



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos metanólicos
obtenidos a partir de las hojas de *Crataegus rosei* y caracterización
química de algunos de sus metabolitos secundarios”

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

Q.F.B. Diana López Fitz

Dirigido por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Querétaro, Qro., a Noviembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas de *Crataegus rosei* y caracterización química de algunos de sus metabolitos secundarios”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestría en ciencias químico biológicas

Presenta

Q.F.B. Diana López Fitz

Dirigida por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado
Secretario

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Vocal

Dr. José Alejandro García Arredondo
Suplente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019
México

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Reina Fitz Alquicira por tus consejos, atención y apoyo incondicional. Porque siempre me inculcaste el hábito del estudio. Tú eres mi mayor inspiración y el motivo de mí existir, gracias a ti por este logro que hoy es tuyo.

A mi padre Florenciano López Ayala por los consejos que me diste, porque gracias a ti me formé con carácter, actitud, responsabilidad y dedicación al estudio. Gracias a ti estoy en el lugar adecuado y esta meta también es tuya.

A mi hermana Nadia López Fitz por el apoyo y motivación que me diste. Gracias por ser mi ejemplo a seguir.

A mi fiel amigo y adoración Mafiz, gracias por la compañía que me diste durante las noches de estudio, por haber llenado mi vida de felicidad y apoyo incondicional sin recibir nada a cambio, gracias por las bienvenidas tan alegres que me dabas al llegar a casa. Siempre tendré presente todo lo que lograste en mí y vivirás por siempre en mi corazón.

A la Q.F.B Mariela Gonzalez Alcauter por la compañía, apoyo, consejos, sabiduría, alegrías que me diste durante este tiempo. Gracias por haberme compartido tu tiempo y tu amistad sin recibir nada a cambio. Gracias por enseñarme a no rendirme y que el querer es poder.

Al Dr. Moustapha Bah por confiar en mí, por su apoyo, dedicación y por compartir conmigo sus conocimientos. Gracias por ser mi guía, estoy infinitamente agradecida por todo lo que hizo por mí.

Al M.C Eloy Rodríguez de León por tus enseñanzas, paciencia y tu apoyo incondicional para lograr este proyecto. Te lo agradeceré infinitamente.

A mis amigos del laboratorio Arlette, Odette, Rebeca, Lorena, Karen y Donaldo gracias por su amistad, acompañamiento y el apoyo durante este proyecto.

Al consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios de la maestría.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría-UAQ (FOPER-2019-01080), por elegir apoyar financieramente este proyecto.

RESUMEN

Las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo y tienen una gran importancia en la medicina moderna. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas. Entre las enfermedades atendidas de manera tradicional, se encuentran las cardiovasculares, las cuales se han convertido hoy en día en una epidemia en los países de bajos y medianos ingresos, incluyendo México. Aunque existen medicamentos manufacturados para controlar dichas enfermedades, no todos los pacientes tienen acceso a ellos, además de que algunos producen efectos secundarios de consideración. Las plantas medicinales, que son más accesibles, constituyen una alternativa. Entre las que se usan para ese tipo de padecimiento, destacan las pertenecientes al género *Crataegus*, 15 de las cuales se encuentran en México. De plantas del género, existen extractos estandarizados elaborados en otros países, que se comercializan en forma de fitomedicamentos, cuyos efectos benéficos e inocuidad han sido comprobados. Debido al uso tradicional, se asume que la especie mexicana *Crataegus rosei* tiene metabolitos secundarios con efecto vasorrelajante, y por lo tanto, con potencial hipotensor. La presente propuesta consistió en evaluar la actividad vasorrelajante del extracto metanólico de una muestra de las hojas de *C. rosei* recolectada en Guanajuato y posteriormente caracterizar químicamente algunos de sus principios vasorrelajantes. Para la evaluación farmacológica, se utilizó el ensayo de aorta aislada de rata y para la parte química, se siguieron los métodos fitoquímicos convencionales, los cuales incluyeron tres de las cromatografías y la Resonancia Magnética Nuclear. El extracto metanólico obtenido (EM) de las hojas fue sometido a dos procedimientos de fraccionamiento primario, los cuales proporcionaron por una parte un extracto libre de grasas, clorofilas y taninos (EMLGT), y por otra, la porción de taninos. El extracto original sin fraccionamiento previo produjo *per se* una vasorrelajación significativa de la aorta, con una CE_{50} de 55.49 [intervalo de confianza: 37.31 a 82.52] $\mu\text{g/mL}$ y un efecto máximo (E_{max}) de $78.01 \pm 3.03\%$ de relajación, con una potencia 6 veces menor que la de la ACh utilizada como control positivo [$CE_{50} = 8.6$ (7.22 a 10.49) $\mu\text{g/mL}$; $E_{\text{max}} = 69.50 \pm 5.75\%$], mientras que el EMLGT relajó la aorta con una CE_{50} de 7.2 [3.03 a 17.14] $\mu\text{g/mL}$, una potencia similar a la de la ACh ($E_{\text{max}} = 66.95 \pm 6.59\%$). Los estudios químicos condujeron al aislamiento y a la caracterización estructural de cuatro ácidos triterpénicos: el ursólico, el euscápico (también conocido como euscáfico), el 3-epicorosólico y el maslínico, cuyas actividades vasorrelajantes (excepto para el epicorosólico) habían sido efectivamente reportadas por otros autores. Estos compuestos han de contribuir de manera significativa al efecto hipotensor que se atribuye a las hojas de esta planta.

ABSTRACT

Medicinal plants are important resources in the health systems of the developing countries and are of great importance in modern medicine. The World Health Organization has estimated that more than 80% of the world's population routinely use traditional medicine to meet their primary health care needs and that much of traditional treatments involve the use of plant extracts. Cardiovascular diseases, that have reached an epidemic level in low- and middle-income countries, including Mexico, are among those most commonly treated by medicinal plants. Although there are conventional drugs to control these diseases, not all patients can provide themselves with these drugs, and some produce considerable side effects. Medicinal plants, which are more accessible, represent the other alternative. Among those used for this type of conditions are species belonging to the genus *Crataegus*, 15 of which are found in Mexico. In fact, from plants of the genus, there are commercial standardized extracts from other countries, which are marketed in the form of phytomedicines, whose beneficial effects and safety have been proven. Due to traditional uses, it is assumed that the Mexican *Crataegus rosei* has secondary metabolites which possess relaxing effect and therefore hypotensive potential. The current project aimed to assess the vasorelaxant activity of the methanol extract of a sample of *C. rosei* leaves collected in Guanajuato and subsequently chemically characterize some of its active principles. For the pharmacological evaluation, the isolated rat aorta assay was used and for the chemical study, conventional phytochemical methods were followed, which included chromatography techniques and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). The methanol extract obtained (EM) from the leaves was subjected to two primary fractionation procedures, which provided, on one hand, a chlorophylls and fats-free extract (EMLGT), and on the other, tannins. The original extract without prior fractionation produced *per se* a significant vasorelaxing effect on the aorta, with an CE_{50} de 55.49 [confidence interval: 37.31 to 82.52] $\mu\text{g/mL}$ and $E_{\text{max}} = 78.01 \pm 3.03\%$, that was 6 times less potent than that of ACh, which was used as positive control [$CE_{50} = 8.6$ (7.22 to 10.49) $\mu\text{g/mL}$ and $E_{\text{max}} = 69.50 \pm 5.75\%$], while the EMLGT relaxed the aorta with an $EC_{50} = 7.2$ [3.03 to 17.14] $\mu\text{g/ml}$ and $E_{\text{max}} = 66.95 \pm 6.59\%$, with a similar potency than that of ACh. The chemical studies led to the isolation and structural characterization of four triterpene acids [ursolic, euscaphic (also known as euscaphic), 3-epicorosolic and maslinic], whose vasorelaxant activities (except for epicorosolic acid) had previously been confirmed by other authors. So these compounds contribute significantly to the hypotensive effect attributed to the leaves of this plant species.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Enfermedades cardiovasculares.....	3
2.1.1 Definición y epidemiología.....	3
2.1.2 Factores de riesgo.....	3
2.1.3 Principales enfermedades cardiovasculares.....	5
2.1.3.1 Hipertensión arterial sistémica.....	5
2.1.3.2 Cardiopatía isquémica.....	5
2.1.3.3 Aterosclerosis.....	6
2.1.3.4 Angina de pecho.....	6
2.1.3.5 Insuficiencia cardíaca.....	6
2.1.3.6 Infarto al miocardio.....	7
2.2. Estructura y función de los vasos sanguíneos.....	7
2.2.1 Endotelio.....	9
2.2.1.1 Factores constrictores derivados del endotelio.....	9
2.2.1.1.1 Endotelina-1.....	9
2.2.1.1.2 Angiotensina II.....	10
2.2.1.2 Factores relajantes derivados del endotelio (FRDE).....	11
2.2.1.2.1 Prostaciclina (PGI ₂).....	12
2.2.1.2.2 El sulfuro de hidrógeno (H ₂ S).....	12
2.2.1.2.3. Óxido nítrico (NO).....	13
2.3 Género <i>Crataegus</i>	14
2.3.1 Taxonomía del género <i>Crataegus</i>	14
2.3.2 Distribución geográfica del género <i>Crataegus</i>	15
2.3.3 Descripción botánica del género <i>Crataegus</i>	17
2.3.4 Composición química del género <i>Crataegus</i>	17
2.3.4.1 Procianidinas oligoméricas.....	18
2.3.4.2 Flavonoides descritos en el género <i>Crataegus</i>	19
2.3.4.3 Terpenos identificados en el género <i>Crataegus</i>	22
2.3.4.4 Azúcares y alcoholes derivados de azúcares identificados en <i>Crataegus</i>	22
2.3.5 Efectos farmacológicos del género <i>Crataegus</i>	23
2.3.5.1 Efectos farmacológicos de algunos compuestos del género.....	24
2.3.6 Extractos estandarizados del género <i>Crataegus</i>	25
2.3.6.1 Extracto estandarizado LI 132.....	26
2.3.6.2 Extracto estandarizado WS 1442.....	26
2.3.6.3 Mecanismos farmacológicos del extracto ws1442.....	27

3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1 Recolección y conservación del material vegetal.....	32
6.2 Obtención de extractos de las hojas secas.....	32
6.3 Evaluación de la actividad vasorrelajante <i>ex vivo</i>	32
6.3.1 Análisis estadístico.....	34
6.4 Estudio químico del extracto.....	34
6.4.1 Cromatografía en columna abierta (CC).....	34
6.4.2 Análisis cromatográfico en capa fina (CCF).....	34
6.4.3 Purificación de compuestos por medio de CCF preparativa (CCFP).....	35
6.4.4 Purificación de compuestos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	35
6.4.5 Identificación de compuestos purificados.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1 Evaluación farmacológica de los extractos metanólicos.....	37
7.1.1 Evaluación de los efectos vasorrelajantes de los extractos metanólicos.....	37
7.1.2 Participación del endotelio en el efecto vasorrelajante del EMLGT.....	38
7.1.3 Determinación de la participación de la vía del NO/GMPc en el mecanismo vasorrelajante inducido por el extracto EMLGT.....	39
7.2 Estudios químicos.....	39
7.2.1 Rendimiento de los extractos.....	39
7.2.2 Fraccionamiento del EMLGT.....	40
7.2.3 Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF Uni - y bidimensionales.....	41
7.2.4 Purificación de los compuestos.....	43
7.2.4.1 Purificación de los compuestos de la fracción FCRD-199 mediante HPLC.....	43
7.2.4.2 Purificación de los compuestos de la fracción CRDF-257-290 mediante CCFP.....	43
7.2.5 Identificación de los compuestos purificados.....	46
7.2.5.1 Fracción ECGI.....	46
7.3.3 Identificación preliminar de los compuestos de la fracción ECRD-199.....	48
8. CONCLUSIONES.....	53
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERENCIAS.....	54
11. ANEXO.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Defunciones por enfermedades del corazón	4
2	Estructura de la pared arterial	8
3	Distribución en México de especies de <i>Crataegus</i>	16
4	Frutos de <i>Crataegus rosei</i>	17
5	Estructura de la procianidina trimérica de la (-)-epicatequina	19
6	Estructuras de algunas procianidinas reportadas en el género	20
7	Estructura de algunos flavonoides encontrados en el género <i>Crataegus</i>	21
8	Estructuras de los ácidos oleanólico y ursólico	22
9	Mecanismo molecular dual de protección de la barrera endotelial por el extracto WS 1442	29
10	Curvas concentración respuesta del efecto vasorrelajante de la ACh, el EM y el EMLGT	37
11	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el EMLGT sobre la aorta en presencia (E+) y en ausencia de endotelio (E-)	38
12	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el EMLGT en ausencia y en presencia de los inhibidores L-NAME y ODQ	39
13	Cromatogramas en capa fina de la fracción ECGI	41
14	Cromatograma en capa fina de la fracción ECGI (128) y de la fracción ECRF-199 (199)	42
15	Cromatograma en capa fina de la fracción CRDF-257-290.	43
16	Cromatograma HPLC de la fracción ECRD-199	44
17	Cromatograma en capa fina preparativa de la fracción CRDF-257-290	44
18	Cromatogramas en capa fina de las bandas aisladas de la fracción CRDF-257-290	45
19	Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (1)	47
20	Espectro de RMN de ¹ H del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (1)	47
21	Espectro de RMN de ¹³ C de la fracción ECRD-199	49
22	Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto ECRD-199-3 identificado como ácido euscápico (2)	51
23	Estructuras de los ácidos triterpénicos caracterizados en las hojas de <i>C. rosei</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores de E_{\max} (% relajación) y CE_{50} de los dos extractos metanólicos y de la acetilcolina	38
2	Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en columna del EMLGT y sus rendimientos	40
3	Rendimiento de las bandas raspadas de la CCFP de la fracción CRDF-257-290	45
4	Comparación de algunos δ_C (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 y los del ácido euscápico (2) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016)	49
5	Comparación de algunos δ_C (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 y los del ácido 3-epicorosólico (3) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016)	49
6	Comparación de algunos δ_C (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 con los del ácido maslínico (4) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016)	49

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional representa una extensa variedad de terapias y prácticas que son diferentes entre países y regiones. Es denominada también como medicina alternativa o complementaria por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018). Desde hace miles de años, la medicina tradicional ha contribuido ampliamente a la salud humana. Los productos naturales, entre ellos las plantas medicinales que constituyen parte importante de esta contribución, han mantenido su popularidad en todo el mundo. En los países industrializados, aproximadamente el 20% de las prescripciones médicas son en base a plantas, las cuales, de hecho, representan casi el 80% en la terapéutica en los países en desarrollo. Por ejemplo, la terapia de las enfermedades infecciosas se basa casi enteramente sobre los productos naturales (Newman y Cragg, 2016). Las plantas medicinales representan un área de gran utilidad como materia prima para la obtención de extractos o sustancias naturales puras. De esa forma, estas sustancias puras y los extractos estandarizados tienen gran relevancia para la terapéutica (Bermúdez y col., 2005). Aunque en cierto momento del siglo pasado hubo una explosión de sustancias sintéticas y su uso terapéutico, relegando a segundo plano los productos naturales, la medicina tradicional ha resurgido a partir de la década de 1990 en varios países desarrollados y en desarrollo, debido a múltiples factores. Por ejemplo, la mayor parte de la población de los países en desarrollo no tiene acceso a los medicamentos industrializados; esto justifica el amplio uso de las plantas medicinales en esos lugares, ya que en muchas ocasiones es el único recurso terapéutico disponible. De los recursos empleados en dicha medicina, las plantas medicinales se usan cada vez más. Otros factores que han incidido en el interés por los productos naturales incluyen las limitaciones en síntesis orgánica, sobre todo cuando se trata de generar compuestos con centros quirales específicos. Además, aunque algunos de los productos naturales han sido tóxicos, los efectos indeseables de compuestos sintéticos han sido más relevantes.

Desde épocas antiguas, en la medicina tradicional se han utilizado las hojas y las flores de plantas del género *Crataegus* para tratar afecciones relacionadas con la función cardíaca y nerviosa. También estos órganos vegetales han permitido regular la presión arterial, palpitaciones, irritabilidad y agotamiento. En el siglo I, Dioscórides nombra por primera vez a *Crataegus* como remedio cardiotónico y en el siglo XIX se documentó en el continente americano el uso de *Crataegus* para el tratamiento de distintas enfermedades del corazón, angina de pecho, para potenciar el efecto de *Digitalis*, o en casos de latidos cardíacos irregulares cuando *Digitalis* no es tolerado; también se indica su uso como preparación tónica para el corazón y para regular la circulación. Se menciona también para el tratamiento de arteriosclerosis y neurosis cardíaca de dispépticos. Hoy en día, en la Unión Europea, *Crataegus monogyna*, reconocida por su uso tradicional para aliviar síntomas de molestias cardíacas temporales como palpitaciones, latidos cardíacos adicionales percibidos debido a ansiedad leve y para el alivio de síntomas leves de trastorno mental, estrés y para ayudar a dormir (Abuashwashi y col., 2016).

El presente proyecto tuvo como meta contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de una muestra de las hojas de *Crataegus rosei* colectadas en el Estado de Guanajuato y corroborar si el extracto, y eventualmente alguno de los compuestos aislados, tienen efecto vasodilatador sobre la aorta aislada de rata pre-contraída, como potenciales agentes hipotensivos para pacientes con ese padecimiento, lo cual ayudaría mucho para evitar o aminorar las complicaciones cardiovasculares posteriores.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades cardiovasculares

2.1.1 Definición y epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares (EC) son un conjunto de alteraciones del corazón y de los vasos sanguíneos. En los últimos años, estas enfermedades han tenido un impacto significativo sobre la morbilidad y la mortalidad en diferentes partes del mundo. Según la OMS, las enfermedades cardiovasculares representan la causa principal de muerte a nivel mundial (OMS, 2015).

En México, estudios recientes del INEGI reportaron 703,047 defunciones en el año 2017, de las cuales las enfermedades cardiovasculares representaron la primera causa en nuestro país, correspondiendo a un total de 141,619 defunciones, lo cual representa un 20.1% a nivel nacional. Cabe mencionar que del total de estas muertes, 101,877 se debieron a enfermedades isquémicas, esto es un 71.9%, seguida por las hipertensivas con 23,215 casos (16.4%) y 15,763 defunciones se relacionan con problemas de la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón con un 11.1%, y por último, a la fiebre reumática aguda y enfermedades cardíacas reumáticas crónicas, les correspondió en conjunto el 0.6% con 764 defunciones (Figura 1) (INEGI, 2018).

2.1.2 Factores de riesgo

Las enfermedades cardiovasculares pueden ser ocasionadas por diversos factores, entre los que sobresalen la edad y el sexo como no modificables (Baena-Díez y col., 2005). Otros factores, pero que son modificables, incluyen la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y el tabaquismo (OMS, 2015). Por ejemplo, este último causa un efecto tóxico directo sobre el endotelio vascular, ya que provoca trastornos del metabolismo de los lípidos y estimula una respuesta inflamatoria por los macrófagos (Hernández-Escolar y col., 2010).

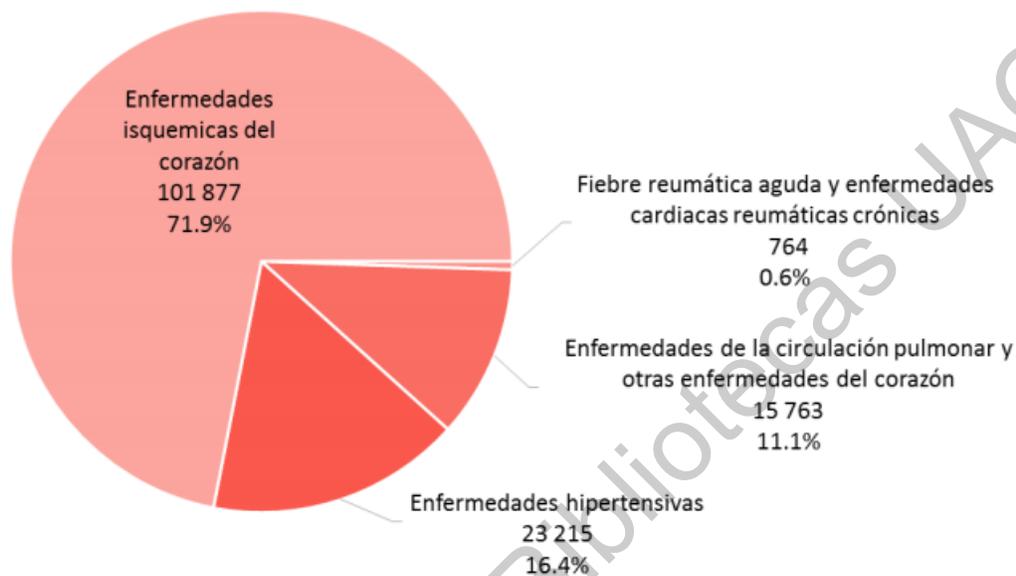


Figura 1. Defunciones por enfermedades del corazón (INEGI, 2018).

Otros factores que se relacionan con las enfermedades cardiovasculares son el sedentarismo, la ingesta elevada de grasas saturadas y grasas *trans*, así como consumo excesivo de sodio y alcohol (Hernández-Escolar y col., 2010). El término factores de riesgo cardiovasculares puede utilizarse en dos sentidos: el primero y más extenso, que engloba a aquellos factores que se cree benefician el desarrollo y aparición de lo que denominamos enfermedad cardiovascular; y el segundo que es aplicable exclusivamente a factores relacionados con cardiopatía coronaria. Según A. Jeremiah Stamler, a quien se le atribuye la primera mención del término de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) en 1948, cualquier condición relacionada que involucre un riesgo de presentar algunas de las patologías cardiovasculares más comunes es considerada como factor de riesgo cardiovascular (Ruiz-Jiménez, 2003).

2.1.3 Principales enfermedades cardiovasculares

2.1.3.1 Hipertensión arterial sistémica

La hipertensión también conocida como presión arterial alta, se define como la presión arterial sistólica mayor a 140 mm de mercurio (mm Hg) y una presión diastólica mayor a 90 mm Hg (Hackfort y Mishra, 2016).

La hipertensión desarrolla un estrés excesivo en la vasculatura (Hackfort y Mishra, 2016), lo cual representa uno de los principales factores de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular, cerebrovascular e insuficiencia renal, siendo éstas, importantes causas de muerte en México (Saturno-Chiu, 2017).

Existen factores como la edad, el tabaquismo, el estilo de vida sedentario, el alto consumo de sodio y grasas saturadas, presencia de enfermedades crónicas como diabetes, obesidad, dislipidemias, entre otras, que participan en la aparición de la hipertensión arterial (Franco-Diez, 2013).

2.1.3.2 Cardiopatía isquémica

La isquemia ocurre cuando el aporte de oxígeno es insuficiente debido al flujo sanguíneo inadecuado (Fox, 2014 y Moreu-Burgos y Macaya-Miguel, 2007). La aterosclerosis de las arterias coronarias es el origen más frecuente de isquemia miocárdica (Fox, 2014).

Existen dos tipos de isquemia miocárdica, la irreversible y la reversible. La irreversible presenta tres tipos de muerte celular: la necrosis, la apoptosis y la autofagia, mientras que en la reversible, la restauración de la función de las células cardiovasculares está determinada por factores como el restablecimiento temprano del flujo sanguíneo coronario y fenómenos de pre- y pos-acondicionamiento isquémico (Moreno y Portillo, 2016).

2.1.3.3 Aterosclerosis

El término aterosclerosis deriva del griego *athero*, que significa cera o engrudo, que representa el núcleo en la base de la placa aterosclerótica, y *sclerosis* que significa endurecimiento o induración, refiriéndose a la capa fibrosa de plaquetas en el borde luminal. A pesar de que aún no se ha definido una idea precisa de su definición, la explicación etimológica refiere una idea global del concepto de aterosclerosis. Aterosclerosis se define entonces como una enfermedad multifactorial crónica que daña al endotelio vascular de arterias de mediano y gran calibre, así como también áreas de ramificación, o como rúmen, es considerada una endotelio patía crónica inflamatoria y degenerativa (Saturno-Chiu, 2017). La prevalencia de esta enfermedad es igual en ambos sexos (Crawford y col., 2007).

2.1.3.4 Angina de pecho

La angina de pecho se define como un cuadro doloroso, que se produce por déficit de oxígeno y por el alto consumo del miocardio; esto se debe a la oclusión de una arteria coronaria o de una estenosis grave (Levine, 2014). La localización de la angina de pecho esternal o subesternal abarca todo el pecho y puede diseminarse hacia el cuello, epigastrio, mandíbula o brazos (Saturno-Chiu, 2017). En la cardiopatía isquémica, la angina de pecho es la expresión clínica más frecuente y la manifestación inicial de la enfermedad coronaria en aproximadamente 50% de los pacientes (Aguilar-Souto y González-Juanatey, 2010).

Los pacientes refieren al dolor como una opresión en el pecho o dolor torácico (Levine, 2014), utilizando los adjetivos asfixiante, apretado, ardoroso y pesado, ocasionalmente punzante variando con la posición y la respiración (Saturno-Chiu, 2017). El malestar puede encontrarse en una región del tamaño del puño o aún más extenso (Levine, 2014).

2.1.3.5 Insuficiencia cardiaca

La insuficiencia cardiaca se define como un síndrome clínico que abarca un conjunto de signos y síntomas secundarios a una alteración, ya sea orgánica hasta

funcional del corazón. Esto puede ser ocasionado por una disminución del gasto cardiaco o por aumento de la presión intracardiaca. Cabe mencionar que estas alteraciones pueden ocurrir inducidas por esfuerzo o hasta en mismo reposo. Este síndrome representa el estado final de algunas afecciones al corazón. La insuficiencia cardiaca consecuente presenta un alto riesgo de muerte, si no se corrige a tiempo (Saturno-Chiu, 2017).

2.1.3.6 Infarto al miocardio

El infarto agudo al miocardio se define como la existencia de áreas de necrosis cardiaca en la anatomía patológica, así como aumento en los niveles de las enzimas cardiacas, en especial la troponina. Esta enfermedad se produce por la rotura de una placa inestable y rica en lípidos, lo que conlleva a la formación de trombo que obstruye, ya sea total o parcialmente, la luz de la arteria coronaria, provocando un déficit de riego distal. Cabe mencionar que ésta es la forma más frecuente secundaria a aterosclerosis. Existen otras causas como disección coronaria y embolia coronaria. También existen causas extracardiacas que disminuyen el flujo coronario o ayudan a que se genere la trombosis como anemia de células falciformes, estados de hipercoagulabilidad, inhalación de monóxido de carbono, entre otros (Franco-Diez, 2013).

Dentro de las manifestaciones clínicas más importantes, destaca el dolor de tipo angor, pero prolongado, intenso y que sucede cuando el paciente se encuentra en reposo. Este tipo de síntoma no se controla con nitratos sublinguales. El infarto se presenta por la mañana, al levantarse. Sus síntomas incluyen dolor epigástrico, infarto de localización inferior, disnea o síncope, sin presentarse dolor torácico previo (Franco-Diez, 2013).

2.2 Estructura y función de los vasos sanguíneos

La principal función de los vasos sanguíneos es llevar la sangre rica en oxígeno y nutrientes desde el corazón hacia todos los tejidos y órganos. Otras funciones importantes son: la eliminación de dióxido de carbono y desechos

metabólicos, transmisión de señales hormonales e interacción del sistema inmune a los tejidos (Daneman y Prat, 2015).

La estructura de los vasos sanguíneos se compone de tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia (Seidemann y col., 2014) (Figura 2).

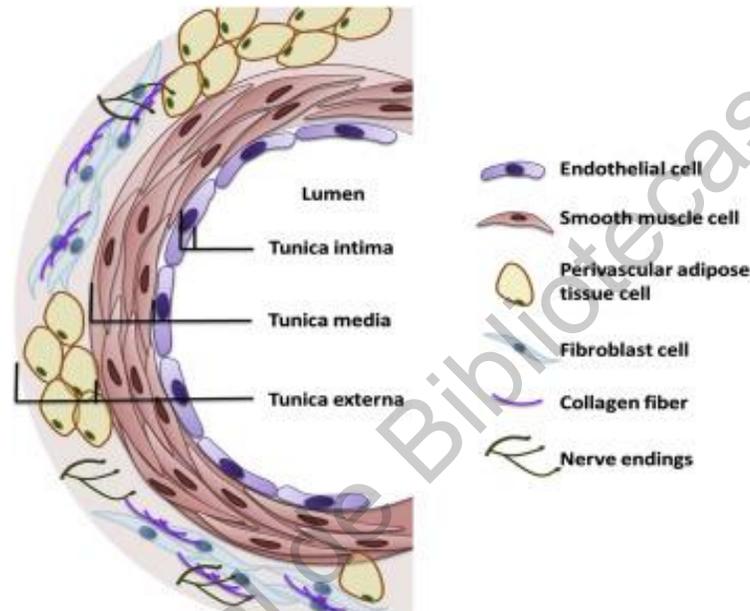


Figura 2. Estructura de la pared arterial (Zhao y col., 2015).

La túnica íntima o capa interna está constituida por una capa de células endoteliales (Seidemann y col., 2014). Estas células recubren el interior de los vasos sanguíneos y tienen un papel fundamental en la regulación del tono vascular. La túnica media está compuesta por fibras elásticas, las cuales son secretadas por las células del músculo liso y están distribuidas en arterias grandes conocidas como arterias elásticas. En caso de las arterias musculares, la túnica media está formada por células musculares lisas, con fibras elásticas diseminadas y fibras de colágeno (Carvajal-Carvajal, 2017). La túnica adventicia, también conocida como túnica externa, se compone de fibroblastos, nervios (Seidemann y col., 2014) y tejido adiposo perivascular. Estos componentes están relacionados con el desarrollo y

remodelación vascular, tráfico de células inflamatorias e intercambio de señales entre el vaso sanguíneo y el tejido en el que se encuentran (Zhao y col., 2015).

2.2.1 Endotelio

El endotelio está constituido por células que forman la superficie interna de los vasos sanguíneos, como capilares, venas y arterias (Pereira-Vatanabe y col., 2017; Carvajal-Carvajal, 2017). En un adulto, aproximadamente de 1 a 6×10^{13} células componen el endotelio, con un peso de alrededor de 1 kilogramo y cubriendo un área de 1 a 7 m² (Carvajal-Carvajal, 2017). Estas células separan la sangre de los tejidos y a su vez presentan amplias funciones como la regulación del flujo sanguíneo y la perfusión tisular a través de modificaciones en el diámetro y tono vascular (Carvajal-Carvajal, 2017). El endotelio cumple también una función en la regulación del tono vascular; esto lo hace mediante la liberación de agentes vasodilatadores y agentes vasoconstrictores (Basri y col., 2018). A continuación se mencionan algunos de estos agentes.

2.2.1.1 Factores constrictores derivados del endotelio

El endotelio produce los factores constrictores más poderosos de vasculatura, como son la endotelina 1 (ET-1) y la angiotensina II (Ang II) (Bernatova, 2014). Estos factores juegan un papel crucial en la patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares (Planes y col., 2019).

2.2.1.1.1 Endotelina-1

En el año 1988, se aisló por primera vez la endotelina (ET-1), la cual existe en tres isoformas: ET-1, ET-2 y ET-3 (Chen y col., 2019). La ET-1 es un péptido compuesto por 21 aminoácidos y usualmente es producida en el endotelio, pero también por células musculares lisas vasculares, cardiomiocitos, macrófagos, leucocitos y fibroblastos. La isoforma ET-1 es la más predominante y tiene mayor efecto vasoconstrictor (Finch y Conklin, 2016).

Existen 2 tipos de receptores de la ET-1: el receptor ET_A y ET_B. Estos dos receptores están acoplados a proteínas G. Se puede encontrar el receptor ET_A en células del músculo liso vascular y en cardiomiocitos, generando una respuesta contráctil mediante el aumento de calcio citosólico (Finch y Conklin, 2016). Este resultado se obtiene de la unión de la ET-1 con su receptor ET_A en el sarcolema de la célula del músculo liso vascular, activando la fosfolipasa C (PLC), lo cual activa a su vez la hidrólisis de los lípidos de inositol, produciendo dos segundos mensajeros: 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a su receptor en la superficie del retículo sarcoplasmático. Gracias a esta unión, se libera el calcio hacia el citosol, dando como resultado un aumento de calcio inicial y transitorio, que produce la activación de la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y de Rho-cinasa, que a su vez fosforila e inactiva la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP). Por lo tanto, el aumento de la actividad de MLCK y la disminución de la actividad de MLCP conducen a la vasoconstricción (Flores-Valdez, 2013; Cau, Evora y Tostes, 2018). Por su parte, el receptor ET_B se localiza en células endoteliales, epiteliales, endocrinas y nerviosas vasculares. Dicho receptor produce la liberación de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), a través de la estimulación de la vía AKT, ya que fosforila a la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Chen y col., 2019; Finch y Conklin, 2016). El receptor ET_B presenta un subtipo, el ET_{B2}, y aunque no se localiza en toda la vasculatura, produce vasoconstricción. Se dice que la ET-1 es el vasoconstrictor más potente y al unirse a ET_A, es 100 veces más potente, en comparación con la norepinefrina (Finch y Conklin, 2016).

2.2.1.1.2 Angiotensina II

La angiotensina II es un octapéptido del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y es un potente vasoconstrictor (Busse y col., 2017). Cumple grandes funciones en la fisiología cardiovascular, neurológica, renal y también está relacionada con el mantenimiento de la presión arterial, sensación de sed, respuestas al reflejo de barorreceptores, entre otros; sin embargo, conlleva algunas

fisiopatologías del sistema cardiovascular (Busse y col., 2017), como la hipertensión, la aterosclerosis (Sato y col., 2018), la hipertrofia cardíaca, la remodelación ventricular miocárdica y una elevación en la presión arterial (Bussard y Busse, 2018).

La renina, que se secreta en el aparato yuxtaglomerular del riñón, transforma el angiotensinógeno producido en el hígado, en angiotensina I (Ang I), la cual es convertida en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esto sucede en el endotelio de los pulmones, pero de igual forma también en el plasma, lecho vascular de riñones, corazón y cerebro (Bussard y Busse, 2018).

Se conocen cuatro tipos de receptores de angiotensina: AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄ (Sato y col., 2018). Cuando la Ang II se une a los receptores AT₁, produce vasoconstricción, inotropía y remodelación cardíaca, potenciación del sistema nervioso simpático, liberación de vasopresina y regulación del mecanismo de sed (Bussard y Busse, 2018). El mecanismo por el cual ocurre la vasoconstricción mediada por la angiotensina es el siguiente: el receptor AT₁, por medio de la Proteína G_q, activa la isoforma β de la fosfolipasa C (PLCβ), disparando la secuencia de inositol-trifosfato, calcio intracelular, unión calcio-calmodulina y activación de ATPasas y cinasas que median la respuesta celular. También cuando se activa la PLCβ y la fosfolipasa D, se induce la formación de diacilglicerol y la activación de la proteincinasa C. En células cromafines, ganglio simpático o miocardio, la angiotensina II produce despolarización y entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Flórez, 2014).

Por otro lado, la activación de los receptores AT₁ produce la estimulación de la fosfolipasa A₂ y libera eicosanoides. Por ejemplo en los tejidos suprarrenal, renal o hepático, el receptor de angiotensina II está acoplado negativamente a la adenilato ciclasa mediante una proteína G inhibidora (Gi), lo cual reduce la actividad de la proteincinasa A (Flórez, 2014).

2.2.1.2 Factores relajantes derivados del endotelio (FRDE)

En el endotelio, se liberan factores como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂), que son conocidos como factores relajantes derivados del endotelio (FRDE). De igual modo, se consideran los FRDE al sulfuro de hidrógeno y a los factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (Loh y col., 2018). Los FRDE son fundamentales para modular el tono vasomotor en microvasos y cabe mencionar que factores de hiperpolarización derivados del endotelio y el NO comparten la función de mantener la relajación vascular (Dunn y Das, 2017).

2.2.1.2.1 Prostaciclina (PGI₂)

Dentro de los factores relajantes del endotelio, la prostaciclina (PGI₂) fue la primera en ser descubierta (Bernatova, 2014). La PGI₂ también es conocida como prostaglandina I₂ (Loh y col., 2018) y algunas de sus funciones incluyen la vasodilatación, la inhibición de la agregación plaquetaria, la adhesión celular y gastroprotección (Pluchart y col., 2017).

La prostaciclina se sintetiza en el endotelio (Loh y col., 2018; Pluchart y col., 2017) a partir del ácido araquidónico (AA) que es liberado en el citosol; éste es convertido por la ciclooxigenasa en prostaglandina H₂ (PGH₂) y por último, la prostaciclina sintetasa cataliza la descomposición de PGH₂ a PGI₂. La prostaciclina se une al receptor IP y como este receptor está acoplado a la proteína G_s con subunidad α, la cual une trifosfato de guanosina (GTP) y estimula a la adenilato ciclasa (AC), que convierte el trifosfato de adenosina (ATP) en 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica (AMPc). Esta cadena de eventos activa la PKA, la cual produce un efecto vasodilatador (Loh y col., 2018).

2.2.1.2.2 El sulfuro de hidrógeno (H₂S)

Fue descubierto en el año de 1777 como un gas incoloro, con un olor característico a "huevo podrido". Se creía que era una sustancia tóxica que se encuentra en el gas de alcantarillado, gas de pantano y en la descarga volcánica (Hackfort y Mishra, 2016). A pesar de ello, logró ser reconocido por su importancia

citoprotectora y pleiotrópica que tiene en varios tejidos de mamíferos. El sulfuro de hidrógeno es sintetizado por algunas enzimas como la cistationina- γ -liasa (CSE), la cistationina- β -sintasa (CBS) y la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MT) con ayuda de la cisteína aminotransferasa (aspartato aminotransferasa) (Kram y col., 2013). Las enzimas cistationina- γ -liasa (CSE) y la cistationina- β -sintasa (CBS) se expresan en tejidos específicos. Por ejemplo, la CBS se localiza en el sistema nervioso y la CSE se localiza en diferentes tejidos vasculares y en el corazón (Wang, 2009).

La activación de los receptores de acetilcolina activa a su vez la enzima CSE dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Esta enzima promueve la síntesis de sulfuro de hidrógeno a partir de L-cisteína. El sulfuro de hidrógeno puede activar la ruta PI3K/Akt, lo que conduce a la fosforilación de la eNOS y al aumento de la actividad de eNOS. Por otro lado, el sulfuro de hidrógeno tiene efecto inhibitorio de fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), por lo tanto impide la degradación de GMPc. La elevación de los niveles de GMPc activa a su vez la PKG, provocando de esta forma la angiogénesis y la vasorrelajación dependiente de endotelio (Coletta y col., 2012). Todo esto expresa una relación de cooperación entre las dos vías (NO y H_2S).

2.2.1.2.3. Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es un gas soluble (Tousoulis y col., 2012). Existen cuatro isoenzimas, conocidas como óxido nítrico sintasas, que sintetizan el óxido nítrico. Éstas son las siguientes: la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS), la mitocondrial (mtNOS) y la endotelial (eNOS) (Bernatova, 2014).

La producción de óxido nítrico que se lleva a cabo en el endotelio ocurre con el aumento de la concentración de calcio en el citosol, lo cual favorece la formación del complejo calcio-calmodulina. Este complejo activa la enzima eNOS (Loh y col., 2018), convirtiendo L-arginina a óxido nítrico y L-citrulina (Pandolfi y De Filippis, 2007). Por otra parte, se puede activar la eNOS de manera independiente de calcio: las proteínas cinasas A (PKA) y proteína cinasa B (Akt) activan eNOS al fosforilar Ser1177 en respuesta a varios estímulos (Zhao y col., 2015).

El óxido nítrico originado del endotelio se difunde en las células del músculo liso vascular, activando la cascada de señalización de la guanilato ciclasa soluble (GCs) (Loh y col., 2018; Pandolfi y De Filippis, 2007), ya que se ha reportado que ésta es la receptora del óxido nítrico. Cuando se activa la GCs, se libera un segundo mensajero, el monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), el cual activa la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG); lo cual lleva a una disminución de calcio intracelular, produciendo vasorrelajación (Bernatova, 2014).

Algunas de las funciones del óxido nítrico son importantes en el sistema cardiovascular, como por ejemplo la supresión de la inflamación y de la adhesión celular en los macrovasos, la inhibición de la trombosis que favorece el flujo sanguíneo, la limitación de la vasoconstricción y la remodelación de la pared del vaso. En los microvasos y capilares, el óxido nítrico, acompañado de los factores de crecimiento, impulsa la angiogénesis (formación de nuevos vasos) (Ghimire y col., 2017). Además, el NO también realiza funciones en el sistema nervioso e inmunológico; por ejemplo, ayuda a regular la motilidad gastrointestinal y apoya a los mecanismos de defensa contra algunas infecciones y tumores (Zhao y col., 2015).

2.3 Género *Crataegus*

2.3.1 Taxonomía del género *Crataegus*

A la fecha, existen datos dispersos sobre el número de especies de *Crataegus* a nivel mundial. La dificultad de su identificación se debe en parte a la frecuente hibridación entre diferentes especies. Por esta razón, es particularmente notorio el cambio de nombre para la misma especie. Por ejemplo, *Crataegus pubescens* ha pasado a denominarse *C. mexicana* y, recientemente, se ha ido sosteniendo, sin que esté muy claro, que es la misma especie que hoy en día se conoce como *C. gracilior*. En México, la taxonomía de este género no está bien determinada, ya que solo se cuenta con dos estudios relacionados con la

identificación de las especies nativas, el primero del siglo XX descrito por Eggleston y el más reciente propuesto por Phipps. Sin embargo, todas comparten las especies de este género que se conocen en México con el nombre común de “tejocote” (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011), nombre que proviene del náhuatl “telt-xocotl”, que significa fruta agria salvaje o dura (García-Mateos y col., 2013). El número total de especies del género se ha estimado en 140 por algunos autores (Phipps y col., 2003), mientras que otros reportan hasta 300 especies (Tassell y col., 2010). De las existentes, se ha mencionado que 95 de ellas se localizan en el continente americano, de las cuales 15 se encuentran en México (López-Santiago y col., 2008).

2.3.2 Distribución geográfica del género *Crataegus*

Se ha descrito que las especies de *Crataegus* se encuentran en 20 estados de la República Mexicana, en altitudes que van de los 400 a los 3000 metros sobre el nivel del mar, en clima húmedo, semiseco y seco. Se localizan en las zonas montañosas de la Sierra Madre Oriental entre los estados de Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León hasta las zonas altas de Veracruz, la Sierra Madre Occidental que abarcaría desde la sierra de Durango en la frontera con Sinaloa hasta la sierra Tarahumara en Chihuahua y hasta el estado de Jalisco; en la Sierra Madre del Sur, se localizan en la Sierra de Oaxaca y los altos de Chiapas; en el Eje Neo-Volcánico que abarca desde las zonas altas de Veracruz en la frontera con Puebla hasta las zonas montañosas de Jalisco (Banderas-Tarabay y col., 2015) (Figura 3).



Figura 3. Distribución en México de especies de *Crataegus* (Banderas-Taray y col., 2015).

Con base en los estudios realizados en el año 1909 por Eggleston, en 1990 por Phipps y colaboradores, en 1997 por Phipps, en el 2000 por McVaugh y en el 2003 por Phipps y colaboradores, actualmente la taxonomía del género mexicano se clasifica en seis series: Serie *Parvifoliae*, Serie *Mexicanae*, Serie *Crus-galli*, Serie *Madrenses*, Serie *Greggianae*, Serie *Baroussanae*, de las cuales *Crataegus rosei* Eggleston pertenece a la serie *Crus-galli*, teniendo dos supespecies: *C. rosei* subespecie *parryana*, la cual se puede encontrar en Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León e Hidalgo y *C. rosei* subespecie *rosei* que presenta tres variedades botánicas: *C. rosei* subespecie *rosei* var. *rosei*, que se localiza en Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nayarit, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Tamaulipas, *C. rosei* subespecie *rosei* var. *mahindae* encontrada en San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas y por último, *C. rosei* subespecie *rosei* var. *amoena*, localizada en Coahuila y Nuevo León (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011).

2.3.3 Descripción botánica del género *Crataegus*

Se describe al género *Crataegus* como arbustos florecientes, carnosos o árboles pequeños que son originarios de regiones templadas del norte, las cuales engloban áreas de Norteamérica, Europa y Asia (Lund y col., 2017). La mayoría de las hojas de las especies de *Crataegus* miden de 15 mm a 5 cm de largo; son lisas, anchas u ovaladas y cuentan con bordes dentados de tres a siete lóbulos. Sus flores se desarrollan en racimos de 5 a 12, con rangos de color blanco a rosa o rosa a rojo. Las frutas, conocidas también como bayas de espino, son de color verde cuando brotan, sucesivamente se pintan de un color rojo brillante y después de un rojo intenso (Kumar y col., 2012).

La especie *rosei* se destaca por su extenso grupo endémico y variabilidad de todas las especies mesoamericanas de *Crataegus*. También tiene una enorme variación morfológica, principalmente en color, forma de la fruta y margen de la hoja, por lo tanto, existe una gran polémica sobre el grupo de esta especie. En 1909, Eggleston describe a *Crataegus rosei* como fruta roja, como se aprecia en la Figura 4 (Piedra-Malagón y col., 2016).



Figura 4. Frutos de *Crataegus rosei* (Piedra-Malagón y col., 2016).

2.3.4 Composición química del género *Crataegus*

Las hojas, frutas, raíces y ramitas de *Crataegus* contienen muchos nutrientes, incluyendo proteínas, grasas, fibra dietética, vitaminas y muchos

metabolitos secundarios con actividad biológica benéfica para los humanos (Zhao y col., 2017). En los estudios químicos de *Crataegus*, se ha demostrado el contenido químico de por lo menos 27 especies distintas y dos híbridos provenientes de Asia, Europa y Norteamérica. Se han identificado 49 flavonoides distintos, 5 ácidos hidroxicinámicos, 6 azúcares, 10 ácidos orgánicos o fenólicos, 26 terpenos y 56 componentes del aceite esencial (Edwards y col., 2012). Se ha sostenido que las flavonas se sintetizan como respuesta al estrés ambiental, así como defensa contra depredadores y patógenos (Zhao y col., 2017).

Los compuestos sintetizados por flores, hojas y bayas son fitoquímicamente parecidos, pero sólo son distintos en su proporción de flavonoides específicos y procianidinas presentes. Las flores contienen un elevado nivel de flavonoides, mientras que en las hojas se encuentran los más altos niveles de procianidinas oligoméricas (Tassell y col., 2010), siendo éstas últimas los constituyentes más importantes del género (Wang y col., 2013).

2.3.4.1 Procianidinas oligoméricas

En las plantas, se llevan a cabo reacciones de oxidación donde las catequinas y epicatequinas suelen participar para formar dímeros, trímeros y estructuras oligoméricas, nombradas procianidinas (Figura 5).

Como se observa, químicamente son macromoléculas formadas por la condensación de flavanonas [en esta Figura, la (-)-epicatequina], las cuales son ejemplos de la proantocianidina más grande y taninos condensados (Nabavi y col., 2015). Las proantocianidinas se pueden catalogar dependiendo de la unión de las unidades de flavan-3-ol.

Por ejemplo, si las unidades de flavan-3-ol se unen a través de $C4 \rightarrow C6$ y/o $C4 \rightarrow C8$, entonces catalogamos a las proantocianidinas de tipo B y las de tipo A, en las que los flavan-3-oles se unen en $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$ o $2\beta \rightarrow O \rightarrow 5$ (Hellenbrand y col., 2015).

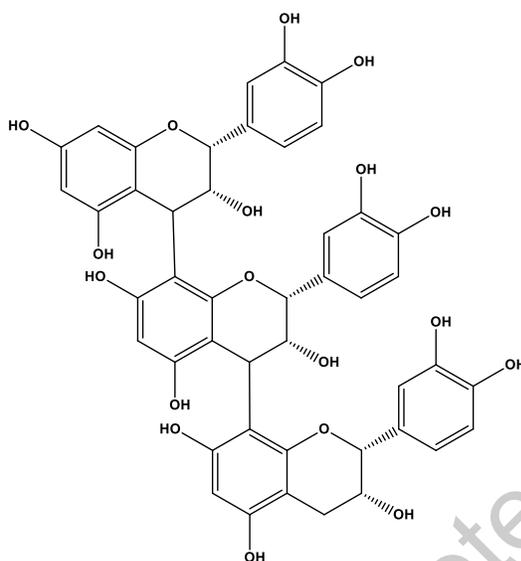


Figura 5. Estructura de una procianidina trimérica de la (-)-epicatequina (Wang y col., 2013).

Las procianidinas se pueden clasificar en oligoméricas y poliméricas. Las oligoméricas contienen en su estructura de 2 a 6 unidades de flavanol, mientras las poliméricas cuentan con más de 6 unidades de flavanol (Svedström y col., 2002). En algunas especies del género *Crataegus*, se aislaron y cuantificaron algunas procianidinas como los dímeros B2, B4 y B5, el trímero C1, el tetrámero D1 y el pentámero E1 (Figura 6). Estas procianidinas son ejemplos de proantocianidinas de tipo B (Svedström y col., 2002; Edwards y col., 2012 y Nabavi y col., 2015).

2.3.4.2 Flavonoides descritos en el género *Crataegus*

Los flavonoides son de gran importancia para los tejocotes, ya que les ayudan a proporcionar su pigmentación, los protegen contra los rayos solares y los agentes patógenos. Pero los flavonoides no son esenciales para la supervivencia del “tejocote”. Sus concentraciones dependen principalmente de factores ambientales, como el estrés hídrico, intensidad solar y el tipo de terreno (Banderas-Tarabay y col., 2015).

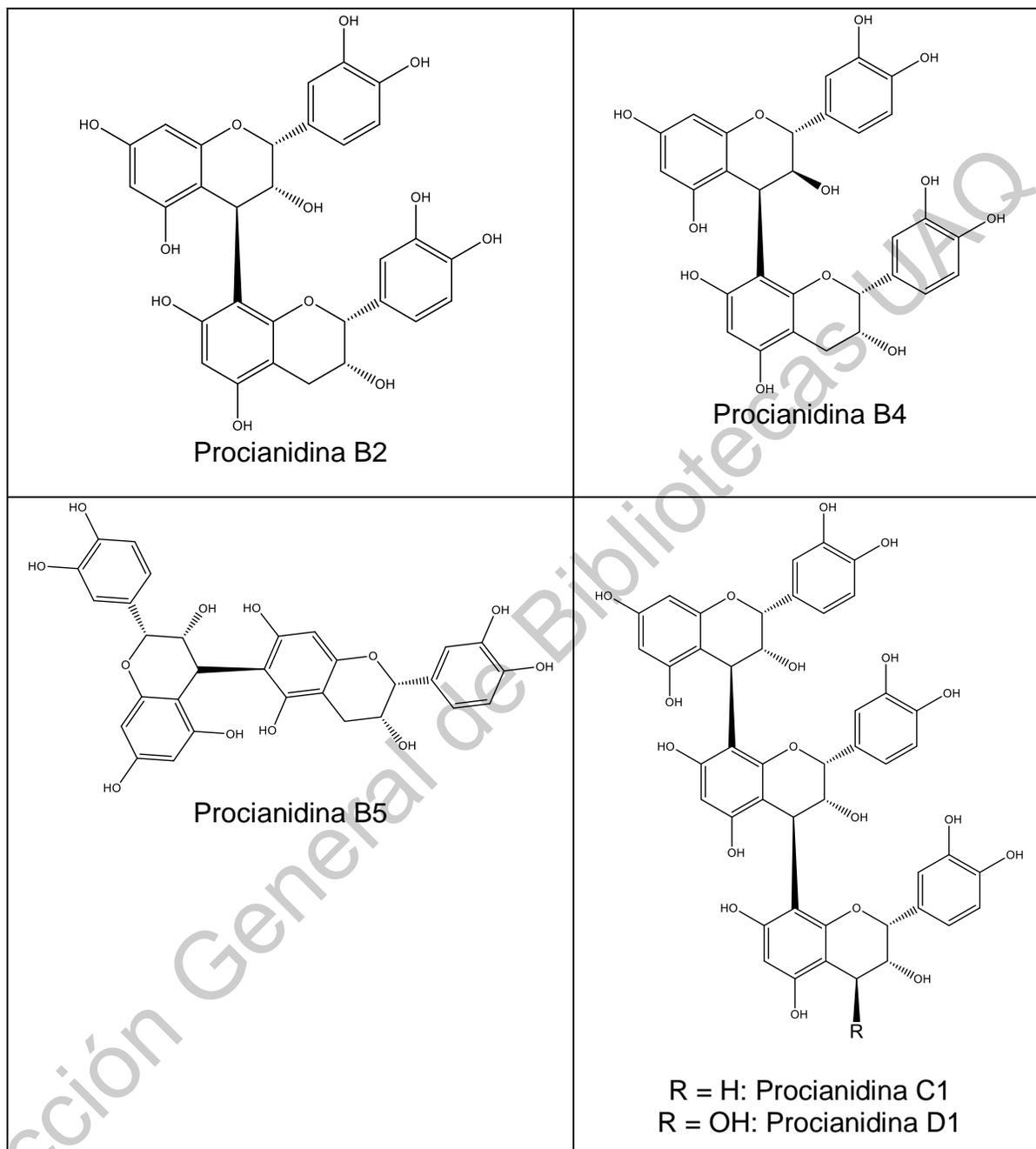


Figura 6. Estructuras de algunas procianidinas reportadas en el género.

Estos compuestos se subdividen en varias clases, como flavonoles, flavononas, flavanos, antocianidinas, isoflavonas, neoflavonas y chalconas (Nabavi y col., 2015).

En las especies de *Crataegus*, se han identifican principalmente los flavonoides como vitexina, apigenina, luteolina y sus derivados, por ejemplo, vitexina-2"-O-ramnósido y acetilvitexina-2"-O-ramnósido. En las flores, se concentran los glicósidos de flavonol y en las hojas, derivados de flavona y polímeros de (-)-epicatequina y (+)-catequina (Edwards y col., 2012; Yang y Liu 2012). También se han encontrado algunos glicósidos de flavonol como la quercetina, el kaempferol, la sexangularetina (8-metoxikaempferol), el hiperósido, la isoquercitrina, la rutina (Yang y Liu, 2012). Algunos ejemplos de flavonoides se encuentran en la Figura 7. Con respecto a *Crataegus mexicana*, se han detectado algunos flavonoides como la quercetina y sus derivados glicosilados (Figura 7) (Banderas-Tarayay y col., 2015).

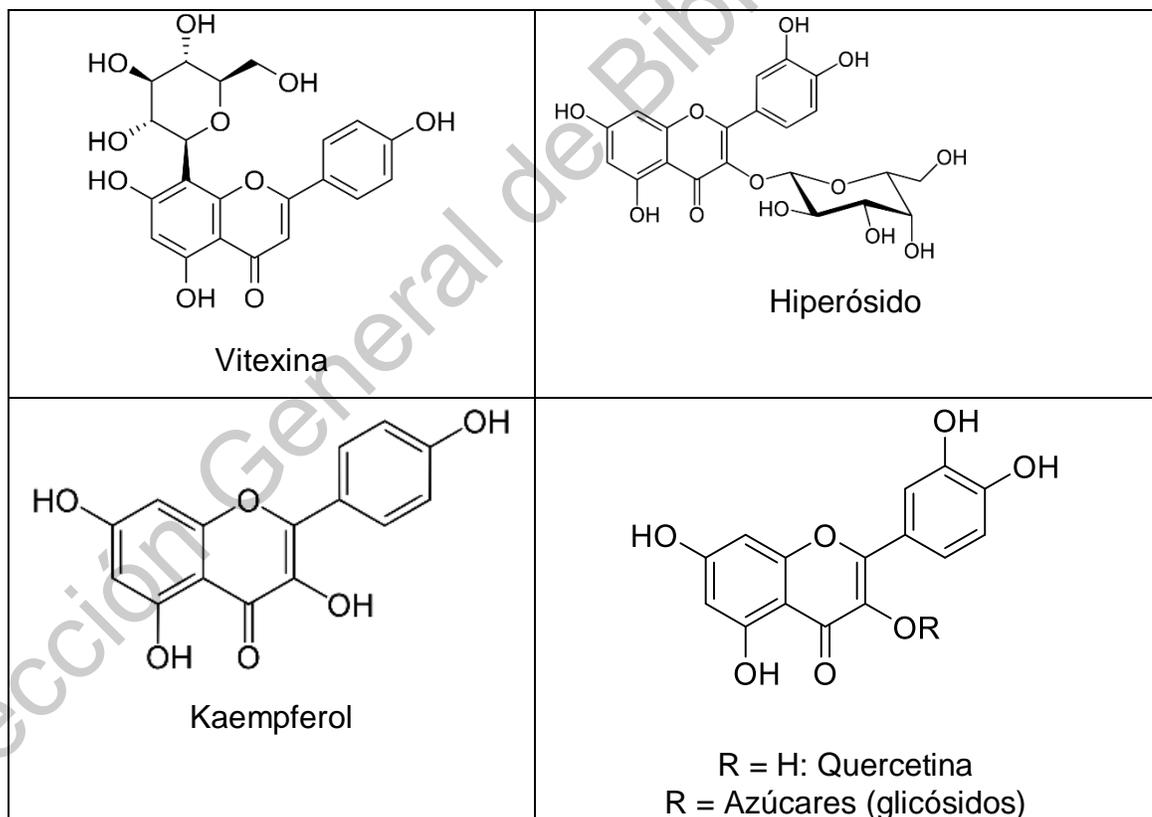


Figura 7. Estructuras de algunos flavonoides representativos del género *Crataegus*.

2.3.4.3 Terpenos identificados en el género *Crataegus*

Los terpenos están presentes en todas las plantas. Esos metabolitos actúan como toxinas, repelentes y atrayentes. Los estudios realizados cuantificaron terpenos en *Crataegus pinnatifida* como el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Figura 8); así mismo se cuantificaron glucósidos monoterpénicos de las hojas de *Crataegus pinnatifida* (Edwards y col., 2012).

En otras especies de *Crataegus*, se han aislado los ácidos corosólico, euscápico, betulínico y el butirospermol (Edwards y col., 2012; Nabavi y col., 2015).

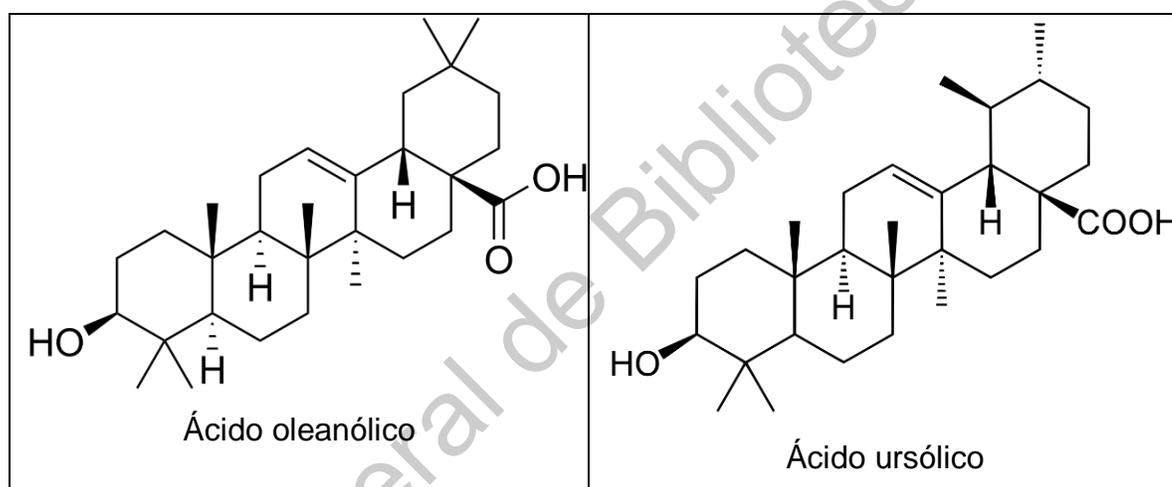


Figura 8. Estructuras de los ácidos oleanólico y ursólico (Edwards y col., 2012).

2.3.4.4 Azúcares y alcoholes derivados de azúcares identificados en *Crataegus*

En las hojas de *Crataegus*, se producen los azúcares, que son transportados a las vacuolas y a los espacios libres de la fruta en su desarrollo. Los azúcares cuantificados en los frutos de *Crataegus* son glucosa, sacarosa, fructosa y xilosa. Han sido cuantificados también alcoholes de azúcares como el mio-inositol y el sorbitol, siendo éste último el más importante en los frutos de *Crataegus* por ser el principal azúcar traslocante. En frutos de *Crataegus*, la fructosa es el azúcar de mayor abundancia, mientras que la glucosa, sacarosa y xilosa se encuentran en menor cantidad (Edwards y col., 2012).

2.3.5 Efectos farmacológicos del género *Crataegus*

En la medicina tradicional, el género *Crataegus* se destaca por su utilidad para tratar enfermedades cardiovasculares (Rastogi y col., 2016), pero también se ha utilizado para tratar otros padecimientos como la diarrea, el insomnio, las enfermedades de la vesícula biliar y problemas respiratorios (tos, gripe, bronquitis, asma) (Pawlaczyk-Graja, 2018). Por varios siglos, se ha utilizado también en la alimentación de varios países, incluidos China, Norte América y algunos países de Europa (Lund y col., 2017). Se describe que a finales del siglo XIX, se empezó a utilizar el género *Crataegus* en la medicina preventiva (Du y col., 2019); hoy en día, alrededor del mundo más de veinte especies de *Crataegus* se utilizan como ingredientes de medicamentos herbolarios (Rastogi y col., 2016). Como ya se ha mencionado anteriormente, los extractos obtenidos de frutos, hojas y flores pueden prevenir la hipertensión. Ayudan a mejorar la circulación sanguínea, disfunción miocárdica, aterosclerosis, dislipidemia, hipotensión, angina de pecho, arritmias, insuficiencia cardíaca (Dong y col., 2017); Tienen además efectos inotrópicos positivos, efecto de remodelación anticardíaco, antiagregante plaquetario, vasodilatador, protector endotelial, de reducción de la migración y proliferación de células musculares lisas, efecto protector contra isquemia/lesión por reperfusión, efecto antiarrítmico (Wang y col., 2013). Con relación a los efectos antiarrítmicos, los extractos de *Crataegus* prolongan el potencial de acción de mecanismos inotrópicos positivos a través de la inhibición de canales de potasio internos (Brenyo y Aktas, 2014).

Los estudios farmacológicos actuales señalan que los extractos de *Crataegus* tienen actividad vasoprotectora, así como también son empleados para el tratamiento profiláctico y para afecciones como la disfunción endotelial, la enfermedad coronaria y para prevenir la reestenosis/reoclusión después del tratamiento endovascular periférico (Koch y Malek, 2011). Algunos estudios experimentales demuestran las propiedades antioxidantes de los extractos de *Crataegus* a nivel celular y mitocondrial, ya que tiene un amplio espectro de

protección contra la radiación UV (Pawlaczyk-Graja, 2018). De esta forma, el género contiene evidentemente muchos compuestos biológicamente activos (Du y col., 2019).

2.3.5.1 Efectos farmacológicos de algunos compuestos del género

Los extractos estandarizados obtenidos a partir de hojas y flores, como el Li 132 y el WS 1442, contienen procianidinas oligoméricas, algunos flavonoides (hiperósido, vitexina, ramnosil vitexina y rutina), triterpenos y ácidos fenilcarboxílicos (Holubarsch, Colucci y Eha, 2018; Hernández-Pérez y col., 2014).

La vitexina se encuentra en varias plantas medicinales, pero principalmente en las hojas del género *Crataegus* (He y col., 2016). Este metabolito tiene propiedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral (Zhang y col., 2017), anti-alzheimer, anti-espasmódico, anti-hipoxia, antidepresivo, antiviral (He y col., 2016) y desempeña un papel clave en los trastornos cardiovasculares (Zhang y col., 2017), por ejemplo tiene efecto antihipertensivo (He y col., 2016).

El hiperósido es un componente principal de los medicamentos de patente tradicional chinos. Estudios demuestran que tiene propiedades antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antiisquémicas (Wang y col., 2018) y posee propiedades cardioprotectoras, por ejemplo, mejora la función cardíaca, protege los cardiomiocitos de las lesiones de isquemia/reperjución (Xiao y col., 2017) y reduce la lesión de isquemia/ reperusión cerebral mediante la regulación de la vía de señalización del óxido nítrico (Gong y col., 2017).

Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, por su parte, poseen efecto antioxidante, antiinflamatorio, mejoran el sistema cardiovascular y disminuyen la hipertensión (Zeng y col., 2019). Se les atribuye a las procianidinas la capacidad de reducir la probabilidad de sufrir un infarto (riesgo vascular), debido a las propiedades vasodilatadoras que tienen (Novakovic y col., 2017), gracias a su capacidad para estimular la formación de óxido nítrico a través

de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), lo que conduce a un aumento de la acumulación de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Byun y col., 2014).

Existen estudios realizados con las procianidinas C1 y la B2, donde se demuestra que esas tienen efecto vasodilatador dependiente de endotelio, a través del aumento de los niveles de óxido de nítrico, la hiperpolarización y la regulación de entrada de Ca^{2+} en el endotelio vascular (Byun y col., 2014 y Novakovic y col., 2017).

Algunos ácidos triterpénicos aislados también de *Crataegus* han demostrado diversas actividades biológicas. Se ha demostrado que el ácido corosólico induce la vasodilatación dependiente del endotelio, mediante la activación de las vías ATP NO/GMPc y $\text{H}_2\text{S}/\text{K}$ (Luna-Vázquez y col., 2018) además de poseer actividades antiinflamatorias, antiobesidad, antitumorales y antidiabéticos. Por su parte, el ácido betulínico tiene propiedad antitumoral y antiproliferativa con efecto citotóxico en líneas celulares de melanoma o células de glioblastoma, antiinflamatoria, antiviral y aumenta la producción del NO mediante estimulación de la NO sintasa endotelial (eNOS) y la regulación positiva de la expresión de eNOS (Hohmann y col., 2016).

El ácido ursólico posee efectos farmacológicos como anticancerígenos, antitumorales, antiarrugas, antidiabéticos, antiinflamatorios, anti-aterosclerótico y se ha demostrado que causa una vasodilatación dependiente del endotelio, efecto que se produce a través de la vía NO/GMPc y $\text{H}_2\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$. El ácido ursólico podría activar la eNOS al unirse a un sitio alostérico ubicado en la enzima (Luna-Vázquez y col., 2016).

2.3.6 Extractos estandarizados del género *Crataegus*

Dentro de los productos herbolarios medicinales más utilizados en el mundo occidental, se encuentran extractos elaborados a base de *Crataegus* spp. (Fürst y col., 2010). Desde el siglo I. d. C., se han elaborado productos a partir de hojas y flores de algunas especies de *Crataegus*, como remedios para el tratamiento de

enfermedades cardíacas así como también para fortalecer el corazón (Holubarsch y col., 2018).

Los extractos de *Crataegus* más populares y estudiados son los estandarizados WS 1442 Y LI 132, siendo éstos obtenidos de hojas y flores (Zorniak y col., 2017). Se han realizado investigaciones tanto farmacológicas como clínicas con estos extractos (Koch y Malek, 2011).

2.3.6.1 Extracto estandarizado LI 132

El extracto estandarizado LI 132, preparado con metanol-H₂O (70:30) a partir de hojas y flores de ciertas especies de *Crataegus*, es ajustado a un contenido de 2.2% de flavonoides (Dahmer y Scott, 2010; Wang y col., 2013).

El extracto de LI 132 es utilizado como tratamiento complementario para la insuficiencia cardíaca crónica ya que ayuda a controlar los síntomas y es favorable a los resultados fisiológicos (Dahmer y Scott, 2010). Sin embargo, dentro de los estudios realizados, se encontraron algunos efectos secundarios como mareos, vértigo, molestias gastrointestinales, dolor de cabeza, migraña y palpitaciones (Wang y col., 2013).

2.3.6.2 Extracto estandarizado WS 1442

El extracto de *Crataegus* nombrado WS 1442 (Fürst y col., 2010), producido por la compañía Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals (Alemania) (Zorniak y col., 2017), es un extracto estandarizado preparado con etanol-H₂O (45:55) (Holubarsch y col., 2018), a partir de flores y hojas de ciertas especies de *Crataegus* (Fürst y col., 2010); es ajustado a un contenido de entre 17.3% y 20.1% de procianidinas oligoméricas (Fürst y col., 2010). Este extracto es utilizado para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva de clase II, como la define la New York Heart Association (Bubik y col., 2012). Numerosos ensayos demuestran la eficacia y seguridad del extracto (Fürst y col., 2010). Algunos de los efectos benéficos de este extracto para tratar enfermedades cardiovasculares se deben a que contiene dos grupos de

constituyentes químicos como flavonoides monoméricos y procianidinas oligoméricas (Fürst y col., 2010).

Algunos de los efectos secundarios que pueden causar los extractos de *Crataegus* pueden ser vértigo, mareos, náuseas, fatiga, sudoración, palpitaciones, dolor de cabeza y epistaxis, pero son muy escasos los reportes de que ocasiona estos efectos secundarios (Zorniak y col., 2017). Sin embargo, se observó en otro estudio que los extractos de *Crataegus* previenen los mareos en vez de provocar toxicidad (Tassell y col., 2010).

Se han realizado estudios clínicos como de vigilancia, después de la comercialización de los extractos WS 1442, en donde se demostró que cumplen con un perfil de seguridad favorable, ya que no se han observado reacciones adversas e interacciones cuando se administra con otros fármacos cardiovasculares como inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), bloqueadores de receptores β , espironolactona, nitratos (Holubarsch y col., 2018) y la digoxina, por lo tanto se concluyó que WS 1442 se puede coadministrar con seguridad con otros fármacos antihipertensivos (Tassell y col., 2010).

2.3.6.3 Mecanismos farmacológicos del extracto WS 1442

A pesar de que existen muchos estudios de este extracto, son escasas las investigaciones sobre los mecanismos farmacológicos (Willer y col., 2012). Sin embargo, se ha probado que el extracto de *Crataegus* WS 1442 muestra propiedades vasoprotectoras e induce vasorrelajación por el aumento del óxido nítrico (NO), los factores relajantes derivados del endotelio (Peters y col., 2012), así como el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Holubarsch y col., 2018).

El extracto produce efecto vasorrelajante al aumentar la acción del nitroprusiato (donador de óxido nítrico) (Holubarsch y col., 2018) e incrementa la liberación del NO a través de la fosforilación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en la serina 1177 (Ser1177) (Holubarsch y col., 2018; Zorniak y

col., 2017). Debido al aumento del NO endotelial, retrasa la activación de la angiotensina y la senescencia endotelial (Holubarsch y col., 2018). También se ha demostrado que este extracto activa rbcNOS y origina la formación de NO en los glóbulos rojos (Zorniak y col., 2017).

Algunos estudios muestran que WS 1442 protege el endotelio de la hiperpermeabilidad. Esta protección se produce por un mecanismo dual. El primero se debe a la disminución de los niveles de calcio intracelular provocado por la trombina, seguida de activación de la proteína cinasa C (PKC) y la ATPasa RhoA (enzima involucrada en la regulación de la división celular), protegiendo de esta forma la disrupción de la barrera endotelial. El segundo mecanismo se debe al estímulo de AMPc, que conlleva al aumento de la activación de la señalización de Rap1/Rac1 (pequeñas proteínas citosólicas pertenecientes a las familias GTPasa y ATPasa respectivamente), lo que da como resultado la estabilización de la integridad de la barrera endotelial (Figura 9) (Zorniak y col., 2017 y Willer y col., 2012; Fuchs y col., 2017).

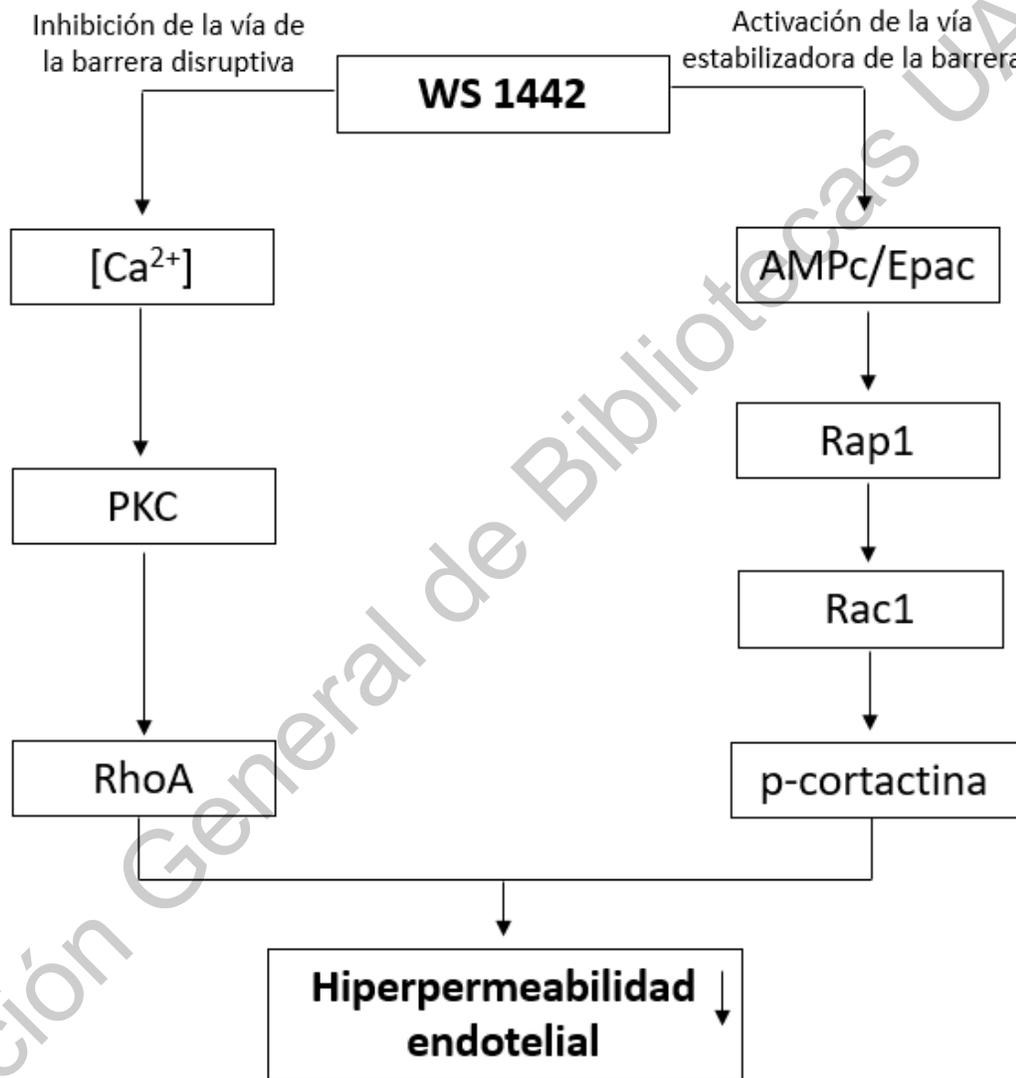


Figura 9. Mecanismo molecular dual de protección de la barrera endotelial por el extracto WS 1442 (tomada y editada de Fuchs y col. (2017)).

3. JUSTIFICACIÓN

Diversas plantas medicinales se han utilizado en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión sistólica, angina de pecho, aterosclerosis, insuficiencia cerebral, insuficiencia venosa y arritmia. Esas enfermedades cardiovasculares son las primeras causas de muerte en el mundo en general y también en México, y por lo tanto, requieren estrategias innovadoras para una prevención y tratamiento más eficaz en los casos donde la enfermedad está asentada.

Un reciente aumento en la popularidad de la medicina alternativa y productos naturales ha revivido el interés en los remedios tradicionales que se han utilizado para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Plantas del género *Crataegus* han sido de las más usadas para esos fines, ya que se han incorporado en dicha terapia a más de veinte especies y, hacia finales del siglo XX, se ha comprobado que ayudan a mejorar la circulación sanguínea, la disfunción miocárdica, la hipertensión y la aterosclerosis. Algunos extractos estandarizados que se comercializan ayudan a prevenir la insuficiencia cardíaca y la hipertensión.

Dado que México cuenta con al menos 15 especies, no todas identificadas de manera certera a pesar de que se estén utilizando en la medicina tradicional, es importante explorar su potencial farmacológico que combine estudios químicos de sus metabolitos secundarios y evaluación de sus efectos sobre el sistema cardiovascular.

La presente propuesta estuvo enfocada a generar conocimiento sobre los compuestos mayoritarios presentes en *Crataegus rosei* y la actividad vasorrelajante, tanto del extracto como de los compuestos individuales que se aíslan de las hojas de esta especie vegetal recolectada en el estado vecino de Guanajuato. Dicha información contribuirá a la validación del uso tradicional y sentará las bases para el desarrollo de un fitomedicamento basado en esta especie a mediano plazo.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* mexicana contiene compuestos que inducen un efecto vasorrelajante en segmentos de aorta aislada de rata.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la actividad vasorrelajante del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*, identificar sus metabolitos secundarios mayoritarios y comprobar sus efectos vasorrelajantes respectivos a nivel *ex vivo*.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* y un extracto metanólico libre de grasas y taninos
- Determinar la actividad vasorrelajante de ambos extractos en segmentos de aorta aislada de rata
- Determinar el mecanismo de acción del extracto más potente
- Obtener algunos de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto metanólico.
- Identificar los compuestos aislados
- Determinar la actividad vasorrelajante de aquellos que se obtuvieron en cantidades óptimas y cuyo efecto no haya sido determinado con anterioridad.

6. METODOLOGÍA

6.1 Recolección y conservación del material vegetal

Las hojas de *Crataegus rosei* se recolectaron el día 9 de septiembre de 2017, en la localidad Mesa de Jesús ubicada en las coordenadas 21°30'05.33"N, 100°23'33.99" W, Municipio de San Luis de la Paz, estado de Guanajuato. La identificación fue realizada por la Dra. Mahinda Martínez, investigadora de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Una muestra de referencia (Martínez 9459, voucher QMEX 318) fue depositada en el Herbario Jerzy Rzedowski de dicha Facultad). Las hojas se desecaron en una estufa diseñada *ex profeso* a la temperatura de 40 °C durante cinco días.

6.2 Obtención de extractos de las hojas secas

Se pesaron 1923 g de hojas secas de *Crataegus rosei*, las cuales fueron molidas utilizando un molino manual. Posteriormente, se maceraron de manera independiente y sucesiva con hexano, diclorometano y metanol, utilizando volúmenes de aproximadamente 9 litros por un periodo de una semana. Cada extracto se filtró y se secó a presión reducida en un rotaevaporador. Los extractos secos se guardaron en refrigeración hasta su posterior uso en procedimientos de fraccionamiento y de evaluación farmacológica.

El extracto metanólico seco se disolvió en metanol y se le hizo lavados con éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas y clorofilas, el extracto se llevó a sequedad total. Teniendo el extracto totalmente seco se disolvió con acetato de etilo y se extrajeron los taninos con una solución acuosa de cloruro de sodio al 1% en agua (m/v), el extracto libre de grasas y taninos se llevó a sequedad total y se determinó la actividad vasorrelajante sobre aorta aislada de rata.

6.3 Evaluación de la actividad vasorrelajante *ex vivo*

Para la evaluación de la actividad vasorrelajante del extracto metanólico, se utilizó el ensayo de aorta aislada de rata mediante un procedimiento previamente

estandarizado (Ibarra-Alvarado y col., 2010). Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 275-325 g y, posteriormente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación conforme al apartado 9.5.3.3 de la NOM-062-ZOO-1999. Se extirpó la aorta torácica y se colocó en solución de Krebs-Henseleit (NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 30 mM y D-glucosa 5.0 mM con un pH 7.4) oxigenada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La aorta se lavó con solución Krebs-Henseleit para evitar la formación de coágulos intravasculares. Se eliminó el tejido conectivo y se cortaron segmentos de anillos de 4 a 5 mm de longitud que se sujetaron entre ganchos de acero inoxidable en cámaras de incubación de 5 mL con solución de Krebs-Heinseleit a 37°C y con un burbujeo constante de carbógeno. Los tejidos se equilibraron durante 60 minutos bajo una tensión de 1.5 g. Durante este período, el medio del baño se cambió cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos aórticos fueron contraídos con KCl 100 mM. Cuando se estabilizó la contracción, el medio de baño se cambió para rehabilitar la tensión basal de 1.5 g. Posteriormente, se contrajeron los tejidos con 1 µM de L-fenilefrina y se registró la fuerza de contracción desarrollada, la cual fue definida como el 100%. En seguida, se añadió la muestra a evaluar a diferentes concentraciones (0.1–1000 µg/mL) disueltas en dimetilsulfoxido (a concentraciones menores a 0.02%). Se utilizó como control positivo la acetilcolina (ACh, 1 µM). La tensión isométrica se midió con un transductor de desplazamiento de fuerza Grass FT03 unido a un polígrafo de marca Grass 7D. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción inicial alcanzada al adicionar la fenilefrina.

El manejo de los animales de experimentación utilizados en esta sección se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.3.1 Análisis estadístico

Se realizaron de 6 a 8 evaluaciones para cada uno de los extractos. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación sigmoïdal y se graficaron mediante el programa PRISMA 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) para la obtención de las curvas concentración-respuesta. Los valores de CE_{50} se tomaron como significativamente diferentes cuando sus intervalos de confianza de 95% no se traslapan entre ellos y el efecto máximo (E_{max}) con un error estándar.

6.4 Estudio químico del extracto

6.4.1 Cromatografía en columna abierta (CC)

Para el aislamiento y purificación de los compuestos, se siguió la metodología fitoquímica tradicional usada de manera rutinaria. Se seleccionó el extracto metanólico libre de grasas y tanino (EMLGT), del cual se pesaron 30 g que fueron absorbidos en 19.5 g de gel de sílice (Kiesegel 60 Merk, tamaño de poro 60 Å, malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm). Posteriormente, la muestra adsorbida seca se aplicó en una columna de 7 cm de diámetro y 100 cm de alto, previamente rellena con 953.5 g de gel de sílice suspendida en diclorometano. El gradiente de elución estuvo formado por distintas proporciones de diclorometano, acetato de etilo y metanol, iniciando con 100 % de diclorometano y terminado con 100 % de metanol.

6.4.2 Análisis cromatográfico en capa fina (CCF)

Se utilizaron cromatofolios recubiertos con gel de sílice (sílica gel 60 GF254 Merck), los cuales fueron utilizados para analizar todas las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna. También se utilizó una lámpara ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) que permitió visualizar los compuestos. Finalmente, las fracciones monitoreadas por CCF se revelaron con una solución de sulfato cérico amoniacal, con un calentamiento a 80°C. El agente revelador del

sulfato cérico amoniacal se preparó de la siguiente manera: se agregaron 12 g de sulfato cérico amoniacal a 300 g de hielo (elaborado con agua destilada). A esta mezcla, se adicionaron lentamente y con agitación 22.5 mL de ácido sulfúrico concentrado hasta la formación de una solución homogénea, la cual fue utilizada directamente para el revelado.

Las fracciones fueron agrupadas de acuerdo a su similitud de su perfil en CCF.

6.4.3 Purificación de compuestos por medio de CCF preparativa (CCFP)

Para la purificación de compuestos de algunas fracciones (seleccionadas de acuerdo a su rendimiento y perfil cromatográfico) obtenidas por CC, se pesaron 30 mg de la fracción CRDF-257-290, los cuales se disolvieron en aproximadamente en 5 mL de metanol (MeOH). La solución fue aplicada en una placa preparativa de vidrio de 20 cm x 20 cm, recubierta con gel de sílice (sílica gel 60 GF254 Merck, con espesor de la fase estacionaria de 500 μm), para la separación de sus compuestos. Como fase móvil, se utilizó la mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (95:05). Con la ayuda de la lámpara UV, se observaron las bandas, las cuales fueron delimitadas y raspadas. Las bandas recuperadas fueron agitadas en un matraz Erlenmer durante 30 min con MeOH, utilizando un agitador magnético, luego filtradas y las soluciones resultantes evaporadas a sequedad para recuperar los correspondientes compuestos individuales.

6.4.4 Purificación de compuestos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para la purificación de los compuestos por medio de cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC"), se utilizó un sistema cromatográfico de marca Waters (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), integrado por una bomba cuaternaria de entrega automática de disolventes (fases móviles), modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (UV-Visible), modelo 2998. Como fase estacionaria, se utilizó una columna preparativa Zorbax XDB-C18 (21.2 X 150 mm, 5 Micron) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una elución isocrática con una fase móvil formada por CH_3CN -MeOH (95:5) y un flujo de 1.25

mL/min. Las inyecciones fueron de 1250 μ L (equivalentes a 10 mg) de una solución previamente preparada en un volumen total de 1 mL.

6.4.5 Identificación de compuestos purificados

La identificación de los compuestos purificados se realizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN), para lo cual se obtuvieron los espectros unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H COSY y heteronucleares ^1H - ^{13}C en sus modalidades a un enlace (HSQC, de sus siglas en inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence o HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) y a múltiples enlaces (HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation). El registro de los espectros de RMN se realizó mediante colaboración con la Universidad de Guanajuato. Todos los espectros de RMN fueron adquiridos en un espectrómetro de la marca Brüker Avance III HD de 500 MHz del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM) UG-UAA-CONACyT No. 123732 de la Universidad de Guanajuato. Se utilizó $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ como disolvente y tetrametilsilicio (TMS) como estándar interno.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación farmacológica de los extractos metanólicos

7.1.1 Evaluación de los efectos vasorrelajantes de los extractos metanólicos

Los resultados obtenidos de la evaluación farmacológica mostraron que los dos extractos metanólicos evaluados [el metanólico original (EM) y el libre de grasas y taninos (EMLGT)] relajaron la aorta de una manera dependiente de la concentración (Figura 10 y Tabla 1). Con el EM, se obtuvo una CE_{50} de 55.49 [37.31 a 82.52] $\mu\text{g/mL}$ y con el EMLGT una CE_{50} de 7.2 [3.03 a 17.14] $\mu\text{g/mL}$. El EMLGT relajó la aorta con una potencia similar a la de la ACh ($CE_{50} = 8.6$ [7.22 a 10.49] $\mu\text{g/mL}$) utilizada como control positivo, mientras que el EM presentó una potencia más de 6 veces menor que la de la ACh. Estos resultados indican que la eliminación de grasas y taninos incrementó el efecto vasodilatador del EM.

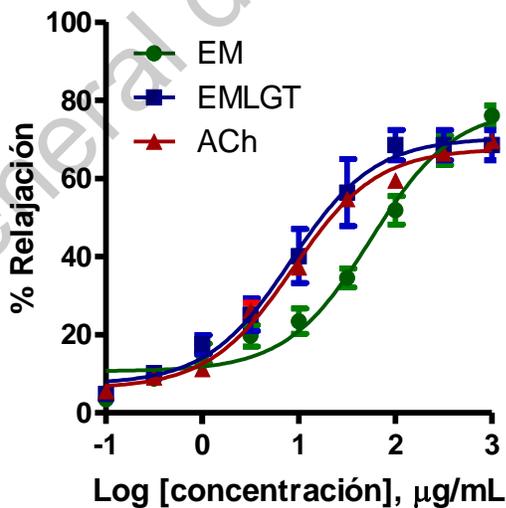


Figura 10. Curvas concentración respuesta del efecto vasorrelajante de la ACh, el EM y el EMLGT en presencia de endotelio.

Tabla 1. Valores de E_{max} (% relajación) y CE_{50} de los dos extractos metanólicos y de la acetilcolina (ACh).

ACh y extractos	E_{max} (% relajación)	CE_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Potencia relativa: $[\text{CE}_{50} \text{ extracto}/[\text{ACh}]$
ACh	69.50 ± 5.7	8.60 [7.22 a 10.49]	1
EM	78.01 ± 3.03	55.49 [37.31 a 82.52]	6.45 veces menos potente que la ACh
EMLGT	66.95 ± 6.59	7.20 [3.03 a 17.14]	0.83 más potente

7.1.2 Participación del endotelio en el efecto vasorrelajante del EMLGT

Para determinar si el efecto vasorrelajante ejercido por el EMLGT depende de endotelio, se realizó la evaluación en ausencia de dicho tejido. En la Figura 11, se muestra que la eliminación del endotelio disminuyó de manera significativa el porcentaje de vasorrelajación, por lo tanto su efecto depende principalmente de dicho tejido.

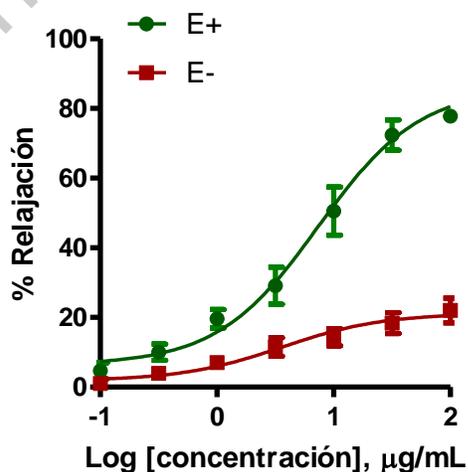


Figura 11. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el EMLGT sobre la aorta en presencia (E+) y en ausencia de endotelio (E-).

7.1.3 Determinación de la participación de la vía del NO/GMPc en el mecanismo vasorrelajante inducido por el extracto EMLGT

Con la finalidad de evaluar si el efecto vasorrelajante del extracto EMLGT involucra la participación de la vía del NO/GMPc, se utilizó L-NAME, un inhibidor de la enzima NO sintasa (NOS) y ODQ, un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (GCs). La inhibición de las enzimas NOS con L-NAME y de la GCs con ODQ disminuyó significativamente el efecto vasorrelajante producido por el EMLGT (Figura 12), lo cual indicó que dicho efecto se debe principalmente a la activación de la vía del NO/GMPc.

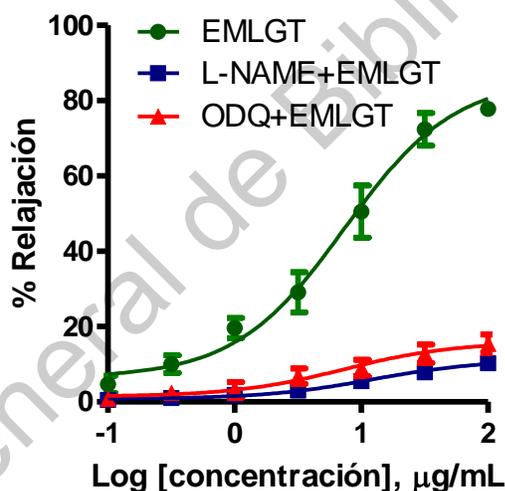


Figura 12. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el EMLGT en ausencia y en presencia de los inhibidores L-NAME y ODQ.

7.2 Estudios químicos

7.2.1 Rendimiento de los extractos

Se pesaron 1923 g de hojas secas de *Crataegus rosei* y se obtuvieron 7 g de extracto hexánico, 24 g de diclorometánico y 304.5 g de metanólico. Se ocuparon

138 g del extracto metanólico para su tratamiento y se obtuvo 100.6 g de extracto metanólico libres de grasas y taninos (EMLGT).

7.2.2 Fraccionamiento del EMLGT

El extracto metanólico tratado se seleccionó para llevar a cabo los estudios químicos. Se obtuvieron 419 fracciones, las cuales fueron agrupadas por su perfil químico en 28 fracciones finales. En la Tabla 2, se muestran las fracciones agrupadas, sus rendimientos y los sistemas de elución empleados durante el fraccionamiento.

Tabla 2. Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en columna del EMLGT y sus rendimientos.

FASE MÓVIL	FRACCIONES COLECTADAS	FRACCIONES AGRUPADAS	PESO (mg)	CLAVE
CH ₂ Cl ₂	1-83	1-37	ND*	
		38-43	ND	
		44-97	72.3	
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (95:05)	84-99	98-100	ND	
		101-111	4.8	
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (85:15)	100-172	112-124	69.1	
		125-143	460	ECGI
		144-159	99.2	
		160-170	60.4	
		171-189	ND	
		190-196	273.4	
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (75:25)	173-277	197-211	400	ECRD-199
		212-226	86.3	
		227-240	88.9	
		241-256	85.5	ECRD-241-256
		257-290	243.9	
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (65:35)	278-322			

		290-316	84.2	
		317-323	ND	
CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (1:1)	323-386	324-345	155.8	
		346-356	75	
		357-370	134.3	
		371-380	V	
		381-398	129.9	
		AcOEt	387:395	
AcOEt-MeOH (80:20)	396-403	399-402	ND	
AcOEt-MeOH (1:1)	404-413	403-405	ND	
		406	231.1	
		407	879.9	
		408-419	ND	
MeOH	414-419			

*ND: No determinado; AcOEt: acetato de etilo

7.2.3 Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF uni- y bidimensionales

Se decidió analizar la fracción con clave ECGI por medio de CCF (ver Tabla 2), al observar que dicha fracción mostraba un precipitado blanco. Se obtuvo un perfil cromatográfico que indicaba un solo componente (Figura 13 A).

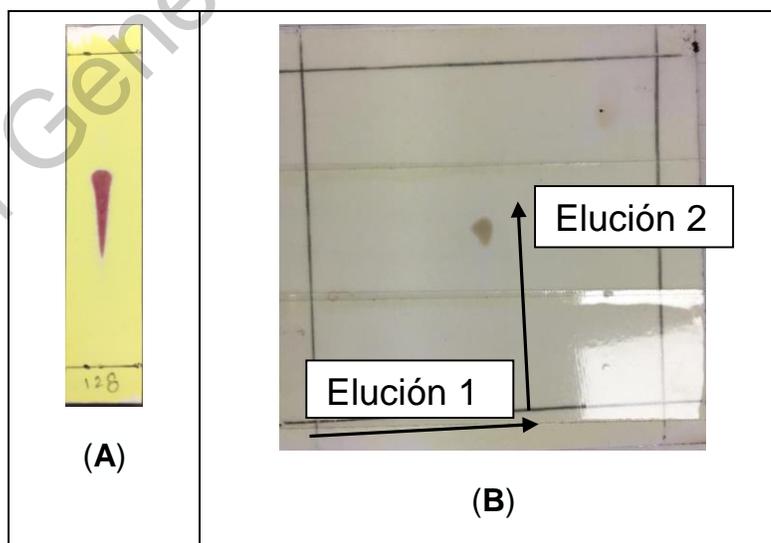


Figura 13. Cromatogramas en capa fina de la fracción ECGI. Revelador: sulfato cérico. Sistema de elución: CH₂Cl₂-MeOH (95:05).

Para comprobar si esta fracción estaba pura, se realizó una CCF bidimensional (Figura 13 **B**) y los resultados mostraron una sola mancha, sin desdoblamiento. Por lo tanto, esta fracción fue analizada por RMN.

Siguiendo con la elución de la CC, se obtuvo un precipitado blanco en la fracción CRDF-199 (ver Tabla 2), el cual fue comparado con la fracción ECGI por medio de CCF (Figura 14). Como se observa, los perfiles de ambos fueron diferentes.



Figura 14. Cromatograma en capa fina de la fracción ECGI (128) y de la fracción ECRF-199 (199). Revelador: sulfato cérico. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH (95:05).

De la fracción CRDF-257-290, precipitó un sólido amarillo que fue analizado por CCF (Figura 15), proporcionando un perfil cromatográfico complejo, pero cuyos constituyentes podían separarse mediante CCFP.



Figura 15. Cromatograma en capa fina de la fracción CRDF-257-290 (“261-270”).
Revelador: sulfato cérico. Sistema de elución: CH₂Cl₂-MeOH (90:10).

7.2.4 Purificación de los compuestos

7.2.4.1 Purificación de los compuestos de la fracción FCRD-199 mediante HPLC

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel preparativo de la fracción ECRD-199 generó el siguiente cromatograma (Figura 16), del cual se colectaron los siguientes picos con tiempos de retención de 25.40 min (4.3 mg) (clave: ECRD-199-1), 32.44 min (4.2 mg) (clave: ECRD-199-2), 36.73 min (4.5 mg) (clave: ECRD-199-3) y 44.90 min (peso despreciable).

7.2.4.2 Purificación de los compuestos de la fracción CRDF-257-290 mediante CCFP

Utilizando las mejores condiciones de resolución a nivel analítico, se eligió la fracción CRDF-257-290 para la purificación de sus compuestos a través de CCF preparativa. La Figura 17 muestra la placa cromatográfica preparativa, donde se observan 4 bandas que fueron raspadas y recuperadas. El rendimiento de las bandas se muestra en la Tabla 3.

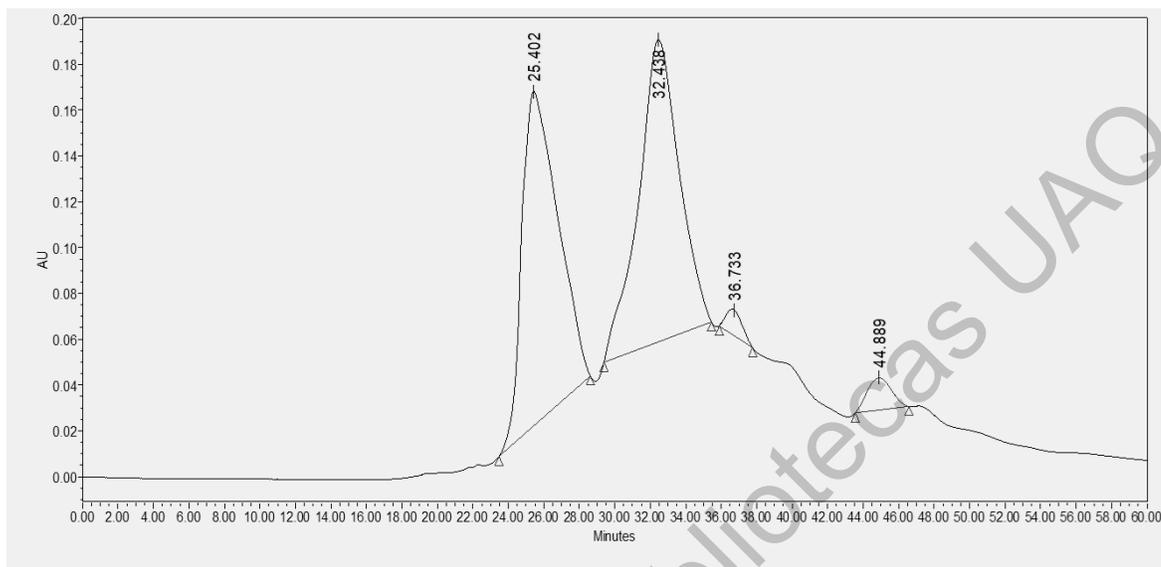


Figura 16. Cromatograma HPLC de la fracción ECRD-199. Condiciones: (ver punto 6.3.4).

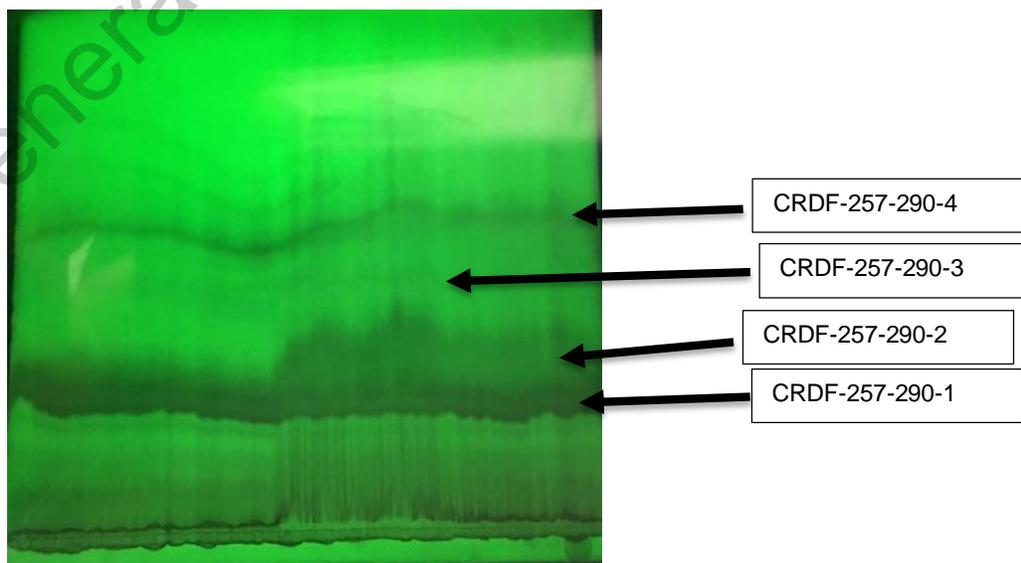


Figura 17. Cromatograma en capa fina preparativa de la fracción CRDF-257-290. Revelador: Luz UV. Longitud de onda: 254 nm. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH (90:10).

Tabla 3. Rendimiento de las bandas raspadas de la CCFP de la fracción CRDF-257-290.

Clave de la fracción	Rendimiento por cada 30 mg de muestra
CRDF-257-290-1 (banda 1)	5 mg
CRDF-257-290-2 (banda 2)	3.5 mg
CRDF-257-290-3 (banda 3)	3.5 mg
CRDF-257-290-4 (banda 4)	2.7 mg

Se llevaron a cabo análisis mediante CCF uni- [Figura 18 **A**] y bidimensionales [Figura 18 **B**] de los compuestos aislados para comprobar su homogeneidad y se observó que las bandas 2 y 3 muestran algunas impurezas, mientras que la banda 1 con clave CRDF-257-290-1 está pura [Figura 18 **B**], por lo cual se decidió registrar sus espectros de RMN. Sin embargo, su perfil no fue favorable para análisis estructural.

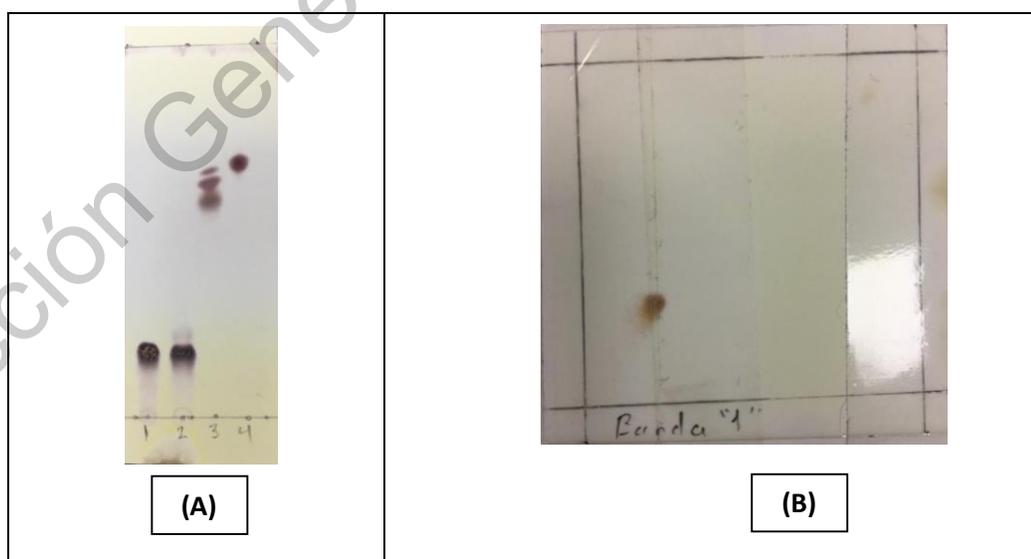


Figura 18. Cromatogramas en capa fina de las bandas aisladas de la fracción CRDF-257-290 [sulfato cérico, CH_2Cl_2 -MeOH (90:10), 254 nm].

7.2.5 Identificación de los compuestos purificados

7.2.5.1 Fracción ECGI

El análisis de los espectros de la fracción ECGI permitió identificar 30 señales en su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19), una de las cuales en $\delta = 179.9$ de un grupo ácido, señales todas que son características de triterpenos. El espectro de ^1H (Figura 20) muestra a campo alto señales de metilos y metilenos, dos dobletes en $\delta = 0.97$ y 1.25 , ambos con una $J = 6.6$ Hz, lo cual es característico de un esqueleto de ursano. Además, se identificaron 5 metilos singuletes, otra señal en $\delta = 3.47$ como multiplete que corresponde al protón de la posición oxigenada (H-3) y en $\delta = 5.51$ como un singulete ancho que corresponde a un protón vinílico. Además, en su espectro DEPT (ver Figura A-1) se identificaron 2 metilenos, 5 metinos, un carbono monoxigenado en $\delta = 78.1$ (C-3). El estudio de los espectros de RMN, incluyendo el COSY, permitió identificar al compuesto ECGI como el ácido ursólico, el cual ya había sido reportado en otras especies de *Crataegus*, tanto europeas (Nabavi y col., 2015) como asiáticas (Wen y col., 2017) y mexicanas (Hernández-Pérez y col., 2014).

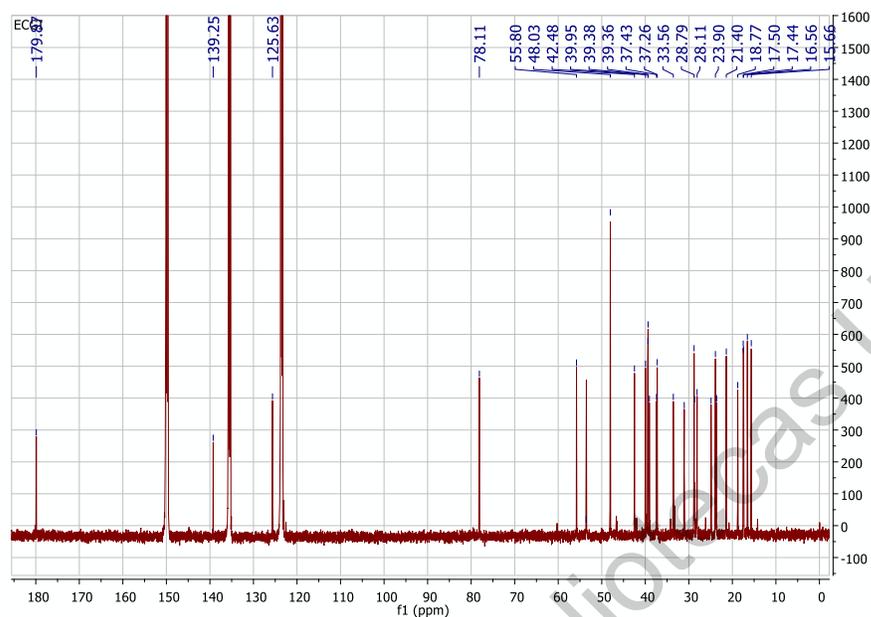


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

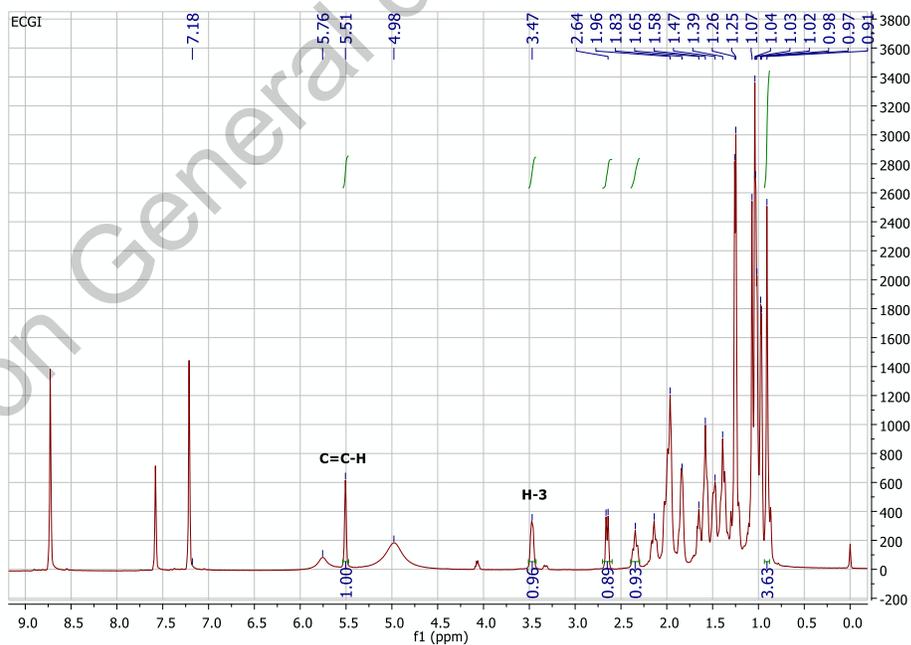


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).

7.3.3 Identificación preliminar de los compuestos de la fracción ECRD-199

El espectro de ^{13}C de la fracción ECRD-199 mostró el perfil de una mezcla de tres triterpenos (Figura 21), como se detalla a continuación.

Se observaron tres señales de carbonilos de ácidos ($\text{C}=\text{O}$) en $\delta = 180.64$, 180.14 y 179.86 , seis carbonos vinílicos, tres de los cuales se encuentran en la región característica de vinílicos cuaternarios ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CR}_3\text{R}_4$) en $\delta = 144.81$, 139.91 y 139.25 , mientras que los 3 restantes en $\delta = 127.95$, 125.51 y 122.43 , son característicos de metinos vinílicos ($=\text{CH}$). Estas dos series de señales (carbonilos y vinílicos) indican claramente una mezcla de tres compuestos. Otra serie de señales entre $\delta = 66.00$ y 84.00 indica carbonos mono-oxigenados ($\text{C}-\text{O}$).

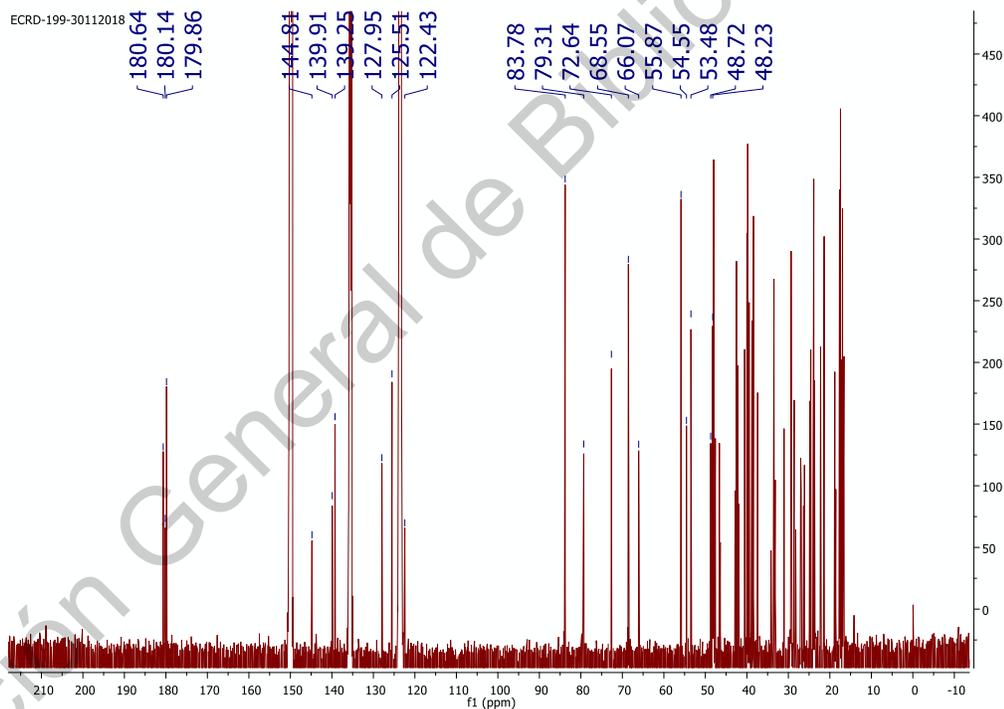


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de la fracción ECRD-199 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

A pesar de la complejidad del espectro, algunos desplazamientos químicos de la muestra coincidieron con los de los ácidos euscápico, 3-epicorosólico y maslínico publicados también, ya descritos en diversas plantas (Palencia y col., 2016). En las

Tablas 4, 5 y 6 se resumen algunas de las señales que soportaron la propuesta de identidad de los constituyentes químicos de la muestra ECRD-199.

Tabla 4.- Comparación de algunos δ_c (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 y los del ácido euscápico (2) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016).

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{13}C$ (ppm) (Palencia y col., 2016)
2	66.07	65.99
3	79.31	79.18
19	72.64	72.57
12	127.95	127.77
13	139.91	139.87
28	180.64	-

Tabla 5.- Comparación de algunos δ_c (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 y los del ácido 3-epicorosólico (3) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016).

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{13}C$ (Palencia y col., 2016)
2	66.07	65.94
3	79.31	79.16
12	125.51	125.35
13	139.25	139.22
28	179.86	180.10

Tabla 6.- Comparación de algunos δ_c (C_5D_5N) de la muestra ECRD-199 con los del ácido maslínico (4) reportados en C_5D_5N por Palencia y col. (2016).

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{13}C$ (ppm) (Palencia y col., 2016)
2	68.55	68.29
3	83.78	83.63
12	122.43	122.17
13	144.81	144.87
28	180.14	180.18

Al separar los compuestos de la fracción ECRD-199 (ver cromatograma Figura 16), solo el pico ECRD-199-3 proporcionó un espectro de ^{13}C (Figura 22) adecuado para su análisis, la cual confirmó que el mismo era el ácido euscápico, ya que los carbonos bases de oxígeno en las posiciones C-2, C-3 y C-19 y el carbonilo

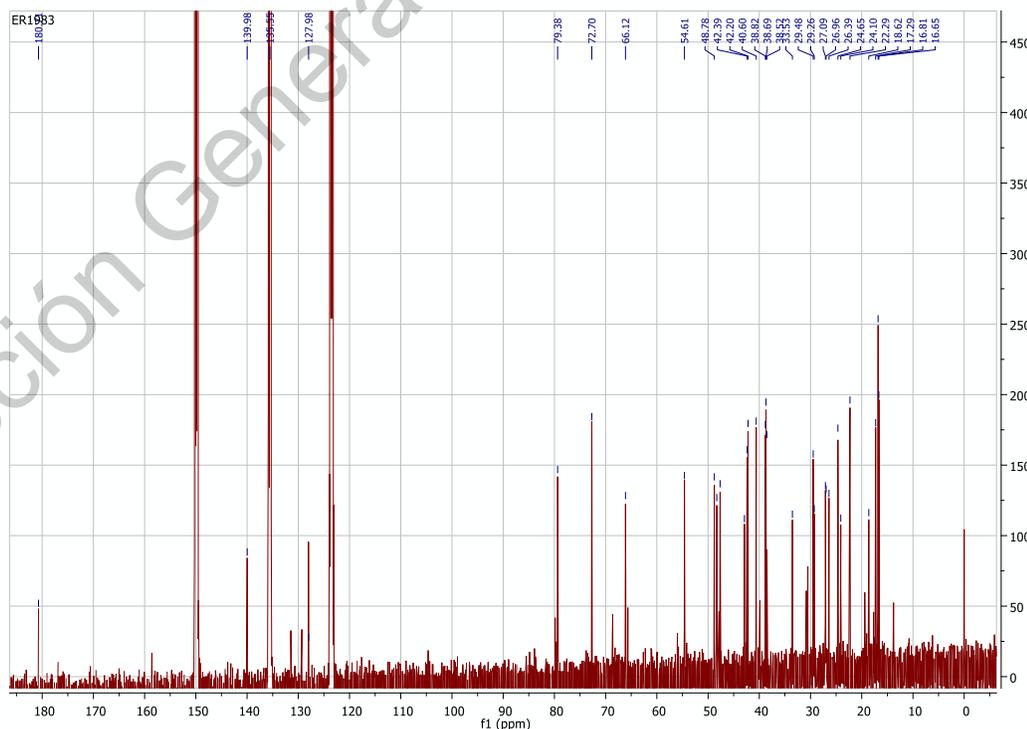
C-28 en 180.64 coincidieron con los desplazamientos químicos en la mezcla ECRD-199.

Las estructuras de los compuestos identificados en el extracto metanólico de las hojas de *C. rosei* se ilustran en la Figura 23.

Se ha reportado que el ácido ursólico tiene potencial para tratar la aterosclerosis (Li y col., 2018) y algunos estudios demuestran que tiene efecto vasorrelajante en anillos de aorta aislada de rata, al igual que el ácido euscápico (Al-Habib y col., 2015).

También algunos estudios han demostrado que el ácido maslínico tiene efecto vasodilatador en aorta de ratas hipertensas (Lozano-Mena y col., 2014).

Sin embargo, no existe reporte alguno de actividad vasorrelajante del ácido epicorosólico.



Figuras 22. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto ECRD-199-3 identificado como ácido euscápico ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz).

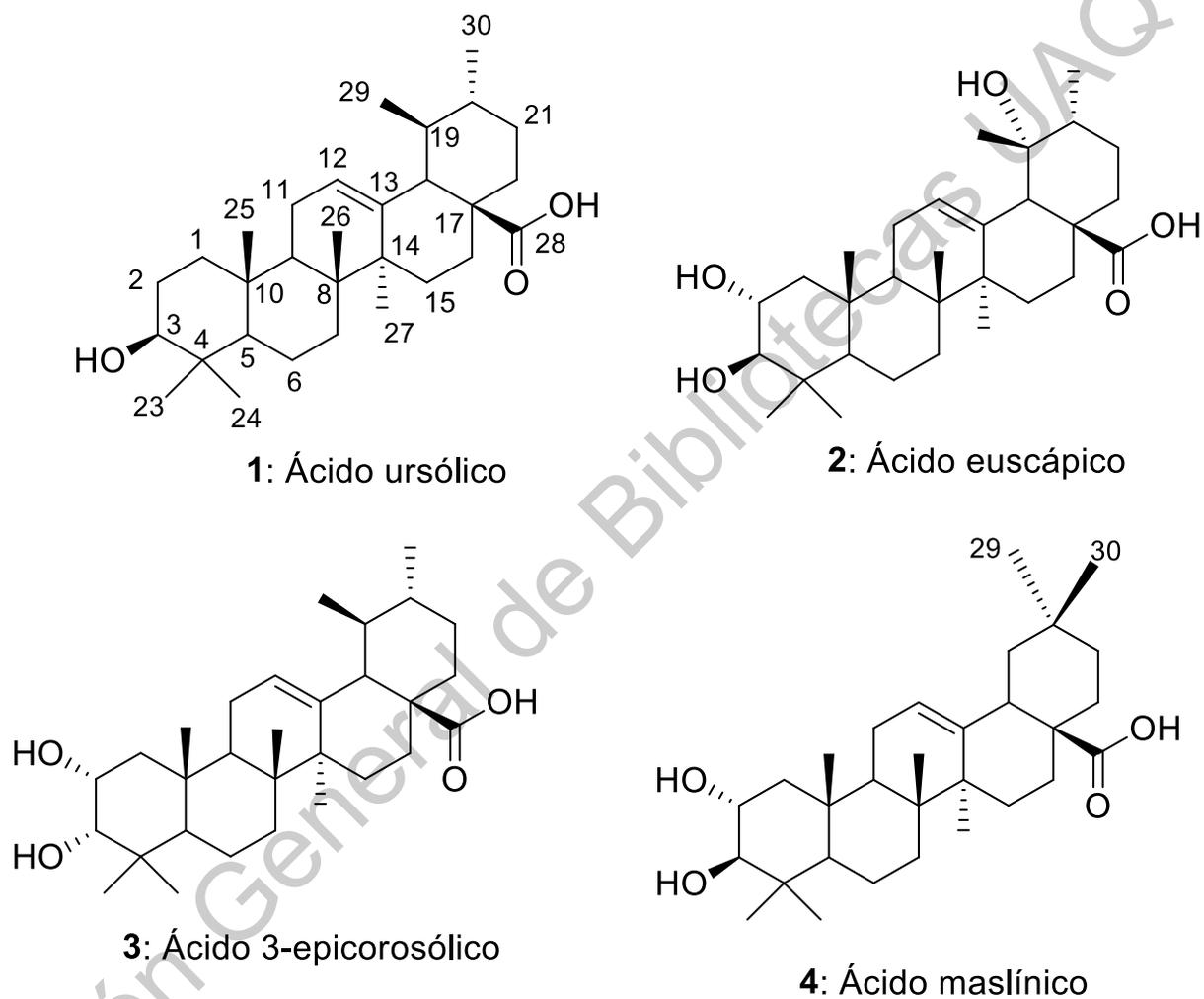


Figura 23. Estructuras de los ácidos triterpénicos caracterizados en las hojas de *C. rosei*.

8. CONCLUSIONES

1. Los dos extractos preparados de las hojas de *Crataegus rosei*, el metanólico original (EM) y el metanólico libre de grasas y taninos (EMLGT) relajaron la aorta de manera dependiente de la concentración. El EMLGT relajó el músculo liso arterial con mayor potencia que el EM, lo cual puede deberse a que la eliminación de las grasas y los taninos del EM incrementó la concentración de compuestos vasodilatadores en el EMLGT, aumentando su efecto vasorrelajante.

2. En estudios previos, se ha reportado la presencia en otras especies del género *Crataegus* de los ácidos triterpénicos caracterizados en *Crataegus rosei*, 3 de los cuales (ursólico, euscápico, maslínico) poseen actividad vasorrelajante. Por lo tanto, es posible que estos compuestos hayan contribuido a la actividad vasodilatadora de los dos extractos y pueden justificar, al menos en parte, el uso tradicional de las hojas de esta especie vegetal para tratar la hipertensión arterial.

9. PERSPECTIVAS

Este proyecto continúa con cuatro etapas:

- a) El registro de los espectros de la banda mayoritaria CRDF-257-290-1 obtenida de la CCF preparativa de la fracción CRDF-257-290 (Figura 20).
- b) La purificación de más constituyentes individuales de las fracciones mayoritarias restantes, su elucidación estructural y la evaluación de sus respectivos efectos vasodilatadores en caso de que esos no hayan sido evaluados.
- c) La extracción selectiva de los taninos, la evaluación de su actividad vasodilatadora y la identificación de sus principales constituyentes químicos.
- d) Evaluar la actividad vasorrelajante del ácido epicorosólico para ver si contribuye a la del extracto metanólico.

10. REFERENCIAS

- Abuashwashi M, Palomino O, Gomez-Serranillos M. 2016. Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*. 54(11):2708-2713.
- Aguilar-Souto P, González-Juanatey JR. 2010. Angina crónica estable: fisiopatología y formas de manifestación clínica. *Revista Española de Cardiología*. 10:11B-21B.
- Al-Habib OA, Mahmud SA, Vidari G. 2015. Anti-Contraction Effects of Euscaphic Acid Isolated from *Crataegus azarolus* var. *aronia* L on Rat's Aortic Smooth Muscle. *Advances in Life Science and Technology*. 33.
- Baena-Díez JM, Del Val García JL, Tomás-Pelegrina J, Martínez-Martínez JL, Martín-Peñacoba R, González-Tejón I, Piñol-Forcadell P. 2005. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología*. 58(4):367-73.
- Banderas-Tarabay JA, Cervantes-Rodríguez M, Méndez-Iturbide D. 2015. Biological Properties and Antioxidant Activity of Hawthorn *Crataegus mexicana*. *Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics*. 6(4):1-8.
- Basri FD, Rahman AN, Ali SS, Zainalabidin S. 2018. The vasorelaxant effect of *Canarium odontophyllum* Miq. (Dabai) extract in rat thoracic aorta. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(1):75-79.
- Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 30(8):453-459.
- Bernatova I. 2014. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? *BioMed Research International*. 14.

- Brenyo A, Aktas MK. 2014. Review of Complementary and Alternative Medical Treatment of Arrhythmias. *The American Journal of Cardiology*. 113:897-903.
- Bubik MF, Willer E, Bihari P, Jürgenliemk G, Ammer H, Krombach F, Fürst R. 2012. A novel approach to prevent endothelial hyperpermeability: the *Crataegus* extract WS 1442 targets the cAMP/Rap1 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 52(1):196–205.
- Bussard RL, Busse LW. 2018. Angiotensin II: a new therapeutic option for vasodilatory shock. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 14:1287–1298.
- Busse LW, Wang SX, Chalikonda DM, Finkel KW, Khanna AK, Szerlip HM, Chawla L. 2017. Clinical Experience With IV Angiotensin II Administration: A Systematic Review of Safety. *Critical Care Medicine*. 45(8):1285–1294.
- Byun EB, Sung NY, Yang MS, Song DS, Byun EH, Kim JK, Kim JH. 2014. Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. *Journal of Medicinal Food*. 17(7):742–748.
- Carvajal-Carvajal C. 2017. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina legal de Costa Rica*. 34(2).
- Cau S, Evora P, Tostes R. 2018. *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*. Estados Unidos: Academic press.
- Chen CI, Lin TY, Huang JS, Wu BN, Hsu JH, Tan MS, Dai ZK. 2019. Decreased Ambient Oxygen Tension Alters the Expression of Endothelin-1, iNOS and cGMP in Rat Alveolar Macrophages. *International Journal of Medical Sciences*. 16(3):443-449.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Szabo, C. 2012. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the

regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America. 109(23):9161–9166.

Crawford MH, Srivathson K, McGlothlin DP. 2007. Consulta rápida Cardiología. 1ra. Edición. Editorial McGraw-Hill, Madrid, España.

Dahmer S, Scott E. 2010. Health Effects of Hawthorn. American Family Physician. 81(4):465-468.

Daneman R, Prat A. 2015. The Blood–Brain Barrier. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 7(1).

Dong P, Pan L, Zhang X, Zhang W, Pan L, Zhang X. 2017. Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. Journal of Ethnopharmacology. 198:479-488.

Du X, Zhang X, Bu H, Zhang T, Lao Y, Dong W. 2019. Molecular Analysis of Evolution and Origins of Cultivated Hawthorn (*Crataegus spp.*) and Related Species in China. Frontiers in Plant Science. 10.

Dunn SM, Das KC. 2017. Decreased EDHF-mediated relaxation is a major mechanism in endothelial dysfunction in resistance arteries in aged mice on prolonged high-fat sucrose diet. Physiological Reports. 5(23).

Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. 2012. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry. 79:5-26.

Finch J, Conklin DJ. 2016. Air Pollution-Induced Vascular Dysfunction: Potential Role of Endothelin-1 (ET-1) System. HHS public access Author Manuscripts. 16(3):260–275.

Flores-Valdez N. 2013. Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. Med. 21(2):64-78.

- Flórez J. 2014. Farmacología Humana. España: Elsevier Masson.
- Fox SI. 2014. Fisiología Humana 13 Edición. D.F, México: McGRAW-HILL.
- Franco-Diez E. 2013. Cardiología y cirugía cardiovascular. 6a. Edición. Editorial AMIR.
- Fuchs S, Bischoff I, Willer EA, Bräutigam J, Bubik MF, Erdelmeier C, Fürst R. 2017. The Dual Edema-Preventing Molecular Mechanism of the *Crataegus* Extract WS 1442 Can Be Assigned to Distinct Phytochemical Fractions. *Planta Medica*. 83(8): 701-709.
- Fürst R, Zirrgiebel U, Totzke F, Zahler S, Vollmar A, Koch E. 2010. The *Crataegus* extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR- β . *Atherosclerosis*. 211(2):409-417.
- García-Mateos R, Ibarra-Estrada E, Nieto-Angel R. 2013. Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus spp.*) of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84:1298-1304.
- Ghimire K, Altmann H, Straub A, Isenberg J. 2017. Nitric oxide: what's new to NO?. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 312(3):C254–C262.
- Gong Y, Yang Y, Chen X, Yang M, Huang D, Yang R, Xiong Z. 2017. Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits. *Biomedicine y Pharmacotherapy*. 91:831-840.
- Hackfort BT, Mishra PK. 2016. Emerging role of hydrogen sulfide-microRNA crosstalk in cardiovascular diseases. *American Journal of physiology Heart and Circulatory Physiology*. 310(7):H802 – H812.
- He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW. 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*. 115:74-85.

- Hellenbrand N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Hensel A. 2015. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus spp.*). *Fitoterapia*. 104:14-22.
- Hernández-Escolar J, Herazo-Beltrán Y, Valero MV. 2010. Frecuencia de factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares en población universitaria joven. *Revista de Salud Pública*. 12(5):852-864.
- Hernández-Pérez A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Rivero-Cruz J, Rojas-Molina A, Rojas-Molina J, Cabrera-Luna J. 2014. Aortic Relaxant Activity of *Crataegus gracilior* Phipps and Identification of Some of Its Chemical Constituents. *Molecules*. 19(12).
- Hohmann N, Xia N, Steinkamp-Fenske K, Förstermann U, Li H. 2016. Estrogen Receptor Signaling and the PI3K/Akt Pathway Are Involved in Betulinic Acid-Induced eNOS Activation. *Molecules*. 21(8).
- Holubarsch CJ, Colucci WS, Eha J. 2018. Benefit-Risk Assessment of *Crataegus* Extract WS 1442: An Evidence-Based Review. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 18(1):25–36.
- Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez D, Hernández-Sandoval L. 2010. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*. 48 (7):732-739.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2018. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Consultado en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodem/DEFUNCIONES2017.pdf> [consultada el 6 de septiembre del 2019].

- Koch E, Malek FA. 2011. Standardized Extracts from Hawthorn Leaves and Flowers in the Treatment of Cardiovascular Disorders – Preclinical and Clinical Studies. *Planta Medica*. 77:1123–1128.
- Kram L, Grambow E, Mueller-Graf F, Sorg H, Vollmar B. 2013. The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. *Thrombosis Research*. 132(2):e112–e117.
- Kumar D, Arya V, Bhat ZA, Khan NA, Prasad DN. 2012. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 5(22):1187-1200.
- Levine GN. 2014. *Cardiología Secretos*. 4a. Edición. Editorial Elsevier, Barcelona, España.
- Li Q, Zhao W, Zeng X, Hao Z. 2018. Ursolic Acid Attenuates Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice: Role of LOX-1 Mediated by ROS/NF- κ B Pathway. *Molecules*. 23(5), 1101.
- Loh YC, Tan CS, Chang YS, Yeap ZQ, Ng CH, Yam MF. 2018. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(1):120.
- López-Santiago J, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego AF, Rodríguez-Pérez E., Colinas-Leon, M. T., Borys, M. W. y col. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus spp.*). *Revista Chapingo serie horticultura*. 14(2):97-111.
- Lozano-Mena G, Sánchez-González M, Juan EM, Planas JM. 2014. Maslinic Acid, a Natural Phytoalexin-Type Triterpene from Olives — A Promising Nutraceutical? *Molecules*. 19(8), 11538-59.

- Luna-Vázquez F, Ibarra-Alvarado C, Camacho-Corona M, Rojas-Molina A, Rojas-Molina J, García A, Bah M. 2018. Vasodilator Activity of Compounds Isolated from Plants Used in Mexican Traditional Medicine. *Molecules*. 23(6).
- Luna-Vázquez F, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Romo-Mancillas A, López-Vallejo F, Solís-Gutiérrez M, Rivero-Cruz F. 2016. Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Vasodilator Effect of Ursolic Acid and Uvaol from Black Cherry *Prunus serotina* Fruits. *Molecules*. 21(1).
- Lund JA, Brown PN, Shipley PR. 2017. Differentiation of *Crataegus spp.* guided by nuclear magnetic resonance spectrometry with chemometric analyses. *Phytochemistry*. 141:11-19.
- Moreno PR, Portillo JH. 2016. Isquemia miocárdica: conceptos básicos, diagnóstico e implicaciones clínicas. Segunda parte. *Revista Colombiana de Cardiología*. 23(6): 461-582.
- Moreu-Burgos J, Macaya-Miguel C. 2007. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología*. 7:19-25.
- Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SM. 2015. Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients*. 7(9):7708–7728.
- Newman DJ, Cragg GM. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*. 79:629–661.
- Novakovic A, Marinko M, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Nenezic D, He GW. 2017. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of procyanidin B2 on human internal mammary artery. *European Journal of Pharmacology*. 807:75-81.

- Núñez-Colín CA, Hernández-Martínez MÁ. 2011. La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus spp.*) En México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2(1):141-153.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Enfermedades cardiovasculares. Consultado en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [consultada el 6 de Abril del 2018].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018. Medicina tradicional. Consultado en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/ [consultada el 2 de Abril del 2018].
- Palencia M, Combatt E, Arrieta Á. 2016. Estudio fitoquímico de las hojas de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. Revista de la Sociedad Química del Perú. 82(3).
- Pandolfi A, De Filippis EA. 2007. Chronic hyperglycemia and nitric oxide bioavailability play a pivotal role in pro-atherogenic vascular modifications. Genes y Nutrition. 2(2):195–208.
- Pawlaczyk-Graja I. 2018. Polyphenolic-polysaccharide conjugates from flowers and fruits of single-seeded hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq.*): Chemical profiles and mechanisms of anticoagulant activity. International Journal of Biological Macromolecules. 116:869-879.
- Pereira-Vatanabe I, Dos Santos-Rodrigues CN, Cristina-Buzinari T, Francisco de Moraes T, Santana da Silva R, Rodrigues JG. 2017. Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats. Sociedad brasileira de cardiologia. 109(2):124–131.
- Peters W, Druempel V, Kusche-Vihrog K, Schubert C, Oberleithner H. 2012. Nanomechanics and Sodium Permeability of Endothelial Surface Layer Modulated by Hawthorn Extract WS 1442. Plos One. 7(1).

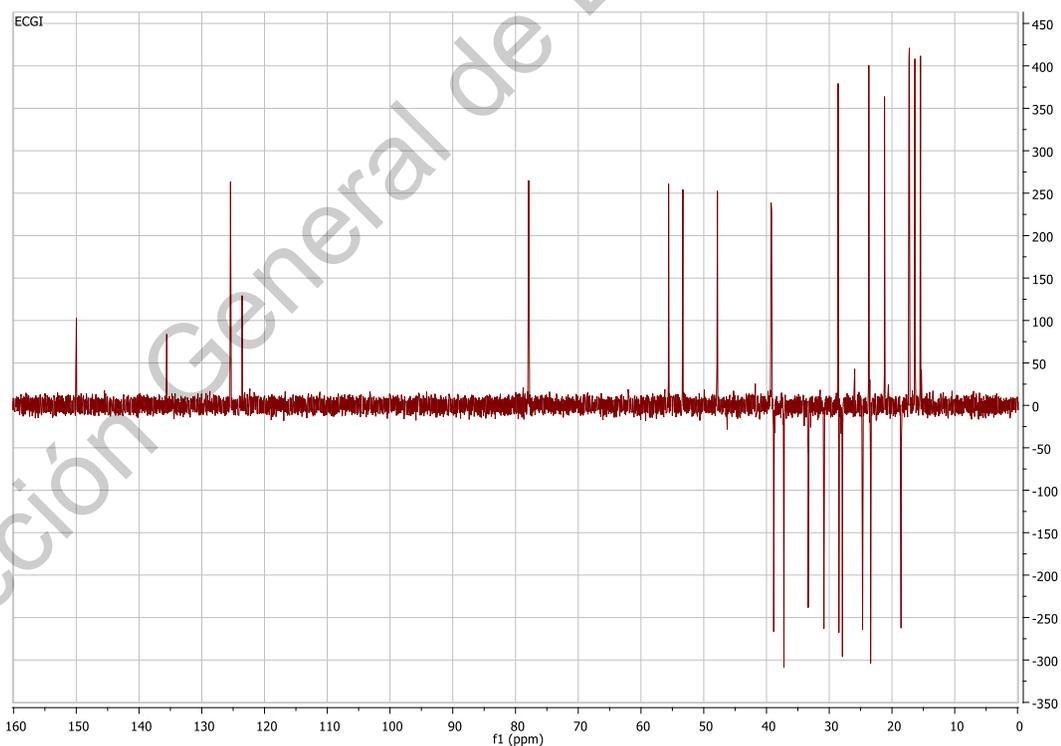
- Phipps JB, O'Kennon RJ, Lance RW. 2003. Hawthors and medlars. Royal Horticultural Society. Plant Collection Guide. Editorial Timber Press, Portland, USA.
- Piedra-Malagón EM, Albarrán-Lara AL, Rull J, Piñero D, Sosa V. 2016. Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei* complex. *Systematics and Biodiversity*. 14(2):244-260.
- Planes N, Digman MA, Vanderheyden PP, Gratton E. 2019. Number and brightness analysis to study spatio-temporal distribution of the angiotensin II AT₁ and the endothelin-1 ET_A receptors: Influence of ligand binding. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1863:917–924.
- Pluchart H, Khouri C, Blaise S, Roustit M, Cracowski JL. 2017. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends in pharmacological sciences*. 38(6):512-523.
- Rastogi S, Mohan Pandey M, Rawat A. 2016. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine*. 23:1082–1089.
- Ruiz-Jiménez MÁ. 2003. Factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes. 1ra. Edición. Editorial Díaz de Santos, Madrid España.
- Sato A, Ueda C, Kimura R, Kobayashi C, Yamazaki Y, Ebina K. 2018. Angiotensin II induces the aggregation of native and oxidized low-density lipoprotein. *European Biophysics Journal*. 47(1):1-9.
- Saturno-Chiu G. 2017. *Cardiología*. 1ra. Edición. Editorial El Manual Moderno, México.
- Seidelmann SB, Lighthouse JK, Greif DM. 2014. Development and pathologies of the arterial wall. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71(11):1977–1999.

- Svedström U, Vuorela H, Kostianen R, Tuominen J, Kokkonen J, Rauha JP, Hiltunen R. 2002. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*. 60(8):821-825.
- Tassell MC, Kingston R, Gilroy D, Lehane M, Furey A. 2010. Hawthorn (*Crataegus spp.*) in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacognosy Reviews*. 4(7):32–41.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Papageorgiou CT, Stefanadis C. 2012. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*. 10(1).
- Wang J, Xiong X, Feng B. 2013. Effect of *Crataegus* Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 16.
- Wang R. 2009. Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney International*. 76(7):700-704.
- Wang X, Liu Y, Xiao L, Li L, Zhao X, Yang L, Zhang J. 2018. Hyperoside Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling via the AKT Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 51(2):827-841.
- Wen L, Guo R, You L, Abbasi AM, Li T, Fu X, Liu RH. 2017. Major triterpenoids in Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" and their effects on cell proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 100:149-160.
- Willer E, Malli R, Bondarenko A, Zahler S, Vollmar A, Graier W, Fürst R. 2012. The vascular barrier-protecting hawthorn extract WS® 1442 raises endothelial calcium levels by inhibition of SERCA and activation of the IP3 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 53(4):567-577.
- Xiao R, Xiang AL, Pang HB, Liu KQ. 2017. Hyperoside protects against hypoxia/reoxygenation induced injury in cardiomyocytes by suppressing the Bnip3 expression. *Gene*. 629:86-91.

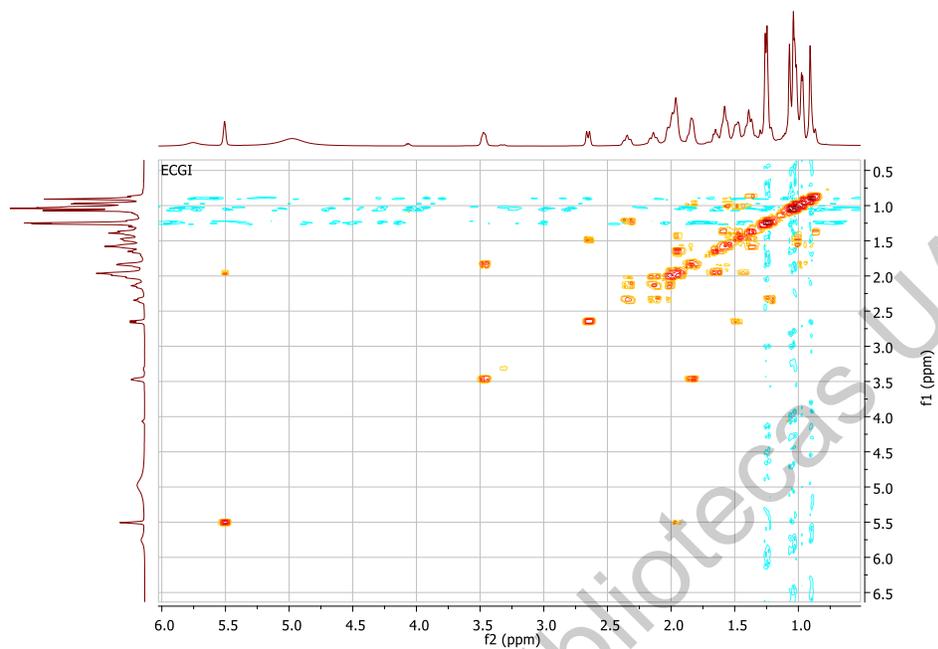
- Yang B, Liu P. 2012. Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus spp.*) of different origins. *Journal of the science of food and agriculture*. 92(8):1578–1590.
- Zeng L, Pons-Mercadé P, Richard T, Krisa S, Teissèdre P, Jourdes M. 2019. Crown Procyanidin Tetramer: A Procyanidin with an Unusual Cyclic Skeleton with a Potent Protective Effect against Amyloid- β -Induced Toxicity. *Molecules*. 24(10).
- Zhang S, Guo C, Chen Z, Zhang P, Li J, Li Y. 2017. Vitexin alleviates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing autophagy via AMPK signaling activation. *Molecular Immunology*. 85:214-221.
- Zhao Y, Su K, Wang G, Zhang L, Zhang J, Li J. 2017. High density genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping for hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge). *Scientific Reports*. 7(5492):1-10.
- Zhao Y, Vanhoutte P, Leung SW. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 129(2):83-94.
- Zorniak M, Szydło B, Krzeminski T. 2017. *Crataegus* Special Extract Ws 1442: Up-To-Date Review Of Experimental And Clinical Experiences. *Journal Of Physiology and Pharmacology*, 68(4), 521-526.

11. ANEXO

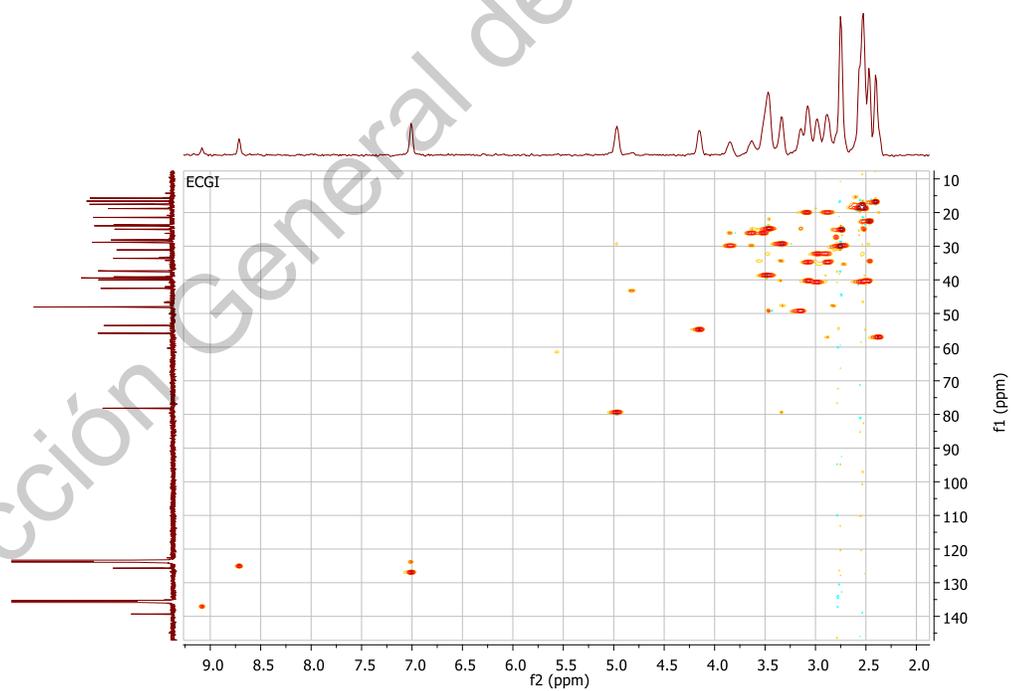
Figura		Página
A-1	Espectro DEPT 135° del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C ₅ D ₅ N)	65
A-2	Espectro COSY del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C ₅ D ₅ N).	66
A-3	Espectro HSQC del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C ₅ D ₅ N)	66
A-4	Espectro HMBC del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C ₅ D ₅ N)	67
A-5	Espectro de RMN de ¹ H del pico identificado como ácido euscápico en la fracción ECRD-199-3	68



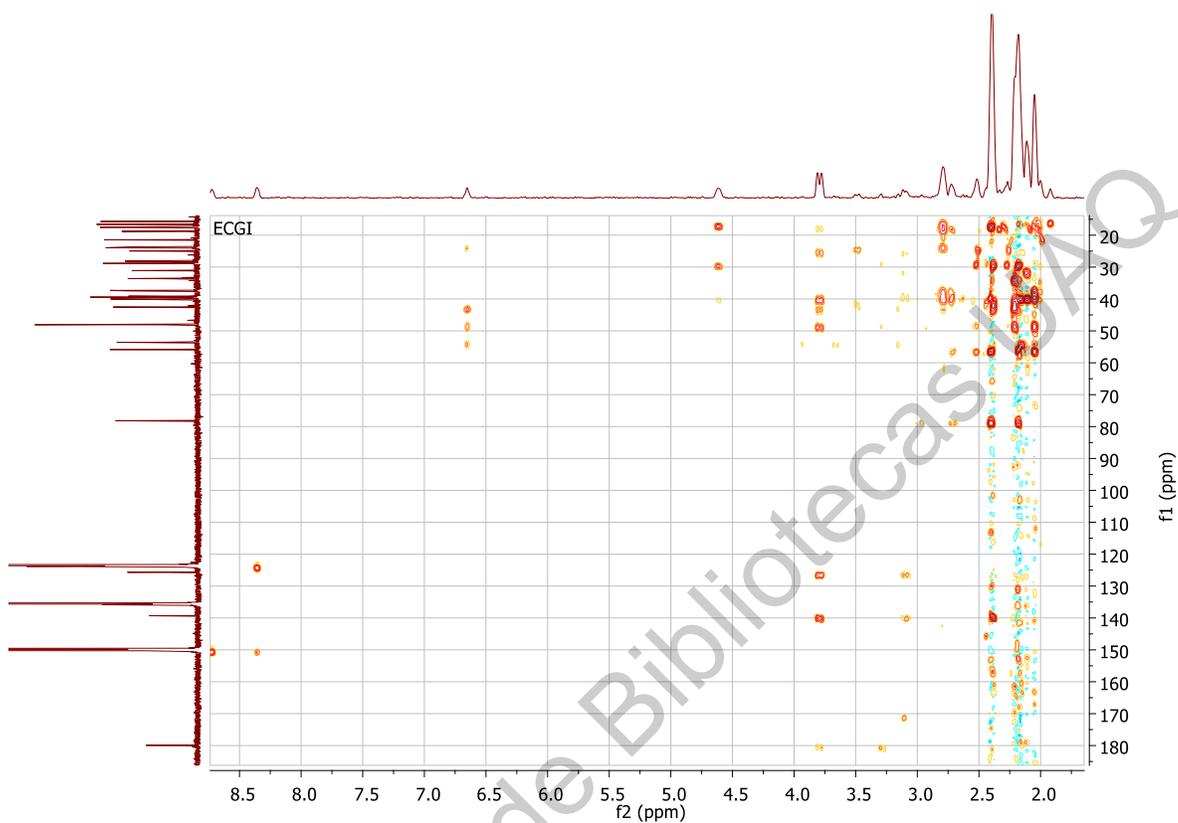
A-1. Espectro DEPT 135° del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C₅D₅N).



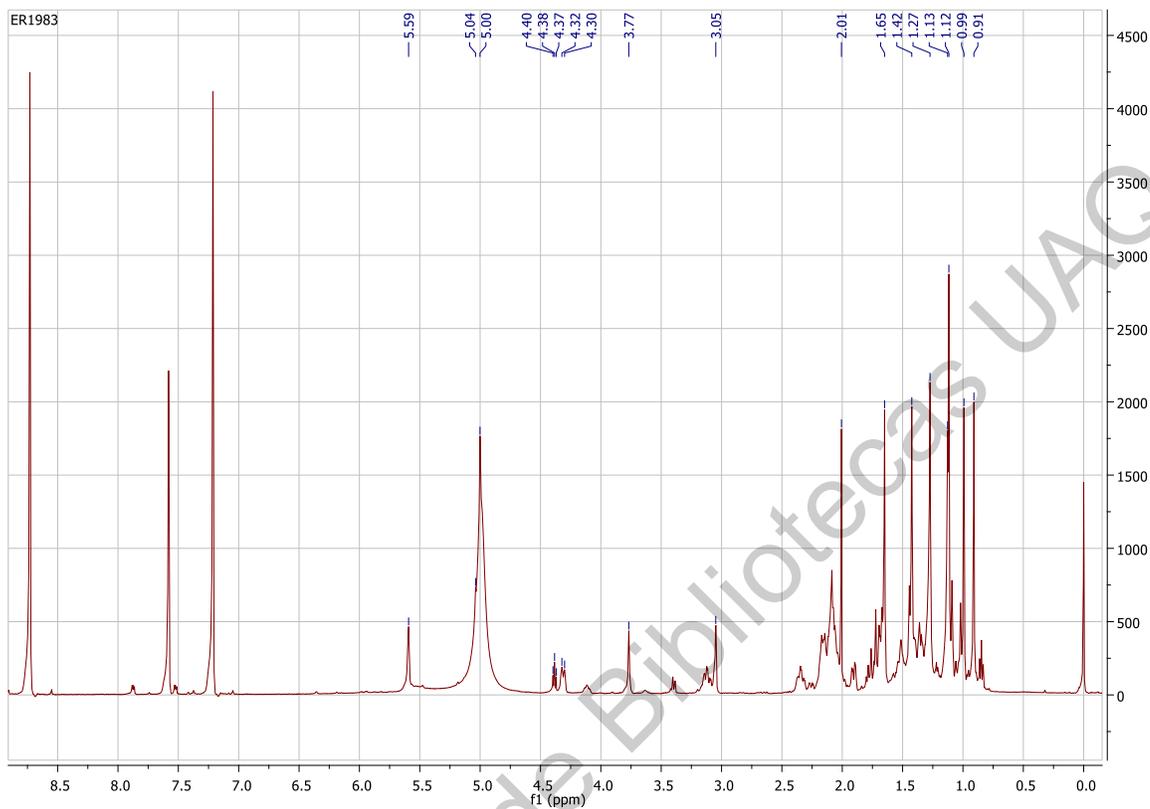
A-2. Espectro COSY del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico
(C_5D_5N).



A-3. Espectro HSQC del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico
(C_5D_5N).



A-4. Espectro HMBC del compuesto ECGI identificado como ácido ursólico (C_5D_5N).



A-5. Espectro de RMN de ^1H del pico identificado como ácido euscáptico en la fracción ECRD-199-3.