado medial; ninguno de los cuales están directamente involucrados en las vías neurales que controlan la PA. Sin embargo, los estudios de hibridación *in situ* posteriores revelaron que la distribución de AT2r en el cerebro es más compleja, incluida la localización dentro del núcleo del tracto solitario (NTS), un área que es bien conocida por modular la función barorefleja y salida simpática, entre otras funciones [19–21].

Steckekings *et al.*, (2017) proponen que existe un control cardiovascular y hormonal por la activación de AT2r ubicada en las neuronas GABA (ácido γ -aminobutírico; neurotransmisor inhibitorio) dentro del NTS deprime la síntesis de GABA (y finalmente la libera), y reduce la inhibición tónica de la presión sanguínea disminuyendo las vías baroreceptoras proporcionadas por estas neuronas; resultando en una mayor disminución de la PA. La activación de las neuronas GABA que contienen AT2r en la región peri-PVN que se sincronizan con las neuronas magnocelulares en la PVN conduce a una mayor secreción de GABA; en consecuencia, disminuye la secreción de vasopresina [19].

Al ser degradada angII, por las aminopeptidasas A y N, se convierte en angiotensina IV (angIV), la cual interactúa con receptores tipo 4 (AT4). Inicialmente, se pensó que este hexapéptido estaba inactivo debido a su incapacidad para activar los receptores clásicos, AT1 y AT2, excepto a altas concentraciones micro molares [22]. Los receptores AT4 están ampliamente distribuidos y altamente conservados en el cerebro de cobayos, ratas, ovejas, monos y humanos. Los sitios receptores se encuentran en alta densidad en el núcleo basal de Meynert, en las regiones CA1 a CA3 del hipocampo y en toda la neocorteza, una distribución que se asemeja mucho a las neuronas colinérgicas y sus proyecciones y es coherente con los efectos sobre la memoria que se le atribuyen a la activación del receptor AT4. Los altos niveles de los receptores también se encuentran en la mayoría de las regiones del cerebro involucradas en el control motor [10].

Además del efecto directo que la angII sobre la PA, aumenta la reabsorción tubular de sodio. También actúa para promover la síntesis y liberación de aldosterona y la liberación de hormona antidiurética. El efecto neto de este mecanismo es la vasoconstricción, la retención de agua y sodio por los riñones y, por lo tanto, la expansión del volumen de líquido extracelular [23]. El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) funciona como un circuito de retroalimentación negativa con dos fases: vasoconstricción rápida (a los pocos minutos del estímulo) mediada por

angII y la hormona antidiurética; y aumento gradual del líquido extracelular por retención de sodio y agua en los riñones. Una vez que regresa la perfusión yuxtaglomerular, cesa la liberación de renina [6].

1.5 Angiotensina II y su papel en la fisiopatología vascular

En concentraciones fisiológicas (femtomoles), angII es el principal regulador de la presión arterial, función cardíaca y también participa en la homeostasis de fluidos y sales corporales [24, 25]. Sin embargo, cuando hay un exceso en la producción de angII ejerce en un papel importante en la patogénesis de un gran número de enfermedades cardiovasculares y renales, que incluyen hipertensión, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, enfermedad isquémica del corazón, fibrosis cardíaca y renal (Figura 4) [26].

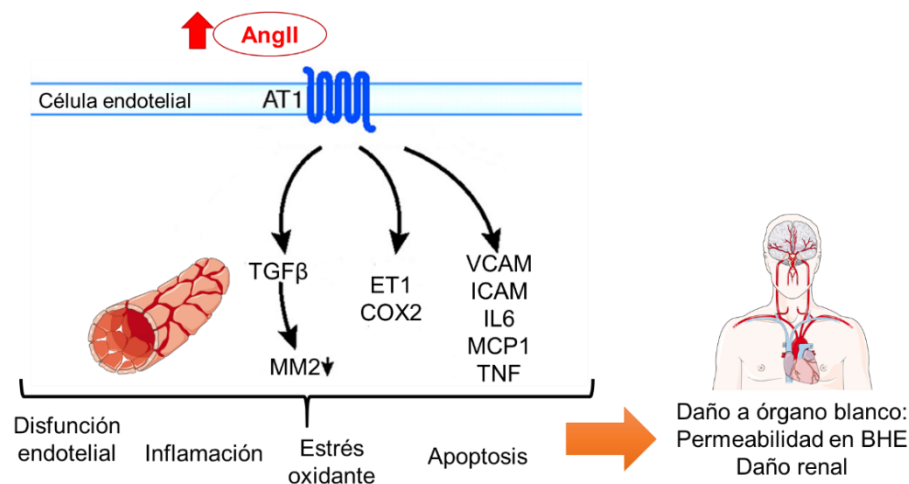


Figura 4. AngII, provoca el remodelamiento y daño vascular, esto incluye vasoconstricción, crecimiento celular, estrés oxidante, inflamación, modifica la actividad de células (como monocitos y plaquetas) e inclusive participa en la modulación de funciones inmunológicas y de la coagulación. AT1; receptor tipo 1 a angiotensina II, TGFβ; factor de crecimiento transformante beta, MM2; metaloproteína 2, ET1; endotelina, COX2; Ciclooxygenasa 2, VCAM; Molécula de adhesión vascular, ICAM; Molécula de adhesión intercelular, IL6; interleucina seis, MCP1; Proteína quimiotáctica de monocitos 1, TNFα; factor de necrosis tumoral alfa. Modificado de Ruster, 2011 [26].

La estimulación continua del endotelio con angII provoca la expresión de moléculas de adhesión (selectina P y E), la facilitación de la adherencia y la activación de células y plaquetas de la sangre medidas por endotelio es factible y la angII participa en este tráfico de señalización. Un incremento en la síntesis de quimosinas (proteínas reguladoras del tráfico celular) puede ser estimulado por esta hormona [24]. Las moléculas de adhesión son receptores de membrana que participan en diversas funciones vinculadas al tráfico celular, a las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Tres grupos de estas moléculas, conocidas como "adhesinas", están

relacionados con la enfermedad vascular: integrinas, selectinas y superfamilia de inmunoglobulinas. Intervienen en los fenómenos de activación y disfunción endotelial [27].

En el caso específico del aparato cardiovascular, las interacciones adhesivas se vinculan tanto con el desarrollo y funcionamiento, como con alteraciones patológicas. Actúan regulando la formación del trombo; facilitando la infiltración leucocitaria; participando en la migración y proliferación de las células musculares lisas y estimulando el depósito de tejido cicatricial [27, 28]. La inflamación puede conducir al desarrollo de hipertensión [29]. Se ha demostrado que el aumento del flujo a través de las arterias pequeñas promueve la hipertrofia medial (de las células endoteliales y vasculares del músculo liso) [30], por lo tanto, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por otro lado, las respuestas de adhesión leucocito-endotelial pueden dar como resultado la infiltración del endotelio permeabilizado por los leucocitos, involucrando citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas de matriz (Figura 5) [14, 27, 31–33]. Las ERO pueden actuar como mensajeros de transducción de señales para factores de transcripción, incluidos NFκB y proteína activadora (AP-1), que están directamente involucrados en la patogénesis de la enfermedad vascular; como el factor de necrosis tumoral (TNF), ciertas interleucinas y quimiocinas como la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP1) [31, 32].

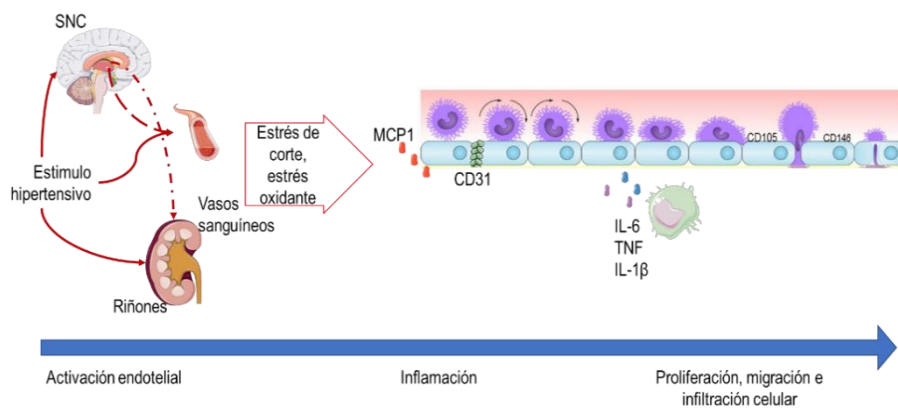


Figura 5. Papel propuesto por Harrison *et al.*, 2012, de las células T y la inflamación en la hipertensión. Los estímulos hipertensivos como la angII, promueven la activación de las células T, una vez activadas ingresan al riñón y la vasculatura. Estas células inflamatorias liberan citocinas que causan vasoconstricción y promueven la absorción de sodio y agua, causando hipertensión severa.

1.6 Disfunción endotelial y generación de micropartículas endoteliales

El término disfunción endotelial (DE) indica que el endotelio no cumple apropiadamente estas funciones. Una menor biodisponibilidad de NO, una alteración en la producción de prostanoïdes (incluyendo prostaciclina, tromboxano-A₂ y/o isoprostanos), un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de endotelina-1, pueden

individualmente o asociados contribuir a la disfunción endotelial [1, 2, 34, 35]. La DE se ha encontrado como un marcador temprano de daño cardiovascular. Estudios recientes sobre marcadores circulantes de actividad endotelial (óxido nítrico y sus metabolitos, endotelinas, citoquinas, moléculas de adhesión, etc.) podrán muy pronto ofrecer pruebas confiables de disfunción endotelial [2, 36].

El flujo de sangre rápido a través de las arterias y arteriolas provoca fuerzas de estrés tangencial vascular (*shear stress*), sobre las células endoteliales, esta tensión contorsiona las células endoteliales en la dirección del flujo y provoca un incremento significativo en el desprendimiento y/o generación de micropartículas circulantes, lo que resulta en una destrucción vascular irreversible [37]. Las dimensiones de estas estructuras varían y representan una de las características que distinguen los tres tipos de vesículas mencionadas anteriormente. Los exosomas típicamente varían en tamaño entre 30 y 100 nm y se liberan al fusionar la membrana limitante de los cuerpos multivesiculares con la superficie celular. Las micropartículas oscilan entre 100 y 1000 nm y son formadas por ampollas hacia afuera de la membrana plasmática, con liberación posterior después de la escisión proteolítica del citoesqueleto; los cuerpos apoptóticos tienen entre 1 y 3 μm , están formados por ampollas indiscriminadas en la membrana plasmática y poseen fragmentos nucleares e histonas [37–39].

Las micropartículas endoteliales (MPE; Figura 6) son vesículas anucleadas formadas después de la reorganización del citoesqueleto y la membrana, y liberadas en la apoptosis o la activación de las células endoteliales en el medio extracelular [38, 40, 41]. Se ha demostrado que la isquemia, la hipoxia, la hiperglucemia, los lipopolisacáridos bacterianos, la trombina, la proteína C reactiva, el clúster de oxígeno activo y la urea inducen la liberación de MPE de las células endoteliales [38].

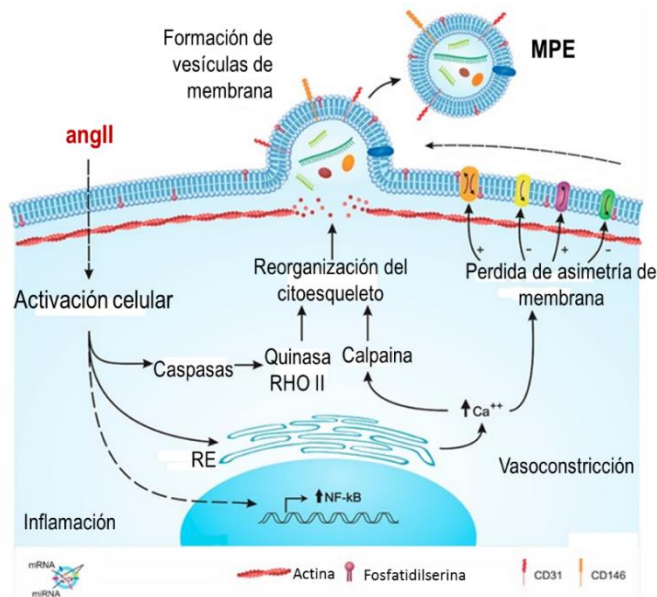


Figura 6. Mecanismos esquemáticos de la formación de micropartículas endoteliales (EMP) inducidas por toxinas urémicas. Las toxinas urémicas inducen la activación de las células endoteliales. Este proceso activa las caspasas y, en consecuencia, la rho quinasa II, que conduce a la reorganización del citoesqueleto. La activación celular induce la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico. El aumento intracelular de calcio activa la calpaína, que, a su vez, induce la reorganización del citoesqueleto. El calcio también conduce a la activación o inhibición de las proteínas responsables del mantenimiento de la asimetría de la membrana, causando la pérdida de esta asimetría. La activación celular eleva la expresión de NFκB. Estos procesos promueven cooperativamente la formación de ampollas de membrana y EMP. Modificado de Favretto G, *et al.*, 2019 [38].

Las MPE pueden definirse de acuerdo con las glucoproteínas de membrana, ya que poseen antígenos expresados constitutivamente en las células endoteliales como el CD31. Los marcadores de superficie característicos de las MPE son numerosos y diferentes (Tabla 3) [37]. Se han propuesto estrategias que usan una combinación de proteína marcadora derivada de diferentes tipos de células para resolver estas dificultades. Los epítomos derivados de diferentes tipos de células utilizados son los marcadores CE positivos (por ejemplo, CD31 y CD144) en combinación con la ausencia de los marcadores de plaquetas CD41 o CD42b [37]. Como se muestra en la Tabla 3, los niveles de CD31⁺, CD105⁺ y CD144⁺ parecen aumentar en las CE apoptóticas. En contraste, cuando el endotelio se activa funcionalmente, los niveles de MPE CD62E⁺, CD54⁺ y CD106⁺ aumentan [37, 40].

Tabla 3. Marcadores endoteliales utilizados para identificar a las MPE. Modificada de Deng *et al.*, 2017.

Marcador CD	Antígeno	Expresión	Localización en CE	Expresión en CE	Enfermedades relacionadas
CD31	PECAM-1	apoptosis	Uniones intercelulares (parte externa de las uniones adherentes)	Expresadas constitutivamente	Aterosclerosis vascular cerebral, infarto miocardio, enfermedad de la arteria coronaria, síndrome coronario agudo,
CD51	Integrina- α V	Apoptosis	Superficie	Expresadas constitutivamente	Enfermedad de la arteria coronaria
CD54	ICAM	Activación	Superficie		Infarto de miocardio, infarto agudo
CD62E	E-Selectina	Activación	Superficie	Baja expresión en CE en reposo; regulado rápidamente en respuesta a la inflamación	Infarto de miocardio, estenosis aortica, infarto agudo, aterosclerosis vascular cerebral, trasplante cardiaco.
CD105	Endoglina	Apoptosis	Superficie	Baja expresión en CE en reposo; de liberación rápida en angiogénesis.	Infarto al miocardio, infarto agudo, hemorragia subaracnoidea espontanea.
CD144	VE-Cadherina	Apoptosis	Uniones adherentes	Expresada constitutivamente	Enfermedad de la arteria coronaria, insuficiencia cardiaca congestiva, estenosis arterial coronaria, infarto agudo, trasplante de corazón y en trasplante de hígado.
CD146	MelCAM S-Endo	Apoptosis	Uniones intercelulares (exterior) y superficie	Expresadas constitutivamente	Síndrome coronario agudo, infarto de miocardio.

PECAM: molécula de adhesión vascular de célula endotelial plaqueta, ICAM: molécula de adhesión intercelular, MelCAM: Molécula de adhesión celular de melanoma.

1.7 Disfunción endotelial e hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA), se define como la elevación constante de la presión en los vasos sanguíneos; mientras más alta es, más esfuerzo efectúa el corazón para bombear con eficiencia la sangre en el organismo; como resultado de la HTA, el funcionamiento de órganos vitales como corazón, cerebro y riñones será deficiente [42, 43]. Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de morbilidad a nivel mundial. México registra la prevalencia más alta de HTA en todo el mundo, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSAUT) 2012; se estima que hasta un 80% de la población vive con HTA, debido a la falta de un diagnóstico oportuno y al desconocimiento de los factores de riesgo que pueden detonar que se eleve la presión arterial [44].

La mayoría de las personas con hipertensión no muestra ningún síntoma. En ocasiones, la HTA causa síntomas como dolor de cabeza, dificultad respiratoria, vértigo, dolor torácico, palpitaciones del corazón y hemorragia nasal [43, 45]. Instituciones como JNC (Joint National Committee; Comité Nacional Conjunto), ACC/AHA (American College of Cardiology; Colegio Americano de Cardiología/American Heart Association; Asociación Americana del Corazón), el IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) y en la NOM-030-SSA2-2009, clasifican a la HTA tomando en cuenta el nivel de presión arterial como principal parámetro para el diagnóstico y el abordaje terapéutico. En la Tabla 4 se presenta la clasificación según el nivel de presión arterial en mmHg.

Tabla 4. Valores de referencia para la presión arterial sistémica.

JNC 7	ACC/AHA 2017	PAS / PAD (mmHg)	IMSS	PAS / PAD (mmHg)	NOM-030-SSA2-2009	PAS / PAD (mmHg)
PA normal	PA normal	<120 / <80	Nivel óptimo	<120 / <80	Óptima	<120 / <80
Prehipertensión	PA elevada	120 a 129 / <80	Normal	120 a 129 / 80 a 84	PA normal	120 a 129 / 80 a 84
Prehipertensión	HTA estadio 1	130 a 139 / 80 a 89	Normal alta*	130 a 139 / 85 a 89	PA fronteriza	130 a 139 / 85 a 89
HTA estadio 1	HTA estadio 2	140 a 159 / 90 a 99	HTA	140 o más / 90 o más	Hipertensión 1	140 a 159 / 90 a 99
HTA estadio 2	HTA estadio 3	≥160 / ≥100	HTA en DM2 o con daño renal establecido	135 o más / 85 o más	Hipertensión 2	160 a 179 / 100 a 109
			HTA sistólica pura	140 o más / <90	Hipertensión 3	≥ 180 / ≥ 110
			HTA diastólica pura	<140 / 90 o más	Hipertensión sistólica aislada	≥140 / <90

PAS; presión arterial sistólica. PAD; presión arterial diastólica. HTA; hipertensión arterial. DM2; Diabetes mellitus tipo 2. JNC; Joint National Committee. ACC; American College of Cardiology. AHA; American Heart Association. IMSS; Instituto Mexicano del Seguro Social. Basado en [45–47]. IR; insuficiencia renal. Norma Oficial Mexicana; NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica.

La HTA altera la estructura de los vasos sanguíneos cerebrales, con ello altera los complejos mecanismos vaso-reguladores que aseguran un suministro sanguíneo adecuado al cerebro, lo que aumenta la susceptibilidad del cerebro a una lesión isquémica, ocasionando la muerte neuronal y la pérdida de sinapsis en las regiones cerebrales involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria, entre otros [48, 49]. La HTA induce un incremento en la presencia de eventos neuropsicológicos, como deterioro cognitivo y ansiedad, incidiendo directamente en la calidad de vida de los individuos. Por ejemplo, se ha determinado que la HTA crónica es un inductor de demencia vascular, una condición en la que el rendimiento cognitivo de los pacientes está afectado, por la disfunción endotelial. De la misma forma, la ansiedad patológica ha sido relacionada con HTA dado que individuos ansiosos, presentan aumento en la frecuencia cardiaca y respiratoria, entre otros síntomas [50].

Hay procesos fisiológicos complejos involucrados en la activación del SRAA. Algunas investigaciones muestran que la ansiedad está asociada con la hipertensión [51]. Una regulación podría estar dada por los receptores AT1, ya que se encuentran distribuidos en partes del sistema límbico [10]. Al ser estimulados por la angII, podrían estar activando el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), sistema fisiológico de respuesta al estrés en el cuerpo [51] (Figura 7).

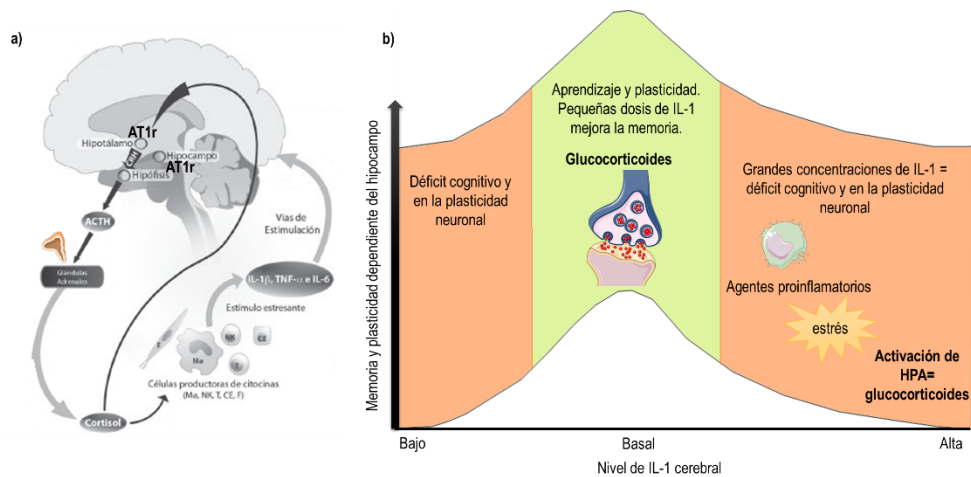


Figura 7. a) Regulación neuroinmunoendocrina ante el estrés crónico. Tanto angII como IL1 median la activación inducida por estrés del eje HPA. A su vez, IL1 induce la secreción de CRH desde el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), ACTH desde la hipófisis y glucocorticoides desde la suprarrenal. Mφ: macrófago, NK: *natural killers*, T: linfocito, F: fibroblasto, CE: célula endotelial, GH: hormona de crecimiento, ACTH: hormona adrenocorticotrópica, CRH: hormona liberadora de corticotropina. b) IL1 media los efectos perjudiciales del estrés en la memoria, el aumento asociado al aprendizaje en los niveles de IL1 es necesario para la formación de la memoria (verde), mientras que cualquier desviación del rango fisiológico, ya sea por exceso de elevación en IL1 niveles o por bloqueo de la señalización de IL1, da como resultado un deterioro de la memoria y la plasticidad (naranja). Modificado de Goshen *et al.*, 2009 [52].

Otros órganos altamente vascularizados que son afectados por HTA son; corazón (isquemia miocárdica, trastornos en la conducción, hipertrofia y arritmias), riñón: nefroesclerosis, síndrome cardiorrenal, proteinuria. La hipertensión secundaria a daño renal se basa en el hallazgo de elevación de urea y creatinina en suero, la disminución en la depuración de creatinina y presencia de proteinuria. Deterioro de la función renal en un individuo hipertenso constituye un potente predictor de eventos cardiovasculares futuros y muerte [45]. Por otro lado, la HTA provoca diferentes retinopatías, entre ellas; fundoscopia (fondo de ojo), cambios arteriales (grado 1 y 2), hemorragias (grado 3), papiledema (grado 4). Todo esto puede reducirse considerablemente por el tratamiento con fármacos antihipertensivos que disminuya tanto la presión arterial como el riesgo de daño del órgano blanco [45].

1.8 Tratamiento farmacológico para HTA

La modulación de la función endotelial es una atractiva opción terapéutica al intentar minimizar algunas de las complicaciones importantes de la hipertensión, padecimientos no curables, sino únicamente tratables, que requieren de mayor atención médica y tratamiento farmacológico de por vida [53]. El tratamiento antihipertensivo clínicamente eficaz parece restaurar la producción de óxido nítrico, pero no parece restaurar la relajación vascular dependiente del endotelio o la

respuesta vascular de agonistas endoteliales. Esto indica que dicha disfunción endotelial es primaria y se vuelve irreversible una vez que se ha establecido el proceso hipertensivo [54].

Al considerar el efecto que los medicamentos tienen sobre la relación de presión arterial, los antihipertensivos se pueden clasificar en tres grupos. Los efectos agudos de estos medicamentos en el corazón y la vasculatura sistémica se observan fácilmente, pero son sus efectos renales específicos los que influyen en la eficacia a largo plazo. El primer grupo son los vasodilatadores (por ejemplo, antagonistas de los canales de calcio y bloqueadores), que, al dilatar predominantemente la arteriola aferente, la "hipertensión glomerular" produce una mayor excreción urinaria de sodio, para cualquier presión arterial sistémica dada, en comparación con los hipertensos no tratados. El segundo grupo son los medicamentos que actúan para modular el sistema simpático renal (bloqueadores β e inhibidores de la enzima convertidora de la angII - ECA-). Estos también aumentan la tasa de excreción de sodio en la orina para cualquier presión arterial sistémica dada, pero actúan inhibiendo la respuesta simpática renal (es decir, inhibiendo la vasoconstricción arteriolar, aumentando así el flujo sanguíneo glomerular y la filtración), o disminuyendo la absorción tubular de sodio y agua mediada por el SRAA. En tercer lugar, están los diuréticos (por ejemplo, tiazidas) (Tabla 5) [54].

Tabla 5. Clasificación de tratamientos antihipertensivos y sus efectos adversos reportados. Modificado de Rosas-Peralta, 2016 [45].

Tipo de medicamentos antihipertensivos	Descripción	Efectos colaterales/ adversos
Diuréticos	“píldoras del agua”, trabajan en el riñón y eliminan agua y el sodio	Diuréticos de asa; eliminan potasio que puede generar hipocalcemia. En ancianos; hipersensibilidad e hiponatremia. Ejemplo: furosemida.
β -bloqueadores	Reducen el estímulo de los receptores betaadrenérgicos (beta-1) del corazón y de los vasos	En ancianos o en obesos; su uso debería restringirse. No es recomendable el uso junto con diuréticos. Ejemplo: acebutolol.
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)	Actúan directamente bloqueando a la enzima que convierte angI a angII.	El 15-25% de los pacientes presentan tos. Ejemplo: captoprilo.
Antagonista del receptor tipo 1 de angII (ARAII)	Medicamento de primera línea en el tratamiento de HTA.	Sustancias cancerígenas en valsartán, irbesartán y losartán (FDA).
Bloqueadores del canal de calcio	Pacientes jóvenes, obesos.	Sin evidencia a daño de órganos blanco. Ejemplo: dihidropiridínicos, benzotiazepínicos, fenilalquilaminas.
α -bloqueadores	Efecto vasodilatador que favorece la disminución de las resistencias vasculares periféricas.	Hipotensión ortostática y taquicardia. Ejemplo: prazosina.
Alfa beta bloqueadores	Vasodilatación periférica	Uso restringido *
Vasodilatadores directos		Uso restringido a hipertensión pulmonar y en embarazo. Ejemplo: hidralazina y el minoxidil
Inhibidores directos del sistema nervioso		Uso restringido a pacientes con HTA refractaria.
Bloqueadores del receptor de endotelina	Tienen efectos similares a los ARA II	Su uso en la clínica está bajo estudio y los resultados no han sido alentadores. Ejemplo: bosentán, ambrisentán.
Bloqueadores de renina	Aliskiren	Se requieren más estudios

Los pacientes con HTA consumen fármacos que, si bien ayudan a controlar los síntomas relacionados con la enfermedad, también les generan efectos adversos, ya que al llegar al torrente sanguíneo actúan en más de un sitio en el organismo; por lo tanto, deben consumir más medicamentos para contrarrestar o aminorar esos efectos, y así se genera un círculo vicioso que afecta la salud del paciente. Como consecuencia, los pacientes optan por abandonar el tratamiento, derivando en una HTA resistente o incontrolada [53,54]. Se han buscado alternativas en diferentes áreas de investigación, cuyo fin es lograr la generación de fármacos capaces de actuar en la prevención, regresión y remediación de estas afecciones.

1.9 Tratamiento no farmacológico para HTA

La hipertensión es prevenible o puede ser pospuesta a través de un grupo de intervenciones no farmacológicas, entre las que se destacan la disminución del consumo de sal, una dieta rica en frutas y verduras, el ejercicio físico y el mantenimiento de un peso corporal saludable [55]. Sin embargo, la necesidad de controlar la presión arterial en pacientes de alto riesgo ha llevado a continuar la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos, dispositivos y procedimientos diseñados para tratar no sólo la hipertensión, sino también sus comorbilidades.

1.10 Modelos animales experimentales de hipertensión

La HTA es una enfermedad multifactorial que involucra interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales. El desarrollo de modelos experimentales de hipertensión permitió la disección y el aislamiento de varios factores asociados con la regulación de la PA y las respuestas celulares a la lesión endotelial. El enfoque basado en el fenotipo aprovecha la cría selectiva de animales (principalmente ratas) que exhiben un fenotipo deseado. Los modelos impulsados por el genotipo, en los cuales los ratones son los más exitosos para la eliminación selectiva o la sobreexpresión de genes diana. Cabe destacar que los modelos experimentales permitieron el desarrollo de intervenciones dirigidas destinadas a disminuir no solo la PA sino también la lesión de órganos. La utilización continua de modelos experimentales que simulan hipertensión humana, particularmente aquellos que combinan otras comorbilidades clínicamente relevantes como la obesidad o hipercolesterolemia, puede permitir el desarrollo de estrategias efectivas para abordar esta enfermedad común [56].

Los primeros modelos animales experimentales de hipertensión implicaron la constricción de arterias renales (riñón de Goldblatt) o parénquima (riñón de Page). La fisiopatología imitaba de cerca sus análogos humanos. Sin embargo, la hipertensión renovascular y el riñón de Page representan solamente una pequeña fracción de la hipertensión humana. La mayoría de los estudios experimentales de hipertensión con animales se ha centrado en comprender los mecanismos de la hipertensión esencial [57]. En los modelos animales de HTA estudiados se ha encontrado que la relajación dependiente del endotelio está reducida, posiblemente por defectos en la síntesis, liberación, inactivación del NO o por alteraciones de producción o expresión de factores constrictores de origen endotelial [2]. Teniendo en cuenta el hecho de que el desarrollo, la progresión y la manifestación de la hipertensión depende de factores genéticos y ambientales, los científicos utilizan modelos animales genéticos y no genéticos (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de modelos animales para la investigación sobre hipertensión.

Modelos	Cepa / Inductor	Fenotipo
Genéticos	SHR (rata espontáneamente hipertensa)	Hipertensión espontánea
	SHR-SP (rata espontáneamente hipertensa propenso a los accidentes cerebrovasculares)	Hipertensión severa e infarto
	MHS (Cepa hipertensiva de Milán)	Hipertensión (leve) media espontánea
	LH (Ratas Lyon hipertensivo)	Hipertensión media espontánea
	FHH (Rata, <i>Fawn hooded hypertensive</i>)	Hipertensión espontánea y daño renal
	PHR (Rata hipertensa de Praga)	Hipertensión espontánea
	GH (genéticamente hipertenso)	Hipertensión espontánea
Endocrina	DS/Jr (Ratas Dahl sensibles a la sal)	Sensibilidad a sal e hipertensión
	SBH/y (Sabra resistente a hipertensión)	Sensibilidad a sal e hipertensión
	SJH-Rs (San Juan hipertenso)	Sensibilidad a sal
	DOCA (acetato de desoxicorticosterona)	Hipertensión endocrina. Hipertrofia cardíaca, proteinuria, glomeruloesclerosis, alteraciones de las relajaciones dependientes del endotelio
Ambiental	ISIAH (Hipertensión arterial hereditaria inducida por estrés)	Hipertensión inducida por estrés
	Hipertensión inducida por estrés (luces intermitentes, ruido fuerte, jaula de retención, estímulos fríos o calientes).	La activación del SNS y el SRAA puede contribuir al inicio de la hipertensión inducida por el estrés.
Modelos físicos	2K-1C (2 riñones 1 clip)	Activación de SRAA, el aumento de la producción de renina y la posterior liberación y conversión de angiotensina I por la ECA en Ang-II.
	2K-2C (2 riñones 2 clips)	Estenosis arterial renal bilateral y el mecanismo involucrado es similar al modelo 2K-1C, pero con un fenotipo más grave.
	1K-1C (1 riñón 1 clip)	En ausencia de un riñón funcional, no se observa aumento compensatorio en la excreción de sodio y agua. En consecuencia, se retiene más líquido dentro del cuerpo.
	Riñón de Page (envoltura de celofán)	Constricción parenquimatosa renal capaz de alterar la microcirculación intrarenal provocando fenómenos isquémicos aumentando así la cantidad de renina circulante y elevando las cifras de tensión arterial.
Farmacológicos	Angiotensina II	Vasoconstrictor, proinflamatorio en la pared vascular, formación de ERO. Patogénesis de aneurismas aórticos.
	L-NAME (N(G)-nitro-L - arginina - metil éster)	Un inhibidor de NOS. Aumento de la presión arterial dependiente del volumen. A dosis altas; hipertensión independiente de sal y volumen.
	Glucocorticoides	Activación de SRAA.

Modificado de [57–60]

Las intervenciones farmacológicas que usan infusiones a largo plazo de angII, glucocorticoides o DOCA (acetato de desoxicorticosterona con y sin dieta alta en sal), se usan con mayor frecuencia en animales pequeños como roedores [57]. En el Centro de Investigación Biomédica del Sur, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS), se han realizado investigaciones sobre el efecto de diferentes especies vegetales sobre el daño a nivel endotelial por la administración de angII de manera crónica (Tabla 7). A partir de la semana ocho provoca la elevación de la presión arterial [30, 61–63], y a las 10 semanas de administración se observa un proceso de estrés oxidante, inflamación y disfunción endotelial [64, 65].

Tabla 7. Modelos experimentales de disfunción endotelial e hipertensión, utilizados en el Centro de Investigación Biomédica del Sur.

Dosis y periodo de administración de angII	Referencia
0.2 µg/Kg, ip, 8 semanas en ratón.	[61]
0.1 µg/kg, ip, 8 semanas en ratón.	[62]
1 µg/Kg, ip, 10 semanas en ratón.	[64]
0.1 µg/Kg, ip, 10 semanas en ratón.	[65]
0.2 µg/Kg, ip, 12 semanas en ratón.	[66]
2 µg/Kg, ip, 12 semanas en ratón.	[67]
0.1 µg/Kg, ip, 20 semanas en ratón.	[68]
0.1 µg/kg, ip, 8 semanas en ratón.	[69]
0.1 µg/kg, ip, 8 semanas en ratón.	[70]
0.1 µg/kg. Ratón.	[71]
0.01 µg/kg, ip, 8 semanas en ratón.	[72]
0.5, 1, 2 µg/kg, iv, en rata.	[73]
Ip: intraperitoneal. Iv: intravenoso.	

Las acciones de angII en el cerebro, incluyen la regulación de la formación y liberación hormonal, el control de los sistemas simpato-adrenales central y periférico, y la regulación de consumo de agua y sodio. Como consecuencia de cambios hormonales, en los sistemas simpáticos y electrolíticos, mecanismos de retroalimentación modulan la acción de angII en el cerebro. Es razonable hipotetizar que angII cerebral está relacionada con la regulación de otras funciones incluyendo el desarrollo cerebral, migración neuronal, procesamiento de

información sensorial, cognición, regulación de respuestas emocionales, y el flujo sanguíneo cerebral. Por lo que se han establecido diferentes modelos conductuales de experimentación animal.

1.11 Modelos biológicos para evaluar deterioro cognitivo, exploración motora y ansiedad

En una variedad de enfermedades humanas, incluida la hipertensión, los modelos animales han sido útiles para comprender la patogénesis de la enfermedad al proporcionar estrategias experimentales incisivas que no son posibles en estudios en humanos. En la hipertensión, la utilidad de los modelos animales para mejorar la comprensión de la patogénesis, la prevención y el tratamiento de la hipertensión y sus comorbilidades depende de su validez para representar formas humanas de hipertensión, incluidas las respuestas a la terapia y la calidad de los estudios en esos modelos [74].

1.11.1 Laberinto acuático de Morris

El procesamiento de nueva información (aprendizaje) y la habilidad de recordar o recuperar la información en un tiempo posterior (memoria), son funciones cognitivas que se encuentran muy analizadas en el campo de la neurociencia. Los enfoques integradores para el estudio de estas funciones incluyen la combinación de manipulaciones en el comportamiento con técnicas moleculares, electrofisiológicas y farmacológicas. Los deberes dentro del campo cognitivo están dirigidos a evaluar la función de las áreas del cerebro específicas y los circuitos implicados (sistemas neuronales) en el aprendizaje y la memoria. Los modelos conductuales en animales de laboratorio permiten comprender el mecanismo de acción de los diferentes neurotransmisores involucrados en los procesos cognitivos que se llevan a cabo de manera cotidiana, e incluso buscar alternativas farmacológicas para prevenir el deterioro de éstas [75, 76]. Una de las pruebas más utilizadas por los investigadores para el estudio de la memoria espacial es el laberinto acuático diseñado por el investigador en neurociencias Richard G. Morris en 1981 (LAM), con el fin de evaluar el aprendizaje dependiente del hipocampo, incluida la adquisición de memoria espacial y memoria espacial a largo plazo. El LAM es un procedimiento relativamente simple que generalmente consta de seis ensayos diarios. La principal ventaja es la diferenciación entre las condiciones espaciales (plataforma oculta) y no espaciales (plataforma visible). Además, el entorno de prueba de LAM reduce la

interferencia del rastro de olor. Esto ha llevado a que la prueba se use ampliamente en el estudio de la neurobiología y neurofarmacología del aprendizaje espacial y la memoria [75].

1.11.2 Ensayo de actividad exploratoria: Prueba de campo abierto

La tendencia natural del animal en un ambiente nuevo es la de explorarlo, a pesar del conflicto con el miedo provocado por el ambiente nuevo. Este modelo fue desarrollado por Hall C. en el año de 1934 [77]. En la actualidad es uno de los más empleados para estudiar parámetros conductuales animales tales como ansiedad, sedación o valoración de la actividad motora. Proporciona una evaluación fácil y bastante rápida de comportamientos bien definidos que no requieren entrenamiento para el sujeto de prueba. Estos atributos han llevado al uso generalizado del laberinto de campo abierto en la investigación, extendiéndola a otras especies animales como terneros, cerdos, conejos, primates, abejas y langostas. Los roedores, por ejemplo, muestran distintas aversiones a ambientes grandes, iluminados, abiertos y desconocidos. Todas estas características se incorporan en el laberinto de campo abierto y forman la base de su uso en las pruebas de paradigma de comportamiento. Un laberinto de campo abierto consiste en un área encerrada en la pared que es suficientemente alta para evitar que el sujeto se escape. Las formas típicas del laberinto son circulares o cuadradas, con un área grande, según el tamaño del sujeto examinado, para provocar una sensación de apertura en el centro del laberinto [78]. Se pueden calificar varias variables en el laberinto de campo abierto con la mayoría de los parámetros que involucran diferentes tipos de actividad motora. La deambulación es el comportamiento más común estudiado, pero también se pueden medir otros como la latencia o los levantamientos verticales [79].

1.11.3 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)

La prueba de laberinto elevado en forma de cruz (LEC), es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad. La prueba se basa en la aversión natural de los ratones para áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio espontáneo natural en entornos nuevos. El aparato consta de brazos abiertos y brazos cerrados, cruzados en el medio perpendicularmente entre sí, y un área central. Los ratones tienen acceso a todos los brazos y se les permite moverse libremente entre ellos. El número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo que pasan en los brazos abiertos se usan como índices de ansiedad inducida por el espacio abierto en ratones. Esta prueba de comportamiento asociada a

la ansiedad se ha utilizado para detectar y fenotipar ratones transgénicos y noqueados genéticamente [80], y para el descubrimiento de fármacos [80, 81]. La prueba de LEC tiene una fuerte validez predictiva para la detección de fármacos ansiolíticos [80, 82, 83]. Los medicamentos ansiolíticos aumentan el número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo que pasan allí. Mientras que los medicamentos ansiogénicos disminuyen significativamente el tiempo y permanencia en brazos abiertos [84].

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales utilizadas para el control de la presión arterial: género *Ocimum*

El uso de terapias herbales para el tratamiento y manejo de enfermedades cardiovasculares está aumentando [85]. Los efectos medicinales beneficiosos de estos materiales vegetales se deben principalmente a las combinaciones químicas de metabolitos secundarios producidos por las plantas, principalmente flavonoides, taninos, ácido ascórbico y carotenoides [86, 87]. En la medicina tradicional mexicana, el conocimiento popular sobre las plantas medicinales ha dado, a lo largo del tiempo, un gran número de especies que han sido y siguen siendo utilizadas en el tratamiento de problemas médicos frecuentes en el país, tales como: enfermedades infecciosas, gastrointestinales, pulmonares, metabólicas, cardiovasculares, etcétera [13, 88]. En el caso de la hipertensión y de las complicaciones que se presentan a largo plazo asociadas a ésta, existen estudios de una gran variedad de especies vegetales que muestran su capacidad para modificar los eventos de daño en modelos biológicos [87, 89].

La familia Lamiaceae (labiadas) incluye una de las variedades de plantas oleaginosas más ricas, compuesta por más de 252 géneros y 7000 especies [90]. Uno de los géneros de la familia Lamiaceae con mayor registro de usos medicinales y culinarios es el género *Ocimum*; la "Reina de las hierbas" ha sido considerada como "elixir de la vida" y se cree que promueve la longevidad. Este género está conformado aproximadamente por 30 especies, su área de distribución es en los trópicos y subtrópicos tanto del Nuevo como del Viejo Mundo. Se cultivan con frecuencia en Europa y América. Son reconocidas en la cultura de diferentes partes del mundo por sus propiedades aromáticas, medicinales y alimenticias. Las hojas tienen importantes actividades antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, antiartríticas, anticoagulantes, hipotensoras, antibacterianas y quimioprotectoras atribuidas principalmente a su alto contenido en aceites esenciales (Tabla 8) [31, 87, 89–92].

Tabla 8. Comparación de la presencia de aceites esenciales de especies del género *Ocimum*. Modificado de Viera *et al.*, 2014 [93].

Componente	Composición (%)		
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i>	<i>Ocimum selloi</i>
β -pineno	1.5	2.6	-
Mirceno	1.0	1.9	-
1,8-Cineol	8.9	15.5	7.4
(E)- β -Ocimeno	3.1	4.2	-
γ -Terpineno	1.3	2.0	-
(Z)-hidrato de sabineno	-	-	0.8
(Z)-Oxido de linalol	-	-	2.8
(E)-Oxido de linalol	-	-	2.6
Linalol	41.5	44.0	16.8
Alcanfor	0.9	1.7	1.7
Terpineno-4-ol	-	0.7	2.1
Anetol	-	5.7	52.2
Bornil acetato	1.2	0.6	0.8
Timol	1.1	0.8	-
Eugenol	1.3	1.1	0.6
α -Copaeno	0.6	-	-
β -Elemeno	2.5	0.9	-
Metil eugenol	0.8	0.4	-
(Z)- α -Bergamoteno	5.7	4.5	-
α -Guaieno	0.9	0.4	-
α -Humuleno	2.7	1.1	-
γ -Muuroloeno	1.7	-	-
Germacrene D	5.9	3.4	-
α -Bulnesene	-	1.2	-
γ -Cadineno	5.6	2.6	1.1
p-Metoxi-cinnamaldehido	-	-	2.9
Epóxido de humuleno II	-	-	0.9
1,10-di-epi-cubenol	-	0.7	-
α -Muurulol	11.8	4.4	2.3

La composición química del género *Ocimum* es altamente compleja, contiene muchos nutrientes y otros compuestos biológicamente activos, cuyas proporciones pueden variar considerablemente entre plantas dentro de la misma población [94]. El ácido ursólico y el ácido oleanólico son los triterpenos más abundantes y son considerados como marcadores químicos para el desarrollo de muchos medicamentos herbales estandarizados basados en *Ocimum* [90]. Junto con los triterpenos, los flavonoides son uno de los grupos más grandes de compuestos polifenólicos que se encuentran en plantas superiores y se consideran una excelente fuente de productos antihipertensivos funcionales. Su capacidad para inhibir la ECA se ha atribuido a la contribución general de sus grupos funcionales, incluidos los grupos carboxilo e hidroxilo; su capacidad para formar interacciones carga-carga con el ion zinc

presente en el sitio activo de ECA y su interacción con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima [87].

Se han demostrado diferentes efectos de las especies del género *Ocimum*, como vasorelajante debido a reducción de estrés oxidante, inflamación (inhibe la formación de ciclooxigenasa) y señalización de la angII; y por incrementar: la biodisponibilidad del NO, la capacidad antioxidante natural, la producción de H₂S, la disponibilidad de prostaglandinas (PGI₃ que tiene actividad vasodilatadora) y sus receptores, por inhibir a la ECA, entre otros mecanismos [13, 85]. También, presentan efecto hipolipidémico, así como supresión de isquemia y accidente vascular cerebral [87].

2.1.1 *Ocimum basilicum* Linn

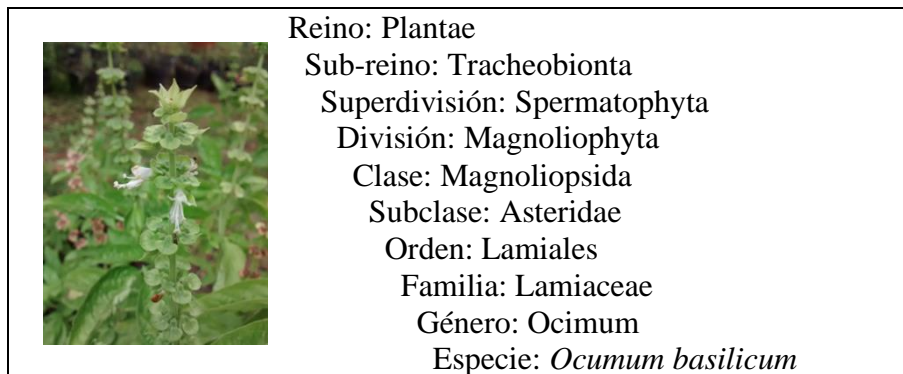


Figura 8. Clasificación taxonómica de *Ocimum basilicum*. Fotografía en el CIBIS-IMSS tomada por M. en C. Elian Yuritzí Alegría Herrera.

Conocida comúnmente como albahaca (Figura 8), es una hierba perenne, nativa de Asia, África, Suramérica y el Mediterráneo, pero es ampliamente cultivada en diferentes países [95, 96]. La administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) clasifica a *O. basilicum* como una especie reconocida generalmente como segura (*generally recognized as safe*, gras). Es una planta que se utiliza en la medicina tradicional y como hierba culinaria. Se ha empleado para el tratamiento de la ansiedad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, dolores de cabeza, dolor de nervios, anticonvulsivante, antiinflamatorio, resfriados, tos, desordenes digestivos, fiebres, migrañas, picaduras de insectos, cólicos menstruales, sinusitis, y desórdenes neurodegenerativos [91, 97, 98]. Por otra parte, las hojas y flores de la planta son útiles como carminativo, galactogogo, estomacal y antiespasmódico [99]. Existen reportes farmacológicos que diferentes extractos provenientes de *O. basilicum* tienen actividad anticáncida, antibacterial [100], antifúngica

[101], anti-giardia, antiviral, antioxidante, hipolipemiante, antiinflamatoria, inhibe la agregación plaquetaria, antitrombótica, broncodilatadora, antiulcerogénica y anticancerígena [102].

Umar *et al.* en el 2010, reportaron que el extracto de *O. basilicum* reduce de 20 y 25 mmHg la presión arterial sistólica y diastólica, en el modelo hipertensión renovascular en ratas (que genera un incremento en la concentración de angII); en el mismo estudio se encontró una reducción de la hipertrofia cardíaca y el nivel de endotelina [86].

O. basilicum contiene antocianinas aciladas y glicosiladas, ácidos fenólicos, ácido rosmarínico [98, 103], ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido gálico junto con trazas de ácido vanílico. Los ácidos fenólicos tienen efecto antioxidante y, por lo tanto, un potente papel neuroprotector [94]. Por otro lado, los componentes activos como el ácido ursólico, el ácido rosmarínico, el eugenol y el *b*-cariofileno que se han evaluado individualmente para determinar su duración y efectos moduladores del estrés relacionados con la edad y se sugirió que poseen potencial antienvjecimiento [89].

2.1.2 Ácido fenólico: ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico (AR; Figura 9) es un ácido hidroxicinámico antioxidante polifenólico que se ha aislado especialmente de las especies de Lamiaceae [104] y hierbas culinarias ampliamente utilizadas [105]. Scarpati y Oriente (1958) [106], aislaron por primera vez el ácido rosmarínico (α -O-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl ácido láctico) como un compuesto puro y lo denominaron así por la planta de la que se aisló, *Rosmarinus officinalis*. La biosíntesis del ácido rosmarínico comienza con los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina. El AR es soluble en agua y el rendimiento de este compuesto en infusiones es de aproximadamente el 90% [107]. El AR se metaboliza parcialmente en ácido cumárico y ácido cafeico en el organismo de la rata y se ha propuesto que su efecto hipolipidémico puede deberse a la acción de sus metabolitos [108].

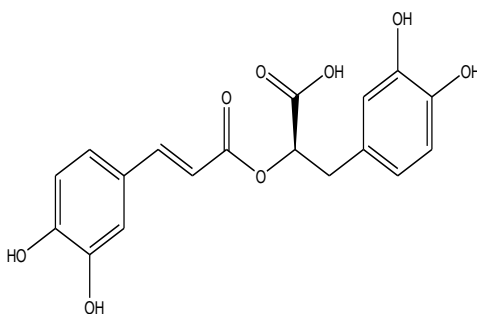


Figura 9. Estructura del ácido rosmarínico.

Este compuesto tiene efectos biológicos notables, como el antiviral, antibacteriano, anticancerígeno (células de estómago, colon, hígado, mama y leucemia), antioxidantes, antienvjecimiento, antidiabético, cardioprotector, hepatoprotectos, nefroprotector, antidepressivo [108–111], antialérgico (rinoconjuntivitis alérgica estacional) [112] y antiinflamatorio (osteoartritis [113] y dermatitis atópica [114]).

El posible mecanismo de acción del AR sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos puede estar mediado por la peroxidación del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) [115]. La actividad antioxidante del AR deriva directamente de su estructura; la presencia de 4 hidrógenos en el sistema fenólico y dos catecólicos, le dan un carácter polar. Los estudios electroquímicos han demostrado que el AR se oxida en dos pasos: en el primero el resto del ácido cafeico se oxida y en el segundo el residuo del ácido 3,4-dihidroxifenil láctico [108]. Por otro lado, se ha demostrado que el AR estimula la regulación de las subunidades catalíticas de la glutamato cisteína ligasa (la enzima implicada en la biosíntesis de glutatión reducido, GSH) en las células madre hematopoyéticas [116]. Por lo tanto, RA se considera el antioxidante más fuerte de todos los derivados del ácido hidroxicinámico [108].

En un estudio realizado por Karthik *et al.*, en el 2011, se reportó que el AR reduce la presión sanguínea inducida por la fructosa al disminuir la actividad de la ECA y la endotelina-1 y aumentar el nivel de óxido nítrico (NO)[117]. AR también interviene en muchos pasos importantes de la angiogénesis, incluida la adhesión, la migración, la proliferación y la formación de tubos de células endoteliales de la vena umbilical humana en un patrón dependiente de la dosis [108, 118].

Se ha demostrado que reduce el comportamiento de estrés/miedo ocasionado por exposición a frío [109] y disminuye significativamente la duración de la respuesta en la prueba de nado forzado, sugiriendo acción antidepressiva [119].

2.1.3 *Ocimum selloi* Benth

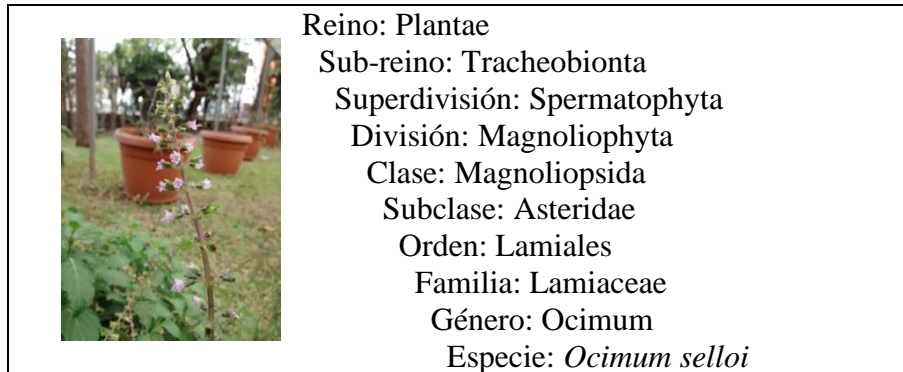


Figura 10. Clasificación taxonómica de *Ocimum selloi*. Fotografía tomada en el CIBIS-IMSS, por M. en C. Elian Yuritzi Alegría Herrera.

Se le conoce como “hierba del hierro” y “hierba del zopilote” [120]. Es una hierba o arbusto corto de 30 cm a 1.40 m de alto, con las hojas anchas en la parte de en medio y sus extremos terminando en punta, los bordes con denticillos tienen las flores blancas lilas o moradas y en forma de tubo y abriendo en 2 labios (Figura 10). Los frutos son de color verde, muy pequeños. Originaria de México, habita en climas cálido y semicálidos desde el nivel del mar hasta los 700 m. Asociado a bosques tropicales caducifolio y perennifolio, además de pastizal. En Chiapas, Hidalgo y Puebla se le emplea para aliviar padecimientos digestivos, como dolor de estómago, gases intestinales, diarrea, disentería, dolor de abdomen y parásitos intestinales. Se le usa para tratar la gripa y como antitusígeno, en baños postparto, para la presión arterial o el aire del corazón, así como en el sarampión, la calentura con escalofrío, en la tristeza, como antiespasmódico, o bien, para el “aire” (término cultural) [121].

Las hojas y flores de *Ocimum selloi* contienen un aceite esencial en el que se han identificado los componentes fenólicos *cis* y *trans* anetol, anisaldehído, anisol y estragol [122], y el monoterpeno cineol [90]. *O. selloi* es una planta mexicana con pocos reportes farmacológicos, uno de ellos derivado del presente trabajo [123] y por Souza *et al.*, 2015, quienes reportan una actividad antiespasmódica en un modelo de íleon de cobayo, por el bloqueo de los canales de calcio [124].

3. JUSTIFICACIÓN

La disfunción endotelial y la agregación plaquetaria desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares así como en el desarrollo de las principales complicaciones, como son la aterosclerosis y la formación de trombos arteriales [1]. Los riesgos graves de la HTA crónica, como son el daño vascular, deterioro cognitivo y enfermedades psiquiátricas, no tienen un tratamiento específico, por lo que éste se basa en establecer un régimen de control de dicho padecimiento, para alargar el tiempo o evitar en la medida de lo posible la presencia de síntomas neurológicos, entre otros. El cerebro es el órgano blanco ante los efectos deletéreos de la HTA, ya que es el principal factor de riesgo de ictus, acompañado de deterioro cognitivo e incluso demencia [125, 126].

En México, el paciente acude al médico cuando han transcurrido varios años desde el inicio de su HTA y, probablemente, ya habrá algún grado de en órgano blanco. Además, se estima que solamente el 10% de la población mexicana hipertensa tiene un control óptimo de la presión arterial. Lo anterior podría contribuir a explicar por qué la tasa de urgencias hipertensivas y eventos vasculares cerebrales van en aumento, y no en reducción como en otros países [127].

El abordaje de la HTA es y será siempre multidisciplinario, es decir, que debe abordarse en el contexto de la prevalencia e interacción con otras enfermedades crónicas esenciales del adulto, así como de otros factores de riesgo, como la obesidad, la diabetes, las dislipidemias, el tabaquismo. Entre mayor participación de factores, mayor será el riesgo cardiovascular. La necesidad de controlar la presión arterial, así como la inhibición de las acciones de la angII continúa siendo uno de los objetivos primordiales en la terapéutica cardiovascular, que intenta controlar las consecuencias a largo plazo de la HTA, lo que ha planteado una interesante evolución hacia la prevención en estos pacientes de alto riesgo, mediante el desarrollo de nuevos medicamentos, dispositivos y procedimientos, no únicamente diseñados para tratar la hipertensión sino también sus comorbilidades, ya que se trata de entidades no curables, con secuelas que en su mayoría serán incapacitantes[54, 128].

La estrategia terapéutica de la patología vascular busca como objetivo obtener un medicamento efectivo que no perjudique la calidad de vida (sin propiciar factores de riesgo) y, principalmente, a la protección de los órganos blanco asociados con la HTA (cerebro, corazón y riñón). La atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones. La Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de las medicinas

tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo. La vigencia del uso de las plantas medicinales en amplios sectores de la población de México expresa la permanencia de esta práctica cultural y pone de manifiesto la necesidad de una revalorización del conocimiento tradicional con la finalidad de impactar en la solución de problemas de salud [129]. Muchas de las especies de plantas medicinales que utilizan los habitantes crecen de manera silvestre y han sido aprovechadas por la gente de diferentes comunidades para solucionar sus problemas de salud. Los efectos terapéuticos de las especies vegetales ocurren debido a las combinaciones químicas de metabolitos secundarios producidos por la planta. La investigación sobre las plantas medicinales ahora está siendo muy popular en todo el mundo. Por lo tanto, es necesario un examen científico de los remedios, estandarización, caracterización y el control de calidad de los medicamentos para garantizar su seguridad.

Tomando en cuenta que para la especie *O. selloi* no hay reportes farmacológicos sobre su efecto a nivel vascular en sistema nervioso central, en el presente trabajo se estudió el efecto antihipertensivo a nivel vascular y conductual de los extractos orgánicos de *O. basilicum*, *O. selloi* y el ácido rosmarínico en un modelo murino crónico de hipertensión arterial inducido con angII.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- a) ¿Los extractos orgánicos de *O. basilicum* y de *O. selloi*, son capaces de contrarrestar el daño a cerebro y riñones, disfunción endotelial y estrés conductual por la administración crónica de angII?
- b) ¿Diferentes dosis de ácido rosmarínico, presente en ambos extractos orgánicos, son capaces de disminuir del efecto de la angII?

5. HIPÓTESIS

1. Los extractos de *O. basilicum* y *O. selloi*, contrarrestan los efectos deletéreos de la administración crónica de angII sobre el sistema vascular cerebral, la hipertensión, el déficit cognitivo y la inflamación.
2. Diferentes dosis de ácido rosmarínico, bloquean los efectos deletéreos de la administración crónica de angII sobre el sistema vascular cerebral y periférico, la hipertensión, el déficit cognitivo e inflamación.

6. OBJETIVO GENERAL

Demostrar el efecto antihipertensivo de los extractos de *O. basilicum* (Ob-AEt), *O. selloi* (Os-AEt) referidos a la concentración de ácido rosmarínico, así como su efecto sobre las comorbilidades asociadas: daño a órgano blanco, inflamación, déficit cognitivo y estrés conductual.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar el efecto antihipertensivo de Ob-AEt y Os-AEt, en el modelo de hipertensión arterial crónica.
2. Determinar el efecto ansiolítico, consolidación de la memoria a corto y largo plazo, sobre la conducta motora espontánea y coordinación motora de Ob-AEt y Os-AEt, en un modelo murino de hipertensión por angII.
3. Cuantificar los niveles serios de corticosterona en ratones tratados con Ob-AEt y Os-AEt, en el modelo de HTA.
4. Establecer el efecto inmunomodulador de Ob-AEt y Os-AEt, en cerebro y riñones de ratones hipertensos por la administración crónica de angII
5. Demostrar el efecto protector de Ob-AEt y Os-AEt sobre el endotelio cerebral en un modelo de HTA por angII.
6. Medir la concentración de ácido rosmarínico (AR) en Ob-AEt y Os-AEt.
7. Evaluar el efecto antihipertensivo, antiinflamatorio, ansiolítico y nootrópico del AR en el modelo de angII.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Obtención de material vegetal

En la Tabla 9 se muestra la información sobre la colecta de las partes aéreas de las especies del género *Ocimum*:

Tabla 9. Datos de la colecta de las especies del género *Ocimum*.

Especie	Lugar y fecha de colecta	Coordenadas	Registro ejemplar de herbario	Observaciones
<i>Ocimum basilicum</i>	Noviembre 2004. Xochitepec, Morelos, México	Latitud: 18.88215817501883 Longitud: 99.1775	2054 Herbario del INAH (Jardín botánico).	Extracto hidroalcohólico, realizado en CIBIS- IMSS [130]
<i>Ocimum selloi</i>	20 enero 2016. Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero, INECOL, Xalapa, México.	Latitud: 19.513434; Longitud: 96.943641	2053 Herbario del INAH (Jardín botánico)	Donación

INECOL: Instituto de Ecología. INAH: Instituto Nacional de Antropología e Historia. CIBIS-IMSS: Centro de Investigación Biomédica del Sur-Instituto Mexicano del Seguro Social.

8.2 Preparación de los extractos

El material vegetal se secó a la sombra, se molió y se realizó la extracción por maceración con un sistema hidro-alcohólico al 60%, por 72 horas para ambas especies. Ambos extractos se concentraron a presión reducida (Laborota 4000; Heidolph WB eco) a 50°C y a 37 xg (81 rpm). A partir del extracto hidroalcohólico se realizó una separación líquido-líquido con acetato de etilo (Merck)-agua, recuperando la parte orgánica.

8.3 Caracterización de extractos orgánicos

Los extractos fueron sometidos a un proceso de separación de sus componentes por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El equipo utiliza un módulo de separación Waters 2695 con un arreglo de diodos de detección Waters 996, y el software Empower Pro (Waters Corporation, USA). Se utilizó una columna Supelcosil LC-F (4.6mm x 250 mm i.d., 5-µm tamaño de partícula) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). En la Tabla 10 se muestran las condiciones.

Tabla 10. Gradiente de elución utilizado en el CLAR.

Tiempo (min)	Fase móvil (gradiente en porcentaje)	
	Ácido trifluoroacético al 0.05%	Acetonitrilo
0-1	100	0
2-3	95	5
4-20	70	30
21-23	50	50
24-25	20	80
26-27	0	100
28-30	100	0

El flujo se mantuvo a 0.9 mL min^{-1} y el volumen inyectado fue de $10 \mu\text{L}$, la absorbancia se midió a 330 nm . Identificando al ácido rosmarínico (AR) como uno de los compuestos mayoritarios en el extracto de *O. basilicum* (Ob-AEt). El AR, se identificó por comparación con una muestra comercial (grado de pureza 96%, Sigma, Aldrich), usando los tiempos de retención y el espectro UV que se generaron al analizar ambas muestras en CLAR. El peso molecular se corroboró por análisis UPLC-MS (ACQUITY, software Waters). La cantidad de este compuesto polifenólico se estimó por interpolación del área bajo la curva del pico cromatográfico en cada extracto orgánico, comparándolo otra vez con el estándar de referencia mediante una curva de calibración, usando las concentraciones de 0.039, 0.078, 0.152, 0.3.12 y 0.624 mg/mL, mediante un método de análisis por triplicado. Bajo las mismas condiciones de corrida por CLAR: (λ 330, y gradiente de elución como se muestra en la Tabla 10). Este proceso analítico permitió obtener una ecuación lineal ($Y=31874x-134853$, $R^2=0.9994$). Los resultados se expresan como valores promedio en mg/g de extracto seco.

8.4 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones de la cepa ICR ($n=12$ por grupo) con un peso aproximado de 30-35 g, acondicionados en el laboratorio a una temperatura ambiente de 25°C , con ciclos de 12 horas de luz por 12 horas oscuridad, con acceso libre al alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones de técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio).

8.5 Modelo de daño vascular inducido por administración crónica de angII

La selección de los animales para el modelo crónico se realizó a través de medir la tensión arterial de estos, usando un equipo LE5002 *storage pressure meter LSI Letica Scientific Instruments*, con un esfigmomanómetro integrado. Aquellos animales que tenían la presión arterial normal fueron seleccionados para formar, inicialmente 2 grupos:

1. Recibió durante la experimentación solamente agua (n=12).
2. Recibió angII 0.2 µg/Kg por 6 semanas por vía intraperitoneal (ip, n=132)

A partir de la semana 6 de la administración ip de angII, se realizó una siguiente medición de la presión arterial de todos los animales. Posteriormente, los 132 animales con angII, recibiendo también un tratamiento por vía oral (fármacos de referencia o los experimentales, Tabla 11). Finalmente, en la 12ava semana se realizó la última medición de la PA, además de los ensayos conductuales y la toma de muestras biológicas, para las pruebas bioquímicas (Figura 11).

Tabla 11. Fármacos utilizados en el modelo de HTA crónica inducida con angII 0.2 µg/Kg

Grupos	Tratamiento (mg/Kg) vía oral	Clave	Administración de angII
Sanos	-	Sanos	-
Controles			
Negativo (Vehículo)	Agua	Veh	+
Antihipertensivo	Telmisartán (10)	Tel 10	+
Nootrópico	Galantamina (0.20)	Gal 0.2	+
Ansiofítico	Diazepam (0.25)	Dzp 0.25	+
Experimentales	Extracto de acetato de etilo de <i>O. basilicum</i> (25)	Ob-AEt 25	+
	Extracto de acetato de <i>O. selloi</i> (25)	Os-AEt 25	+
	(0.39)	AR 0.39	+
	(0.78)	AR 0.78	+
	Ácido rosmarínico (1.56)	AR 1.56	+
	(3.12)	AR 3.12	+
	(6.24)	AR 6.24	+

AR, 96% estándar de referencia de Sigma Aldrich.

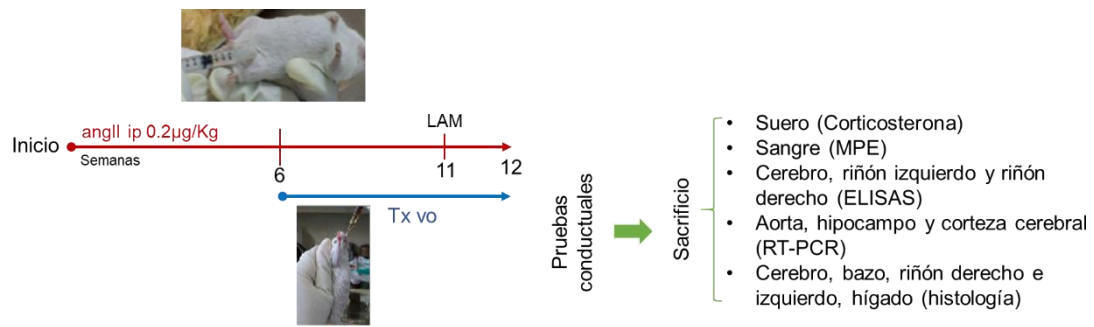


Figura 11. Línea temporal del desarrollo del modelo de daño cerebrovascular asociado por HTA crónica-inducida con angII. LAM; laberinto acuático de Morris. LEC; laberinto elevado en forma de cruz. CA; campo abierto.

8.6 Pruebas conductuales

Al finalizar las 12 semanas de experimentación y antes del sacrificio se realizaron los ensayos conductuales. Los 12 animales de cada grupo fueron sometidos a la prueba de campo abierto (CA), mientras que 6 de éstos fueron evaluados en el laberinto acuático de Morris (LAM) y los otros 6 en el laberinto elevado en forma de cruz (LEC). Cabe señalar que 60 minutos antes de la exposición de los ratones a cada prueba, recibieron su tratamiento correspondiente.

8.6.1 Laberinto acuático de Morris (LAM)

En la semana 11 de experimentación se llevó a cabo la fase inicial de esta prueba (entrenamiento). En una tina (el laberinto) de 150 cm de diámetro por 50 cm de profundidad, dividida en cuatro cuadrantes (norte, sur, este y oeste), se coloca una plataforma sumergida a 1.5 cm debajo de la superficie del agua, parte importante del ensayo es que alrededor del contenedor se colocan imágenes, que sirven de señales visuales para los roedores.

La fase de entrenamiento consistió en colocar el ratón en uno de los cuadrantes, permitiéndole la exploración por todo el laberinto durante 60 seg, con la finalidad de que encontrará la plataforma sumergida. Al finalizar el tiempo de recorrido, si el roedor no la encontraba, se le guiaba hacia ella y se le permitía permanecer por 30seg.

A cada individuo se les expuso a cuatro recorridos por día, cada uno de ellos iniciando en los diferentes cuadrantes. También, el lugar de inicio cambió cada día durante el entrenamiento por 5 días, esta etapa es la de aprendizaje. Posteriormente, y durante dos días los animales descansaron de la prueba de LAM, tiempo que se aprovechó para realizarles la evaluación de conducta motora espontánea y actividad exploratoria en el campo abierto (CA) (Figura 12).

Finalmente, para llevar a cabo el análisis de memoria en el LAM, al octavo día la plataforma del laberinto fue retirada y cada animal fue colocado en la tina durante 60 seg, tiempo en el cual se mide el tiempo en que los ratones llegan a la zona de la plataforma (latencia) y el número de cruces sobre esta zona. La prueba se videograbó para su posterior análisis mediante el programa SMART V3 (PanLab tracking software). Al finalizar el ensayo, todos los individuos fueron sacrificados por dislocación cervical (NOM062-ZOO inciso 9.5.3.2), para la obtención de órganos; cerebro y ambos riñones, así como sangre para su posterior análisis.

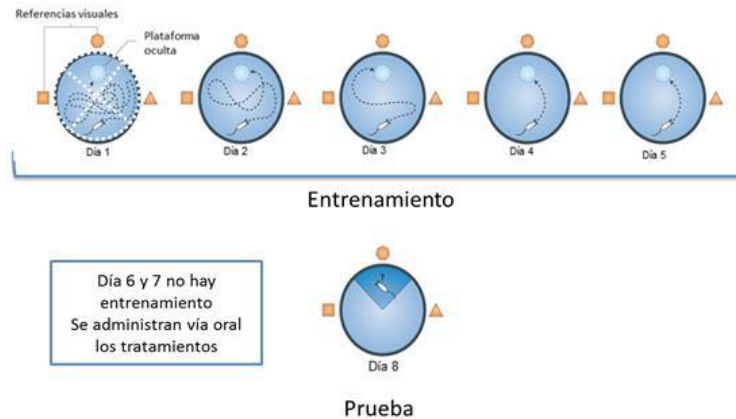


Figura 12. Protocolo para el Laberinto acuático de Morris. Línea punteada blanca, cuadrantes en los que se divide el contenedor; línea punteada negra, trayectoria del ratón.

8.6.2 Laberinto elevado en forma de cruz (LEC)

El equipo empleado está construido de acrílico, con un centro de 5x5 cm, los brazos abiertos y cerrados de 30 cm de largo por 5 cm de ancho a una altura de 50 cm del piso, la altura de las paredes de los brazos cerrados es de 15 cm. Cada ratón fue colocado en el centro del laberinto y su comportamiento fue observado durante 5 min. Al terminar cada ensayo se limpió el equipo con etanol al 10%. Para obtener el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\%TA = \left(\frac{TA}{TA + TC} \right) (100) \qquad \%EA = \left(\frac{EA}{EA + EC} \right) (100)$$

Dónde: TA: Tiempo en brazos abiertos, TC: Tiempo en brazos cerrados, %TA: Porcentaje de TA, EA: Entradas a brazos abiertos, EC: Entradas a brazos cerrados, %EA: Porcentaje de EA.

8.6.3 Prueba de campo abierto (CA)

El campo abierto (CA) está fabricado de acrílico, sus paredes son transparentes y piso negro, con 9 divisiones marcadas de color blanco; mide 30 x 30 cm, sus paredes miden 15 cm. Los animales se observaron durante 5 min y se tomaron en cuenta los parámetros de cruces totales (CT) y de elevaciones verticales (EV) (Figura 13).



Figura 13. Aparato de campo abierto.

8.7 Permeabilidad vascular por método de azul de Evans

Se administraron 200 μ L de azul de Evans al 0.5% disuelto en PBS vía endovenosa a ratones ICR. Se observaron durante 30 min: transcurrido este tiempo se anestesiaron con pentobarbital sodico (6.3 mg/mL), se realizó la ultima medición de la presión arterial; y posteriormente se realizó una perfusión con PBS y heparina al 1% (Figura 14). Los órganos se disectaron y se incubaron en 500 μ L de formamida (Eastman Kodak) a 55°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 233.33 xg (14000 rpm) durante 7 min, y el sobrenadante se colocó en celdas de cuarzo para su análisis en espectrofotometro a $\lambda=620$ nm, utilizando formamida como blanco.

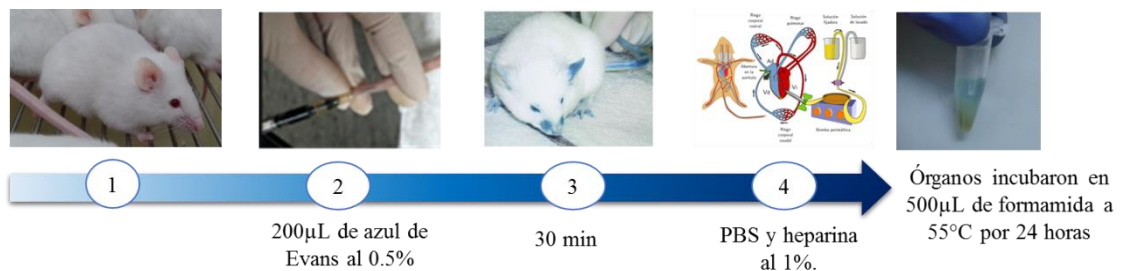


Figura 14. Línea del tiempo en la evaluación de extravasación con azul de Evans. 1) animal sin administración de azul de Evans, 2) administración endovenosa del colorante, 3) medición de PA, 4) perfusión y disección de órganos.

8.8 Cuantificación de citocinas y corticosterona por método de ELISA

El cerebro y ambos riñones (derecho e izquierdo) por separado fueron homogenizados en una solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 7.4 con fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF: inhibidor de proteasas de serina) al 0.1% (5mM) en una proporción 5:1 peso: volumen, por medio de un politrón (ULTRA-TURRAX T25 basic) a 108.335 xg (6500 rpm). Las muestras fueron centrifugadas a 233.33 xg (14000rpm) durante 7 minutos y el sobrenadante se utilizó para realizar la cuantificación de las citocinas por el método de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), siguiendo las instrucciones del fabricante; Mouse IL1 β ELISA set (Cat. No. 559603) BD OptEIA TM. Mouse IL6 ELISA Set (Cat. No. 555240) BD OptEIA TM. Mouse TNF Mono/Mono ELISA Set (Cat. No. 555268) BD OptEIA TM. Mouse IL10 ELISA Set (Cat. No. 555252) BD OptEIA TM. Mouse IL4 ELISA Set (Cat. No. 555232) BD OptEIA TM. Human/Mouse TGF beta 1 Uncoated ELISA (Cat. No. 88-8350) Introvigen Thermo Fisher Scientific. Mouse MCP1 ELISA Set (Cat. No. 555260) BD OptEIA TM. Para la cuantificación de la concentración de corticosterona, se utilizó el suero y se siguieron las instrucciones del fabricante Corticosterone ELISA Kit (Item No. 501320) Cayman Chemical.

8.9 Aislamiento de micropartículas endoteliales

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,000 g durante 15 min dentro de los 30 min después de la extracción (flebotomía). El plasma se almacenó a -40°C. Las muestras se descongelaron en baño de agua a 37°C durante 5 min, se agitaron en vortex y se centrifugaron a 3,000 xg por 15 min. El plasma libre de plaquetas se centrifugó varias veces: a 20,000 x g por 30 min (recupera >90% de las micropartículas); se removió el sobrenadante, y el pellet (MPE) se reconstituyó con 0.5 mL de solución de Hank con glucosa al 0.05% y amortiguado a un pH 7.4 con HEPES a 20 mM. Las muestras reconstituidas se agitaron en vortex y se centrifugaron, de nuevo, a 20,000 g por 30 min. Después de la centrifugación, los pellets se fijaron con paraformaldehído al 1%, hasta su análisis por citometría de flujo.

8.10 Tinción de micropartículas endoteliales (MPE)

Se realizó el lavado de las muestras mediante una centrifugación a 20,000 g por 30 min. Al pellet, se le agregaron 200 μ L de PBS (libre de Ca²⁺ para tinción con Anexina V). Y

nuevamente se centrifugaron a 20,000 xg por 10-15 min. A continuación de incubaron las muestras en albúmina y PBS (1:1), durante 15 min a 4°C y en oscuridad. Se lavaron nuevamente por 20,000 xg por 7 min y el pellet se resuspendió en 200 µL de PBS. Al finalizar, se adicionaron los flourocromos y se incubaron durante 20 min a 4°C en oscuridad. Las muestras se leyeron en el equipo Guava easyCheck™ HT System (Merck).

8.11 Análisis estadístico



Los datos obtenidos se analizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) post-prueba Tukey para las pruebas *in vitro* y para los modelos conductuales se utilizó ANOVA post-prueba Dunnet, ambas con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.0.

9. RESULTADOS

9.1 Rendimiento y análisis cromatográfico de los extractos orgánicos de *Ocimum basilicum* y *Ocimum selloi*

Se obtuvo un rendimiento del 2.92% de la fracción de acetato de etilo de *O. basilicum* (Oba-AEt) (Tabla 12), se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, y se identificó un compuesto mayoritario el cual se purificó por cromatografía líquida en columna abierta en un sistema de fase reversa (agua: acetonitrilo), y se envió a resonancia magnética nuclear (RMN; colaboración con la Dra. Isabel Laurents de la UNAM). El análisis de ObAeC2-F7 permitió establecer que el compuesto es el ácido rosmarínico (AR) (Figura 15).

Tabla 12. Rendimiento en la obtención de los extractos hidroalcohólicos y orgánicos de *O. basilicum* y de *O. selloi*.

Especie y número de ejemplar de herbario	Extracto	Rendimiento (%)
<p><i>Ocimum basilicum</i>: 2054</p> 	<p>Procesamiento realizado por Herrera-Ruiz 2008 [130].</p>	
	<p>Oba-HA: 65 gr</p>	<p>-</p>
	<p>Oba-AEt: 1.898 gr</p>	<p>2.92</p>
<p><i>Ocimum selloi</i>: 2053</p> 	<p>Planta: 132.7467 g (peso seco)</p>	
	<p>Extracto</p>	<p>Rendimiento (%)</p>
	<p>Ose-HA: 22.5 g</p>	<p>16.95</p>
	<p>Ose-AEt: 1.4774 g</p>	<p>6.55</p>

Ambas especies fueron identificadas en el jardín botánico del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), delegación Morelos, por M en C Margarita Avilés y M en C Macrina Fuentes.

Para el caso de la especie de *Ocimum selloi* Benth se utilizó toda la planta (partes aéreas hasta raíz) y se obtuvieron 132.75g en peso seco, con los que se realizó la maceración en etanol al

60% (Ose-HA). Se obtuvieron 22.5g de Ose-HA, al cual se sometió a un proceso de extracción líquido: líquido (agua/acetato de etilo) Con este proceso se obtuvieron 2 fases, ambas fueron llevadas a sequedad total mediante el proceso de destilación. La fracción de acetato de etilo fue nombrada Ose-AEt (1.48 g), y Ose-Ac la fracción acuosa cuyo disolvente fue eliminado totalmente por liofilización (Tabla 12).

Se realizó la comparación de los extractos Oba-AEt y Ose-AEt, por CLAR. En la Figura 15 se muestra el perfil cromatográfico de todos los extractos obtenidos de ambas especies, utilizando como referencia al AR. En la Tabla 13, se muestra el espectro de absorción UV de algunos compuestos identificados en los diferentes extractos vegetales.

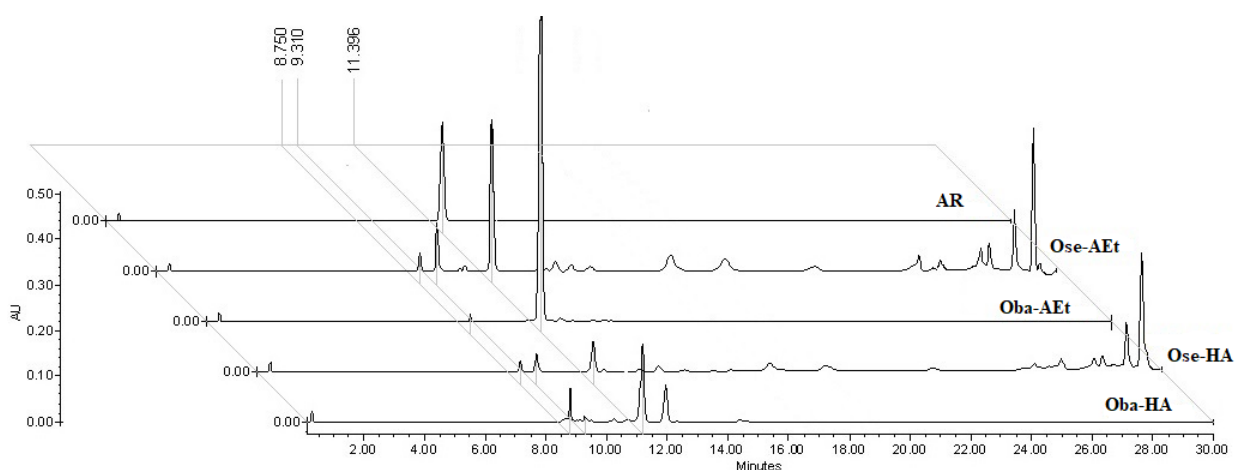


Figura 15. Perfil cromatográfico de los extractos Oba-HA (3mg/mL), Oba-AEt (0.75mg/mL), Ose-HA (3 mg/mL) y Ose-AEt (3mg/mL). Como referencia se utilizó AR (Sigma Aldrich con un nivel de pureza del 96%).

Tabla 13. Tiempo de retención, longitud de onda máxima absorción en la región visible ($\lambda_{\text{máx}}$) e identificación tentativa de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de *O. basilicum* y *O. selloi*.

Compuestos sugeridos con base en las características cromatográficas	Tiempo de retención (min)	Espectro de absorción UV (nm)
Ácido clorogénico (estándar)	8.7	204, 242.7, 323.2
Ácido cafeico (estándar)	9.3	195.8, 218.1, 241.5, 323.2
Ácido rosmarínico (estándar)	11.4	2.19, 330.3
Ácido cumárico (estándar)		194.6, 227.4, 300.6
Ácido cafeico (Oba-AEt)	9.346	193.5, 219.2, 243.9, 325.5, 421, 453.6, 502
Cafeoilo no identificado (Oba-AEt)	11.067	219.2, 330.3
Ácido rosmarínico (Oba-AEt)	11.395	194.6, 219.2, 330.3
Cafeoilo no identificado (Oba-AEt)	11.767	193.5, 219.2, 241.5, 324.4, 403, 421, 439.1, 470.5, 500.1
Flavona no identificada (Oba-AEt)	13.417	202.8, 231, 289.9, 344.6, 425.9, 471.7, 493.5, 505.6, 577.3, 556.6, 532.3, 453.6
Cumarina no identificada (Oba-AEt)	18.939	
Flavona no identificada (Ose-AEt)	12.936	205.2, 262.7, 316, 417.4, 440
Cafeiolo no identificado (Ose-AEt)	15.466	199.3, 268.6, 439.1
Flavonol/ flavona no identificada (Ose-AEt)	17.062	208.7, 256.9, 313.7, 440.3, 471.7, 493.5
Flavona no identificada (Ose-AEt)	18.52	197, 251, 336.3, 441.5, 472.9
Compuesto fenólico no identificado (Ose-AEt)	22.013	211, 268.8
Clorofilas (Ose-AEt)	28-30	192.3, 221.6, 278.1, 325.5, 412.6, 506.8

A partir de la interpolación del área del pico del AR (compuesto mayoritario en Oba-AEt) y con la ecuación lineal ($Y=31874x-134853$, $R^2=0.9994$), se obtuvieron las concentraciones de AR (mg) por cada gramo de extracto seco. En Tabla 14, se indica la concentración obtenida del extracto de acetato de etilo de ambas especies vegetales utilizadas en el proyecto.

Tabla 14. Cuantificación de ácido rosmarínico en los extractos de las especies de *Ocimum*.

Extracto orgánico	AR por g de extracto	Dosis administrada (vo) de extracto	AR administrado (vo)
Oba-AEt	251.65 mg	25 mg/Kg	6.29 mg/Kg
Ose-AEt	15.94 mg	25 mg/Kg	0.39 mg/Kg

9.2 Pruebas biológicas

9.2.1 Modelo de HTA

En la Figura 21, se muestra el resultado del monitoreo de la presión arterial a las 0, 6 y 12 semanas del modelo de HTA. Al administrar durante 6 semanas angII ip, se observó un incremento de aproximadamente 13mmHg en la presión arterial, con respecto al grupo basal, tanto en la presión sistólica (PAS) como diastólica (PAD). Al continuar con la administración de angII durante las 6 semanas restantes, se observó un incremento de 12 mmHg adicionales (* $p<0.05$), en comparación con el grupo de ratones sanos a las 6 semanas.

Se observa disminución significativa en ambas presiones (* $p<0.05$) de los animales por la administración de telmisartán (10mg/Kg) y diazepam (0.25 mg/Kg), con respecto al grupo Veh a las 12 semanas (Figura 16). También los grupos experimentales; Ob-AEt (25 mg/Kg), Os-AEt (25 mg/Kg) y AR con las dosis de 0.39, 1.56, 3.12 y 6.24 mg/Kg, disminuyeron el efecto hipertensivo de la angII, con respecto con el grupo vehículo a las 12 semanas (Figura 17).

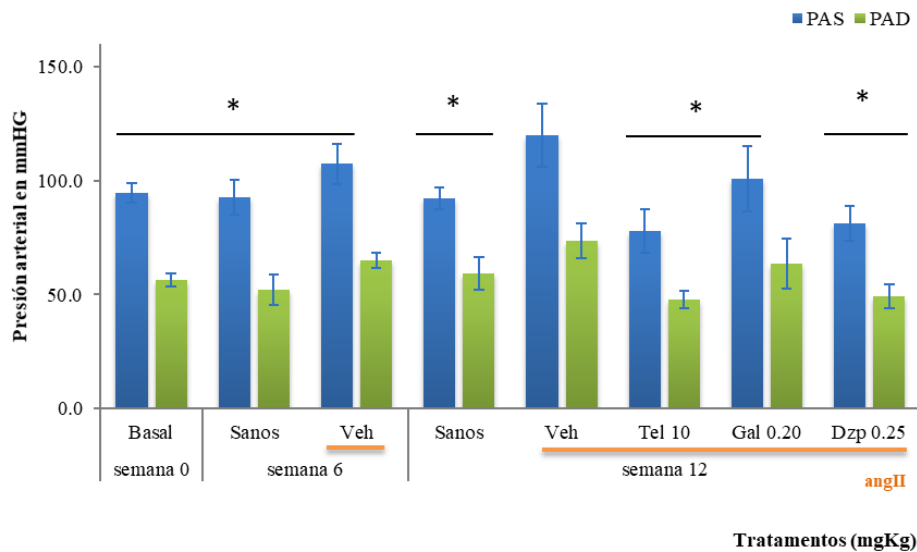


Figura 16. Registro de la presión arterial en el modelo de hipertensión crónica con angII. Semana cero; inicio del modelo, sanos a las 6 y 12 semanas, Veh a las 6 y 12 semanas; control negativo, tratamientos control administrados: telmisartán; tel 10, galantamina; gal 0.20, Diazepam; Dzp 0.25. PAS; presión arterial sistólica, PAD; presión arterial diastólica. ANOVA, post-prueba Dunnet, * $p \leq 0.05$ comparado contra el Veh a las 12 semanas ($n=12$, $\bar{x} \pm DE$).

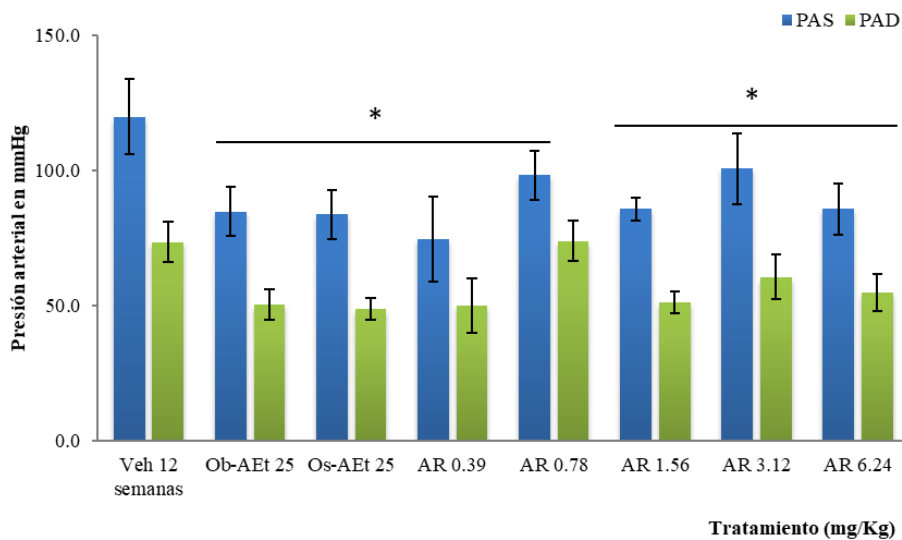


Figura 17. Efecto de los tratamientos experimentales administrados en el modelo de hipertensión arterial. Extracto orgánico de *O. basilicum*; Ob-AEt, extracto orgánico de *O. selloi*; Os-AEt, diferentes dosis de ácido rosmarínico; AR 0.39 a 6.54 mg/Kg. ANOVA, post-prueba Dunnet, * $p \leq 0.05$ comparado contra el Veh a las 12 semanas ($n=12$, $\bar{x} \pm DE$).

9.3 Pruebas conductuales

9.3.1 Laberinto acuático de Morris

Los indicadores del proceso de memoria y aprendizaje que obtuvimos en este ensayo fueron; la latencia (tiempo que le tomó al roedor llegar a la zona de la plataforma), el tiempo sobre la zona de la plataforma y el número de cruces sobre ella. En la Figura 23, se muestra el efecto de los diferentes tratamientos utilizados en el modelo de HTA. Al administrar angII durante 12 semanas se observó un incremento en la latencia, en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas, incluso algunos animales no recordaron donde se encontraba la plataforma sumergida; este efecto se contrarrestó con la administración de telmisartán, galantamina, diazepam, Ob-AEt y Os-AEt; incluso se observó una tendencia en los animales administrados con el extracto de Os-AEt a dirigirse más rápido que los animales administrados con galantamina (nootrópico) (Figura 18A).

En la Figura 23B se muestra el efecto de las diferentes dosis de AR, en donde se observa una disminución en la latencia por la administración de las dosis de 0.39, 0.78, 1.56 y 3.12 mg/Kg.

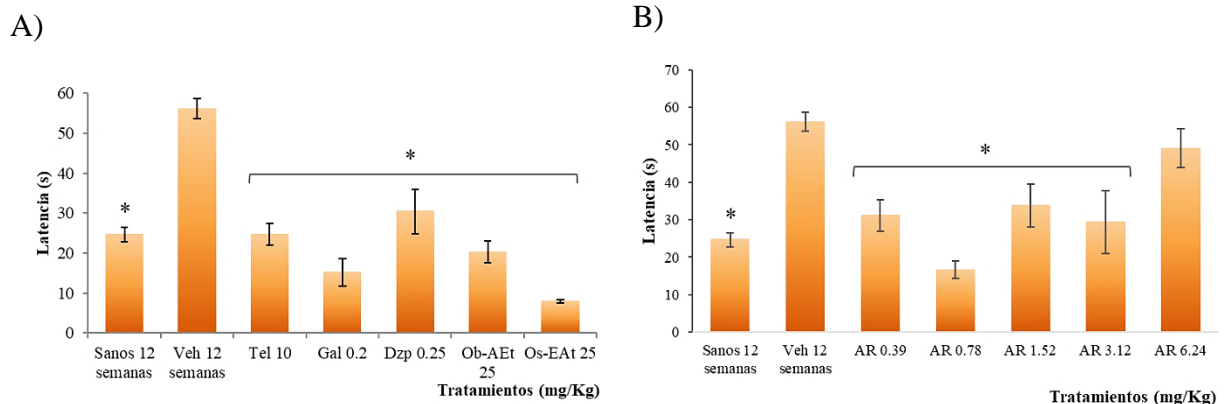


Figura 18. Efecto de los tratamientos en la latencia hacia la plataforma en la prueba de laberinto acuático de Morris. ANOVA, post-prueba Dunnet, *p<0.05 comparado contra el Veh a las 12 semanas (n=6, $\bar{X} \pm EE$).

Confirmando el resultado anterior, en la Figura 19; se muestra que el grupo administrado con angII por 12 semanas no logró permanecer mucho tiempo en la zona de la plataforma y por lo tanto el número de cruces también fue mínimo (o incluso nulo). galantamina, Ob-AEt, Os-AEt (Figura 19A) y las dosis de AR 0.39, 0.78 y 3.12 mg/Kg (Figura 19B) incrementaron el tiempo de permanencia en la zona de la plataforma, con respecto al vehículo a las 12 semanas. De nuevo se observó una tendencia del grupo de Os-AEt, al incrementar el tiempo de

permanencia, esto en comparación con el grupo de galantamina. En cuanto al número de cruces sobre la zona de la plataforma, todos los tratamientos administrados contrarrestaron el efecto de la angII (Figura 19) y las dosis de 0.39, 0.78 y 3.12 mg/Kg de AR (Figura 19D).

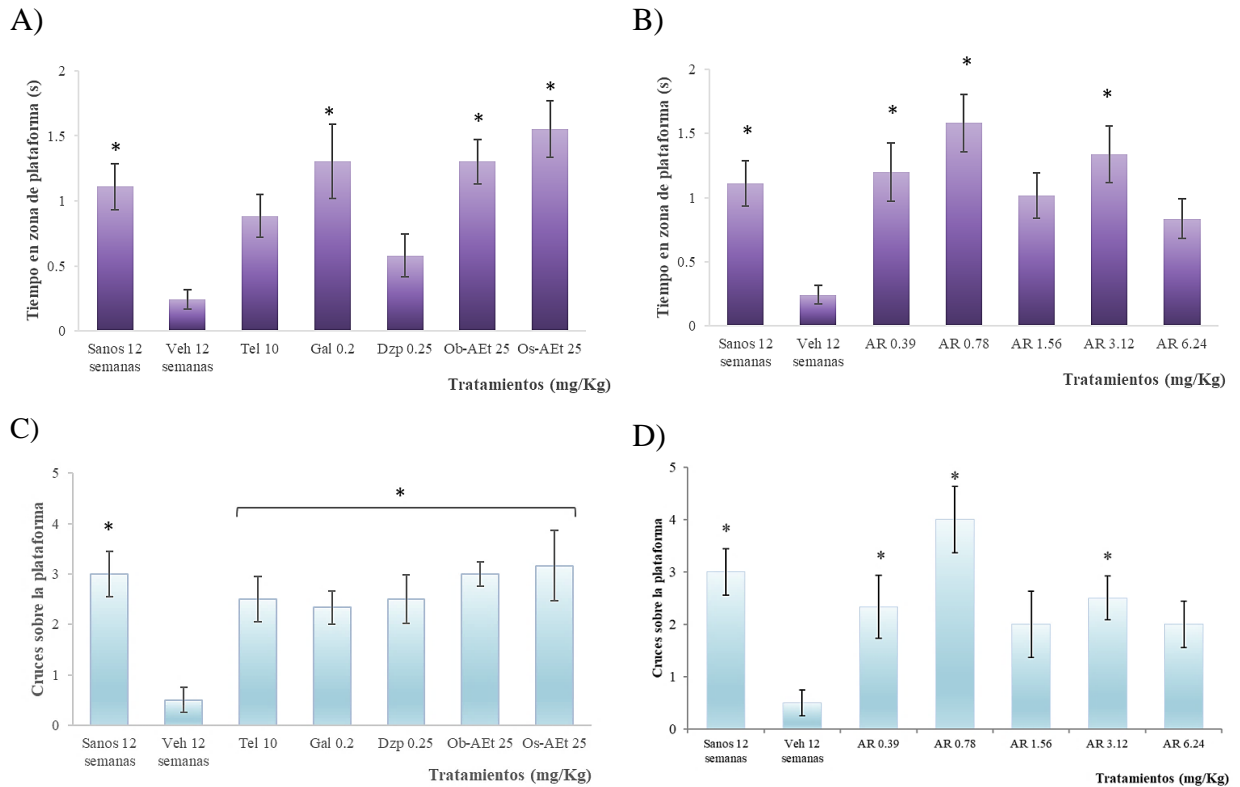


Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos, en el tiempo sobre la zona de la plataforma (A, B) y en el número de cruces sobre la zona de la plataforma (C, D) en la prueba de laberinto acuático de Morris. ANOVA, post-prueba Dunnet, * $p \leq 0.05$ comparado contra el Veh a las 12 semanas ($n=6$, $\bar{X} \pm EE$).

9.3.2 Laberinto elevado en forma de cruz

Al evaluar los diferentes tratamientos en la prueba de LEC, la angII provocó un comportamiento de ansiedad en los animales, ya que pasan menos tiempo en los brazos abiertos (%TA y %NA), en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas. Esta conducta se contrarrestó por la administración de los diferentes tratamientos (Figura 20 y Figura 21), principalmente por diazepam (ansiolítico). A partir de las diferentes dosis de AR se obtuvieron los parámetros de efecto máximo (Em_{\max}) y dosis efectiva 50 (DE_{50}) (Tabla 15).

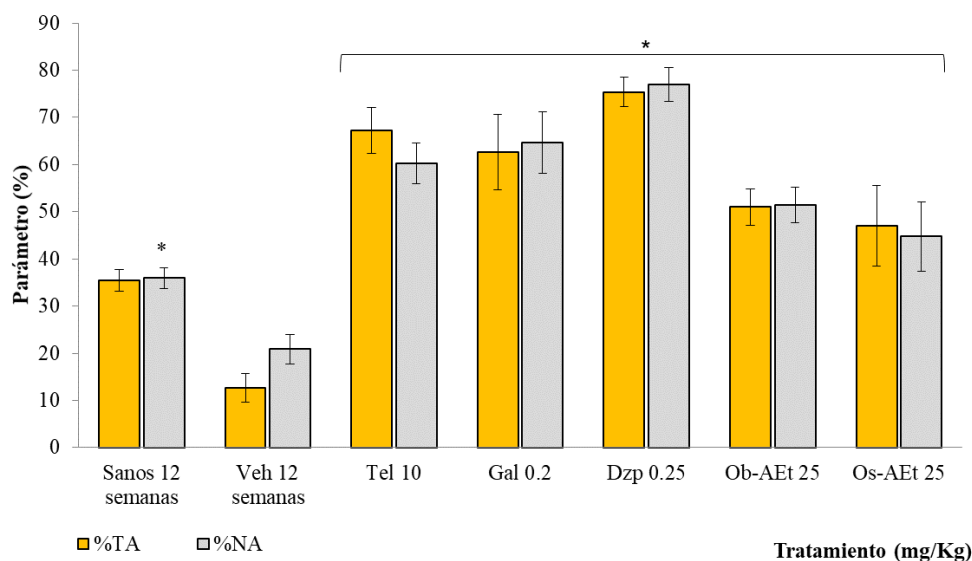


Figura 20. Evaluación de los tratamientos en LEC; telmisartán (Tel 10 mg/Kg), galantamina (Gal 0.2 mg/Kg), diazepam (Dzp 0.25 mg/Kg), Ob-AEt y Os-AEt (25 mg/Kg). Tiempo de permanencia en brazos abiertos (%TA); número de entradas en los brazos abiertos (%NA). * $p < 0.05$ ($n = 7$; $\bar{x} \pm DE$) en comparación con el veh 12 semanas por ANOVA post-prueba Tukey.

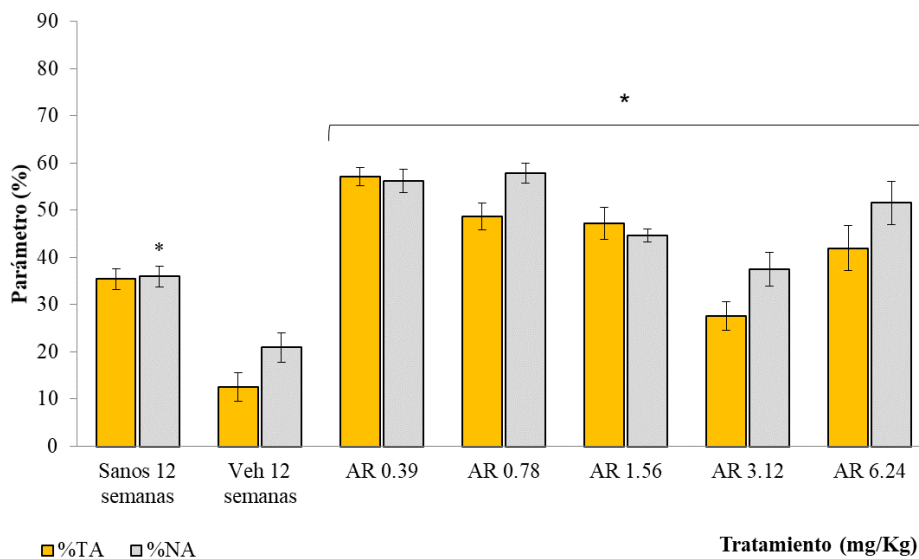


Figura 21. Evaluación de las diferentes dosis de AR (0.39 a 6.24 mg/Kg) en LEC; Tiempo de permanencia en brazos abiertos (%TA); número de entradas en los brazos abiertos (%NA). * $p < 0.05$ en comparación con el veh 12 semanas por ANOVA post-prueba Tukey ($n = 7$; $\bar{x} \pm DE$).

Tabla 15. $E_{m\acute{a}x}$ y DE_{50} de ácido rosmarínico en la prueba de LEC.

Parámetro	$E_{m\acute{a}x}$	DE_{50}
%NA	63.69 %	0.23 mg/Kg
%TA	59.17 %	0.15 mg/Kg

9.3.3 Campo abierto

AngII (veh 12 semanas) redujo de manera significativa cruces totales (CT) y elevamientos verticales (EV), en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas. Los tratamientos que incrementaron el número de CT fueron; galantamina, diazepam, Os-AEt, AR a 0.39, 0.78, 3.12 y 6.24 mg/Kg, con respecto al vehículo a las 12 semanas. En cuanto a los EV, los tratamientos que incrementan el número de eventos, fueron; galantamina, Os-AEt, AR a 0.39 y 3.12 mg/Kg (Tabla 16) con respecto al vehículo. Con base a las diferentes dosis de AR, se obtuvieron los datos para Emáx y DE₅₀ (Tabla 17).

Tabla 16. Efecto de los diferentes tratamientos en la prueba de campo abierto.

Grupo	Número de eventos	
	Cruces totales	Levantamientos verticales
Sanos 12 semanas	139.6±16.10*	37±11.39*
Veh 12 semanas	69.33±15.66	24.55±4.69
Tel 10	81.42±7.61	27.28±6.96
Gal 0.20	105.33±14.26*	45.66±7.95*
Dzp 0.25	97.37±17.22*	28.12±11.37
Ob-AEt 25	75.33±8.97	27.11±5.19
Os-AEt 25	107.28±10.64*	42.14±5.08*
AR 0.39	121.6±11.17*	43.2±3.70*
AR 0.78	89.4±16.83*	20±6.04
AR 1.56	79.2±12.49	33±13.76
AR 3.12	107.2±17.54*	41.8±6.37*
AR 6.24	88.2±11.84*	19±5.43

Tel: Telmisartán 10mg/Kg; Gal: Galantamina 0.2 mg/Kg; Dzp: Diazepam 0.25 mg/Kg; Ob-AEt: extracto orgánico de *O. basilicum* 25 mg/Kg; Os-AEt: extracto orgánico de *O. selloi*. AR: ácido rosmarínico a diferentes dosis (0.39 a 6.24 mg/Kg). * $p < 0.05$, en comparación con el Veh 12 semanas por ANOVA post-prueba Dunnet. (n=7; $\bar{X} \pm DE$)

Tabla 17. Emáx y DE₅₀ del AR en la prueba de campo abierto.

Parámetro	Emáx	DE ₅₀
Cruces totales	0.0196	0.2830
Elevamientos verticales	80.64	0.153

9.4 Extravasación azul de Evans

Al administrar angII durante 12 semanas, se obtuvo una concentración de 11 ± 0.4 mM de azul de Evans, concentración que se tomó como referencia del 100% de extravasación, al compararlo con los grupos administrados con los grupos experimentales, se observó una disminución significativa de Ob-AEt (78.88%) y Os-AEt (78.17%), en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto de los tratamientos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Grupo	Concentración de azul de Evans (mM) en cerebro	Inhibición extravasación (%)
Sanos 12 semanas	3.97 ± 0.12 *	63.91
Veh 12 semanas	11.00 ± 0.40	-
Tel 10	5.14 ± 0.13 *	53.27
Gal 0.2	7.87 ± 0.26 *	28.51
Dzp 0.25	6.99 ± 0.14 *	36.45
Ob-AEt 25	2.32 ± 0.10 *	78.88
Os-AEt 25	2.40 ± 0.06 *	78.17

El porcentaje de inhibición se tomó como el 100% el efecto de la angII durante 12 semanas.
* $p < 0.05$, en comparación con el Veh 12 semanas por ANOVA post-prueba Dunnet. (n=3; $\bar{X} \pm DE$)

9.5 Cuantificación por ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas (ELISA)

9.5.1 Corticosterona

La concentración sérica de corticosterona se incrementó por la administración crónica de angII por 12 semanas (* $p < 0.05$), en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas. Al administrar los diferentes tratamientos se observó una disminución significativa de la concentración sérica de corticosterona, principalmente por Ob-AEt y Os-AEt y todas las dosis a partir de la dosis de 0.39 mg/Kg hasta la dosis de 3.12mg/Kg (Tabla 19).

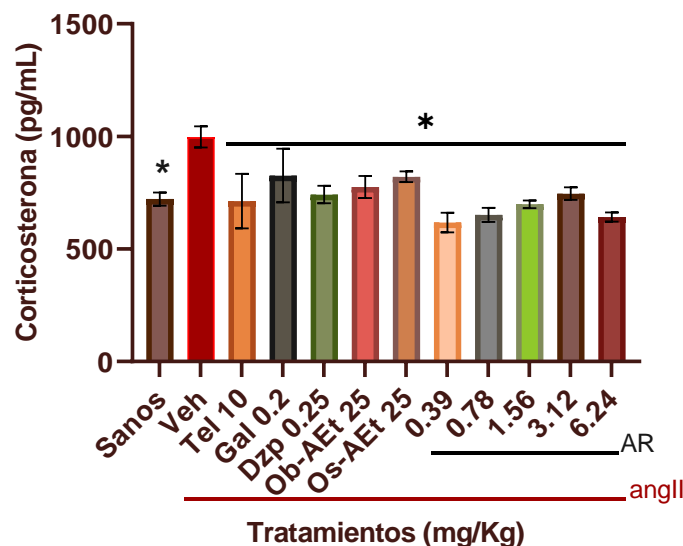


Figura 22. Concentración de corticosterona al final del experimento 12 semanas. (A) Grupos administrados con telmisartán 10 mg/Kg; galantamina 0.2 mg/Kg; diazepam 0.25 mg/Kg; Ob-AEt 25 mg/Kg; Os-AEt 25 mg/Kg. (B) AR: ácido rosmarínico (0.39 – 6.24 mg/Kg). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas por ANOVA post-prueba Tuckey. ($n=6$; $\bar{x} \pm DE$).

Tabla 19. Parámetros de $E_{m\acute{a}x}$ y DE_{50} del AR en la concentración de corticosterona sérica.

Parámetro	$E_{m\acute{a}x}$	DE_{50}
Concentración de corticosterona sérica (pg/mL)	769.23	0.077

9.5.2 Citocinas ($TNF\alpha$, IL1, IL6, IL4, IL10, TFG β) y quimiocina (MCP1)

En las Figuras 23, 24 y 25, se muestran las concentraciones de a) $TNF\alpha$, b) IL6, c) IL1 β , d) MCP1, e) IL4 y f) IL10 en riñón izquierdo. La administración de angII incrementó significativamente la concentración de $TNF\alpha$, IL1 β e IL6 (citocinas consideradas como proinflamatorias) en cerebro y ambos riñones, en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas. Se observó modulación de $TNF\alpha$ (Figura 23A) por la administración de telmisartán, galantamina, diazepam, Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR, en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas.

En el riñón izquierdo (Figura 23B) IL6 fue reducida en comparación con el vehículo, por la administración de los tratamientos control y de los tratamientos experimentales (Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR). IL1 β (Figura 23C) se redujo por la administración de

telmisartán, galantamina, Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR, en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas.

La quimiocina MCP1 incrementó por la administración de angII (en comparación con el grupo de ratones sanos); sin embargo, con la administración de telmisartán y diazepam aumenta significativamente en comparación con el vehículo. Los tratamientos que lograron contrarrestar el efecto de la angII son Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR (Figura 23D).

En cuanto a la concentración de IL4 (Figura 23E), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratones sanos y el vehículo. Por otro lado, por la administración conjunta de angII y todos los tratamientos se observó un incremento significativo de IL4 en comparación con el vehículo.

No hubo diferencia significativa entre las concentraciones de IL10 en los grupos de ratones sanos y el vehículo en ambos riñones (Figura 23F y Figura 24F) y en cerebro (Figura 25F). Sin embargo, todos los tratamientos incrementaron significativamente IL10 en comparación al grupo vehículo.

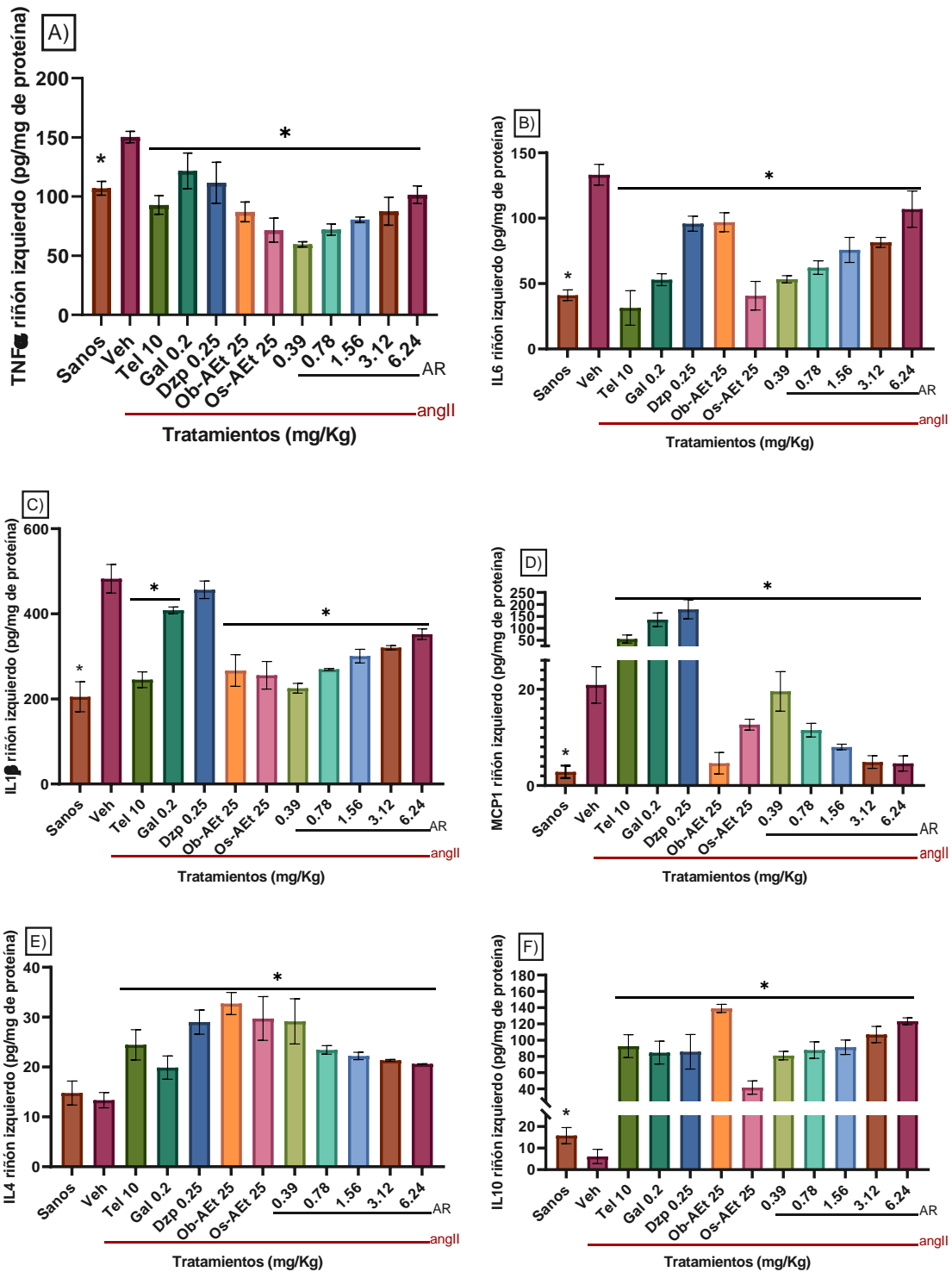


Figura 23. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en riñón izquierdo (pg/mg de proteína). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo vehículo por ANOVA post-prueba Tuckey, los valores están expresados $\bar{x} \pm DE$ (n=8).

En la Figura 24, se muestran las concentraciones de a) TNF α , b) IL6, c) IL1 β , d) MCP1, e) IL4 y f) IL10 en riñón derecho. Las concentraciones de TNF α (Figura 24A), IL1 β (Figura 24C) y MCP1 (Figura 24D) en el riñón derecho se redujeron significativamente por la administración de telmisartán, diazepam, Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR, en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas.

La concentración de IL6 disminuyó significativamente en comparación con el grupo vehículo, por la administración de todos los tratamientos (Figura 24B). No se observó diferencia significativa entre los ratones sanos y el vehículo en la concentración de IL4 (Figura 24E); sin embargo, por la administración de telmisartán, galantamina, Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR se observó un incremento significativo con respecto al grupo vehículo.

IL10 (Figura 24F), considerada como una citocina antiinflamatoria, incrementa significativamente en comparación con el vehículo por la administración de todos los tratamientos y las dosis de AR.

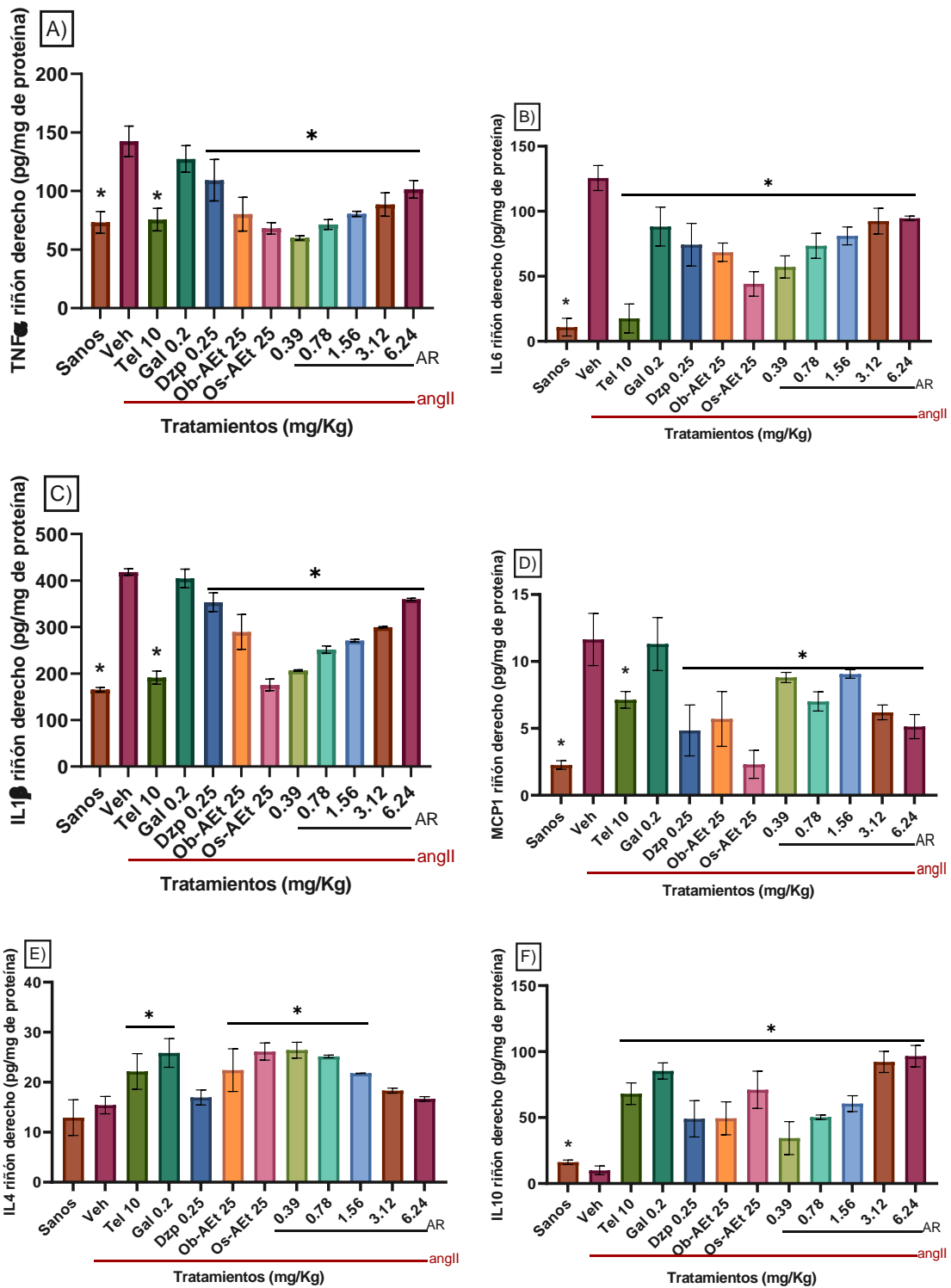


Figura 24. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en riñón derecho (pg/mg de proteína). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo vehículo por ANOVA post-prueba Tuckey, los valores están expresados $\bar{x} \pm DE$ (n=8).

En la Figura 25, se muestran las concentraciones de a) TNF α , b) IL6, c) IL1 β , d) MCP1, e) IL4 y f) IL10 en cerebro. Se observó una disminución significativa de TNF α (Figura 25A) e

IL1 β (Figura 25C) en cerebro por la administración de todos los tratamientos, en comparación con el grupo vehículo a las 12 semanas. La concentración de IL6 (Figura 25B) incrementó significativamente con respecto al grupo de ratones sanos por la administración de angII durante 12 semanas; este efecto fue contrarrestado por la administración de telmisartán, galantamina, Os-AEt y todas las dosis de AR.

Al administrar angII se incrementó la concentración de MCP1, lo que ocasionó un incremento en la permeabilidad del endotelio (Figura 25C). Al administrar los tratamientos control (telmisartán, galantamina y diazepam), se observó un incremento significativo con respecto al vehículo; este efecto se ve contrarrestado por Ob-AEt, Os-AEt y las dosis de AR.

La concentración de IL4 (Figura 25E), aumentó por la administración de angII (comparado con el grupo de ratones sanos); con la administración de los grupos control se observó un incremento significativo con respecto al vehículo; los tratamientos que redujeron la concentración de IL4 fueron Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR. IL10 (Figura 25F), en cerebro, disminuyó significativamente comparado con el vehículo, por la administración de telmisartán, galantamina, diazepam, Ob-AEt y Os-AEt, y por las de AR de 0.39 y 0.78 mg/Kg.

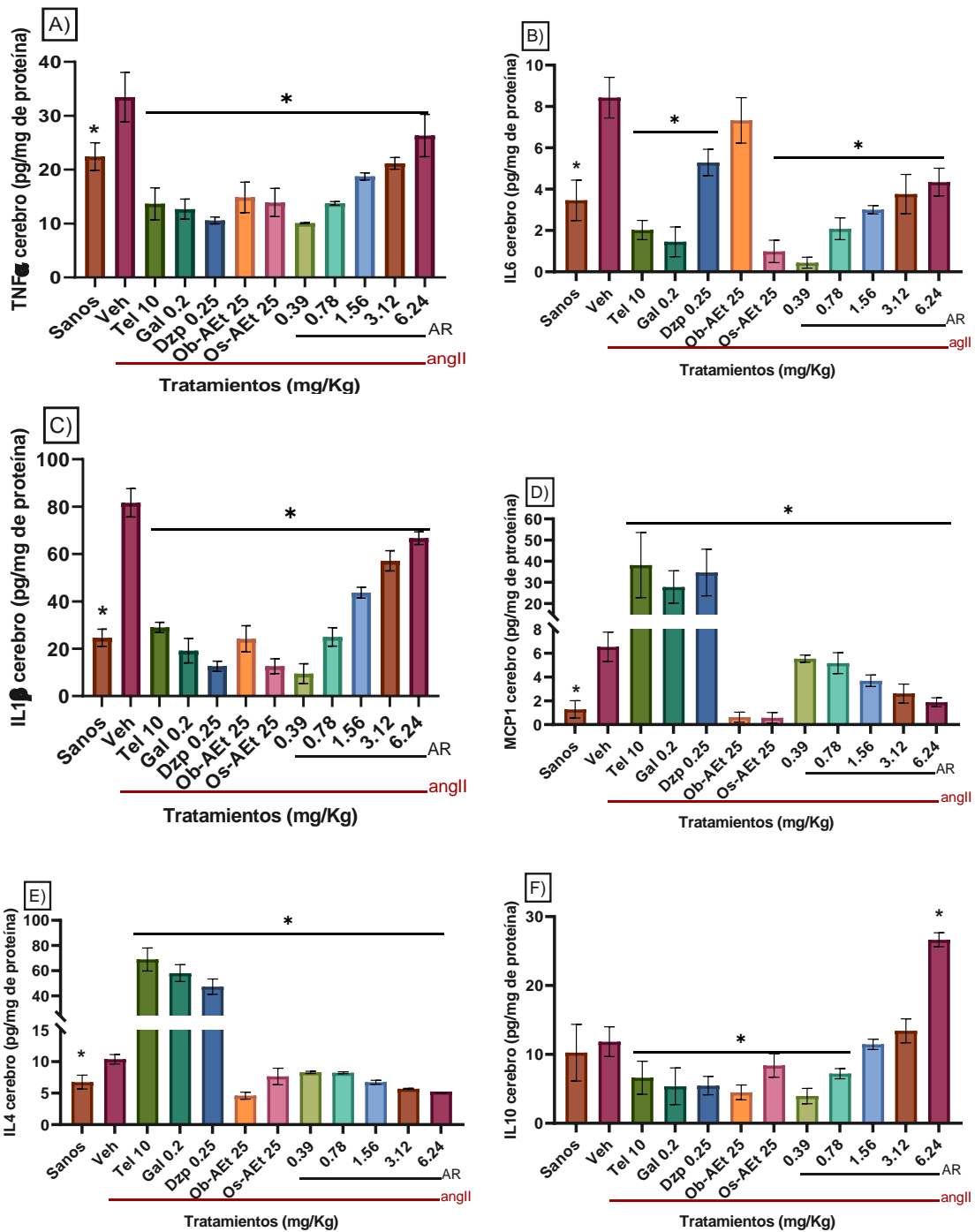


Figura 25. Efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de citocinas y MCP1 en cerebro (pg/mg de proteína). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo vehículo por ANOVA post-prueba Tuckey, los valores están expresados $\bar{x} \pm DE$ (n=8).

En la Tabla 20 se muestran las concentraciones del del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), en el grupo de ratones sanos, del grupo vehículo y de AR. A nivel cerebral se observó una disminución significativa de TGFβ, por la administración conjunta de angII y las dosis de 0.39mg/Kg y 3.12 mg/Kg de AR con respecto al grupo de ratones sanos. Por otro lado, la dosis de 1.56 mg/Kg de AR incrementaron significativamente el nivel de TGFβ con respecto al grupo de ratones sanos.

En la periferia, en ambos riñones, la administración de angII provocó una disminución significativa con respecto a los ratones sanos. Este efecto se contrarrestó en riñón derecho por la administración de las dosis de 0.78 mg/Kg y 1.56 mg/Kg de AR. En el riñón izquierdo, Ob-AEt, Os-AEt y todas las dosis de AR, incrementaron la concentración de TGFβ con respecto al vehículo. A partir de la administración de las diferentes dosis de AR, y analizando su comportamiento dosis dependiente, se calculó el efecto máximo y la dosis efectiva 50. En la Tabla 21 se muestran los resultados.

Tabla 20. Concentración de TGFβ (pg/mg de proteína) a nivel sistémico. *p<0.05 en comparación con el grupo vehículo por ANOVA post-prueba Tuckey, los valores están expresados en promedio ± DE (n=8).

Tratamiento (mg/Kg)	TFGβ (pg/mg de proteína)		
	Órgano		
	Cerebro	Riñón derecho	Riñón izquierdo
Sanos 12 semanas	98.86 ± 8.09	529.14 ± 73.36*	317.24 ± 23.59 *
Veh 12 semanas	-	336.10 ± 109.41	62.41 ± 13.04
Ob-AEt	-	289.65 ± 66.18	229.21 ± 22.02 *
Os-AEt	-	296.08 ± 20.56	296.25 ± 15.88 *
AR 0.39	43.80 ± 9.21 #	305.45 ± 61.29	316.78 ± 27.58 *
AR 0.78	69.56 ± 9.41	534.32 ± 102.62 *	343.20 ± 43.25 *
AR 1.56	163.19 ± 45.73 #	113.17 ± 29.39 *	220.80 ± 65.55 *
AR 3.12	58.86 ± 17.63 #	321.57 ± 20.59	265.92 ± 58.34 *
AR 6.24	92.94 ± 19.19	445.16 ± 86.38	410.27 ± 52.02 *

#p<0.05 en comparación con el grupo de ratones sanos a las 12 semanas.

*p<0.05 en comparación con el vehículo por ANOVA post-prueba Tuckey. Los valores están expresados en promedio ± DE (n=8).

Tabla 21. Efecto máximo (Emáx) y dosis efectiva 50 (DE50) del ácido rosmarínico en la modulación de las citocinas pro- y anti- inflamatorias a nivel sistémico.

Citocina/ quimiocina	Órgano					
	Cerebro		Riñón derecho		Riñón izquierdo	
	Emáx	DE50	Emáx	DE50	Emáx	DE50
TNFα	26.67	0.66	98.04	0.25	98.04	0.25
IL1β	400	15.16	333.33	0.27	344.83	0.21
IL6	8.33	7	99.01	0.29	96.15	0.34
IL10	29.76	2.54	104.17	0.80	120.48	3.25
IL4	95.24	0.03	84.03	0.10	80	0.05
MCP1	98.04	0.03	94.34	0.02	97.09	0.08
TGFβ	454.54	3.77	1666.67	23.83	476.19	1.95

Emáx, efecto máximo; DE50, dosis efectiva 50.

9.6 Cuantificación de MPE por citometría de flujo

Para el análisis de las micropartículas (MPs), primero se midieron las poblaciones positivas para anexina V, es decir, aquellas que pueden proceder de monocitos (MMPs), de plaquetas procoagulantes (PMPs), células endoteliales (EMPs), conjugados de células endoteliales con monocitos (EMP-MC) o con plaquetas (EMP-PC). Para definir las poblaciones celulares, se tomaron en cuenta las características de tamaño (eventos $<100\text{nm}$ y $\geq 100\text{nm}$) y granularidad (menos compleja; detritus). Los resultados se expresaron en el número de eventos contabilizados en el citómetro, y se compararon estadísticamente contra el grupo de vehículo (Veh).

En la Figura 26 se muestran las diferentes poblaciones de MP. A las 12 semanas de administración de angII se incrementó considerablemente la producción de todas las poblaciones de MPE (Figuras 27 y 28):

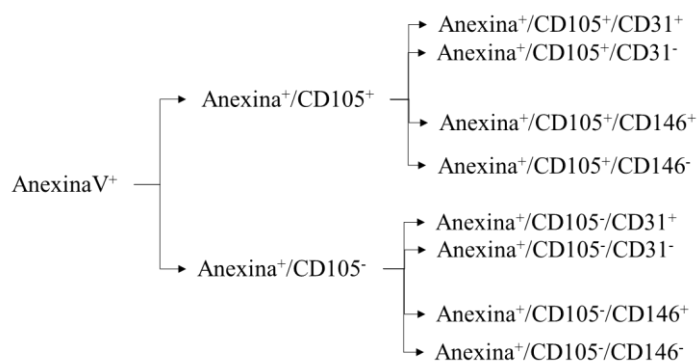


Figura 26. Poblaciones de MPE analizadas por citometría de flujo.

Los tratamientos de telmisartán, diazepam, Oba-AEt y Ose-AEt, y las dosis de AR 0.39, 0.78, 1.56 y 3.12 disminuyeron significativamente la población de MPs AnexinaV⁺/CD105⁻/CD31⁺ (plaquetas), respecto al grupo vehículo (Figura 27a). Las MPE anexinaV⁺/CD105⁺/CD31⁺ (Figura 27b), aumentaron por la administración de angII, con respecto al grupo de ratones sanos. Se observó un efecto protector endotelial por la administración de los tratamientos de telmisartan y la dosis de 6.24 de AR. Los tratamientos de galantamina, diazepam, Ob-AEt, Os-AEt y la dosis de 0.78 de AR incrementaron significativamente la población de MPE, con respecto al grupo vehiculo.

Telmisartán, diazepam, Oba-AEt y Ose-AEt, y las dosis de AR 0.78, 1.56, 3.12 disminuyeron la población de MPs anexinaV⁺/CD105⁻/CD31⁻ (monocitos), con respecto al grupo vehículo (Figura 27c).

Las MPs anexinaV⁺/CD105⁺/CD31⁻ (Figura 27d), incrementaron significativamente con respecto al grupo de ratones sanos. Galantamina, diazepam, Ob-AEt y AR a 0.78 mg/Kg, incrementaron significativamente el numero de eventos con respecto al vehiculo, únicamente el telmisartán disminuyó significativamente la producción de MPs anexinaV⁺/CD105⁺/CD31⁻.

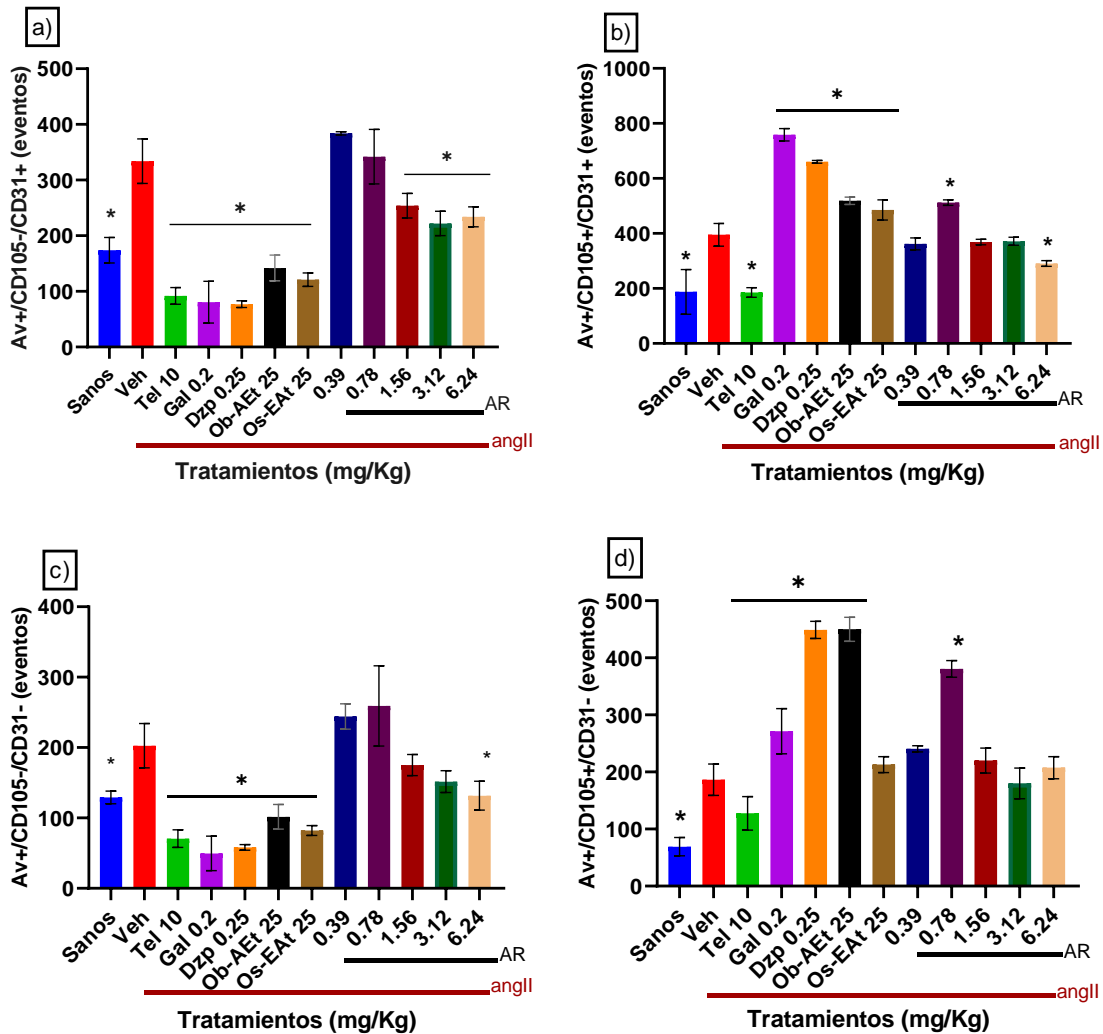


Figura 27. Poblaciones de MPs marcadas con anexina V-FITC, CD105-PECy7 y CD31-APC.

Ya que se utilizaron dos marcadores acoplados a APC (CD31-APC y CD146-APC), se realizó una segunda tinción para evitar solapamiento de señales (Figura 28). Nuevamente se observó un incremento significativo de la generación de MPs por la administración de angII, con respecto al grupo de ratones sanos. Todos los tratamientos lograron disminuir significativamente la población de MPs anexinaV⁺/CD105⁻/CD146⁺, respecto al grupo vehículo (Figura 28a).

Las MPE anexinaV⁺/CD105⁺/CD146⁺ (Figura 28b), aumentaron por la administración de angII, con respecto al grupo de ratones sanos. Se observó una disminución significativa de esta población solamente en el grupo administrado con telmisartan. Los demás tratamientos incrementaron significativamente, con respecto al grupo vehículo, la producción de estas

MPE. Al administrar los tratamientos control y experimentales disminuyó la población de MPs anexinaV⁺/CD105⁻/CD146⁻, con respecto al grupo vehículo (Figura 28c). Las MPs anexinaV⁺/CD105⁺/CD146⁻ (figura 28d) incrementaron significativamente con respecto al grupo de ratones sanos. La administración de telmisartán y Ob-AEt disminuyeron significativamente el número de eventos con respecto al vehículo. Con los demás tratamientos se observó un incremento significativo con respecto al vehículo..

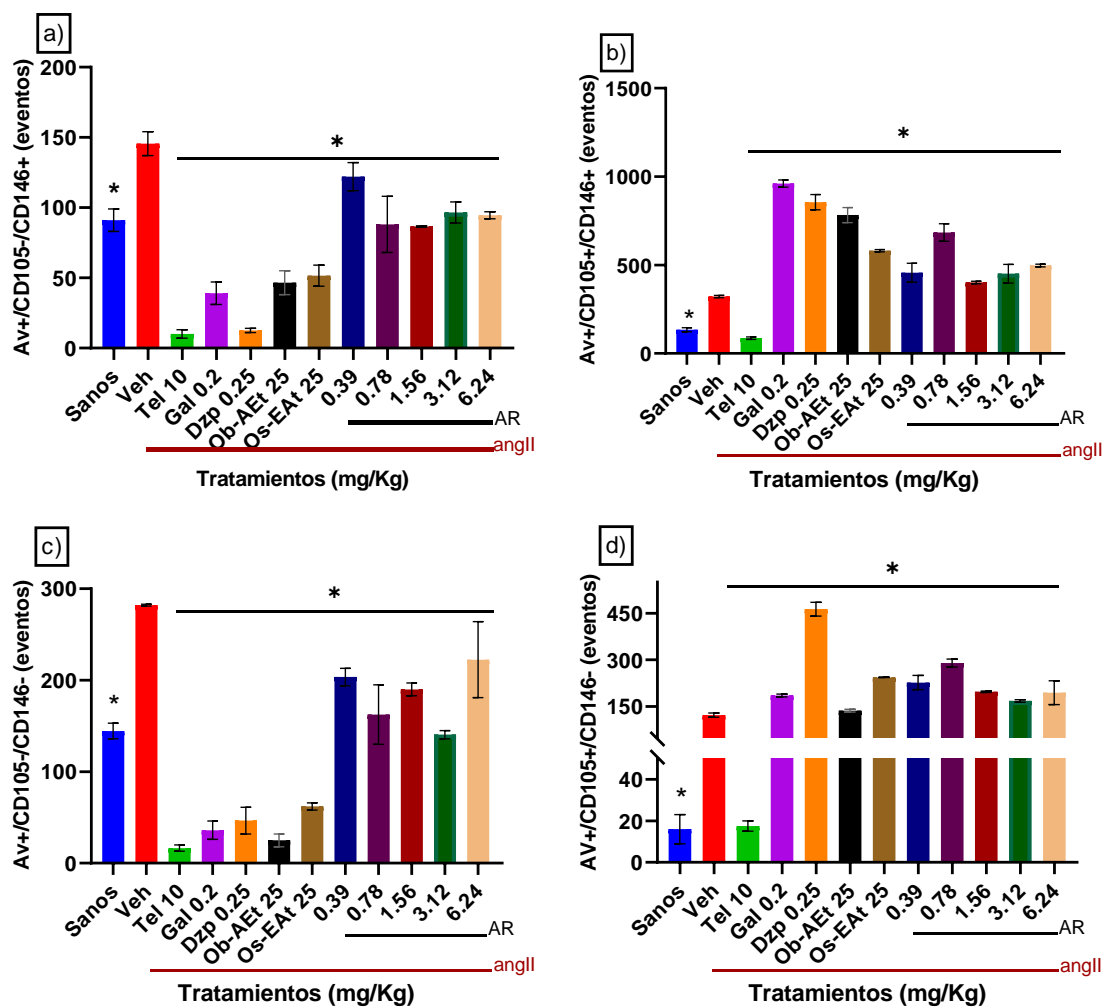


Figura 28. Poblaciones de MPs marcadas con anexina V-FITC, CD105-PECy7 y CD146-APC.

10. DISCUSIÓN

El control neurológico y humoral de la PA es una respuesta fisiológica integrada que mantiene la homeostasis esencial del flujo sanguíneo en los tejidos. Si bien los barorreceptores muestran la capacidad de responder a los cambios a corto plazo en la presión arterial, los mecanismos renales son responsables del ajuste de la presión a largo plazo [6]. Los cambios fisiopatológicos en estos sistemas conducen a respuestas desadaptativas, siendo la HTA la más frecuente [1]. La HTA es desconocida por el 50% de sus portadores; las urgencias hipertensivas siguen siendo un grave problema de salud en México [45]. Tratar solo la HTA y no controlar otros factores, puede incrementar el riesgo cardiovascular, incluso puede reducir de manera significativa el efecto del tratamiento antihipertensivo a corto y largo plazo [131, 132].

El endotelio es uno de los componentes más importantes de la homeostasis vascular, la cual logra mediante la producción continua y equilibrada de diferentes factores relajantes y contráctiles. Cuando hay una alteración patológica en la liberación de estos productos, ocurre una disfunción endotelial (DE) [1, 2]. La inhibición de las acciones de la angII ha sido y continúa siendo de los objetivos primordiales de la terapéutica cardiovascular [133]. AngII es un vasoconstrictor potente, una millonésima de gramo puede aumentar la presión arterial de un ser humano en 50mmHg o más [1, 133]. En un estudio realizado por Monassier [134], la administración continua de altas dosis de angII (0.7 mg/kg/día) por medio de bombas osmóticas puede inducir rápidamente un aumento de la presión arterial de alrededor de 45 mmHg. Esta hipertensión inducida por angII se asocia con una hipertrofia cardíaca, fibrosis y activación de las vías involucradas en el estrés oxidante en el corazón, la pared de los vasos y el cerebro [134]. En nuestro equipo de trabajo, se tienen reportes que la administración *ip* de angII a partir de la semana 8 provoca la elevación de la presión arterial [30, 61–63], y a las 10 semanas de administración se observa un proceso de estrés oxidante, inflamación y disfunción endotelial [64, 65].

Algunas especies del género *Ocimum* tienen antecedentes en el tratamiento y la prevención de enfermedades cardiovasculares mediante la reducción del contenido de lípidos en la sangre, la prevención de la isquemia y el accidente vascular cerebral, la reducción de la hipertensión y también debido a sus propiedades antioxidantes. Además, juegan un papel importante al inhibir la agregación plaquetaria y prevenir el riesgo de hipertensión pulmonar [87]. Se ha

demostrado que las dietas ricas en polifenoles desempeñan un papel positivo en el funcionamiento vascular, incluida la agregación plaquetaria en humanos [85, 87].

Deveci *et al.*, 2019, reportaron un mayor contenido en ácidos fenólicos por la extracción con acetona. En este estudio, se analizaron 16 compuestos, donde el ácido cafeico fue un compuesto fenólico abundante, seguido del ácido rosmarínico y el ácido trans-2-hidroxycinámico [104]. En la presente investigación, utilizamos acetato de etilo, que tiene una polaridad similar a la acetona, al analizar la composición de Os-AEt (*Ocimum selloi*) y Ob-AEt (*O. basilicum* presentaron ácidos fenólicos tales como ácido cafeico, ácido clorogénico y el ácido rosmarínico. En *O. basilicum*, el ácido rosmarínico (AR) fue el compuesto mayoritario ($\lambda=330$), por lo que decidimos utilizarlo como referencia para cuantificarlo en ambos extractos. Os-AE contiene también flavonas, cafeoilos, otros ácidos fenólicos y pigmentos de tipo clorofila, que no se han identificado. La cantidad de muchos de estos componentes se puede afectar por las diferentes condiciones de crecimiento, cosecha, procesamiento y almacenamiento, las que aún no se conocen bien [94].

Umar *et al.*, reportaron que el extracto crudo de *O. basilicum* (100-400 mg/ g) reduce la presión arterial en ratas [86]. También, tiene efecto vasorelajante en los anillos aórticos de ratas, aunque no se determinó cómo ocurre la relajación [135]. Un mecanismo podría deberse a la capacidad antioxidante de especies reactivas de oxígeno (EROS) de la albahaca [13, 103]. Se tienen reportes de que las especies de *Ocimum* inhiben la formación de ciclooxigenasa (COX) y estimulan la biosíntesis de tromboxano A₃ (TXA₃) y prostaciclina (PGI₃), con actividad vasodilatadora [87, 136, 137]. Fathiazad (2012), reporta que *O. basilicum* tiene un efecto contra el infarto inducido por isoproterenol y sugiere que los efectos cardioprotectores podrían estar relacionados con actividades antioxidantes [138].

Se necesitan más pruebas del efecto de *O. selloi* sobre la vasculatura, pero se puede proponer que, al estar presente el AR junto con otros compuestos de tipo terpeno, inhibe y/o regula la ECA [139, 140], o puede causar efecto vasodilatador dependiente del endotelio [141]. También podría estar protegiendo en el daño por de isquemia/reperfusión [142]. En otro estudio, el AR redujo la presión sanguínea inducida por la fructosa al disminuir la actividad de las enzimas convertidoras de angiotensina y la endotelina-1 y aumentar el nivel de NO [117]. También redujo los niveles séricos en ayunas de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y aumentó los niveles de glutatión peroxidasa (GPX) y super oxido

dismutasa (SOD) [143]. Así mismo, interviene en muchos pasos importantes de la angiogénesis, incluida la adhesión, la migración, la proliferación y la formación de tubos de células endoteliales [108].

Como control antihipertensivo utilizamos telmisartán, que es bloqueador de los receptores tipo 1 para angII (BRA, colectivamente llamados *sartanes*), los cuales son compuestos ampliamente utilizados en la clínica para controlar trastornos cardiovasculares, enfermedad renal, síndrome metabólico y diabetes. Recientemente, se ha reconocido que son neuroprotectores y tienen un uso terapéutico potencial en muchos trastornos cerebrales. Los BRA mejoran las respuestas inflamatorias y apoptóticas al glutamato, IL1 β y la endotoxina bacteriana en neuronas cultivadas, astrocitos, células gliales y cerebrovasculares endoteliales. Cuando se administran por vía sistémica, excepto telmisartán, ingresan al cerebro, protegiendo el flujo sanguíneo cerebral, manteniendo la función de BHE disminuyendo la hemorragia cerebral, la inflamación cerebral excesiva y la lesión neuronal en modelos animales de accidente vascular cerebral, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, entre otras afecciones cerebrales [144]. Sin embargo, a partir del verano de 2018, la FDA se enteró e informó que algunas versiones genéricas de los medicamentos BRA (valsartán, losartán e irbersartán) contienen impurezas de nitrosamina que no cumplen con los estándares de seguridad de la agencia. Las impurezas de nitrosamina, incluidas la N-nitrosodimetilamina (NDMA), la N-nitrosodietilamina (NDEA) y el ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico (NMBA) son potencialmente carcinógenos [145].

El cerebro es un objetivo importante de los efectos nocivos de la HTA [48, 146]. Se ha propuesto un vínculo entre HTA y síntomas psicológicos relacionados con procesos de ansiedad, depresión y deterioro cognitivo, entre otros [147–149]. Para evaluar el efecto de nuestros tratamientos experimentales, utilizamos diferentes pruebas conductuales: el laberinto acuático de Morris (LAM), que se estableció por primera vez por el neurocientífico Richard G. Morris en 1981 para poner a prueba el aprendizaje dependiente del hipocampo, incluyendo la adquisición de memoria espacial y la memoria a largo plazo; el laberinto elevado en forma de cruz (LEC), ampliamente utilizado y validado para evaluar el efecto ansiolítico de fármacos, realizado de acuerdo a lo reportado por Komada *et al.*, 2008 y Chioca *et al.*, 2013 [84, 150]. En la prueba del campo abierto (CA) se observa la tendencia natural del animal de explorar un ambiente nuevo, a pesar del miedo provocado por esa experiencia. Desarrollado en 1934 por Hall, es uno de los más empleados para estudiar ansiedad, sedación o actividad motora. Se

realizó con base en el protocolo reportado por Mineur *et al.*, 2006 y Tatem *et al.*, 2014 [151, 152].

En el LAM utilizamos galantamina (alcaloide inhibidor de la acetilcolinesterasa; AChE), como fármaco de referencia (nootrópico, mejorador de la memoria). Se usa como medicamento de primera línea en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [153]; aunque puede causar algunos síntomas cardíacos adversos relacionados con la estimulación colinérgica en pacientes de edad avanzada [154]. El efecto vasodilatador de galantamina podría deberse al incremento de la biodisponibilidad e interacción de la acetilcolina por medio del receptor muscarínico [4]. La incidencia de eventos adversos, en particular en el sistema gastrointestinal, generalmente es baja y puede minimizarse utilizando el esquema de escalada de dosis lenta recomendado. Sin embargo, en el esquema de administración que utilizamos, los animales presentaron diarrea durante las últimas semanas de administración del nootrópico. En cuanto a la prueba de memoria a largo plazo en el LAM, todos los tratamientos disminuyeron la latencia e incrementaron el número de cruces sobre la plataforma. Los animales administrados con Os-AEt mostraron una tendencia a dirigirse más rápido que los animales administrados con galantamina y no presentaron los problemas gastrointestinales observados con el fármaco nootrópico.

En particular, dos sistemas se movilizan bajo estrés: el sistema nervioso simpático de acción rápida y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) de acción lenta. Hay un papel de angII en cerebro, y en particular de sus receptores, en la regulación de la respuesta al estrés [16, 155]. La activación de las vías angiotensinérgicas por el receptor central de aldosterona-mineralocorticoide (MR) juega un papel crítico en la HTA inducida por angII. El órgano subfornical (OSF) contiene receptores de MR y AT1r y puede transmitir las señales de angII circulante a núcleos cerebrales, como el núcleo paraventricular (PVN), el supraóptico (SON) y la médula ventrolateral rostral (RVM) [10, 156]. En ratas Wistar, la infusión subcutánea de angII a 500 ng/min/kg durante 1 ó 2 semanas aumentó las EROS medidas por tinción de dihidroetidio (DHE) [157].

Herrera-Ruiz (2008), evaluó el extracto hidroalcohólico a diferentes dosis, con una sola administración antes de exponer a los animales al LEC. La dosis de 25 mg/Kg la que incrementó TA y NA [130]. Al exponer a los animales administrados durante seis semanas con Ob-AEt y Os-AEt y todas las dosis de AR en la prueba de LEC, se incrementó el tiempo

de permanencia (TA) y número de entradas (EA) a los brazos abiertos, con respecto al vehículo, sugiriendo una actividad tipo ansiolítica.

Se ha demostrado que miles de productos químicos aislados de plantas ejercen efectos sobre los animales que, en muchos casos, son beneficiosos para la salud. De hecho, las concentraciones micromolares de vitamina E y numerosos polifenoles pueden proteger una variedad de células contra el estrés oxidante en modelos de cultivo celular de cáncer [158], enfermedades cardiovasculares [159], aterosclerosis y trastornos neurodegenerativos [160]. Sin embargo, en las dosis relativamente bajas consumidas por los humanos, estos fitoquímicos nocivos activan las vías de respuesta al estrés celular sin afectar negativamente su función, este tipo de respuesta farmacológica recibe el nombre de hormesis [161].

Hormesis es un término utilizado por los toxicólogos para referirse a una dosis con respuesta bifásica a un agente ambiental, caracterizado por una estimulación a una dosis baja o efecto beneficioso y un efecto inhibitor o tóxico a una dosis alta. En los campos de la biología y la medicina, la hormesis se define como una respuesta adaptativa de células y organismos a un estrés moderado (generalmente intermitente) [161]. Una definición funcional breve de hormesis es: "un proceso en el que la exposición a una dosis baja de un agente químico o factor ambiental que es perjudicial a dosis más altas induce un efecto beneficioso adaptativo en la célula u organismo" [162, 163]. El concepto de que las drogas ejercen sus efectos beneficiosos mediante mecanismos de acción horméticos se remonta al siglo XVI por un químico y médico suizo llamado Paracelso, quien escribió: "Todas las cosas son veneno y nada es sin veneno, sólo la dosis permite que algo no sea venenoso" [161, 162].

Pereira, *et al.*, administraron AR a 1, 2, 4 y 8 mg/Kg a animales expuestos a diferentes modelos conductuales, entre ellos; LEC, evitación pasiva (memoria) y campo abierto en ratas; observaron un incremento en EA a una dosis de 2 y 4 mg/kg ip de AR, sin afectar la memoria a corto plazo y la retención de memoria a largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria. El AR (8 mg/kg) indujo un aumento en la ansiedad y la actividad locomotora en ratas [111]. En nuestro trabajo utilizamos dosis menores a 8 mg/Kg, por lo que no observamos el efecto ansiogénico del AR en las pruebas de LEC y campo abierto. Os-AEt y AR a 0.39, 0.78, 3.52 y 6.24 m/Kg contrarrestaron el efecto depresor del sistema locomotor de la angII en la prueba de campo abierto.

Las respuestas del sistema nervioso simpático incluyen la liberación de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina desde la médula suprarrenal. La activación del eje HPA conduce, a

través de pasos intermedios, a la liberación de glucocorticoides (GC; principalmente cortisol en humanos, corticosterona en roedores) desde la corteza suprarrenal [164].

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos del estrés antes y/o después del aprendizaje o antes de las pruebas de memoria, existe evidencia reciente de que el estrés puede influir en la memoria posterior también si se presenta después de la recuperación, lo que sugiere que el estrés afecta también los procesos de consolidación y/o extinción [164–166].

Las condiciones con niveles crónicamente elevados de GC generalmente se asocian con un rendimiento cognitivo deteriorado y se cree que estos déficits son el resultado de una carga acumulativa y duradera sobre la función y la morfología del hipocampo [52, 167, 168].

En el presente trabajo observamos que al administrar angII ip durante 12 semanas, la concentración sérica de corticosterona se incrementa significativamente con respecto al grupo de animales sanos. Al contrastar estos resultados con la evaluación sobre la memoria en el LAM, existe un incremento del tiempo de latencia y una disminución en el número de cruces sobre la zona de la plataforma, indicando el deterioro en el aprendizaje y/o en la memoria. Cuando administramos los tratamientos experimentales Ob-AEt, Os-AEt y AR se contrarrestó el efecto de la angII, es decir, el tiempo de latencia hacia la plataforma disminuye e incrementa el número de cruces sobre la plataforma.

El tratamiento contra la ansiedad es eficaz para reducir la presión sanguínea en pacientes con hipertensión excesiva [169]. El uso clínico de los benzodiazepinas está limitado por el desarrollo de la tolerancia a sus efectos farmacológicos [170]. Un hallazgo clave, que apunta a un mecanismo principal de control de la presión arterial mediada por AT2r, es la localización predominante en las neuronas GABAérgicas. Por lo tanto, la estimulación de AT2r en neuronas GABAérgicas puede potenciar los efectos inhibitorios de la señalización de GABA en las vías de señalización clave excitadoras que controlan la actividad nerviosa simpática [19]. Williams *et al.*, (2018), proponen que las benzodiazepinas midazolam, diazepam y lorazepam son moduladores alostéricos positivos (PAM) de los adrenoreceptores α_1 . Las benzodiazepinas se prescriben ampliamente como sedantes, ansiolíticos, anticonvulsivos y miorrelajantes [171]. En el presente trabajo, utilizamos diazepam (0.25 mg/Kg) que además de actuar como ansiolítico (en LEC), también redujo la HTA inducida con angII.

La angII además de ser un potente vasoconstrictor, desempeña un papel fundamental en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades cardiovasculares y renales, que incluyen hipertensión, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, cardiopatía isquémica, fibrosis cardíaca y

renal. Wang, *et al.*, 2016 demostraron que las citocinas, como TNF α , IL1 β , IL6, IL10, interferón (IFN) - γ y TGF β , se expresan altamente en la hipertensión inducida por angII [24, 157].

La inflamación se caracteriza por la acumulación de células y mediadores inflamatorios, junto con la microglía, los leucocitos procedentes de la sangre periférica son las células inflamatorias más activas, conduciendo al daño por inflamación [172]. Normalmente IL1 es sintetizada en el SNC por la microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales en niveles bajos; después de un proceso isquémico aumenta su expresión. La influencia de esta citocina proinflamatoria en la memoria y la plasticidad sigue un patrón en forma de “U” invertido, es decir, el aumento asociado al aprendizaje en los niveles de IL1 es necesario para la formación de la memoria, mientras que cualquier desviación del rango fisiológico, ya sea por exceso en los niveles o por bloqueo de la señalización de IL1, da como resultado un deterioro de la memoria y la plasticidad. Las dosis bajas de GC también pueden facilitar la memoria, mientras que los estresores crónicos o severos, así como los niveles altos de GC, pueden afectar la memoria y la plasticidad neural [48].

La angII está involucrado principalmente en el proceso inflamatorio al modular la liberación de citocinas y factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear kappa B (NF κ B) [14]. La inflamación está bien documentada para contribuir a la remodelación vascular y la consiguiente HTA. Se sabe que NF κ B participa en la HTA. Induce la disfunción de las células endoteliales, el estrés oxidante y la inflamación [24, 173]. Se tienen reportes de que las especies de *Ocimum* inhiben la formación de ciclooxigenasa (COX) y estimula la biosíntesis de tromboxano A3 (TXA3) y protaciclina (PGI3), que tiene actividad vasodilatadora [87, 136, 137]. Además, se ha encontrado que AR es un fuerte agente antiinflamatorio, causando potente inhibición de forbol-12-miristato 13-acetato (PMA), TNF α y en el desprendimiento del receptor de proteína C endotelial (EPCR) en un modelo por ligadura cecal y punción (CLP) [108, 174, 175].

La IL6 puede contribuir al daño provocado por la inflamación en el cerebro. Implicada en la regulación de la apoptosis neuronal, se sugiere que esta citocina es sobre regulada después de isquemia cerebral, con resultados deletéreos. En consecuencia, los niveles elevados de esta proteína podrían ser un buen indicador de deterioro neurológico temprano mayor volumen infartado y a un mal pronóstico [176]. El TNF α , una citocina proinflamatoria que, en el sistema nervioso central constituye el principal mediador de inflamación, provoca una cascada

de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal, por lo que el bloqueo de TNF α , disminuye la lesión renal e hipertensión [177]. TNF α , IL1 β e IL6 se expresan altamente en la hipertensión inducida por angII [157, 178].

IL10 es una citocina antiinflamatoria que juega un papel protector en la enfermedad vascular cerebral. Se sabe que pacientes con bajos niveles de IL10 presentan un mayor riesgo de infarto, por lo que se propone que los mecanismos mediados por esta proteína son potenciales blancos terapéuticos durante dicho evento patológico [30, 179]. *O. basilicum*, podría también estar modulando la expresión de NF κ B y en consecuencia inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas.

Para el caso de *O. selloi*, ya que el AR se encuentra en concentraciones menores, la actividad moduladora de la inflamación podría estar asociada a compuestos no identificados de tipo polifenol [180], e incluso algunos pigmentos como las clorofilas [181, 182]. En nuestros resultados de la cuantificación de citocinas por el método de ELISA, al administrar los tratamientos experimentales observamos una modulación de IL1 β , TNF α , IL6 y MCP1, y un incremento en los niveles de IL10 e IL4 en ambos riñones y en cerebro, esto comparado contra el vehículo.

La molécula clave en el inicio de las respuestas inflamatorias vasculares, cardíacas y renales puede ser la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP1), un importante mediador de activación y reclutamiento de monocitos en el endotelio vascular. La expresión de quimiocinas es nociva después de un daño cerebral, dado que aumentan la infiltración leucocitaria. Esto se ha comprobado en diversos modelos experimentales de isquemia, y su inhibición o deficiencia se ha asociado a un menor daño [31, 178]. También se ha observado que MCP1 aumenta 17 veces la permeabilidad de la BHE. Un método para evaluar su integridad es la cuantificación de Azul de Evans a nivel cerebral [183]. Este método consiste en una inyección endovenosa de azul Evans en ratón. El colorante se une a la albumina. Ante condiciones fisiológicas normales el endotelio es impermeable a la albumina, así que la sustancia permanece en los vasos sanguíneos. En condiciones patológicas que promueven el aumento en la permeabilidad vascular, se pierden parcialmente sus uniones estrechas por lo que el endotelio se vuelve permeable a proteínas como la albumina. Esta condición permite el paso (extravasación) del azul de Evans a los tejidos [183].

El estrés tangencial vascular, una fuerza mecánica generada por el flujo sanguíneo en las células endoteliales (CE) vasculares juega un papel fundamental en la regulación del fenotipo

del endotelio [184]. Las micropartículas (MP) son vesículas de membrana submicrónicas (0.1–1 μm) liberadas en la activación celular o apoptosis [185]. Se caracterizan por la exposición de fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina [38], que puede ser cuantificado por citometría de flujo mediante la tinción con Anexina V. Las MP se originan a partir de diferentes tipos celulares, principalmente plaquetas, leucocitos y glóbulos rojos y también de CE. Los MP endoteliales (MPE) se han identificado como un marcador de disfunción vascular y como un marcador de remodelación sistémica [38].

En estudios preliminares se determinó que la recuperación de MP era la misma en comparación con muestras frescas y muestras que se sometieron a un proceso de congelación y descongelación único [186, 187]. Por lo que realizamos el protocolo propuesto por Jayachandram *et al.*, 2012 para el aislamiento de MPE. Como marcadores propusimos a CD31, CD105, CD1046 y Anexina V, que son marcadores endoteliales relacionados a procesos de apoptosis [186, 187].

Las MPE CD31⁺ (PECAM), se concentran en las uniones endoteliales; sin embargo, el marcador PECAM-1 también se expresa en la superficie de plaquetas, neutrófilos y subconjuntos de linfocitos; por lo tanto, los marcadores específicos de plaquetas, como CD41 o CD42b, se usan para distinguir MP derivados de plaquetas. Los MPE CD31⁺ pueden desempeñar diversos papeles en la biología vascular, regulando la función plaquetaria, la angiogénesis, la activación de las células T y B, la permeabilidad de las CE y la trans migración a través del endotelio. Por lo tanto, las MPE liberadas podrían reflejar la apoptosis de las CE lesionadas [37, 184, 188, 189].

CD105⁺ (Endoglin) es un marcador de CE y mesenquimales; se expresa cada vez más durante la angiogénesis, inflamación tumoral y en tejidos isquémicos, pero tiene bajos niveles de expresión en las CE normales [37]. MCAM (CD146) es una molécula de adhesión que se encuentra en las CE y se encuentra fuera de las uniones de adherencia. MCAM también se encuentra en otros tipos de células, especialmente en subconjuntos de linfocitos T y B, así como en células asesinas naturales (NK) en condiciones patológicas y pericitos. Por lo tanto, las MPE de CD146⁺, otro indicador de lesión de las CE, pueden estar relacionadas principalmente con la transducción de señales, la permeabilidad endotelial, la migración celular, la angiogénesis y la respuesta inmune [37, 185].

Durante la reanimación cardiopulmonar después de un evento de isquemia/reperfusión, se activan diferentes vías relacionadas a una respuesta de inflamación sistémica junto con la

activación del endotelio. Fink *et al.*, (2011) demostraron que pacientes con reanimación cardiopulmonar muestran un incremento de micropartículas anexina V⁺ [37, 190]. Las MPs AnexinaV⁺/CD105⁻, son aquellas que provienen de poblaciones celulares diferentes a CE; los tratamientos que disminuyen la producción de esta población son los grupos; telmisartán (10mg/Kg) y todas las dosis de AR, con respecto al grupo veh a las 12 semanas.

La disfunción endotelial y la agregación plaquetaria desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y las principales complicaciones de la aterosclerosis y la formación de trombos arteriales [188, 191]. Además, las MP derivadas de complejos monocitos-macrófagos también son parte crítica de la progresión de las placas ateroscleróticas inestables [192]. Por lo tanto, la medicina dirigida a la regulación negativa de las MPE, así como la liberación de otras MP, puede ser una posible opción terapéutica para tratar la enfermedad inflamatoria vascular, como la aterosclerosis.

11. CONCLUSIONES

1. El AR es uno de los compuestos mayoritarios en el extracto de *O. basilicum* (a una λ 330).
2. Ob-AEt y Os-AEt y todas las dosis de AR disminuyeron la presión arterial (PAS y PAD) en los animales tratados con angII.
3. Los resultados obtenidos en las pruebas conductuales proponen un efecto ansiolítico; mejorador de la memoria a corto y largo plazo, principalmente por la administración de Os-AEt, sin modificaciones sobre la conducta motora.
4. Ob-AEt, Os-AEt y AR disminuyen la concentración de corticosterona sérica, lo cual puede asociarse con el efecto antiinflamatorio y ansiolítico observado.
5. Ob-AEt, Os-AEt y AR previenen la disfunción endotelial generada por la administración crónica de angII; los extractos presentan actividad antiinflamatoria a nivel cerebral y renal. También reducen la liberación de micropartículas derivadas del endotelio relacionadas a apoptosis.
7. La utilización de modelos experimentales que simulan hipertensión humana pueden permitir el desarrollo de estrategias efectivas para abordar esta enfermedad común.

12. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de Ob-AEt, Os-AEt y AR sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para los genes de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y de AT1r, a nivel cerebral.
2. Después de la administración crónica de Ob-AEt y Os-AEt, estudiar la morfología del hipocampo mediante técnicas inmunohistológicas.
3. Evaluar el efecto de Os-AEt sobre la contracción dependiente de endotelio en la prueba de tejido aislado. La principal ventaja de esta técnica es que el tejido está vivo y funciona como un tejido completo.
4. Evaluar el efecto de Ob-AEt, Os-AEt y AR en un modelo de isquemia / reperfusión.
5. Realizar pruebas de toxicidad y de dosis letal 50 (DL50) para Os-AEt.
6. Continuar con la caracterización química de Os-AEt.
7. Analizar la biotransformación de AR y otros componentes de Ob-AEt y Os-AEt (farmacocinética).
8. Evaluar el efecto de Ob-AEt, Os-AEt y AR en un modelo de hipertensión relacionado con obesidad.
9. Determinar el efecto antioxidante de Os-AEt.

13. LITERATURA CONSULTADA

1. Carvajal-Carvajal C (2017) El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med Leg Costa Rica* 34:90–100
2. Cobos S L (2014) Endotelio e hipertensión arterial. *An la Fac Med* 75:345–350. <https://doi.org/10.15381/anales.v75i4.10854>
3. Guyton AC, Hall JE (2016) Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica
4. Bura-Rivière A, Boccalon H (2015) Fisiología y exploración de la circulación arterial. *EMC - Podol* 17:1–22. [https://doi.org/10.1016/S1762-827X\(14\)69752-2](https://doi.org/10.1016/S1762-827X(14)69752-2)
5. Furchgott RF, Zawadzki J V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
6. Ghosh SK, Pandit JJ (2019) Neurological and humoral control of blood pressure. *Anaesth Intensive Care Med*. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.02.007>
7. Marc Y, Llorens-Cortes C (2011) The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: Implications for new treatment. *Prog Neurobiol* 95:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.006>
8. Bourque CW (2008) Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9:519–531. <https://doi.org/10.1038/nrn2400>
9. Allen AM, MacGregor DP, McKinley MJ, Mendelsohn FAO (1999) Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept* 79:1–7. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00138-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00138-4)
10. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, et al (2003) The brain renin-angiotensin system: Location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 35:901–918. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00306-0)
11. Lezoualc'H F, Fazal L, Laudette M, Conte C (2016) Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease. *Circ Res* 118:881–897. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306529>
12. Fernández-Tresguerres JA, Ariznavarreta-Ruiz C, Cachofeiro V, et al (2010) Fisiología humana, 4e ed. Mc Graw Hill
13. Anwar MA, Al Disi SS, Eid AH (2016) Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part II. *Front Pharmacol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00050>
14. Savoia C, Schiffrin EL (2006) Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:152–158
15. Teixeira LB, Parreiras-E-Silva LT, Bruder-Nascimento T, et al (2017) Ang-(1-7) is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci Rep* 7:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12074-3>
16. Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: New developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 25:485–512. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-4011-5>
17. De Gasparo M, Inagami CT, Wright JW, Unger TH (2000) International Union of Pharmacology.XIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415–472
18. Chrysant SG (2012) The role of angiotensin II receptors in stroke protection. *Curr Hypertens Rep* 14:202–208. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0257-8>
19. Steckekings UM, De Kloet AD, Sumners C (2017) Centrally-mediated cardiovascular actions of the angiotenin II type 2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 28:684–693. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
20. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C (1997) Expression of angiotensin

- type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18:383–439. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0155>
21. Lawrence AJ, Jarrott B (1996) Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol* 48:21–53. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00034-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00034-8)
 22. Singh DK, Karnik SS (2016) Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *J Cell Signal* 01:1–8. <https://doi.org/10.4172/2576-1471.1000111>
 23. MacKenzie A (2011) Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 131:187–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.11.001>
 24. Li XC, Zhuo JL (2008) Nuclear factor- κ B as a hormonal intracellular signaling molecule: Focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:37–43. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3282f2903c>
 25. Zhou T, Zhao L, Zhan R, et al (2014) Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapson. *Biochem Biophys Res Commun* 453:419–424. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.093>
 26. Ruster C, Wolf G (2011) Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 22:1189–1199. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010040384>
 27. Harrison DG, Guzik TJ, Lob H, et al (2012) Inflammation, Immunity and Hypertension. 57:132–140. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576>
 28. Jaitovich A, Jaim Etcheverry G (2004) Adhesion molecules. Their role in cardiovascular physiopathology. *Medicina (B Aires)* 64:455–62
 29. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S (2014) Review Article Roles of Inflammation , Oxidative Stress , and Vascular Dysfunction in Hypertension. 2014:
 30. Cambier L, Giani JF, Liu W, et al (2018) Angiotensin II – Induced End-Organ Damage in Mice Is Attenuated by Human Exosomes and by an Exosomal Y RNA Fragment. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11239>
 31. Luft FC, Mervaala E, Mu DN, et al (1999) Hypertension-Induced End-Organ Damage. A new transgenic Approach to an Old Prolem. 212–219
 32. Pauletto P, Rattazzi M (2006) Inflammation and hypertension : the search for a link. *Nephrol Dial Transpl* 850–853. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl019>
 33. Wagner-grau P (2010) Fisiopatología de la hipertensión arterial Pathophysiology of arterial hypertension. 71:
 34. Gómez-Zamudio JH, García-Macedo R, Lázaro-Suárez M, et al (2015) Vascular endothelial function is improved by oral glycine treatment in aged rats. *Can J Physiol Pharmacol* 93:465–473. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0393>
 35. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, et al (2007) Angiotensin II Induces Endothelial Xanthine Oxidase Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:943–948. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf>
 36. Beevers G, Lip GYH, Brien EO, No A (2001) ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension
 37. Deng F, Wang S, Zhang L (2017) Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *J Cell Mol Med* 21:1698–1710. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13125>
 38. Favretto G, Cunha RS da, Dalboni MA, et al (2019) Endothelial Microparticles in Uremia: Biomarkers and Potential Therapeutic Targets. *Toxins (Basel)* 11:1–16.

- <https://doi.org/10.3390/toxins11050267>
39. Li P, Qin C (2015) Elevated circulating VE-cadherin + CD144 + endothelial microparticles in ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res* 135:375–381. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.12.006>
 40. Sansone R, Baaken M, Horn P, et al (2018) Endothelial microparticles and vascular parameters in subjects with and without arterial hypertension and coronary artery disease. *Data Br* 19:495–500. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.149>
 41. Sansone R, Baaken M, Horn P, et al (2018) Release of endothelial microparticles in patients with arterial hypertension, hypertensive emergencies and catheter-related injury. *Atherosclerosis* 273:67–74. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.012>
 42. NOM-030-SSA2-2009. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5144642
 43. (2019) OMS. <https://www.who.int/topics/hypertension/es/>
 44. Cigarroa-López JÁ (2017) IMSS. <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201707/203>
 45. Rosas-Peralta M, Palomo-Piñón S, Borrayo-Sánchez G, et al (2016) Consenso de Hipertensión Arterial Sistémica en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:3–5
 46. Chobanian A V., Bakris GL, Black HR, et al (2003) The seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *J Am Med Assoc* 289:
 47. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al (2017) 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. *J Am Coll Cardiol* 71:88. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.745>
 48. Hasson CJ, Caldwell GE, Emmerik REA Van (2009) Hypertension and Cerebrovascular Dysfunction. *Cell Metab* 27:590–609. <https://doi.org/10.1016/j.humov.2008.02.015> Changes
 49. Wiesmann M, Zerbi V, Jansen D, et al (2017) Hypertension , cerebrovascular impairment , and cognitive decline in aged A β PP / PS1 mice. *Theranostics* 7:1277–1289. <https://doi.org/10.7150/thno.18509>
 50. Saavedra JM, Ando H, Armando I, et al (2005) Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT 1 receptor antagonists. *Regul Pept* 128:227–238. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.12.015>
 51. Pan Y, Cai W, Cheng Q, et al (2015) Association between anxiety and hypertension : a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11:1121–1130. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/NDT.S77710> Neuropsychiatric
 52. Goshen I, Yirmiya R (2009) Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol* 30:30–45. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.10.001>
 53. Pérez-Rodríguez G (2016) La hipertensión arterial sistémica en México. Un consenso para mitigarla. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 51:3–5
 54. Palomo-Piñón S, Rosas-Peralta M, Paniagua-Sierra R (2016) Tratamiento de la hipertensión arterial en la enfermedad renal crónica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:78–88
 55. Pan American Health Organization (2018) Monitoring and evaluation framework for Hypertension Control Programs
 56. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C (2005) Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med* 146:160–173. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.05.005>

57. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, et al (2019) Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* 73:e87–e120. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>
58. Sarikonda K V., Watson RE, Opara OC, DiPette DJ (2009) Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens* 3:158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2009.02.003>
59. Leong X-F, Ng C-Y, Jaarin K (2015) Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int* 2015:1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/528757>
60. Lin HY, Lee YT, Chan YW, Tse G (2016) Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomed Reports* 5:653–659. <https://doi.org/10.3892/br.2016.784>
61. Medraza Rojas A, Jiménez Aparicio AR, Jiménez Ferrer JE (2015) Evaluación farmacológica de *Malva parviflora* en un modelo de insuficiencia renal. Instituto Politécnico Nacional
62. Martínez Montiel O, Ventura Zapata E, Jiménez Ferrer JE (2012) Evaluación de la actividad inmunomoduladora en un modelo de hipertensión arterial del extracto etanólico de *Physalis peruviana* cultivada en un sistema semi-hidropónico. *Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos*, Instituto Politécnico Nacional.
63. Jiménez-Ferrer E, Hernández Badillo F, González-Cortazar M, et al (2010) Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. *J Ethnopharmacol* 130:340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.013>
64. Núñez Ortega PE, Rosas Salgado G (2013) Efecto de tres extractos con diferente polaridad de *Cucumis sativus* (pepino) sobre la hipertensión arterial, el estado inflamatorio y el daño asociado a esta enfermedad en un modelo murino. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas
65. Lombardo Earl G, Román Ramos R, Jiménez Ferrer JE, Rosas Salgado G (2014) Caracterización farmacológica de los compuestos derivados del ácido cinámico de la raíz de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Y su efecto sobre la disfunción endotelial. Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana
66. Sánchez Sánchez V, Jiménez Ferrer JE, Rosas Salgado G (2017) Efecto de fracciones estandarizadas de *Salvia elegans* sobre la hipertensión e inflamación crónica inducida por angiotensina II. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
67. Martínez Hernández GB, Herrera Ruiz ML, Tortoriello García J (2015) Efecto de *Salvia elegans* Vahl sobre el daño asociado a hipertensión (estrés oxidante, inflamación y daño cognitivo) por la administración crónica de angII. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
68. Trejo Moreno C, Rosas Salgado G, Santana Calderón MA, JiménezFerrer. JE (2013) Evaluación de la capacidad del extracto metanólico de la raíz de *Sechium edule* (chayote) para reparar el daño tisular y controlar la inflamación en un modelo murino de hipertensión. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
69. Gutiérrez Nava ZJ, Jiménez Aparicio AR, Jiménez Ferrer JE (2012) Efecto farmacológico de la penca de *Agave tequilana* Weber sobre un modelo de disfunción endotelial inducido por angiotensina II. Instituto Politécnico Nacional
70. del Castillo Millán I, Jiménez Ferrer JE (2011) Actividad antiinflamatoria de *Argemone platyceras* “Chicalote” en edema arterial asociado a la hipertensión arterial crónica. Universidad Autónoma del Estado de Morelos

71. Lagunas Herrera H, Ventura Zapata E, Jiménez Ferrer JE (2009) Evaluación química y farmacológica de los extractos de Malva parviflora silvestre y cultivadas sobre la inflamación cardiovascular asociada a hipertensión. Instituto Politécnico Nacional
72. Lagunas Herrera H, Jiménez Ferrer JE (2008) Evaluación de Malva parviflora en el remodelamiento cardiovascular en hipertensión provocada por angiotensina II. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
73. Hernández Aparicio LO (2006) Evaluación farmacológica del efecto antihipertensivo del extracto acuoso de Hibiscus sabdarifa a través de modelos experimentales in vivo e in vitro. Instituto Tecnológico de Zacatepec
74. Razny K, Bednarski M, Sapa J, et al (2014) ANIMAL MODELS FOR HYPERTENSION RESEARCH. *Acta Biol Cracoviensia* 55/56:124–129
75. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W (2011) Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. *J Vis Exp* 2–6. <https://doi.org/10.3791/2920>
76. Valerio G, Jaramillo J, Caraza R, Rodríguez R (2016) Principios de Neurociencia aplicados en la Educación Universitaria. *Form Univ* 9:75–82. <https://doi.org/10.4067/S0718-50062016000400009>
77. Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18:385–403
78. Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp* 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>
79. Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21:205–235
80. Crawley J (2007) What's Wrong With My Mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice, second edition. John Wiley Sons, New York
81. Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21–30
82. Rodgers R, Dalvi (1997) A. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neurosci Behav Rev* 21:801–810
83. Mechiel Korte S, De Boer S (2003) A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463:163–175
84. Komada M, Takao K, Miyakawa T (2008) Elevated Plus Maze for Mice. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/1088>
85. Al Disi SS, Anwar MA, Eid AH (2016) Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. *Front Pharmacol* 6:1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00050>
86. Umar A, Imam G, Yimin W, et al (2010) Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res* 33:727–730. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.64>
87. Sharma V, Chanda D (2018) *Ocimum: The Holy Basil Against Cardiac Anomalies*. Springer International Publishing
88. Al Disi SS, Anwar MA, Eid AH (2016) Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. *Front Pharmacol* 6:1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00050>
89. Pant A, Pandey R (2018) *Ocimum Species: A Longevity Elixir*. Springer International Publishing
90. Pandey AK, Singh P, Tripathi NN (2014) Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: An overview. *Asian Pac J Trop Biomed* 4:682–694. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C77>

91. Makri O, Kintzios S (2008) *Ocimum* sp. (Basil): Botany, Cultivation, Pharmaceutical Properties, and Biotechnology. *J Herbs Spices Med Plants* 13:123–150. <https://doi.org/10.1300/J044v13n03>
92. Bora KS, Arora S, Shri R (2011) Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *J Ethnopharmacol* 137:1360–1365. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.066>
93. Vieira PRN, de Moraes SM, Bezerra FHQ, et al (2014) Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. *Ind Crops Prod* 55:267–271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.032>
94. Ghosh S (2018) *Triterpene Functional Genomics in Ocimum*. Springer International Publishing
95. Grayer RJ, Kite GC, Goldstone FJ, et al (1996) Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43:1033–1039. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00429-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00429-3)
96. Srivastava RK, Kumar S, Sharma RS (2018) *Ocimum* as a Promising Commercial Crop. Springer International Publishing
97. Bernert G, Hoeger H, Mosgoeller W, et al (2003) Neurodegeneration, neuronal loss, and neurotransmitter changes in the adult guinea pig with perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 54:523–528. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000081760.48331.7A>
98. Mahajan N, Rawal S, Verma M, et al (2013) A phytopharmacological overview on *Ocimum* species with special emphasis on *Ocimum sanctum*. *Biomed Prev Nutr* 3:185–192. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.002>
99. Sajjadi SE (2006) Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru* 14:128–130
100. Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, et al (2003) Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *J Ethnopharmacol* 87:103–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00115-6)
101. Oxenham SK, Svoboda KP, Walters DR (2005) Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). *J Phytopathol* 153:174–180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00952.x>
102. Bora KS, Arora S, Shri R (2011) Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *J Ethnopharmacol* 137:1360–1365. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.066>
103. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavlejevic S, Trivic S (2011) Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Molecules* 16:7401–7414. <https://doi.org/10.3390/molecules16097401>
104. Deveci E, Tel-Çayan G, Duru ME, Öztürk M (2019) Phytochemical contents, antioxidant effects, and inhibitory activities of key enzymes associated with Alzheimer's disease, ulcer, and skin disorders of *Sideritis albiflora* and *Sideritis leptoclada*. *J Food Biochem* 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13078>
105. Parisi OI, Puoci F, Restuccia D, et al (2014) Polyphenols and Their Formulations. In: *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier, pp 29–45
106. Scarpati M, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus* off.). *Ric Sci* 28:2329–33
107. Fecka I, Turek S (2007) Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J Agric Food Chem* 55:10908–10917. <https://doi.org/10.1021/jf072284d>
108. Nadeem M, Imran M, Aslam Gondal T, et al (2019) Therapeutic Potential of

- Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review. *Appl Sci* 9:3139. <https://doi.org/10.3390/app9153139>
109. Takeda H, Tsuji M, Miyamoto J, Matsumiya T (2002) Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. *Psychopharmacology (Berl)* 164:233–235. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1253-5>
 110. Kiferle C, Lucchesini M, Mensuali-Sodi A, et al (2011) Rosmarinic acid content in basil plants grown in vitro and in hydroponics. *Cent Eur J Biol* 6:946–957. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0057-1>
 111. Pereira P, Tysca D, Oliveira P, et al (2005) Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res* 52:199–203. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.003>
 112. Howes M-JR (2018) Phytochemicals as Anti-inflammatory Nutraceuticals and Phytopharmaceuticals. In: *Immunity and Inflammation in Health and Disease*. Elsevier, pp 363–388
 113. Connelly AE, Tucker AJ, Tulk H, et al (2014) High-Rosmarinic Acid Spearmint Tea in the Management of Knee Osteoarthritis Symptoms. *J Med Food* 17:1361–1367. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0189>
 114. LEE J, JUNG E, KOH J, et al (2008) Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *J Dermatol* 35:768–771. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00565.x>
 115. Han J, Wang D, Ye L, et al (2017) Rosmarinic Acid Protects against Inflammation and Cardiomyocyte Apoptosis during Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Front Pharmacol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00456>
 116. Lu C, Zou Y, Liu Y, Niu Y (2017) Rosmarinic acid counteracts activation of hepatic stellate cells via inhibiting the ROS-dependent MMP-2 activity: Involvement of Nrf2 antioxidant system. *Toxicol Appl Pharmacol* 318:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.008>
 117. Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV (2011) Administration of Rosmarinic Acid Reduces Cardiopathology and Blood Pressure Through Inhibition of p22phox NADPH Oxidase in Fructose-Fed Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:514–521. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31822c265d>
 118. Huang S, Zheng R (2006) Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett* 239:271–280. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.025>
 119. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, et al (2002) Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol* 449:261–267. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02037-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02037-X)
 120. Moreno-Urbe V (2004) *Herbolaria y la tradicion en la región de Xico, Veracruz*. Editorial Universidad Veracruzana, Mexico
 121. campos mota L, Flores sánchez D (2013) Sustratos orgánicos como alternativa para la producción de albahaca (*Ocimum Selloi Benth*) * Organic substrates as an alternatively for the production of pepper basil (*Ocimum Selloi Benth*) Resumen. *Rev Mex Ciencias Agrícolas* 5:1055–1061
 122. Franca CS, Menezes FS, Costa LCB, et al (2008) Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. *Fitoterapia* 79:569–573. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.06.002>
 123. Alegría-Herrera E, Herrera-Ruiz M, Román-Ramos R, et al (2019) Effect of *Ocimum basilicum*, *Ocimum selloi*, and Rosmarinic Acid on Cerebral Vascular Damage in a Chronic Hypertension Model. *Biol Pharm Bull* 42:201–211. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00574>

124. Souza SDF, Franca CSL, Niculau ES, et al (2015) Antispasmodic effect of *Ocimum selloi* essential oil on the Guinea-pig ileum. *Nat Prod Res* 29:2125–2128. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.989392>
125. Ferrer I (2010) Cognitive impairment of vascular origin: Neuropathology of cognitive impairment of vascular origin. *J Neurol Sci* 299:139–149. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.08.039>
126. Bodiga VL, Bodiga S (2013) Renin Angiotensin System in Cognitive Function and Dementia. *Asian J Neurosci* 2013:1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/102602>
127. Rosas-Peralta M, Borrayo-Sánchez G, Madrid-Miller A, et al (2016) Hipertensión arterial sistémica en el adulto mayor. Recomendaciones para la práctica clínica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:75–77
128. Rosas-Peralta M, Palomo-Piñón S, Borrayo-Sánchez G, et al (2016) Consenso de Hipertensión Arterial Sistémica en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:6–51
129. López-Luengo MT (2001) Las plantas medicinales en el tratamiento de la HTA. *Fitoterapia*
130. Herrera-Ruiz ML, Román-Ramos R, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa-Alvarez A (2008) Evaluación de la actividad ansiolítica de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin y *Ocimum basilicum* Linn.
131. Pérez-Rodríguez G (2016) La hipertensión arterial sistémica en México. Un consenso para mitigarla. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:3–5
132. Cantú-Brito C, Ruiz-Sandoval JL, Chiquete E, et al (2011) Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Rev Mex Neurocienc* 12:224–234
133. Lahera V, Vázquez-Pérez S, de las Heras N, et al (2000) Angiotensina II e hipertensión arterial: consecuencias del antagonismo de sus receptores. *Hipertens y Riesgo Vasc* 17:22–29. [https://doi.org/10.1016/s1889-1837\(00\)71005-1](https://doi.org/10.1016/s1889-1837(00)71005-1)
134. Monassier L, Combe R, Fertak L El (2006) Mouse models of hypertension. *Drug Discov Today Dis Model* 3:273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.10.008>
135. Amrani S, Harnafi H, Gadi D, et al (2009) Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *J Ethnopharmacol* 125:157–162. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.043>
136. Lal RK, Gupta P, Chanotiya CS, Sarkar S (2018) *Traditional Plant Breeding in Ocimum*. Springer International Publishing
137. Gupta S, Srivastava A, Shasany AK, Gupta AK (2018) *Genetics, Cytogenetics, and Genetic Diversity in the Genus Ocimum*. Springer International Publishing
138. Fathiazad F, Matlobi A, Khorrami A, et al (2012) Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *DARU J Pharm Sci* 20:1. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-87>
139. Karthik D, Viswanathan P (2011) Administration of Rosmarinic Acid Reduces Cardiopathology and Blood Pressure Through Inhibition of p22phox NADPH Oxidase in Fructose-Fed Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:514–521
140. Li Q, Li B, Zhang Y, et al (2008) Three angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Rabdosia coetsa*. *Phytomedicine* 15:386–388. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.013>
141. Ersoy S, Orhan I, Turan NN, et al (2008) Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine* 15:1087–1092. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.05.007>

142. Luan H, Kan Z, Xu Y, et al (2013) Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: Relation to inflammation response. *J Neuroinflammation* 10:1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-28>
143. Sinkovic A, Suran D, Lokar L, et al (2010) Rosemary extracts improve flow-mediated dilatation of the brachial artery and plasma PAI-1 activity in healthy young volunteers. *Phyther Res* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ptr.3276>
144. Villapol S, Saavedra JM (2015) Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *Am J Hypertens* 28:289–299. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu197>
145. (2019) Recalls of Angiotensin II Receptor Blockers (ARBs) including Valsartan, Losartan and Irbesartan. In: Food Drug Adm. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/recalls-angiotensin-ii-receptor-blockers-arbs-including-valsartan-losartan-and-irbesartan>
146. López Cormenzana JC, Buonanotte CF (2012) Hipertensión arterial y accidente cerebrovascular en el anciano. *Neurol Argentina* 4:18–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2011.08.002>
147. Evans DL, Charney DS, Lewis L, et al (2005) Mood Disorders in the Medically Ill : Scientific Review and Recommendations. *Biol Psychiatry* 58:175–189. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.001>
148. Kaplan MS, Nunes A (2003) The psychosocial determinants of hypertension. *Nutr Metab Cardiovas Dis* 13:52–59
149. Stein DJ, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, et al (2014) Associations between mental disorders and subsequent onset of hypertension. *Gen Hosp Psychiatry* 36:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2013.11.002>. Associations
150. Chioca LR, Ferro MM, Baretta IP, et al (2013) Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *J Ethnopharmacol* 147:412–418. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.028>
151. Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.029>
152. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, et al (2014) Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/51785>
153. Isik AT, Bozoglu E, Naharci MI, Kilic S (2010) Evaluation of the effects of galantamine on cardiac function in elderly patients with Alzheimer’s disease. *Am J Geriatr Pharmacother* 8:454–459. <https://doi.org/10.1016/j.amjopharm.2010.09.001>
154. Lilienfeld S (2002) Galantamine - A novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer’s disease. *CNS Drug Rev* 8:159–176. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x>
155. Armando I, Volpi S, Aguilera G, Saavedra JM (2007) Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Res* 1142:92–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.037>
156. Ganong WF, Murakami K (1987) Role of Angiotensin II in the Regulation of ACTH Secretion. *Ann New York Acad Sci* 512:
157. Wang HW, Huang BS, White RA, et al (2016) Mineralocorticoid and angiotensin II type 1 receptors in the subfornical organ mediate angiotensin II - induced hypothalamic reactive oxygen species and hypertension. *Neuroscience* 329:112–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.050>

158. Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI (2006) Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *BioFactors* 27:19–35. <https://doi.org/10.1002/biof.5520270103>
159. Wu L, Noyan Ashraf MH, Facci M, et al (2004) Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci* 101:7094–7099. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402004101>
160. Mattson MP, Cheng A (2006) Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci* 29:632–639. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.09.001>
161. Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 7:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
162. Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21:91–97. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht217oa>
163. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, et al (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 222:122–128. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.015>
164. Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, et al (2012) Stress effects on memory: An update and integration. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>
165. Roozendaal B (2002) Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 78:578–595. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
166. Tatomir A, Micu C, Crivii C (2014) The Impact of Stress and Glucocorticoids on Memory. *Clujul Med* 87:3–6. <https://doi.org/10.15386/cjm.2014.8872.871.at1cm2>
167. de Quervain DJF, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B (2009) Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358–370. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.03.002>
168. Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>
169. Grossman E, Nadler M, Sharabi Y, et al (2005) Antianxiety Treatment in Patients With Excessive Hypertension. *Am J Hypertens* 18:1174–1177. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.03.728>
170. Ferreri MC, Gutierrez ML, Gravielle MC (2015) Tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam is associated with different alterations of GABA-A receptors in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 310:152–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.038>
171. Williams LM, He X, Vaid TM, et al (2018) Diazepam is not a direct allosteric modulator of $\alpha 1$ -adrenoceptors, but modulates receptor signaling by inhibiting phosphodiesterase-4. *Pharmacol Res Perspect* 7:1–12. <https://doi.org/10.1002/prp2.455>
172. Romano M (2011) Inflammatory mechanisms involved in acute ischemic brain injury. *Neurol Argentina* 3:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2011.06.004>
173. Kang Y, Ma Y, Zheng J, et al (2009) Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 82:503–512. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp073>
174. Ferreira LG, Celotto AC, Capellini VK, et al (2013) Does rosmarinic acid underestimate as an experimental cardiovascular drug? *Acta Cir Bras* 28:83–87.

- <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013001300016>
175. Ku S-K, Yang E-J, Song K-S, Bae J-S (2013) Rosmarinic acid down-regulates endothelial protein C receptor shedding in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 59:311–315. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.003>
 176. Ju X, Tilton RG, Brasier AR (2011) Multifaceted role of angiotensin II in vascular inflammation and aortic aneurysmal disease. In: *Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture*. p 13
 177. Zhao SJ, Guo CN, Wang MQ, et al (2012) Serum levels of inflammation factors and cognitive performance in amnesic mild cognitive impairment: A Chinese clinical study. *Cytokine* 57:221–225. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.11.006>
 178. Zhuo JL (2008) Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator of angiotensin II-induced target damage in hypertensive heart disease? *J Hypertens* 22:451–454
 179. Kwon W, Cha H, Heo J, et al (2016) Interleukin-10 deficiency aggravates angiotensin II-induced cardiac remodeling in mice. *146:214–221*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.022>
 180. Hussain T, Tan B, Yin Y, et al (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016:.. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
 181. Lanfer-Marquez UM, Barros RMC, Sinnecker P (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res Int* 38:885–891. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>
 182. Wangcharoen W, Phimphilai S (2016) Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks. *J Food Sci Technol* 53:4135–4140. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2380-z>
 183. Wick MJ, Harral JW, Loomis ZL, Dempsey EC (2018) An optimized Evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse. *J Vis Exp* e57037:1–9. <https://doi.org/10.3791/57037>
 184. Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, et al (2013) Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res* 112:1323–1333. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300818>
 185. Jenkins NT, Padilla J, Boyle LJ, et al (2013) Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium. *Hypertension* 61:615–621. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00561>
 186. Jayachandran M, Litwiller RD, Owen WG, et al (2008) Characterization of blood borne microparticles as markers of premature coronary calcification in newly menopausal women. *Am J Physiol Circ Physiol* 295:H931–H938. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00193.2008>
 187. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG (2012) Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods* 31:1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
 188. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, et al (2009) Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335:143–151. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0710-9>
 189. Herring JM, McMichael MA, Smith SA (2013) Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 27:1020–1033. <https://doi.org/10.1111/jvim.12128>
 190. Fink K, Schwarz M, Feldbrügge L, et al (2010) Severe endothelial injury and subsequent repair in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care* 14:.. <https://doi.org/10.1186/cc9050>
 191. Dignat-George F, Boulanger CM (2011) The many faces of endothelial microparticles.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:27–33.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.218123>

192. Paudel KR, Panth N, Kim DW (2016) Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression. *Scientifica* (Cairo) 2016:..
<https://doi.org/10.1155/2016/8514056>

14. ANEXOS:

INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

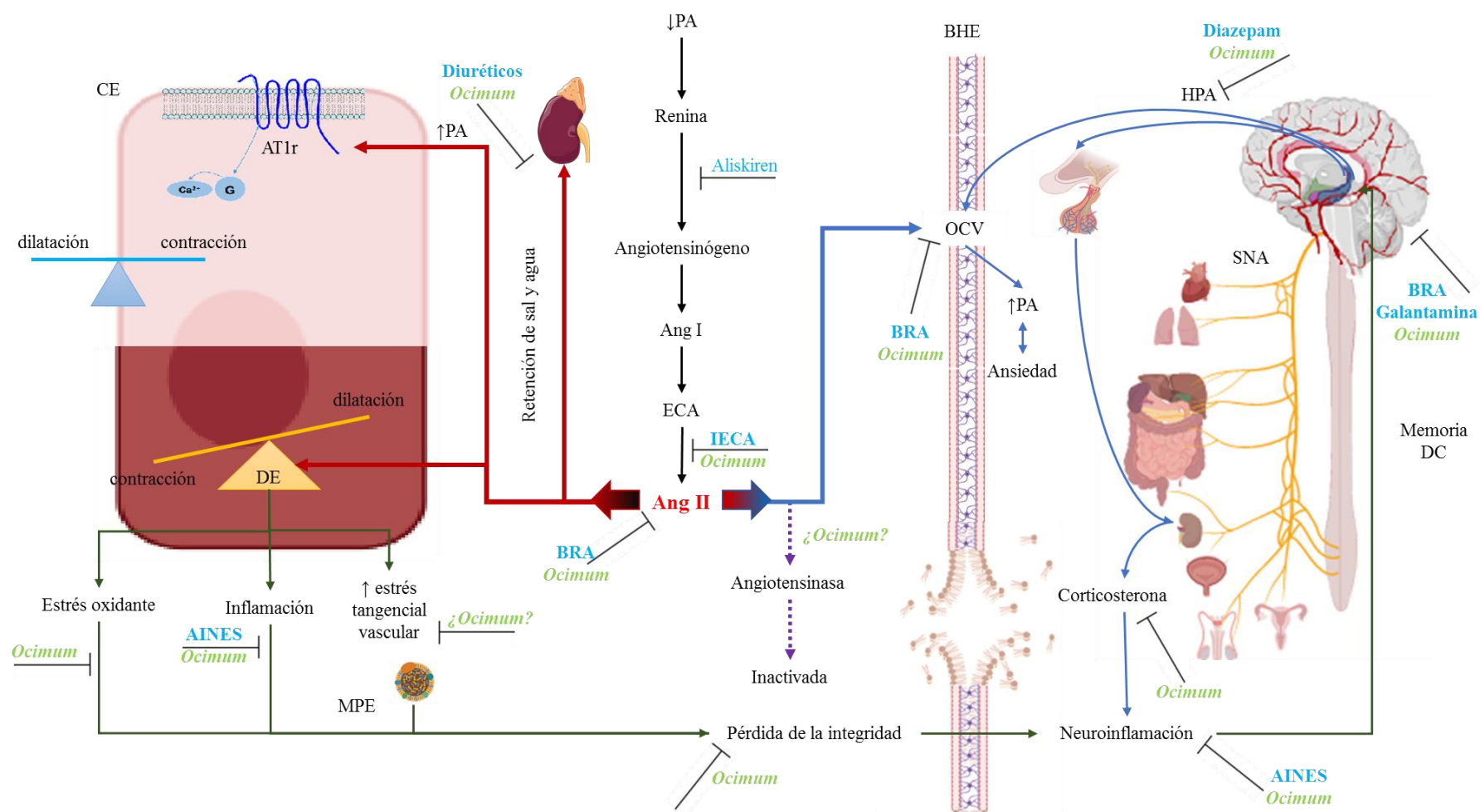


Figura 29. Integración de resultados. Existen medicamentos que regulan el SRAA; cómo el aliskiren, IECA, BRA y diuréticos, entre otros. Disminuyendo así los efectos deletéreos de la HTA. En el presente trabajo se propone que las especies del género *Ocimum* tienen un efecto antihipertensivo, antiinflamatorio y ansiolítico.

CARTA DE COMITÉ DE ÉTICA



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS)

Investigación de
Plantas
Medicinales

Xochitepec Morelos, 3 de septiembre de 2015

**Comisión Académica
Doctorado en Ciencias Biológicas**

Quién suscribe se responsabiliza que para la realización del proyecto de investigación que contempla la tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la M. en C. Elian Yuritzi Alegría Herrera "Efecto protector de tres especies del género *Ocimum* en el daño cerebrovascular asociado a hipertensión arterial inducida con angiotensina II.", se seguirán las normas de buenas prácticas de laboratorio para evitar riesgos ocupacionales. Asimismo, la manipulación de los animales de laboratorio se realizará en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales se mantendrán y se manipularán en el Bioterio del CIBIS bajo control de temperatura y luz, resguardándolos en jaulas resistentes, seguras y a prueba de escape, fabricadas de acrílico que además permitan el libre acceso al agua y alimento; este último será puesto a disposición en forma de croquetas o pelets con los nutrimentos necesarios para la buena alimentación de los animales (Harlan, Laboratories, México). De acuerdo a la Norma, el alimento está libre de aditivos, hormonas, antibióticos, drogas, pesticidas y contaminantes. Al final del estudio los animales se sacrificarán empleando, según el caso y con base a la Norma, cámaras de Bióxido de carbono, dislocación cervical o sobre dosis de anestésico.

Me despido y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración e información, saludos cordiales,

Ma. del Pilar Nicasio T.
Dra. María del Pilar Nicasio Torres
Investigador Asociado
Vocal, Comité Local de Investigación
y Ética en Salud (CLIEIS 1702)

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

4 - AGO. 2015
DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PUBLICACIÓN

Regular Article**Effect of *Ocimum basilicum*, *Ocimum selloi*, and Rosmarinic Acid on Cerebral Vascular Damage in a Chronic Hypertension Model**

Elian Alegría-Herrera,^{a,b,c} Maribel Herrera-Ruiz,^a Rubén Román-Ramos,^c Alejandro Zamilpa,^a Mayra Alejandra Santillán-Urquiza,^a María Isabel Aguilar,^d Margarita Avilés-Flores,^e Macrina Fuentes-Mata,^e and Enrique Jiménez-Ferrer^{*,a}

^aCentro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); Argentina No. 1, Xochitepec, Morelos CP 62790, México; ^bDoctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, Ciudad de México CP 09340, México; ^cDepartamento Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, Ciudad de México CP 09340, México; ^dLaboratorio III, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; Coyoacán, Ciudad de México CP 04510, México; and ^eINAH-Morelos; Matamoros 14, Acatzingo, Cuernavaca, Morelos CP 62440, México.

Received July 29, 2018; accepted November 1, 2018

The main objective of treatment against hypertension is not only to reduce blood pressure levels, but also to reduce vascular risk in general. In the present work, administering angiotensin II (AGII; 0.2 µg/kg intraperitoneally (i.p.) for 12 weeks) activates the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, which caused an increase in corticosterone levels, as well as in proinflammatory cytokines (interleukin 1β (IL-1β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF-α)) and macrophage chemotactic protein 1 (MCP-1), and decreased anti-inflammatory cytokines (interleukin 10 (IL-10) and interleukin 4 (IL-4)). On observing the behavior in the different models, an anxiogenic effect (elevated plus maze (EPM)) and cognitive impairment (water Morris maze (WMM)) was observed in animals with AGII. By administering organic extracts from *Ocimum basilicum* (Oba-EtOAc) and *Ocimum selloi* (Ose-EtOAc), and some doses of rosmarinic acid (RA) (6 weeks *per os* (p.o.)), the damage caused by AGII was stopped by re-establishing corticosterone serum levels and by decreasing the proinflammatory cytokines and MCP-1.

Key words *Ocimum basilicum*; *Ocimum selloi*; angiotensin II; inflammation; anxiety; memory

INTRODUCTION

Chronic arterial hypertension (AH) alters the structure of the cerebral vasculature; thus, the vasoregulatory mechanisms controlled by a functional endothelium are also disrupted. Blood supply to the brain decreases and also increases the susceptibility of this organ to ischemic injury, which causes neuronal death and loss of synapses in regions involved in learning and memory processes.^{1,2} An important element in the pathophysiology of cardiovascular and cerebrovascular diseases is the over-activation of the renin angiotensin aldosterone system (RAAS).^{3,4} One of the main consequences of this altered mechanism is the sustained production of angiotensin II (AGII), one of the final products and the main mediator of this system. The increase in AGII first generates AH, but also induces damage and vascular remodeling, including sustained vasoconstriction, oxidative stress, the inflammatory process, the pro-coagulant state, and cell proliferation.^{3,5–7}

On the other hand, over-activation of RAAS gives rise to a state of anxiety associated with AH. The anatomical substrate that explains this linkage is the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, which is the body's main response system to emotional stress.^{8–11} It has been shown that increased flow through the small arteries, derived from AH, promotes medial hypertrophy (of endothelial and vascular smooth muscle cells),⁵ due to the vascular inflammation that underlies the development of AH.^{12,13} In parallel, there is an increase in

the production of superoxide radical; consequently, there is an infiltration of the leukocytes and other cellular responses that involved an increase of inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, and matrix metalloproteinases.^{3,6,13–15} This generates a vicious circle of anxiety–hypertension–inflammation–oxidative stress–vascular damage–neurological damage.

In this chronic-degenerative process, oxidative stress through the reactive oxygen species (ROS) acts as a signal that induces the expression of messengers for the synthesis of transcriptional factors, which include nuclear factor kappa B (NF-κB) and the activating protein AP-1. Both of the latter are directly involved in the pathogenesis of vascular damage and, in turn, the direct synthesis and release of tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and certain interleukins and chemokines such as macrophage chemotactic protein 1 (MCP-1).^{6,13}

Therefore, vascular diseases are considered an emerging risk factor for dementia and cognitive decline.¹⁶ Because of all of the above, the brain becomes a principal target of the harmful effects of AH and is a cause of related mortality and morbidity.¹

Species of the genus *Ocimum* have an extensive ethno-medical and culinary use. They contain secondary metabolites useful in the treatment of chronic degenerative diseases.¹⁷ *O. basilicum*, for example, has been widely used by the pharmaceutical and cosmetic industry due to its high content of rosmarinic acid (RA), an ester of caffeic acid, with antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and antiviral ac-

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: enriqueferrer_mx@yahoo.com

tivities.¹⁸⁾ Another example of this genus is *O. selloi*, which is native to Mexico, whose pharmacological effects have not, to our knowledge, been studied, although the presence of the following essential oils has been described for this plant: methyl chavicol or stragole; *trans*-anethole; *cis*-anethole, caryphylene,¹⁹⁾ and linalool.¹⁷⁾

The objective of the present work was to evaluate the effect of standardized ethyl acetate extract in its RA content, one of *O. basilicum* (Oba-EtOAc), and the other of *O. selloi* (Ose-EtOAc), in addition to evaluating the effect of different doses of RA on the following: the behavior of anxiety and memory; the serum concentration of corticosterone; the renal and cerebral levels of MCP-1, and interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) and TNF- α in mice with chronic hypertension induced with AGII.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Extraction Both species were identified in the National Institute of Anthropology and History (INAH; Instituto Nacional de Antropología e Historia). The registration number for *O. basilicum* was 2054, and that for *O. selloi* was 2053.

Aerial parts of *O. basilicum* and *O. selloi* were shade-dried, powdered, and extracted by ethanol maceration at 60% for 72 h. The extracts of the both species were concentrated under reduced pressure (Laborota 4000, Heidolph WB eco) at 50°C. From the hydroalcoholic extracts (Oba-EtOH and Ose-EtOH), a separation was carried out in a liquid/liquid interface with ethyl acetate/water, recovering the organic part (Oba-EtOAc and Ose-EtOAc).

Standardization of Organic Extracts in Rosmarinic Acid The extracts were monitored by HPLC under the following conditions: using a Waters 2695 HPLC chromatograph equipped with a Waters 996 diode array detector module, utilizing an Empower Pro Software Program (Waters Corporation, U.S.A.), and by employing a Supelcosil LC-F column (4.6 \times 250 mm i.d., 5- μ m particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, U.S.A.). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 0.5% trifluoroacetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B), while the gradient system was formed in the following manner: 0–1 min, 100% B; 2–3 min 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 24–25 min, 80% B; 26–27 min, 100% B, and 28–30 min, 0% B. The flow was maintained at

0.9 mL/min and the injection volume was 10 μ L. Absorbance was measured at 330 nm. Rosmarinic acid was identified by comparison of the retention time and the UV spectra with a commercial reference (purity grade 96%, Sigma-Aldrich). Molecular mass was corroborated by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS) analysis. The quantity of this polyphenolic compound in each extract was estimated by peak-area interpolation and comparison with a calibration curve of a rosmarinic acid commercial reference (Sigma-Aldrich), which was carried out using five ascending concentrations (0.039, 0.078, 0.152, 0.312, and 0.624 mg/mL) injected by triplicate in the same HPLC method. This analytical process allowed to obtain a linear equation ($Y = 31874x + 134853$, $R^2 = 0.9994$). Results are expressed as mean values in mg/g dry extract.

Animals and Experimental Groups Male ICR mice (age = 10 weeks; $n = 72$), under controlled conditions in a light/dark cycle (12/12 h), at a temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$, with free access to a special diet for rodents (Labdiet) and purified water. For the management and care of the laboratory animals during the experimentation period, we followed Official Mexican Regulation NOM 062-ZOO-1999. The research was conducted in accordance with the international accepted principles for laboratory animal use and care as found in the National Institutes of Health (NIH) guidelines. The behavioral assays were conducted in a soundproofed room with a video recording system; the experimenter avoided the use of a scent and remained in silence. The project was evaluated and authorized by the Committee of Ethics and Institutional Biosecurity and registered with number R-2016-1702-2.

Mice were randomly grouped and a blood pressure measurement was performed by a non-invasive method (LE5002 storage pressure meter; LSI Letica Scientific Instruments), determining baseline systolic pressure and baseline diastolic pressure. After that two groups were formed: A, 66 mice were administered intraperitoneally (i.p.) with AGII at 0.2 μ g/kg, for six weeks; and group B with 6 mice, were not manipulated i.p. (untreated). Once the 6 weeks of the treatment with AGII were completed, the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) of both groups were measured again. Group A was divided into 11 sub-groups that were treated with the drugs listed in Table 1. The treatments were administered orally (*per os* (*p.o.*)) for 6 weeks and the administration of AGII was continued. After 12 weeks, blood pressure was

Table 1. Drugs Used in the Chronic Systemic Hypertension Model Induced with AGII 0.2 μ g/kg

Group	Treatment (mg/kg) <i>p.o.</i>	Clave	Administration i.p. (AGII 0.2 μ g/kg)
Untreated	—	Untreated	—
Negative control	Vehicle (Tween 1%)	Veh	+
AGII Receptor blocker	Telmisartan (10)	Tel 10	+
Nootropic	Galantamine (0.20)	Gal 0.2	+
Anxiolytic	Diazepam (0.25)	Dzp 0.25	+
Experimental	Organic extract of <i>O. basilicum</i> (25)	Oba-EtOAc 25	+
	Organic extract of <i>O. selloi</i> (25)	Ose-EtOAc 25	+
	Rosmarinic acid (0.39)	RA 0.39	+
	Rosmarinic acid (0.78)	RA 0.78	+
	Rosmarinic acid (1.56)	RA 1.56	+
	Rosmarinic acid (3.12)	RA 3.12	+
	Rosmarinic acid (6.24)	RA 6.24	+

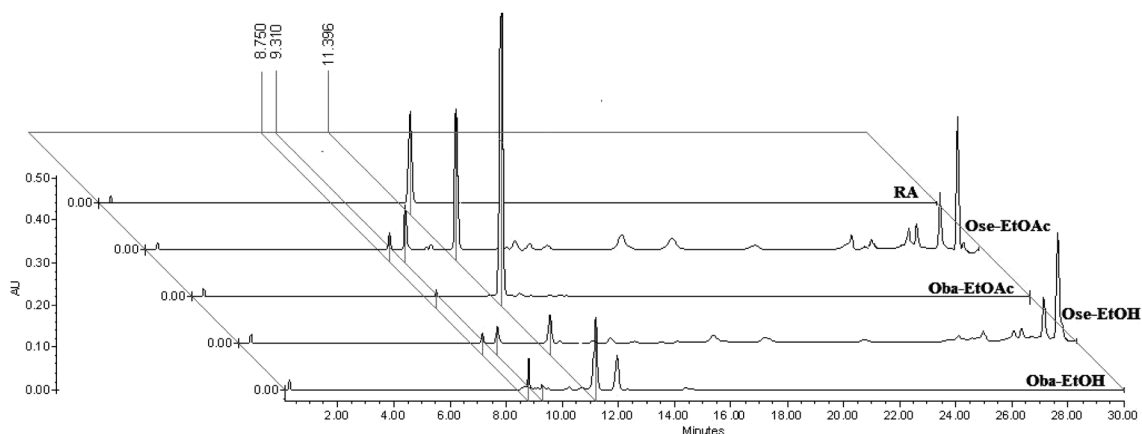


Fig. 1. Chromatographic Profile of the Ethanolic Extracts of *O. basilicum* and *O. selloi* (Oba-EtOH and Ose-EtOH), Oba-EtOAc and Ose-EtOAc, and RA Standard

The following compounds were identified and their corresponding retention times were recorded as follows: chlorogenic acid (8.7 min); caffeic acid (9.3 min), and rosmarinic acid (11.4 min). The sample of each extract was 3 mg/mL, except for that of Oba-EtOAc, which was applied at 0.75 mg/mL.

measured, the behavioral test was performed, and biological samples were taken for the biochemical and immunological tests.

Procedures At the end of the administration of AGII for 12 weeks, behavioral tests were performed. From each group, six animals were taken for the water Morris maze (WMM) and the elevated plus maze (EPM), but not for the open field test (OFT), in that all of the animals were exposed to the latter. On the experimental day, the mice were administered 60 min before the test. After each test, the mice were returned to their cages.

WMM

The WMM was first established by neuroscientist Richard G. Morris in 1981 to test hippocampal-dependent learning, including the acquisition of spatial memory and long-term memory. At week 11 of the hypertension model, training began, in where the maze was divided into four equal quadrants and a white platform was submerged 1 cm below the surface of water. The water was rendered opaque by adding a non-toxic white dye. For 5 d, each mouse was given four trainings to locate the hidden platform. During training sessions, if the animal did not find the platform in 60 s (maximum), it was gently guided to the platform and remained there for 30 s. The mouse was placed in the water each time with a starting point varying in a pseudo-random manner. They were allowed to rest for 2 d, and on day 8, the test was performed, for which the platform was removed and the time taken to go toward the platform area (latency) and the number of crossings over this area were recorded. The test was recorded on a video on the day of the test and analyzed using Smart V3.0 software.

EPM

The EPM is a behavioral trial in rodents that widely used and validated to evaluate the anxiolytic effects of drugs, based on the innate aversion of rodent to open and high spaces. It was performed according to Komada *et al.*²⁰⁾ and Chioca *et al.*²¹⁾ The EPM apparatus was made of plexiglas and consisted of two open arms (30 × 5 cm) and two closed arms (30 × 5 × 15 cm) with 0.25-cm-thick walls. The arms extended from a central platform (5 cm × 5 cm), and the maze was elevated 50 cm from the floor of the room. Each animal was placed at the center of the maze facing one of the enclosed arms. Number of entries and time spent on closed and open

arms were recorded for 5 min. An entry onto an arm was defined as the animal placing all four paws on the arm. All tests were recorded with a video camera. After each test, the maze was carefully cleaned with wet tissue paper with a 10-% ethanol solution. The percentage of number of entries onto open arms (EOA) and the percentage of time spent on open arms (TOA) were registered.

OFT

The animal's natural tendency to explore a new environment is observed, despite the fear caused by that new environment. Developed in 1934 by C. Hall, the OFT is one of the most used instruments to study anxiety, sedation, or motor activity. The OFT was carried out according to Mineur *et al.*²²⁾ and Tatem *et al.*²³⁾ The mice were individually placed in the center of an observation cage made of acrylic (30 × 30 cm), with transparent walls (15 cm) and a black floor with nine divisions marked white. The animals were observed for 5 min directly by an observer. The number of mouse rearings (standing upright on hind legs while the forepaws are free) and total crossings was registered manually.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) At the end of the behavioral test, the animals were anesthetized and blood samples were collected from retro-orbital venous plexus, centrifuged for 7 min (2200 g) and frozen at -80°C until their use. The organs (brain, right and left kidneys) were macerated with phosphate buffered saline-phenylmethylsulfonyl fluoride (0.1%) 1:5 w/v. The suspensions were centrifuged, and the supernatants were recovered and frozen at -80°C until their use. To perform the quantification by means of the ELISA technique of the different molecules, the inserted instructions found in each kit were followed. The biological samples utilized were brain, and right and left kidney. Serum was used for the quantification of corticosterone. Mouse IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , and MCP-1 ELISA kits were purchased from OptEIA™ BD, and Corticosterone ELISA kits were purchased from Cayman Chemical.

Statistical Analysis The results were analyzed with one-way ANOVA, applying a Tukey (post-test) for the results of measurements of blood pressure, the EPM, and the ELISA tests; and of the Dunnett (post-test) for the MWM and the OFT with a level of significance of $p < 0.05$. For all statistical analyses, the SPSS ver. 20 statistical software program was

used.

RESULTS

We analyzed all extracts of the *Ocimum* species by HPLC for detection and quantification of the major constituents of the active extract. Figure 1 presents the HPLC profile of Oba-EtOH, Ose-EtOH, Oba-EtOAc, Ose-EtOAc, and RA (standard), recorded at 330 nm. In the Oba-EtOAc extract, the presence of the major peak at a retention time of 11.396 corresponded to RA.

In both species there are similar compounds, such as chlorogenic acid (t_R :8.7; λ 242, 325 nm) and caffeic acid (t_R :9.3; λ 243, 325 nm). Ose-EtOAc exhibited, in 20–30 min, a compound with UV spectra for chlorophylls (Fig. 1).

Chemical Characterization of the Extracts of *O. basilicum* and *O. selloi* The quantity of this polyphenolic compound in each extract was estimated by peak-area interpolation and by comparison with a calibration curve of the RA commercial reference (Sigma-Aldrich). The amounts of RA in the Oba-EtOAc and Ose-EtOAc determined by HPLC are depicted in Table 2.

Blood Pressure Chronic administration of AGII at 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. increased, by about 20 mmHg, the SBP and DBP at week 6. The increase in both pressures was maintained until week 12, which was the time at which the pharmacological test was concluded. When comparing the blood pressure results of all of the treatment groups, it was observed that there was a significant difference of the values of SBP and DBP ($*p < 0.001$; $F = 1.91$) between the damaged group (Veh) with that of the healthy animals and the values of the other treatments, including telmisartan (10 mg/kg), Oba-EtOAc (25 mg/kg), and Ose-EtOAc (25 mg/kg) (Fig. 2A) and all doses of RA (0.39–6.24 mg/kg) (Fig. 2B).

Morris Water Maze In the device that assesses the spatial learning of rodents, it was observed that the damage group or the disease model (Veh) to which AGII was administered i.p. presented a significant increase in latency time of arrival at the platform in the group compared with the group of healthy mice ($*p < 0.05$; $F = 1.928$). All of the groups of mice that received the different treatments showed a statistically significant decrease in this parameter as follows: telmisartan ($*p < 0.001$); galantamine ($*p < 0.003$); diazepam ($*p < 0.001$, and the experimental treatment ($*p < 0.003$), and Ose-EtOAc ($*p < 0.001$) (Fig. 3A). The fact that the treatment with Ose-EtOAc (25 mg/kg) had the highest nootropic effect, followed by the treatment with galantamine (0.2 mg/kg) was very noteworthy. Another parameter included the time during which the rodents kept swimming on the platform when it was submerged, therefore the number of crossings on this platform. An increase of this latter parameter was observed, which was proportional to the decrease of latency time or arrival time at the platform, as previously described (Fig. 3C),

Table 2. Standardization of Oba-EtOAc and Ose-EtOAc Extracts, in Rosmarinic Acid

Species	RA (mg/g of extract)	Dosage of RA administered in animal model
<i>Ocimum basilicum</i>	251.65	6.29 mg/kg
<i>Ocimum selloi</i>	15.95	0.39 mg/kg

which was significantly lower when this compared with the result of the damage group ($*p < 0.021$; $F = 1.95$). The dose–response curve of RA and latency time of arrival at the platform demonstrated a significant decrease of this time as follows: 0.39 mg/kg ($*p < 0.001$); 0.78 mg/kg ($*p < 0.001$); 1.52 mg/kg ($*p < 0.004$), and 3.12 mg/kg ($*p < 0.001$) (Fig. 3B), although an inverse dose-dependent trend was identified. On the other hand, on increasing the dose, a tendency toward a decrease was observed in the number of crossings on the platform in comparison to those of the Veh (Fig. 3D).

EPM The EPM test allows to assess the degree of anxiety that rodents present, based on the behavior of the animals in the device. The chronic administration of AGII gave rise to a state of anxiety associated with hypertension (Fig. 2) and decreased learning capacity (Fig. 3). The state of anxiety associated with the administration of AGII was evidenced in the mice, due to the significant decrease in the length-of-stay TOA and the number of EOA ($*p < 0.001$; $F = 1.95$). This be-

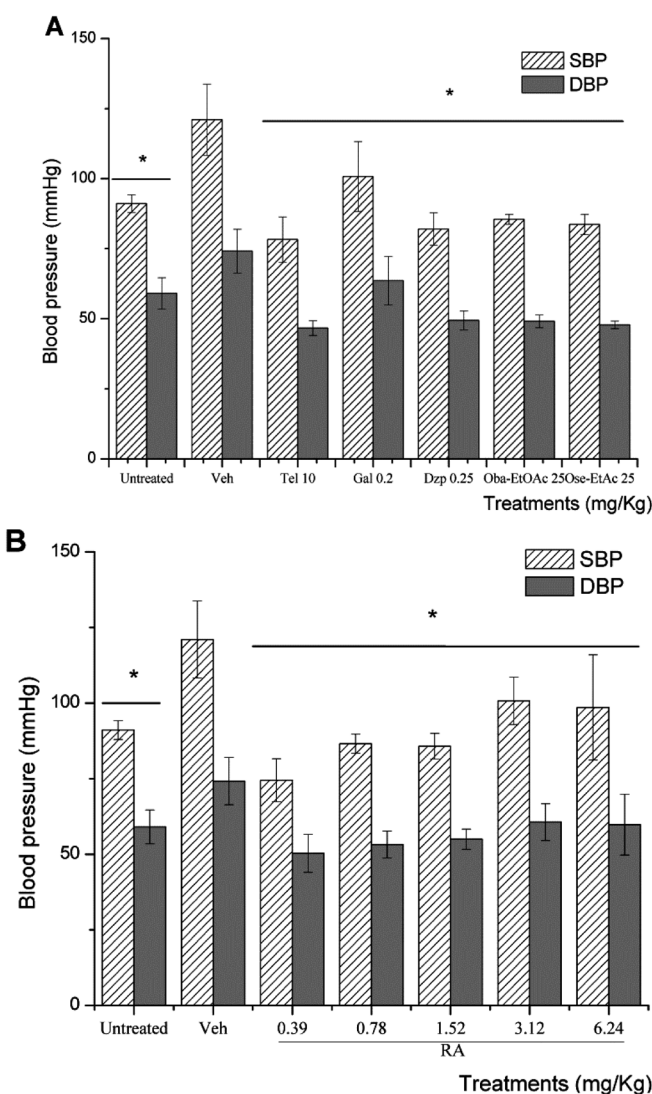


Fig. 2. Effect of the Different Treatments on Blood Pressure in the Chronic Hypertension Model

$*p < 0.001$; $F = 1.91$ compared to the Vehicle (Veh) with analysis by ANOVA with the Tukey post-test. The value represents the mean \pm standard deviation (S.D.) ($n = 10$). SBP and DBP. Oba-EtOAc, Ose-EtOAc, Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam, and RA (0.39–6.24 mg/kg).

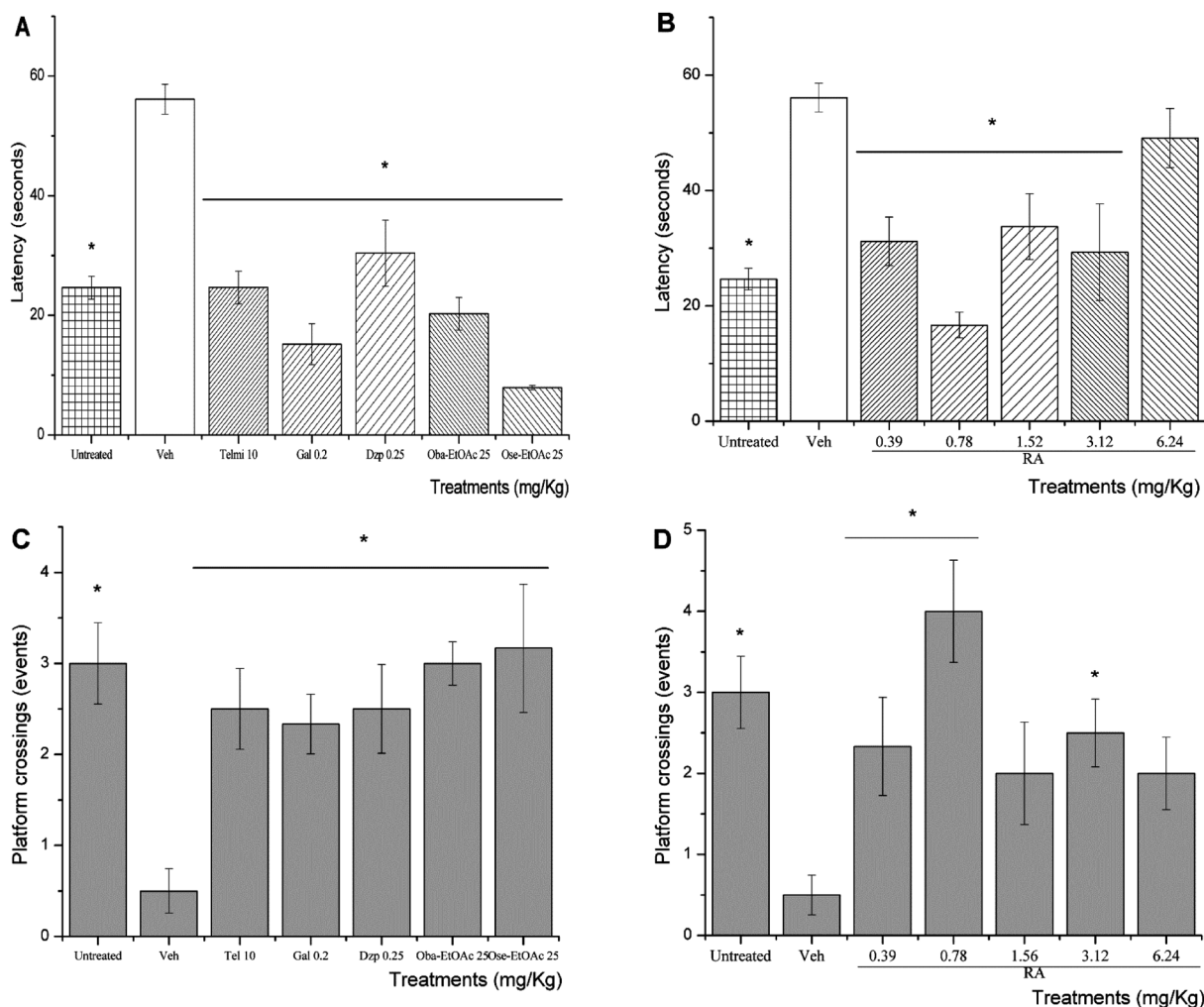


Fig. 3. Effect of (A, C) Control Groups and Oba-EtOAc (25 mg/kg) and Ose-EtOAc (25 mg/kg), and Different Doses of RA (B, D) in the Water Morris Maze

* $p < 0.001$; $F = 1.91$ compared to the vehicle (Veh), with analysis by ANOVA with the Dunnett post-test. The value represents the mean \pm S.D. ($n = 6$). Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam.

havior was reversed both in the treatment groups with control drugs, and in the experimental treatment groups (Oba-EtOAc and Ose-EtOAc), and in the same manner with all of the tested doses of RA (Figs. 4A, B). From the dose-effect curve of RA as anxiolytic, the following pharmacological constants were established: EOA: $E_{max} = 63.69\%$; $ED_{50} = 0.025$ mg/kg; TOA: $E_{max} = 59.17\%$, and

OFT With the intention of consolidating the behavioral results of the nootropic and anxiolytic effect of the experimental treatments, the spontaneous motility of the animals exposed to the administration Oba-EtOAc (25 mg/kg) and Ose-EtOAc (25 mg/kg) was evaluated. The motility assessment was performed in an open-field device, in which it was established that the chronic administration of AGII caused the significant decrease in motility evaluated by the measurement of the total crossings and vertical surveys (rearing) and corresponded to 51 and 35%, respectively, compared with those of the untreated group, which could suggest that the anxiolytic effect would have to be reconsidered. However, the decrease in motility time was determined by the time consumed by the animals in grooming, which is also a parameter indicative of the state of anxiety, in addition, the increase in the number of excreta observed (data not shown). Treatments for

the administration of galantamine, diazepam, Ose-EtOAc, and the first four doses of RA revealed significant increases in total crossings compared with those of the damage group (* $p < 0.001$) (Table 3). From the dose-effect curves of RA, the following pharmacological constants were calculated: $E_{max} = 204.08$ events; $ED_{50} = 0.081$ mg/kg for total crossings, and $E_{max} = 61.35$, $ED_{50} = 0.006$ mg/kg for rearings.

ELISA

Corticosterone

Sustained stimulation of the HPA axis gives rise to a state of anxiety associated with increased serum corticosterone levels. In the proposed hypertension model, chronic administration of AGII caused the condition of behavioral anxiety (Fig. 4), parallel to the significant increase in the serum corticosterone concentration by approximately 25% (* $p < 0.05$; $F = 1.95$). Administration of the control treatments and of the experimental treatments reversed the effect observed in the damage group (Fig. 5A). Similarly, in the dose-response curve of RA, dose-dependent corticosterone-level behavior was observed, which corresponds to the observed behavioral anxiolytic effect (Fig. 4). This behavior was observed between the 0.39 and the 3.12 mg/kg dose.

Inflammatory Damage Markers: $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$,

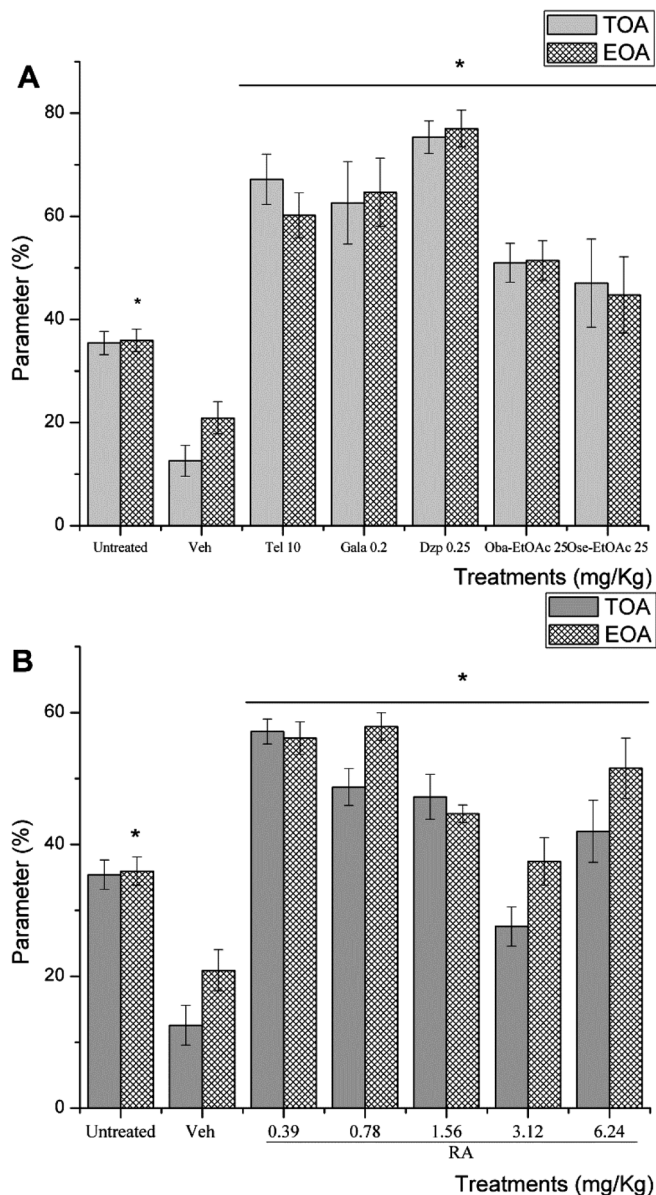


Fig. 4. Anxiolytic Effect of the Treatment with the Oba-EtOAc (25 mg/kg) and Ose-EtOAc (25 mg/kg) on the Anxiety Caused by the Chronic Administration of AGII

* $p < 0.05$; $F = 1.95$ in comparison with vehicle (Veh) by ANOVA and the Tukey post-test. Values are means \pm standard error of mean (S.E.M.) ($n = 6$). TOA: time spent on open arms; EOA: entries onto open arms; Untreated, without the administration of AGII; Veh, vehicle; Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam; Oba-EtOAc; Ose-EtOAc, and RA (0.39–6.24 mg/kg).

MCP-1, and IL-10

Table 4 presents the tissue concentrations of cytokines in organs (brain, and right and left kidneys) that respond to vascular damage, caused by arterial hypertension secondary to chronic administration of AGII. In the damage group, a significant increase was observed in the concentrations of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 (cytokines considered as proinflammatory), both in the brain and in both kidneys (* $p < 0.05$; $F = 1.91$).

A decrease in the level of TNF- α in brain and left kidney is observed with the administration of telmisartan, galantamine, diazepam, and the extracts of both Oba-EtOAc and Ose-EtOAc (* $p < 0.001$).

IL-1 β decreases in brain and right kidney with the administration of telmisartan, galantamine, Oba-EtOAc, and Ose-

Table 3. Effect on Spontaneous Motility in the OFT Device, of the Oba-EtOAc and Ose-EtOAc Extracts, on the Motility Modification Caused by the Chronic Administration of AGII

Group	Total crosses	Rearing
Untreated	139.6 \pm 16.10*	37 \pm 11.39*
Veh	69.33 \pm 15.66	24.55 \pm 4.69
Tel 10	81.42 \pm 7.61	27.28 \pm 6.96
Gal 0.2	105.33 \pm 14.26*	45.66 \pm 7.95*
Dzp 0.25	97.37 \pm 17.22*	28.12 \pm 11.37
Oba-EtOAc 25	75.33 \pm 8.97	27.11 \pm 5.19
Ose-EtOAc 25	107.28 \pm 10.64*	42.14 \pm 5.08*
RA 0.39	121.6 \pm 11.17*	43.2 \pm 3.70*
RA 0.78	107.2 \pm 17.54*	41.8 \pm 6.37*
RA 1.56	89.4 \pm 16.83*	33 \pm 13.76
RA 3.12	88.2 \pm 11.84*	20 \pm 6.04
RA 6.24	79.2 \pm 12.49	19 \pm 5.43

Untreated, without administration of AGII; Veh, vehicle; Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam; Oba-EtOAc, Ose-EtOAc and RA (0.39–6.24 mg/kg). Compared to the Vehicle by ANOVA post-test Dunnet ($n = 6$).

EtOAc, while it decreases in the left kidney with the administration of telmisartan and Ose-EtOAc (* $p < 0.001$).

The concentration of IL-6 in the brain is decreased by the administration of telmisartan, galantamine, and the Ose-EtOAc extract (* $p < 0.001$). In the right kidney, the concentration of IL-6 is decreased compared to that of the Veh group with the administration of telmisartan, galantamine, and Ose-EtOAc, while in the left kidney, by means of the administration of telmisartan, galantamine, diazepam (* $p < 0.014$), and Ose-EtOAc (* $p < 0.001$).

There was no significant difference between the concentrations of IL-10 in brain and both kidneys of the untreated and Veh groups. However, in the brain, galantamine (* $p < 0.006$) and diazepam (* $p < 0.004$), in the right kidney, galantamine (* $p < 0.002$) and Oba-EtOAc (* $p < 0.003$), and in the left kidney, telmisartan (* $p < 0.001$), galantamine (* $p < 0.001$), diazepam (* $p < 0.001$), Oba-EtOAc (* $p < 0.001$), and Ose-EtOAc (* $p < 0.002$) significantly increased the level of IL-10 compared to that of the Veh group.

The chronic administration of AGII also increased the tissue concentration of MCP-1, which gave rise to a decrease in the permeability of the endothelium in brain and both kidneys, on comparison with that of the untreated group (healthy) (* $p < 0.001$). The administration of the treatments significantly decreased the level of this chemokine when compared with the damage group. telmisartan (both kidneys; * $p < 0.001$), galantamine (brain; * $p < 0.011$), left kidney; * $p < 0.001$), diazepam (both kidneys, * $p < 0.001$); Oba-EtOAc (brain, * $p < 0.036$; both kidneys, * $p < 0.001$), and Ose-EtOAc (brain, * $p < 0.001$; both kidneys; * $p < 0.001$).

With respect to the RA curve (Table 5), all doses administered (0.39, 0.78, 1.52, 3.12, and 6.24 mg/kg) decreased the concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MCP-1 and increased the concentrations of IL-10 and IL-4 with regard to the Veh group (* $p < 0.05$). In these cytokines, reverse dose-dependent behavior was observed, that is, the lower the concentration, the greater the modulator effect.

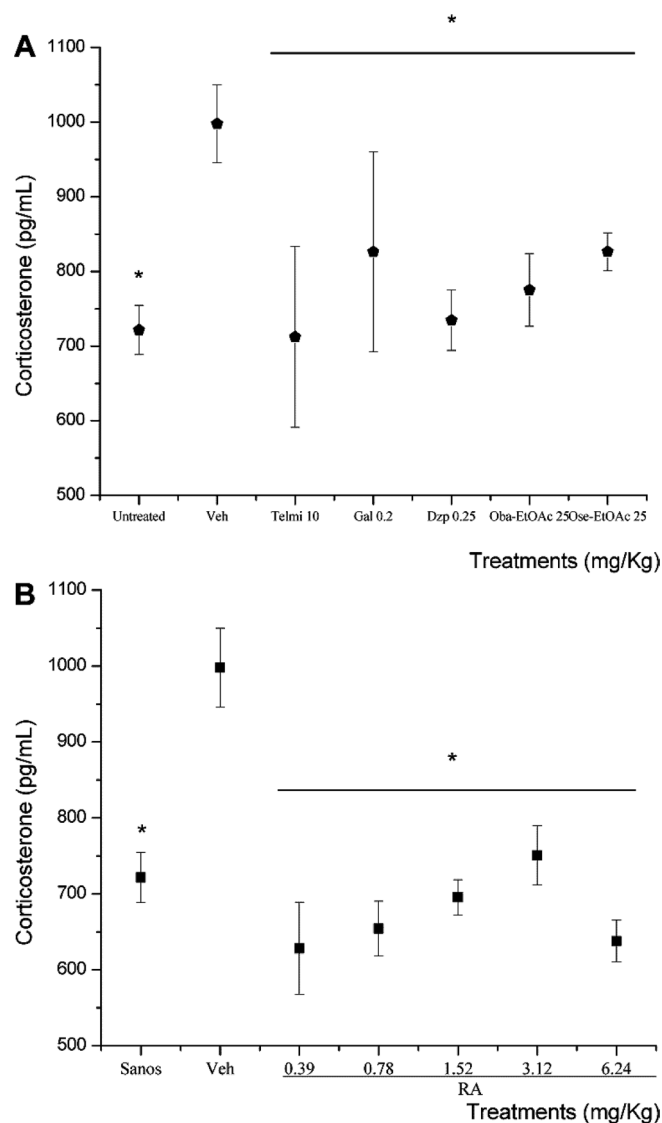


Fig. 5. Antagonistic Effect of the Treatments with Extracts Oba-EtOAc and Ose-EtOAc on the Release of Corticosterone Caused by the Chronic Administration of AGII

The values presented correspond to the serum concentration \pm S.D. ($n=6$). Untreated, without administration of AGII; Veh, vehicle; Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam; Oba-EtOAc; Ose-EtOAc and RA (0.39–6.24 mg/kg). * $p < 0.05$; $F = 1.95$ in comparison with Vehicle by ANOVA post-test Tuckey.

DISCUSSION

The results of the present work indicate that the ethyl acetate extracts of *O. basilicum* and *O. selloi* regulate some of the damage responses generated by chronic AH, which was generated in the mice by the administration during 12 weeks of AGII.

These plants share the presence of caffeic acid, chlorogenic acid, and RA. Chemical analysis allowed observing that, for *O. basilicum*, RA is the majority compound (251.65 mg RA/gram of extract), while, for *O. selloi*, the content of RA was 15.95 mg/gram of extract. Based on this, both extracts were standardized in terms of their RA content, and the evaluation of this compound was carried out at different doses (0.39, 0.78, 1.52, 3.12, and 6.24 mg/kg) in the chronic AH assay.

In the present report, the chronic administration was employed of AGII for the induction of damage associated with

chronic AH, due to that it has been shown that the infusion of this hormone induces an elevation in SBP.^{5,24} Hypertension possesses a multifactorial etiology in which genetic, psychosocial, and environmental factors appear to be important.⁹ Hypertension injures blood vessels and thereby causes end-organ damage. The endothelial layer acts as a signal-transduction interface for hemodynamic forces in the regulation of vascular tone and the chronic structural remodeling of arteries.⁶ Consequently, the mechanisms of regulation mediated by AGII have become a therapeutic target in the treatment of AH and its metabolic complications.^{6,25} After 6 weeks of daily administration of AGII, treatment with the extracts or with RA was initiated; the result of this was that all treatments decreased hypertension, even to the degree of comparison with animals that did not receive AGII (untreated).

For *O. basilicum*, there is experimental evidence that contributes to the knowledge of how this plant species may be exerting its protective effect against the actions of AGII. It was shown that it is capable of strongly protecting the myocardium against isoproterenol-induced infarction and suggests that the cardioprotective effects could be related to antioxidative activities.²⁶ Umar *et al.* report that the crude extract of *O. basilicum* (100–400 mg/kg) decreased the blood pressure (BP) level in rat in a dose-dependent manner.²⁷ It was also reported to cause a vasorelaxant effect in rat aortic rings, though the mechanism for this relaxation was not determined.²⁸ Perhaps one potential action mode could be due to sweet basil's potent ROS scavenging ability.^{29,30}

In the case of *O. selloi*, there is no evidence, to our knowledge, to indicate its pharmacological activity on hypertension and its consequences, even though, in traditional medicine in Mexico, one of the main medicinal uses is against hypertension. While it is necessary to delve more into this species and its benefits, in this work we showed that the extract of both plants are capable of diminishing the hypertension generated by AGII.

This may be partly attributable to its RA content, since this substance is capable of inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE),^{31,32} or it may exert a vasodilatory effect that is endothelium-dependent.³³ It has been shown that RA protects the brain against damage caused by ischemia–reperfusion by maintaining the integrity of the blood–brain barrier.³⁴ However, in the organic extract of *O. selloi*, RA is found at a lower concentration as compared to *O. basilicum*; thus, the vasoactive activity of the extract is probably due to interaction with other compounds.

The effect of the extracts and of the RA were similar to those observed with telmisartan, which is an antagonist of the receptors to angiotensin type 1 (rAT1), and it is probable that *O. selloi* and *O. basilicum* also contain compounds that act in a manner similar to that of the drug. Nonetheless, it should be mentioned that this differentiation toward a regulating phenotype of monocytes may be independent of the rAT1 pathway and/or the antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ).³⁵

It has been described that there is a comorbidity between AH and psychiatric disorders such as anxiety, depression, and cognitive deterioration processes, among others.^{9,36,37} The existence of such associations would be consistent with work indicating that such symptoms are accompanied by alterations in peripheral and central neuro-endocrine systems.³⁶ In par-

Table 4. Effect of the Treatments Oba-EtOAc and Ose-EtOAc on the Tissue Levels of Cytokines of Widely Vascularized Organs

Organ	Treatment (mg/kg)	TNF- α (pg/mg prot)	IL-1 β (pg/mg prot)	IL-6 (pg/mg prot)	IL-10 (pg/mg prot)	IL-4 (pg/mg prot)	MCP-1 (pg/mg prot)
Brain	Untreated	110.70 \pm 39.60*	510.94 \pm 47.25*	62.29 \pm 16.20*	84.96 \pm 18.50	134.33 \pm 22.15*	41.28 \pm 5.65*
	Vehicle	588.69 \pm 65.36	697.38 \pm 108.78	214.51 \pm 83.80	81.92 \pm 24.33	199.27 \pm 54.92	99.73 \pm 31.78
	Tel 10	302.28 \pm 91.46*	570.23 \pm 65.62*	86.12 \pm 11.34*	63.97 \pm 7.98	93.26 \pm 13.68*	73.27 \pm 31.66
	Gal 0.2	231.10 \pm 38.06*	464.41 \pm 104.71*	85.50 \pm 9.01*	43.03 \pm 13.26*	73.17 \pm 9.00*	62.97 \pm 12.75*
	DZP 0.25	214.34 \pm 16.17*	447.32 \pm 70.13*	180.85 \pm 12.77	42.33 \pm 5.85*	73.42 \pm 10.84*	76.44 \pm 9.37
	Oba-EtOAc 25	293.63 \pm 53.78*	500.30 \pm 67.88*	201.14 \pm 28.64	57.85 \pm 4.50	87.05 \pm 10.46*	66.72 \pm 23.18*
	Ose-EtOAc 25	285.19 \pm 62.41*	355.47 \pm 29.90*	104.52 \pm 29.94*	62.12 \pm 5.56	153.79 \pm 30.92*	55.22 \pm 7.65*
	Right kidney	Untreated	114.53 \pm 49.71*	556.93 \pm 98.25*	217.41 \pm 86.41*	113.73 \pm 22.74	345.25 \pm 44.51
Vehicle		1955.73 \pm 395.75	3654.68 \pm 468.84	1251.75 \pm 176.73	179.10 \pm 72.65	303.10 \pm 38.33	185.37 \pm 42.32
Tel 10		492.21 \pm 160.43*	492.21 \pm 160.43*	375.30 \pm 118.09*	191.22 \pm 68.30	419.21 \pm 76.53*	127.87 \pm 14.66*
Gal 0.2		2227.73 \pm 246.44	2227.73 \pm 246.44*	723.06 \pm 256.47*	281.99 \pm 48.95*	464.60 \pm 43.07*	154.15 \pm 42.58
DZP 0.25		1984.68 \pm 168.63	5029.35 \pm 439.36*	1070.73 \pm 374.11	190.88 \pm 53.73	458.16 \pm 45.86*	125.05 \pm 16.06*
Oba-EtOAc 25		1191.30 \pm 85.65*	3003.22 \pm 238.41*	1015.78 \pm 147.90	157.91 \pm 41.65	410.02 \pm 60.08*	111.64 \pm 29.57*
Ose-EtOAc 25		1416.37 \pm 167.23*	1416.37 \pm 167.23*	653.62 \pm 91.79*	278.99 \pm 73.09*	541.10 \pm 79.78*	72.85 \pm 16.16*
Left kidney		Untreated	262.73 \pm 43.73*	1829.48 \pm 122.55*	171.84 \pm 33.62*	71.40 \pm 15.96	254.29 \pm 63.19
	Vehicle	2081.06 \pm 301.41	3753.63 \pm 702.05	1703.19 \pm 85.83	92.47 \pm 25.69	282.32 \pm 29.03	323.92 \pm 52.04
	Tel 10	570.43 \pm 90.06*	2664.81 \pm 377.45*	492.62 \pm 171.59*	292.32 \pm 46.99*	490.49 \pm 72.66*	95.29 \pm 13.17*
	Gal 0.2	1710.29 \pm 176.82*	4058.40 \pm 417.84	676.64 \pm 55.69*	273.95 \pm 48.43*	408.12 \pm 39.56	155.23 \pm 17.28*
	DZP 0.25	1327.03 \pm 167.76*	3924.26 \pm 242.17	1430.43 \pm 201.89*	227.52 \pm 47.50*	455.42 \pm 46.06*	177.44 \pm 34.86*
	Oba-EtOAc 25	1807.78 \pm 195.49*	3653.14 \pm 432.73	1610.02 \pm 239.06	348.92 \pm 105.27*	609.21 \pm 174.57*	94.92 \pm 30.05*
	Ose-EtOAc 25	1781.64 \pm 262.13*	2921.56 \pm 487.79*	734.12 \pm 137.27*	192.98 \pm 48.84*	617.41 \pm 156.31*	64.37 \pm 13.56*

The concentration of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4) and chemokine (MCP-1) is expressed in pg/mg of protein modulator effect. * p < 0.05 (F = 1.91) in comparison with Vehicle by ANOVA post-test Tuckey. Values are means \pm S.D. (n = 8). Tel, telmisartan; Gal, galantamine; Dzp, diazepam; Oba-EtOAc; Ose-EtOAc.

Table 5. Effect of the Dose Response Curve of RA on the Tissue Levels of Cytokines of Widely Vascularized Organs

Organ	Treatment (mg/kg)	TNF- α (pg/mg prot)	IL-1 β (pg/mg prot)	IL-6 (pg/mg prot)	IL-10 (pg/mg prot)	IL-4 (pg/mg prot)	MCP-1 (pg/mg prot)
Brain	Untreated	110.70 \pm 39.60*	510.94 \pm 47.25*	62.29 \pm 16.20*	84.96 \pm 18.50	134.33 \pm 22.15*	41.28 \pm 5.65*
	Vehicle	588.69 \pm 65.36	697.38 \pm 108.78	214.51 \pm 83.80	81.92 \pm 24.33	199.27 \pm 54.92	99.73 \pm 31.78
	RA 0.39	156.98 \pm 23.66*	366.38 \pm 40.94*	139.64 \pm 16.86*	58.39 \pm 12.44	142.16 \pm 5.37*	106.54 \pm 17.36
	RA 0.78	158.92 \pm 27.95*	643.40 \pm 61.43	141.00 \pm 19.31*	68.66 \pm 2.15	200.47 \pm 28.23	110.67 \pm 23.39
	RA 1.52	314.48 \pm 16.67*	631.57 \pm 34.89	152.63 \pm 8.49*	76.22 \pm 7.22	111.73 \pm 10.56*	91.93 \pm 3.09
	RA 3.12	390.22 \pm 26.26*	751.66 \pm 54.02	165.50 \pm 15.44	81.14 \pm 10.34	104.21 \pm 3.33*	89.40 \pm 18.05
	RA 6.24	581.70 \pm 85.10	1011.22 \pm 84.84*	175.53 \pm 22.14	125.10 \pm 45.20*	114.26 \pm 12.83*	78.28 \pm 15.96
	Right kidney	Untreated	114.53 \pm 49.71*	556.93 \pm 98.25*	217.41 \pm 86.41	113.73 \pm 22.74	345.25 \pm 44.51
Vehicle		1955.73 \pm 395.75	3654.68 \pm 468.84	1251.75 \pm 176.73	179.10 \pm 72.65	303.10 \pm 38.33	185.37 \pm 42.32
RA 0.39		1268.18 \pm 75.94*	2767.86 \pm 100.92*	768.28 \pm 51.84*	142.15 \pm 14.83	434.16 \pm 34.78*	128.55 \pm 11.95*
RA 0.78		1461.72 \pm 74.45*	3276.73 \pm 119.02*	860.88 \pm 30.83*	184.76 \pm 13.45	487.60 \pm 27.09*	122.12 \pm 19.95*
RA 1.52		1645.24 \pm 91.84*	3453.32 \pm 245.02	983.71 \pm 73.59	219.70 \pm 39.54	433.70 \pm 15.01*	111.70 \pm 35.07*
RA 3.12		1818.45 \pm 153.33	3625.40 \pm 287.50	1161.72 \pm 74.38	292.45 \pm 19.16*	374.53 \pm 15.11	98.15 \pm 9.02*
RA 6.24		2044.74 \pm 147.87	3305.71 \pm 217.31	1148.60 \pm 92.92	301.27 \pm 26.80*	385.28 \pm 43.45*	76.27 \pm 22.28*
Left kidney		Untreated	262.73 \pm 43.73*	1829.48 \pm 122.55	171.84 \pm 33.62*	71.40 \pm 15.96	254.29 \pm 63.19
	Vehicle	2081.06 \pm 301.41	3753.63 \pm 702.05	1703.19 \pm 85.83	92.47 \pm 25.69	282.32 \pm 29.03	323.92 \pm 52.04
	RA 0.39	1142.82 \pm 72.12*	2306.54 \pm 217.50*	927.37 \pm 55.43*	270.34 \pm 14.97*	403.06 \pm 23.11*	249.38 \pm 35.28*
	RA 0.78	1406.60 \pm 96.62*	2862.79 \pm 188.74*	984.02 \pm 101.88*	310.11 \pm 11.07*	483.24 \pm 43.25	141.32 \pm 13.08*
	RA 1.52	1642.00 \pm 108.50*	3258.38 \pm 183.20	1119.69 \pm 135.22*	317.32 \pm 38.20*	413.37 \pm 15.22	115.70 \pm 21.76*
	RA 3.12	1833.37 \pm 87.26	3533.09 \pm 145.19	1282.89 \pm 220.74*	317.34 \pm 36.14*	398.79 \pm 32.94	85.47 \pm 20.35*
	RA 6.24	1816.60 \pm 113.02	3463.46 \pm 255.71	1411.30 \pm 104.60*	354.02 \pm 17.62*	355.00 \pm 14.59	78.09 \pm 25.37*

The concentration of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4) and chemokine (MCP-1) is expressed in pg/mg of protein. * p < 0.05 (F = 1.91) in comparison with Vehicle by ANOVA post-test Tuckey. Values are means \pm S.D. (n = 8). RA (0.39–6.24mg/kg).

ticular, two systems are mobilized under stress: the fast-acting sympathetic nervous system, and the slow HPA axis. Sympathetic nervous-system responses include the release of the catecholamines adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla. Activation of the HPA axis leads, *via* intermediate

steps, to the release of glucocorticoids (mainly cortisol in humans, and of corticosterone in rodents) from the adrenal cortex.³⁸⁾

There is a role of brain AGII, and in particular, of its rAT1 in the regulation of the response to stress. rAT1 are concen-

trated throughout the HPA axis and in higher centers, controlling the response of the HPA axis to stress.¹¹⁾ The resulting stimulation of the brain regions and pituitary AGII systems activates the HPA axis, enhances the formation and release of corticotropin-releasing hormone (CRH), increases the release of the pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and increases the formation and release of adrenal corticosterone.^{11,39–41)}

Therefore, many extracts of *O. basilicum*, *O. selloi*, and all doses of RA were able to antagonize the anxiogenic effect caused by the chronic administration of AGII within a context of arterial hypertension. The evidence was obtained by the increase of the time of permanence and the number of EOA in the EPM. The dose–response curve of the RA generated the pharmacological constants of $E_{\max} = 63.69\%$; $ED_{50} = 0.23 \text{ mg/kg}$, for EOA; and for TOA: $E_{\max} = 59.17\%$; $ED_{50} = 0.15 \text{ mg/kg}$. The trend that reveals the behavior of the values represent an inverse U-shaped dose–response curve for anxiolytic-like effects. This dose–response curve is usually explained by the actions of drug on different systems (stimulant, depressant) with different thresholds of sensitivity to those drugs.⁴²⁾

In the published report of Pereira *et al.*, the authors administered RA doses of 1, 2, 4, and 8 mg/kg and the animals were exposed to different behavioral models, among these the following: EPM, step-down inhibitory avoidance (memory), and open field task in rats. These authors observed an increase in EOA at doses of 2 and 4 mg/kg i.p. of RA, without affecting short-term-memory and long-term-memory retention in the inhibitory avoidance task. RA at 8 mg/kg induced an increase in anxiety and locomotor activity in rats.⁴²⁾ In this work, we utilized doses lower than 8 mg/kg; thus, we did not observe the anxiogenic effect of the RA in the EPM and open field tests. It is noteworthy that only the *O. selloi* extract with RA at 0.39, 0.78, 3.52, and 6.24 mg/kg counteracted the depressant effect of the locomotor system of the AGII in the OFT.

Although the majority of studies have focused on the effects of stress before learning, after learning, or before memory testing, there is recent evidence that stress can also influence subsequent memory if it is presented after retrieval, thus suggesting that stress also affects the reconsolidation and/or extinction processes.^{38,43,44)} Conditions with chronically elevated glucocorticoid levels are usually associated with impaired cognitive performance, and these deficits are thought to result from a cumulative and long-lasting burden on hippocampal function and morphology.^{45–47)}

In this work, we observed that, when administering AGII i.p. for 12 weeks, the serum concentration of corticosterone was increased to $997.69 \pm 46.53 \text{ pg/mL}$. By contrasting these results with the assessment of learning ability in WMM, an increase in latency and a decrease in the number of crossings over the area of the platform, indicating impaired learning and/or memory, are observed.

When the experimental treatments were administered based on the extracts of *O. basilicum* and *O. selloi*, this harmful effect of AGII is counteracted, that is, latency-time arrival at the platform decreased and the number of crossings on the submerged platform increased. When the doses of 0.39, 0.78, and 3.12 of RA were administered, both parameters were modified.

In the work reported by Hasanein and Mahtaj, adminis-

tration of RA at 8 mg/kg *p.o.* for 7d, did not alter cognitive function in control and scopolamine-treated groups exposed to the passive avoidance model. The combination of anticholinesterase, neuroprotective, and antioxidant properties of RA may be responsible for the observed effects.⁴⁸⁾ In another work, the authors suggested that RA exerts a cognitive-enhancing effect that may be mediated by the inhibition of prolyl oligopeptidase (POP), which is involved in memory-related function.⁴⁹⁾

Antianxiety treatment is effective in lowering blood pressure in patients with excessive hypertension.⁵⁰⁾ The clinical use of benzodiazepines is limited by the development of tolerance to their pharmacological effects.⁵¹⁾

AGII is primarily involved in the inflammatory process by modulating cytokine release and proinflammatory transcription factors such as NF- κ B.³⁾ Inflammation is well-documented as contributing to vascular remodeling and consequent hypertension. NF- κ B, a transcription factor, is known to partake in the pathology of hypertension. It induces endothelial-cell dysfunction, oxidative stress, and inflammation^{52,53)} through the release of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6.^{53,54)}

IL-1 is one of the most critical molecules involved in neuroendocrine and neurobehavioral stress responses. Many types of stressors induce the production of IL-1, both in the periphery and within the brain. The production of stress-induced IL-1 affects many physiological and behavioral systems, and one of the primary effects of stress-induced elevation in brain IL-1 is activation of the HPA axis.

Stress-induced IL-1-mediated secretion of glucocorticoids alters various neurobehavioral processes. In particular, IL-1 plays an important role in the stress-induced modulation of memory functioning. Specifically, low levels of brain IL-1 (which may be elicited by exposure to the stress associated with aversive learning paradigms) promote memory consolidation, whereas high levels of stress-induced IL-1, particularly in chronic situations, impair memory consolidation.⁴⁶⁾

Inflammation plays critical role in the pathogenesis of AGII-induced heart and renal injury,^{7,55)} and the anti-inflammatory effects of IL-10 have been shown to play a protective role in cardiovascular disease (CVD).^{5,56)}

Wang *et al.* demonstrated that cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, interferon gamma (IFN- γ), and transforming growth factor beta (TGF- β), are highly expressed in AGII-induced hypertension.⁵⁵⁾

The key inflammatory molecule in initiating vascular, cardiac, and renal inflammatory responses may be MCP-1, an important mediator of the activation and recruitment of monocytes into the vascular endothelium.^{6,57)}

For *O. basilicum*, there are reports of its antioxidant³⁰⁾ and anti-hypertensive²⁷⁾ effects. Such an antioxidant effect is generally attributed to the presence of RA and caffeic acid.³⁰⁾ In situations in which the possible mechanism is related to the modulation of the production of ROS, it could also be modulating the expression of NF- κ B, and consequently inhibiting the production of proinflammatory cytokines and chemokines.

For the case of *O. selloi*, since the RA is at a lower concentration, the modulating activity of the inflammation could be associated with unidentified compounds of the polyphenol type,⁵⁸⁾ and even some pigments such as chlorophylls.^{59,60)}

CONCLUSION

In addition to the control and prevention of arterial hypertension, the consequences of the latter continue to be one of the priority topics in the area of public health. Although there are treatments to control blood pressure, alternatives are still being sought, especially in the field of phytotherapy.

In the present study, we propose *O. basilicum* and *O. selloi*, and rosmarinic acid, which have shown an effect on the inflammatory response and its consequences in the state of response to stress.

Acknowledgments This work was partially supported by Fondo de Investigación en Salud-IMSS (FIS/IMSS/PROT/PRIO/14/029); Alegría-Herrera-E is grateful for the fellowship from CONACyT 273527 and for the complementary support from IMSS 99185916.

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Iadecola C, Davisson RL. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab.*, **7**, 476–484 (2008).
- Wiesmann M, Zerbi V, Jansen D, Lütjohann D, Veltien A, Heerschap A, Kiliaan AJ. Hypertension, cerebrovascular impairment, and cognitive decline in aged A β PP/PS1 mice. *Theranostics*, **7**, 1277–1289 (2017).
- Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **15**, 152–158 (2006).
- Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: the pathophysiology of hypertension. *BMJ*, **322**, 912–916 (2001).
- Cambier L, Giani JF, Liu W, Ijichi T, Echavez AK, Valle J, Marbán E. Angiotensin II-induced end-organ damage in mice is attenuated by human exosomes and by an exosomal Y RNA Fragment. *Hypertension*, **72**, 370–380 (2018).
- Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage. A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension*, **33**, 212–218 (1999).
- Jia L, Li Y, Xiao C, Du J. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Front. Biosci.*, **17**, 221–231 (2012).
- Stein DJ, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Bruffaerts R, de Jonge P, Liu Z, Miguel Caldas-de-Almeida J, O'Neill S, Viana MC, Al-Hamzawi AO, Angermeyer MC, Benjet C, de Graaf R, Ferry F, Kovess-Masfety V, Levinson D, de Girolamo G, Florescu S, Hu C, Kawakami N, Maria Haro J, Piazza M, Posada-Villa J, Wojtyniak BJ, Xavier M, Lim CCW, Kessler RC, Scott KM. Associations between mental disorders and subsequent onset of hypertension. *Gen. Hosp. Psychiatry*, **36**, 142–149 (2014).
- Pan Y, Cai W, Cheng Q, Dong W, An T, Yan J. Association between anxiety and hypertension: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **11**, 1121–1130 (2015).
- Player MS, Peterson LE. Anxiety disorders, hypertension, and cardiovascular risk: a review. *Int. J. Psychiatry Med.*, **41**, 365–377 (2011).
- Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A, Macova M. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT 1 receptor antagonists. *Regul. Pept.*, **128**, 227–238 (2005).
- Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 406960 (2014).
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 850–853 (2006).
- Harrison DG, Guzik TJ, Lob H, Madhur M, Marvar PJ, Thabet S, Vinh A, Wevand C. Inflammation, immunity and hypertension. *Hypertension*, **57**, 132–140 (2011).
- Wagner-grau P. Pathophysiology of arterial hypertension. *An. Fac. med.*, **71**, (2010).
- Obisesan TO. Hypertension and cognitive Function. *Clin. Geriatr. Med.*, **25**, 259–288 (2009).
- Pandey AK, Singh P, Tripathi NN. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **4**, 682–694 (2014).
- Kiferle C, Lucchesini M, Mensuali-Sodi A, Maggini R, Raffaelli A, Pardossi A. Rosmarinic acid content in basil plants grown *in vitro* and in hydroponics. *Cent. Eur. J. Biol.*, **6**, 946–957 (2011).
- Franca CS, Menezes FS, Costa LCB, Niculau ES, Alves PB, Pinto JEB, Marçal RM. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. *Fitoterapia*, **79**, 569–573 (2008).
- Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J. Vis. Exp.*, **1088**, 1–4 (2008).
- Chioca LR, Ferro MM, Baretta IP, Oliveira SM, Silva CR, Ferreira J, Losso EM, Andreatini R. Anxiolytic like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *J. Ethnopharmacol.*, **147**, 412–418 (2013).
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, **175**, 43–50 (2006).
- Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J. Vis. Exp.*, **91**, 51785 (2014).
- Jiménez-Ferrer E, Hernández Badillo F, González-Cortazar M, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M. Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. *J. Ethnopharmacol.*, **130**, 340–346 (2010).
- Mazón Ramos P. Efectos metabólicos del tratamiento con antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*, **8**, E22–E29 (2008).
- Fathiazad F, Matlobi A, Khorrami A, Hamedevazdan S, Sorava H, Hammami M, Maleki-Dizaji N, Garjani A. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Daru.*, **20**, 87 (2012).
- Umar A, Imam G, Yimin W, Kerim P, Tohti I, Berké B, Moore N. Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, **33**, 727–730 (2010).
- Amrani S, Harnafi H, Gadi D, Mekhfi H, Legssyer A, Aziz M, Martin-Nizard F, Bosca L. Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *J. Ethnopharmacol.*, **125**, 157–162 (2009).
- Anwar MA, Al Disi SS, Eid AH. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part II. *Front. Pharmacol.*, **7**, 50 (2016).
- Kaurinovic B, Popovic M, Vlasisavljevic S, Trivic S. Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Molecules*, **16**, 7401–7414 (2011).
- Li Q-L, Li B, Zhang Y, Gao X, Li C, Zhang G. Three angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Rabdosia coetsa*. *Phytomedicine*, **15**, 386–388 (2008).
- Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **58**, 514–521 (2011).

- 33) Ersoy S, Orhan I, Turan NN, Sahan G, Ark M, Tosun F. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine*, **15**, 1087–1092 (2008).
- 34) Luan H, Kan Z, Xu Y, Lv C, Jiang W. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: Relation to inflammation response. *J. Neuroinflammation*, **10**, 28 (2013).
- 35) Iwashita M, Sakoda H, Kushiyama A, Fujihiro M, Ohno H, Nakatsu Y, Fukushima T, Kumamoto S, Tsuchiya Y, Kikuchi T, Kurihara H, Akazawa H, Komuro I, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan, independently of ATI receptor or PPAR γ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **302**, E286–E296 (2012).
- 36) Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KRR, Nemeroff CB, Bremner JD, Carney RM, Coyne JC, DeLong MR, Frasurre-smith N, Glassman AH, Gold PW, Grant I, Gwyther L, Ironson G, Johnson RL, Kanner AM, Katon WJ, Kaufmann PG, Keefe FJ, Ketter T, Laughren TP, Leserman J, Lyketos CG, McDonald WM, Mcewen BS, Miller AH, Musselman D, O'Connor C, Petitto JM, Pollock BG, Robinson RG, Roose SP, Rowland J, Sheline Y, Sheps DS, Simon G, Spiegel D, Stunkard A, Sunderland T, Tibbits P, Valvo WJ. Mood disorders in the medically ill : scientific review and recommendations. *Biol. Psychiatry*, **58**, 175–189 (2005).
- 37) Kaplan MS, Nunes A. The psychosocial determinants of hypertension. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **13**, 52–59 (2003).
- 38) Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS. Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **36**, 1740–1749 (2012).
- 39) Aguilera G, Young WS, Kiss A, Bathia A. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. *Neuroendocrinology*, **61**, 437–444 (1995).
- 40) Ganong WF, Murakami K. Role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **512** (1 The Hypothala), 176–186 (1987).
- 41) Raasch W, Wittmershaus C, Dendorfer A, Voges I, Pahlke F, Dödt C, Dominiak P, Jöhren O. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology*, **147**, 3539–3546 (2006).
- 42) Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum LFDS, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol. Res.*, **52**, 199–203 (2005).
- 43) Roozendaal B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **78**, 578–595 (2002).
- 44) Tatomir A, Micu C, Crivii C. The impact of stress and glucocorticoids on memory. *Clujul Med.*, **87**, 3–6 (2014).
- 45) de Quervain DJF, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front. Neuroendocrinol.*, **30**, 358–370 (2009).
- 46) Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front. Neuroendocrinol.*, **30**, 30–45 (2009).
- 47) Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.*, **25**, 181–213 (2011).
- 48) Hasanein P, Mahtaj AK. Ameliorative effect of rosmarinic acid on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Neurosci. Lett.*, **585**, 23–27 (2015).
- 49) Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*, **81**, 644–648 (2010).
- 50) Grossman E, Nadler M, Sharabi Y, Thaler M, Shachar A, Shamiss A. Antianxiety treatment in patients with excessive hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **18**, 1174–1177 (2005).
- 51) Ferreri MC, Gutierrez ML, Gravielle MC. Tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam is associated with different alterations of GABA-A receptors in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, **310**, 152–162 (2015).
- 52) Li XC, Zhuo JL. Nuclear factor-k B as a hormonal intracellular signaling molecule : focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **17**, 37–43 (2008).
- 53) Kang Y, Ma Y, Zheng J, Elks C, Sriramula S, Yang Z, Francis J. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **82**, 503–512 (2009).
- 54) Al Disi SS, Anwar MA, Eid AH. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. *Front. Pharmacol.*, **6**, 323 (2016).
- 55) Wang Y, Li Y, Wu Y, Jia L, Wang J, Xie B, Hui M, Du J. 5TNF- α and IL-1 β neutralization ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage in male mice. *Endocrinology*, **155**, 2677–2687 (2014).
- 56) Kwon W, Cha H, Heo J, Choi J, Jang B, Lee I, Park S. Interleukin-10 deficiency aggravates angiotensin II-induced cardiac remodeling in mice. *Life Sci.*, **146**, 214–221 (2016).
- 57) Zhuo JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator of angiotensin II-induced target damage in hvertensive heart disease? *J. Hypertens.*, **22**, 451–454 (2008).
- 58) Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7432797 (2016).
- 59) Lanfer-Marquez UM, Barros RMC, Sinnecker P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.*, **38**, 885–891 (2005).
- 60) Wangcharoen W, Phimphilai S. Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks. *J. Food Sci. Technol.*, **53**, 4135–4140 (2016).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00086

Matrícula: 2153804330

Efecto de *Ocimum basilicum* y *Ocimum selloi* sobre el daño vascular cerebral en un modelo de hipertensión arterial crónica.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 21 del mes de febrero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. RUBEN ROMAN RAMOS
- DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ
- DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ELIAN YURITZI ALEGRIA HERRERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ELIAN YURITZI ALEGRIA HERRERA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

SECRETARIO

DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER