

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PLANTAS EMPLEADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL
MEXICANA COMO FUENTES POTENCIALES DE
COMPUESTOS CON EFECTO SOBRE
EL SISTEMA CARDIOVASCULAR”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

KARLA BRENDA GONZÁLEZ DAMIÁN

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. #71647

No. Título _____

Clas 7 TS

615.320972

67643p



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“PLANTAS EMPLEADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL
MEXICANA COMO FUENTES POTENCIALES DE
COMPUESTOS CON EFECTO SOBRE
EL SISTEMA CARDIOVASCULAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KARLA BRENDA GONZÁLEZ DAMIÁN

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODALES

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

DIRECTOR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODAL

Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ

SINODAL

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Importancia de los principios activos aislados de plantas medicinales	3
II.2 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México	4
II.3 Especies seleccionadas para realizar el estudio farmacológico	5
II.4 Fisiología de los vasos sanguíneos	7
II.4.1 Estructura de la pared vascular	7
II.4.2 Estructura y funciones del endotelio vascular	8
II.4.3 Factores relajantes derivados del endotelio	10
II.4.4 Factores constrictores derivados del endotelio	13
II.4.5 Músculo liso	14
II.4.6 Mecanismos de relajación del músculo liso vascular dependientes de GMPc	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V.1 MATERIALES	20
V.1.1 Plantas objeto de estudio	20
V.1.2 Animales de experimentación	20
V.2. MÉTODOS	20
V.2.1 Recolecta del material vegetal	20
V.2.2 Preparación de los extractos vegetales	20

V.2.3 Ensayo de aorta aislada de rata	20
V.2.4 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica	20
VI. RESULTADOS	23
VI.1 Evaluación del efecto sobre el tono de la aorta aislada de rata de los extractos acuosos preparados	23
VI.2 Comparación del efecto de la acetilcolina y del extracto de <i>D. moldavica</i>	24
VI.3 Efecto vasorelajante de los compuestos presentes en los extractos acuosos de <i>S. edule</i> y <i>A. mexicana</i> sobre la aorta libre de endotelio	26
VI.4 Efecto vasorelajante de los compuestos presentes en <i>D. moldavica</i> , <i>Magnolia sp.</i> y <i>D. grahami</i> sobre el músculo liso arterial en presencia de nifedipina	28
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. CONCLUSIONES	36
IX. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Especies vegetales de la flora medicinal mexicana seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar	6
2	CE ₅₀ y E _{max} del efecto relajante inducido por los extractos de todas las especies estudiadas sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de rata intacta	24
3	Comparación del efecto vasorelajante de la acetilcolina y del extracto de <i>D. moldavica</i>	26
4	CE ₅₀ y E _{max} de los extractos acuosos de <i>S. edule</i> y <i>A. mexicana</i> en presencia y en ausencia de endotelio	27
5	CE ₅₀ y E _{max} del los extractos acuosos de <i>Magnolia sp.</i> , <i>D. moldavica</i> y <i>D. grahami</i> en presencia y en ausencia de nifedipina	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales causas de muerte en México	4
2	Estructura de la pared vascular	8
3	Localización del endotelio y liberación de factores endoteliales	9
4	Mecanismos de la relajación, dependiente de endotelio, del músculo liso vascular	12
5	Regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula del músculo liso por medio del GMPc	17
6	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos acuosos de las especies vegetales estudiadas	23
7	Curvas concentración-respuesta de la ACh y del extracto de <i>D. moldavica</i> que muestra la elevada potencia de la ACh con respecto al extracto de esta especie vegetal	25
8	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos acuosos de A) <i>S. edule</i> y B) <i>A. mexicana</i> en presencia y ausencia de endotelio	27
9	Curva concentración-respuesta del efecto vasorelajante del extracto acuoso de <i>Magnolia sp.</i> en presencia y ausencia de nifedipina	30
10	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos de A) <i>D. moldavica</i> y B) <i>D. grahami</i> en presencia y ausencia de nifedipina	30

RESUMEN

Nuestro país posee una gran biodiversidad en especies vegetales y una tradición milenaria en el empleo de la medicina tradicional. Sin embargo, existe pocos estudios encaminados a validar el efecto farmacológico que se les atribuye a una gran cantidad de plantas medicinales mexicanas. En la actualidad, estos estudios son de particular importancia en el caso de las plantas empleadas tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, ya que este tipo de padecimientos ocupan el primer lugar de las causas de muerte en México. De manera adicional, la investigación fitoquímica y farmacológica de plantas medicinales puede conducir al descubrimiento o desarrollo de nuevas moléculas bioactivas potencialmente útiles para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan el sistema cardiovascular, tales como la hipertensión o la angina pectoris. Por las razones anteriormente mencionadas, se planteó la presente tesis que tiene como objetivo realizar un rastreo farmacológico de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para tratar enfermedades cardiovasculares, el cual incluyó la investigación bibliográfica, la recolección de las especies vegetales, el proceso de obtención de los extractos acuosos de las plantas seleccionadas y su evaluación farmacológica. Las especies seleccionadas fueron: *Desmodium grahami*, *Sechium edule*, *Magnolia sp.*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* y *Chirantodendron pentadactylum*. Los resultados de este trabajo indicaron que los extractos acuosos de todas las plantas estudiadas indujeron la relajación de los vasos sanguíneos. Los extractos de las plantas *C. pentadactylum* y *D. moldavica* fueron las más eficaces. Los extractos de las plantas *S. edule*, *D. moldavica*, *A. mexicana* y *C. pentadactylum* contienen compuestos bioactivos capaces de interactuar con receptores o canales iónicos en el músculo liso arterial, lo cual da como resultado la relajación de la aorta.

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente el 75% de la población mundial, utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus problemas de salud, y se puede afirmar que gran parte de las terapias tradicionales se basan en el uso de extractos o de principios activos obtenidos de plantas. Si bien es cierto que la mayor parte de los usuarios de la medicina tradicional se encuentran en los países en vías de desarrollo, en los países industrializados existe un interés creciente por el uso de plantas con fines curativos. Posiblemente, la causa del resurgimiento de la medicina tradicional en los países del primer mundo sea una consecuencia de la alta incidencia de enfermedades iatrogénicas ocasionadas por muchos medicamentos sintéticos.

Asimismo, se ha demostrado que las plantas y los otros recursos que se emplean en la medicina tradicional, constituyen fuentes potenciales valiosas para la obtención de productos farmacéuticos con aplicación terapéutica. En el caso particular de México, es bien conocido el hecho de que nuestro país posee una gran tradición en el empleo de plantas medicinales, la cual se remonta desde la época prehispánica. En la actualidad gran parte de la población mexicana, principalmente la de bajos recursos económicos, hace uso de las plantas medicinales para la cura de un sinnúmero de enfermedades, entre las que se incluyen las enfermedades cardiovasculares, las cuales representan la principal causa de mortalidad en nuestro país.

A pesar de que en México existe una gran tradición en el empleo de plantas medicinales y que la biodiversidad de nuestro país se encuentra entre las tres primeras a nivel mundial, existen pocos estudios multidisciplinarios que involucren investigaciones etnomédicas, químicas y farmacológicas de plantas medicinales mexicanas.

Con base en estas consideraciones, se realizó el presente proyecto de tesis que tuvo como meta realizar la evaluación farmacológica de especies de la flora medicinal mexicana con el objeto de identificar fuentes potenciales de principios activos útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Las especies

seleccionadas son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversas afecciones cardiovasculares que incluyen enfermedades cardíacas, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis e hipertensión, entre otras. También se contempló la evaluación farmacológica del extracto de la especie vegetal *Desmodium grahami*, ya que estudios previos indicaron que presenta un efecto relajante de la musculatura lisa intestinal. Los resultados de esta tesis indicaron que los extractos de todas las especies vegetales evaluadas relajan la musculatura lisa arterial, lo cual valida, al menos en parte, el uso etnomédico que se les da a estas plantas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Importancia de los principios activos aislados de plantas medicinales

Los productos naturales constituyen una fuente alternativa muy valiosa en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. Un elevado porcentaje de los medicamentos que se utilizan actualmente contienen principios activos de origen natural, principalmente vegetal. Asimismo, un gran número de sustancias naturales han representado prototipos estructurales para la síntesis de fármacos análogos con mayor actividad biológica (Cordell, 2000). De manera adicional, muchos compuestos naturales se emplean como instrumentos de investigación útiles en el estudio de distintos procesos fisiológicos y/o farmacológicos. En la actualidad, el estudio de los productos naturales constituye un campo de investigación muy importante en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, como lo demuestra un estudio recientemente realizado por la Agencia de Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, en el período de 1983 a 1994, el cual indicó que el 30% de los fármacos aprobados en ese lapso eran productos naturales o sustancias derivadas de ellos (Cragg y col., 1997).

En el caso particular de México, se sabe que nuestro país posee una gran biodiversidad de especies animales y vegetales, que constituye una de las más importantes del mundo, junto con las de Australia y Brasil (Mittermier, 1988). Con relación a las especies vegetales, se estima que la flora de México incluye más de 21,600 especies (Rzedowski, 1993) y de acuerdo a un estudio realizado por el Instituto Nacional Indigenista, en el que se recopiló información a partir de médicos tradicionales, herbarios y varias fuentes bibliográficas, se determinó que 3103 especies vegetales, pertenecientes a 183 familias son actualmente utilizadas en México con fines medicinales (Aguilar y col., 1994). De estas especies se ha descrito un grupo básico de 1000 plantas que ha sido empleado en la medicina tradicional de México durante casi 400 años. Las gran mayoría de estas especies son utilizadas para el tratamiento de enfermedades comunes tales como

infecciones respiratorias y de la piel, desórdenes gastrointestinales, hipertensión, dolor y diabetes o para inducir el sueño o el parto (Lozoya, 1994).

A la fecha, aunque existe un interés creciente por estudiar los recursos naturales del país como fuente de moléculas bioactivas, aún son muy escasos los estudios multidisciplinarios encaminados a investigar, de manera integral, las plantas y los animales que comprenden la gran biodiversidad de México. Recientemente, en la Facultad de Química de la U.A.Q. se inició un proyecto encaminado a detectar especies vegetales que constituyan fuentes potenciales de compuestos con actividad sobre el sistema cardiovascular y esta tesis forma parte de dicho proyecto.

11.2 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México

Las enfermedades cardiovasculares representan, desde hace más de una década, la principal causa de muerte en nuestro país (Velázquez-Monroy y col., 2003) y continuó siendo hasta el 2005, según los últimos datos estadísticos proporcionados por el INEGI (2005).

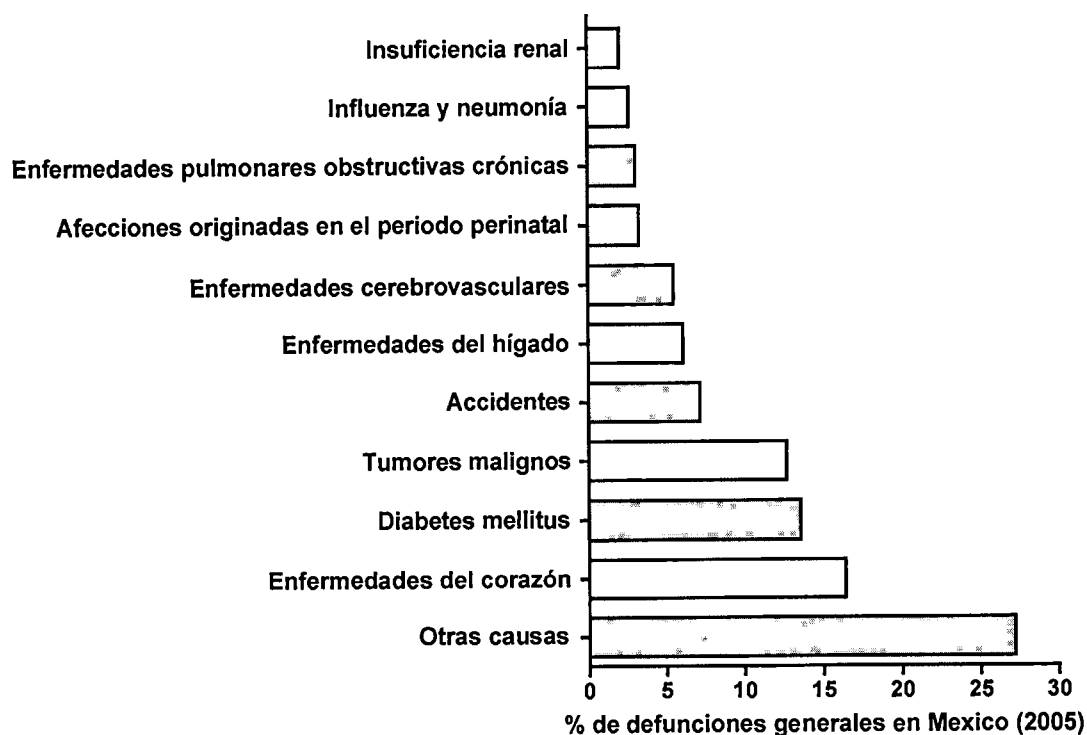


Figura 1. Principales causas de muerte en México (INEGI, 2005)

En la Figura 1 se muestran las principales causas de muerte en México. En primer lugar se encuentran las enfermedades del corazón con un porcentaje de defunciones del 16.4 % y, en sexto lugar, se encuentran las enfermedades cerebrovasculares con un porcentaje de defunciones del 5.5 %. Estos dos grupos de enfermedades representan las enfermedades cardiovasculares, las cuales causan aproximadamente el 20 % de las defunciones en México (INEGI, 2005).

II.3 Especies seleccionadas para realizar el estudio farmacológico

Las plantas seleccionadas para su estudio han sido utilizadas durante años, principalmente por los pueblos indígenas. La mayoría se preparan en infusión, ya sea solas o combinadas con otras plantas. Por ejemplo, la flor de manita se mezcla con magnolia y tila para tratar la hipertensión y el insomnio. La magnolia sola y el toronjil blanco se utilizan preparadas en tinturas (Quiroz, 2000).

Las especies seleccionadas han sido objeto de estudios químicos y farmacológicos previos. Sin embargo, su efecto sobre el tono del músculo liso vascular no se ha determinado con anterioridad, con excepción de *Chiranthodendron pentadactylon*. A continuación se presenta información relacionada con las investigaciones que se han realizado previamente sobre las plantas objeto del presente estudio (Cuadro 1).

En un estudio farmacológico recientemente realizado con el extracto acuoso de *Agastache mexicana*, se observó que esta especie presenta un efecto ansiolítico en ratas (Molina y col., 2000). Otra especie que también ha sido estudiada desde un punto de vista farmacológico es *Sechium edule*, cuyo extracto acuoso, administrado por vía intravenosa en ratas anestesiadas, induce un efecto antihipertensivo (Gordon y col., 2000).

Por otra parte, *D. grahami* también ha sido objeto de estudios farmacológicos. En estos estudios se encontró que el extracto clorofórmico-metanólico 1:1 de *Desmodium grahami* induce una relajación, dependiente de la concentración, de la musculatura lisa intestinal (Rojas y col., 1999). En otro estudio, se analizó el perfil cromatográfico de los aceites esenciales de *Dracocephalum moldavica*, en el cual se identificaron diferentes ácidos grasos esterificados con

glicerol (Holcapek y col., 2003) y otros metabolitos secundarios que incluyen algunos terpenoides (Li y Sing, 2001).

Cuadro 1. Especies vegetales de la flora medicinal mexicana seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar (Argueta, 1994; Aguilar y col., 1994)

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	USOS
<i>Agastache mexicana</i>	Toronjil blanco o morado	Hipertensión, dolor, problemas del corazón
<i>Magnolia sp.</i>	Magnolia	Enfermedades del corazón, hipertensión, dolor de cabeza, mareos, alivia dolor (analgésico)
<i>Sechium edule</i>	Chayote, calabaza con espinas, quelite espinoso	Disminuye la presión arterial, fiebre, abortivo, disminuye el flujo nasal
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	Flor de manita, mano de león	Afecciones del corazón
<i>Dracocephalum moldavica</i>	Toronjil chino o azul	Regula la presión
<i>Desmodium grahami</i>	Pega ropa	Antiespasmódico

Chiranthodendron pentadactylon es la única especie cuyo efecto sobre la musculatura lisa arterial ha sido determinado en un estudio previo. En dicho estudio, se demostró que el extracto acuoso de esta planta inhibe las contracciones inducidas por noradrenalina en aorta aislada de rata. Sin embargo, en este trabajo no se propone el mecanismo de acción que está involucrado en el efecto relajante producido por el extracto (Perusquia y col., 1995).

Finalmente, algunas especies del género *Magnolia* han sido investigadas. Por ejemplo de *Magnolia obsuata* (Kotani y col., 2005) y *Magnolia officinalis* (Chen y col., 2001) se han purificado los alcoholes magnolol y honokiol, que tienen

actividad farmacológica. El magnolol es un potente antioxidante y antihiperglicemiante (Chen y col., 2001). Por otra parte, el honokiol tiene efectos antiarrítmicos y cardioprotectores, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Tsai y col., 1996).

Con base en los antecedentes antes mencionados, resulta evidente que en la actualidad se desconoce, o no se ha estudiado con suficiente profundidad, el efecto que producen los extractos de las plantas seleccionadas sobre el tono del músculo liso vascular. Se desconoce también cuál es la estructura química de los principios activos responsables del efecto farmacológico que se les atribuye a las plantas y evidentemente, no se ha determinado el mecanismo de acción de dichos principios activos. Para la realización de este proyecto se empleó el modelo farmacológico de aorta aislada de rata. Por este motivo, se presentan algunos antecedentes teóricos relacionados con la fisiología de los vasos sanguíneos y con el proceso de contracción de la musculatura lisa vascular.

II.4 Fisiología de los vasos sanguíneos

II.4.1 Estructura de la pared vascular

La pared vascular es un órgano activo, flexible e integrado por componentes celulares, como las células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos, y componentes no celulares, como la matriz extracelular (Risler y col., 2002).

En el sistema arterial, la organización básica de todas las arterias es similar. En todos los tipos de arterias se pueden distinguir tres capas concéntricas: a) una capa interna, la túnica íntima, constituida por células endoteliales, con su eje mayor orientado longitudinalmente; b) una capa media ó túnica media, compuesta fundamentalmente por células musculares lisas, dispuestas circularmente, y c) una capa externa, la túnica adventicia, constituida por fibroblastos y fibras de colágeno que están orientadas longitudinalmente. La capa íntima y la media están separadas por la lámina elástica interna, y la media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa (Figura 2) (Navarro-Cid y col., 1999).

La túnica íntima de las arterias elásticas está constituida por el endotelio y un espacio subendotelial compuesto por una matriz extracelular (Ganong, 2000). El

principal componente de la túnica media en las arterias elásticas es la elastina, que proporciona al vaso la elasticidad necesaria para adaptarse a los cambios de presión originados por el flujo pulsátil del corazón y dota a estas arterias de una capacidad de amortiguación que permite mantener un flujo sanguíneo continuo (Navarro-Cid y col., 1999). Por otro lado, la túnica adventicia está constituida por fibroblastos incluidos en una matriz extracelular compuesta de grandes haces de fibras de colágeno y una red laxa de fibras elásticas. En la túnica adventicia se observan las terminaciones nerviosas y pequeños capilares que penetran ligeramente en la media (Navarro-Cid y col., 1999; Ganong, 2000).

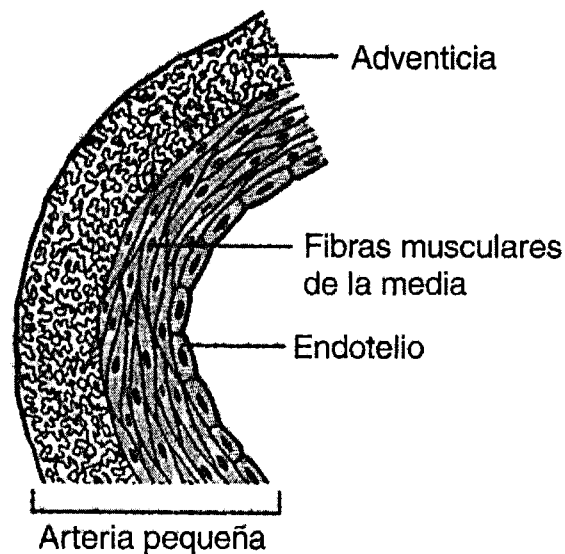


Figura 2. Estructura de la pared vascular (Guyton y Hall, 2001)

II.4.2 Estructura y funciones del endotelio vascular

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales. Las células endoteliales se encuentran entre la sangre circulante y las capas media y adventicia de los vasos sanguíneos, y son capaces de registrar cambios hemodinámicos de la sangre, como la presión o las fuerzas de cizallamiento, cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos, o modificaciones de mensajeros químicos circulantes o procedentes de células vecinas y, en consecuencia, responden a dichos cambios mediante la liberación de

numerosos factores vasoactivos (Figura 3) (Navarro-Cid y col., 1999; Ganong, 2000; Dejana y col., 1995).

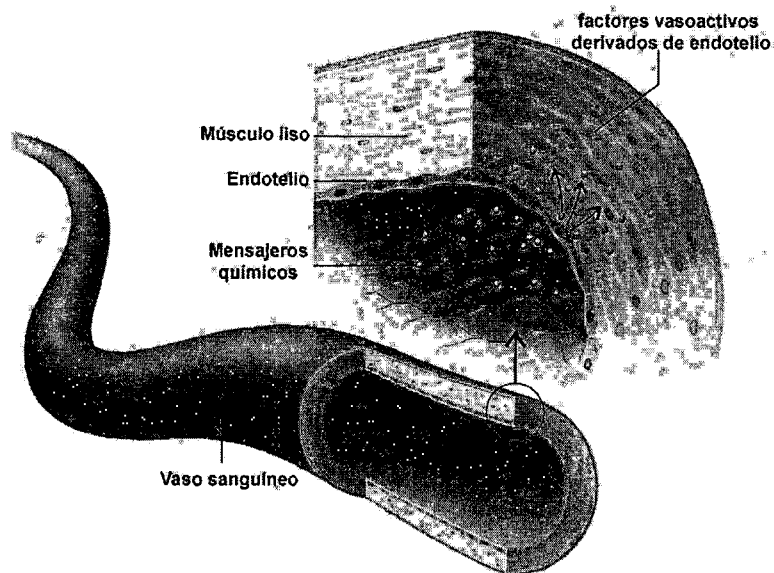


Figura 3. Localización del endotelio y liberación de factores endoteliales

Por estas razones, en la actualidad el endotelio es considerado como el principal órgano de regulación vascular con acción exocrina, paracrina y autocrina, que está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunitarios. Entre los factores biológicamente activos sintetizados y liberados por las células endoteliales destacan: la prostaciclina (PGI_2), el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), la endotelina (ET), la prostaglandina H_2 (PGH_2), el tromboxano A_2 (TXA_2), los sulfato heparinoides, el factor de crecimiento transformante β ($TGF\beta$), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), el factor derivado de plaquetas (PDGF), el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), especies reactivas de oxígeno (aniones superóxido e hidroxilo, peróxido de hidrógeno), interleucinas, quimiocinas, moléculas de adhesión de monocitos, entre otros. Las células endoteliales están firmemente unidas entre sí y se encuentran ancladas a las proteínas de la matriz

subendotelial, de manera que se asegure la función de barrera del tejido, evitando la exposición al torrente sanguíneo de la lámina basal (Dejana y col., 1995).

En condiciones normales, el endotelio manifiesta una importante actividad antitrombógena que permite las acciones del NO y la PGI₂, que inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria, mediante aumentos respectivos de la concentración intraplaquetaria de GMPc y AMPc. En condiciones fisiológicas, predominan las acciones antiagregantes y anticoagulantes, mientras que en pacientes hipertensos, dislipidémicos o diabéticos sucede lo contrario, por lo que el endotelio participa en las complicaciones trombóticas de estos trastornos (Navarro-Cid y col., 1999).

El mantenimiento del tono vasomotor depende de forma decisiva del equilibrio entre las acciones relajantes del músculo liso vascular mediadas por el NO, la PGI₂ y el EDHF, y las acciones constrictoras de la ET-1 y el TXA₂. Los factores relajantes derivados del endotelio, y en especial el NO, además de equilibrar las acciones constrictoras mencionadas, también equilibran las de agentes con acción sistémica como la angiotensina II, las catecolaminas y la vasopresina (Moncada y Higgs, 1991).

II.4.3 Factores relajantes derivados del endotelio

La PGI₂ se sintetiza predominantemente en las células endoteliales vasculares a partir del ácido araquidónico, mediante la acción del complejo enzimático ciclooxigenasa-PGI₂ sintetasa. Sus principales acciones son: inhibición de la agregación plaquetaria y relajación de las células musculares lisas (Coleman y col., 1994).

Sin embargo, no parece probable que la PGI₂ esté ejerciendo un efecto tónico vasodilatador sobre el músculo liso, y por tanto, su participación en el control de la presión arterial en condiciones normales no parece ser relevante. Su mecanismo de acción celular depende de la activación de la adenilato ciclasa y se inactiva mediante una degradación enzimática (Coleman y col., 1994).

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de la PGI₂ son la angiotensina II, la acetilcolina (ACh) o la bradiquina (BK), así como

productos liberados de las plaquetas como la serotonina y el PDGF (Figura 4) (Navarro-Cid y col., 1999).

Por otra parte, el óxido nítrico se sintetiza a partir de la arginina en una reacción catabolizada por la oxido nítrico sintasa (NOS) (Schmidt y col., 1993; Schmidt y Walter, 1994). Se han identificado actualmente tres isoformas de la NOS: NOS_e, forma constitutiva en las células endoteliales; NOS_i, isoforma inducible presente en macrófagos y células musculares lisas; NOS_n, forma neutral constitutiva presente en el tejido nervioso y en estructuras medulares renales. Las NOS_n y NOS_i se activan por los agentes que incrementan la concentración del Ca²⁺ intracelular, entre los cuales se incluyen los vasodilatadores acetilcolina y bradicinina. Sin embargo, la NOS en las células inmaduras no se induce por el Ca²⁺, sino que se activa por las citocinas (Fosterman y col., 1994; Li y Fosterman, 2000; Schmidt y col., 1993). El NO formado por el endotelio difunde hacia las células del músculo liso, en donde activa a la guanililciclase soluble para producir cGMP; éste, a su vez, media la relajación del músculo liso vascular (Figura 4) (Humbert y col., 1990; Ignarro, 1990; Kamisaki y col., 1986).

Asimismo la hemoglobina inactiva al NO. Con el aumento súbito del flujo a un tejido, a consecuencia de la dilatación arteriolar, también se dilatan las arterias en dicho tejido; esta dilatación inducida por el flujo se debe a la liberación local del NO. Los productos de la agregación plaquetaria también producen la liberación del NO y la vasodilatación resultante ayuda a conservar la permeabilidad de los vasos sanguíneos con endotelio intacto. Esto contrasta con los vasos sanguíneos lesionados en los cuales el endotelio se daña en el sitio de la lesión y, por tanto, las plaquetas se agregan para producir vasoconstricción (Murad, 1996).

El NO es un radical muy inestable, que actúa como una hormona paracrina. La acción fundamental del NO es la relajación del músculo liso de la capa media de las arterias y las venas, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células del músculo liso, y la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos del endotelio (Moncada y Higgs, 1991).

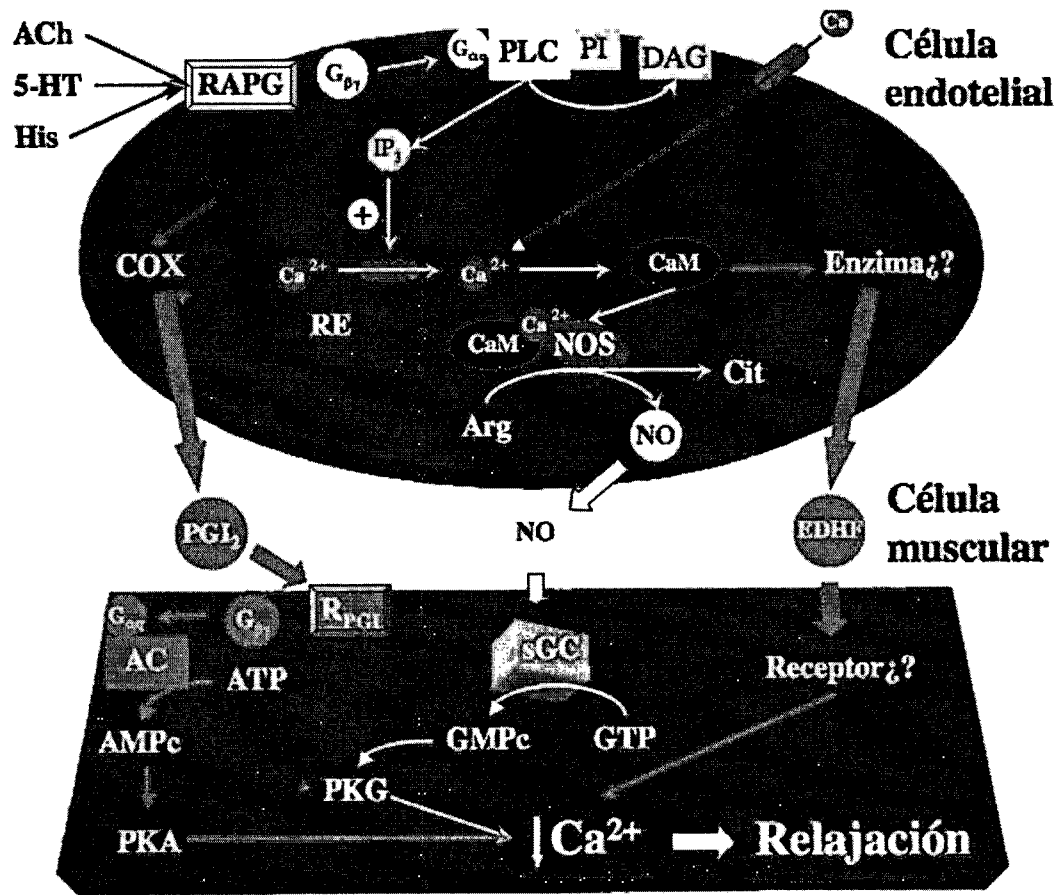


Figura 4. Mecanismos de la relajación, dependiente de endotelio, del músculo liso vascular. Ver detalles en el texto. ACh = acetilcolina, 5-HT = serotonina, His = histamina, RAPG = receptores acoplados a proteínas G, AA = ácido araquidónico, COX = ciclooxigenasa, PGI₂ = prostaciclina, R_{PGI} = receptor a prostaciclina, AC = adenilato ciclasa, PLC = fosfolipasa C, PI = fosfatidilinositol, DAG = diacilglicerol, IP₃ = inositol trifosfato, SOC = canales operados por almacenamiento, CaM = complejo Ca²⁺-calmodulina, NOS = óxido nítrico sintasa, NO = óxido nítrico, sGC = guanilato ciclasa soluble, EDHF = factor hiperpolarizante derivado del endotelio, AMPc = 3',5'-adenosina-monofosfato cíclico, GMPc = 3',5'-guanosina-monofosfato cíclico, PKA = cinasa dependiente de AMPc, PKG= cinasa dependiente de GMPc, GTP = trifosfato de guanosina. Adaptado de Stankevičius y col., 2003.

Como consecuencia, el NO desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, la estructura y la integridad vasculares. Los defectos en la producción de NO contribuyen a la patogénesis de la hipertensión, la trombosis vascular, la aterogénesis, la reestenosis y la lesión prostangioplástica (Hofmann y col., 2000; Pfeifer y col., 1999).

El NO se libera de las células endoteliales en respuesta a numerosos factores tanto físicos como de tipo humoral. El principal factor físico responsable de la liberación del NO por las células endoteliales son las llamadas fuerzas de cizallamiento o la presión ejercida por la sangre sobre el endotelio vascular (Navarro-Cid y col., 1999). Debido a su acción antiagregante plaquetaria, el NO participa junto con la PGI₂ en la inhibición de la agregación plaquetaria (Murad, 1996).

La degradación del NO se produce como consecuencia de la oxidación producida por un radical libre de oxígeno, el anión superóxido, que da lugar al peroxinitrito, el cual a su vez se degrada a otro agente oxidante, el anión hidroxilo y nitrato (Rubbo y col., 1996; Beckman y col., 1994).

Otra sustancia química liberada por el endotelio es el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF). Este factor produce relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular. La hiperpolarización y la relajación inducidas por el EDHF parecen ser debidas a un incremento en la conductancia al K⁺, a través de canales de calcio y ATP dependientes en el músculo liso vascular, ya que la ouabaína, un inhibidor de la Na⁺/K⁺-ATPasa, inhibe su acción. Respecto a su papel fisiológico o fisiopatológico, parece ser un mediador importante en la relajación dependiente del endotelio en las arterias mesentéricas de resistencia (Figura 4) (Navarro-Cid y col., 1999).

II.4.4 Factores constrictores derivados del endotelio

Las células endoteliales también producen ET-1, que es el vasoconstrictor más potente conocido hasta la fecha. La ET-1, la ET-2 y la ET-3 constituyen los miembros de una familia de polipéptidos de 21 aminoácidos similares que producen

una vasoconstricción intensa de las arterias coronarias y efectos inotrópico y cronotrópico positivos en el miocardio (Miwa y col., 1999; Liu y col., 1997).

La ET-1, como otros mediadores derivados del endotelio, se produce bajo condiciones basales, así como por estimulación mecánica, química y humoral. El estímulo más potente para la producción de ET *in vitro* es el ionóforo de calcio A23187, lo que demuestra que un aumento en el calcio intracelular dentro de las células endoteliales es crucial para la producción de ET inducida. La hipoxia es otro estímulo importante para la producción de ET en el tejido vascular aislado, así como en sujetos expuestos a la altitud. En particular, la trombina, la angiotensina II, la adrenalina, la vasopresina, el TGF β , los ésteres de forbol y la interleucina-1 son conocidos estimuladores de la producción de ET-1. La ET estimula el crecimiento y proliferación en muy diversos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales vasculares, musculares lisas, fibroblastos, células gliales y células mesangiales. La ET-1 puede estimular la proliferación del músculo liso de forma indirecta facilitando la producción local de otro potente mitógeno, la angiotensina II (Navarro-Cid y col., 1999).

Es posible que, además de las consecuencias patológicas de su excesiva producción, como el vasoespasmo o la hiperventilación, la ET-1 también podría contribuir a la hemostasis cardiovascular participando en el mantenimiento del tono y de la estructura vascular (Navarro-Cid y col., 1999).

II.4.5 Músculo liso

La capa media y la túnica media están compuestas fundamentalmente por células musculares lisas, algunos fibroblastos y fibras de colágeno, y otros componentes de la matriz intersticial. Las células musculares lisas se encuentran en la pared de todos los vasos sanguíneos a excepción de los capilares, y son las responsables de que los vasos puedan modificar su diámetro, de acuerdo con las necesidades de aporte sanguíneo de cada tejido. Estas células son fusiformes y presentan un único núcleo en posición central. Su disposición es circular, formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso. El músculo liso contiene filamentos de actina y de miosina, de características químicas similares a las del

músculo estriado (Christ y Brink, 2000). Las células musculares lisas contienen una gran cantidad de otra proteína reguladora denominada calmodulina, la cual actúa activando los puentes transversales de miosina. Además, el proceso contráctil es activado por iones de calcio y la energía para la contracción es suministrada por la degradación de ATP a ADP (Huxley, 1969).

Las células musculares lisas pueden formar al menos dos fenotipos diferentes, que se han denominado "sintético" y "contractil". En el fenotipo contráctil, las células son ricas en miofilamentos y en elementos contráctiles, y son capaces de responder a agentes vasoactivos. En el fenotipo sintético, las células musculares pierden elementos contráctiles, se hacen ricas en retículo endoplasmático y complejo de Golgi y pueden responder a moléculas reguladoras de crecimiento y citoquinas (Kargacin y col., 1989).

II.4.6 Mecanismos de relajación del músculo liso vascular dependientes de GMPc

El mecanismo bioquímico que da como resultado la contracción del músculo liso vascular involucra diversas fuerzas que se potencian o antagonizan entre sí para regular la concentración de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Las fuerzas contráctiles elevan el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y/o sensibilizan el ambiente intracelular al Ca^{2+} , mientras que las fuerzas relajantes reducen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y/o desensibilizan el ambiente intracelular al Ca^{2+} . El efecto final de la sumatoria de fuerzas opuestas resulta en la fosforilación de la cadena ligera de miosina de 20 kDa (MLC20) en la serina 19 por la proteína cinasa de la cadena ligera, lo cual produce vasoconstricción. Por el contrario, la defosforilación de la MLC20, causada por la acción de la proteína fosfatasa de la cadena ligera, genera vasorelajación (Bennett y Walkman, 1995).

Una gran cantidad de compuestos exógenos y endógenos, tales como nitrovasodilatadores, NO y péptidos natriuréticos, producen vasorelajación mediante el incremento de la $[\text{GMPc}]_i$. El GMPc relaja las células del músculo liso vascular (CMLV) mediante la desensibilización del sistema contráctil al Ca^{2+} y el decremento en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 5) (Abe y col., 1990; McDaniel y col., 1992).

Aunque se ha propuesto que la proteína cinasa dependiente de GMPc I (PKG I) es la principal responsable de los efectos producidos por el GMPc, no se puede descartar que otras moléculas estén también involucradas. La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), por ejemplo, es una posibilidad, ya que se ha observado una convergencia bioquímica y funcional entre los mecanismos vasorelajantes inducidos por el AMPc y el GMPc (Lucas y col., 2000).

El GMPc induce la relajación del músculo liso vascular principalmente mediante la reducción de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 9). Dependiendo del tejido, la especie y, el fenotipo y el genotipo celulares, el GMPc puede afectar al $[Ca^{2+}]_i$ de cuatro diferentes maneras: 1) reduciendo el influjo de Ca^{2+} ; 2) incrementando la salida de este catión divalente; 3) promoviendo el secuestro de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico; y 4) decreciendo la movilización de este ión. De esta manera, los mecanismos que dependen de GMPc/PKG inhiben canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L por medio de dos mecanismos: una inhibición directa de la actividad del canal y una hiperpolarización indirecta de la superficie de la célula muscular lisa, a través de un incremento en la probabilidad de apertura de canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} (K_{Ca}) (Carrier y col., 1997; Ruiz-Velasco y col., 1998). Se ha demostrado que la PKG tiene la capacidad de fosforilar canales de Ca^{2+} activados por receptor y la subunidad α de canales K_{Ca} , lo cual apoya que la reducción de la entrada de Ca^{2+} producida por GMPc, juega un papel fisiológico importante en el mecanismo de vasorelajación (Blayney y col., 1991; Fukao y col., 1999).

La activación de dos canales iónicos diferentes, la ATPasa de membrana plasmática que bombea Ca^{2+} y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , contribuyen posiblemente a incrementar la salida de Ca^{2+} de la CMLV. La fuerza motriz para eliminar al Ca^{2+} de la célula a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , a su vez, depende de otros dos efectos mediados por GMPc: la eliminación completa de Na^+ intracelular mediante la activación de la ATPasa Na^+/K^+ y la hiperpolarización de la membrana celular a través de la activación de canales de K^+ . La ATPasa que elimina Ca^{2+} de la célula muscular lisa y la ATPasa Na^+/K^+ se activan por GMPc mediante la activación de la PKG (Tamaoki y col., 1997). El GMPc puede producir, de manera indirecta, la salida de Ca^{2+} de las células a través de la activación de

canales de K^+ y la consiguiente hiperpolarización (Furukawa y col., 1991). El GMPc induce la captura de Ca^{2+} por los almacenes intracelulares por medio de la activación de la ATPasa que bombea Ca^{2+} al retículo endoplásmico (Andriantsitohaina y col., 1995). Finalmente, es probable que el GMPc inhiba la vía de trasducción de señales del IP_3 , reduciendo los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 5) (Komalavilas y Lincoln, 1996).

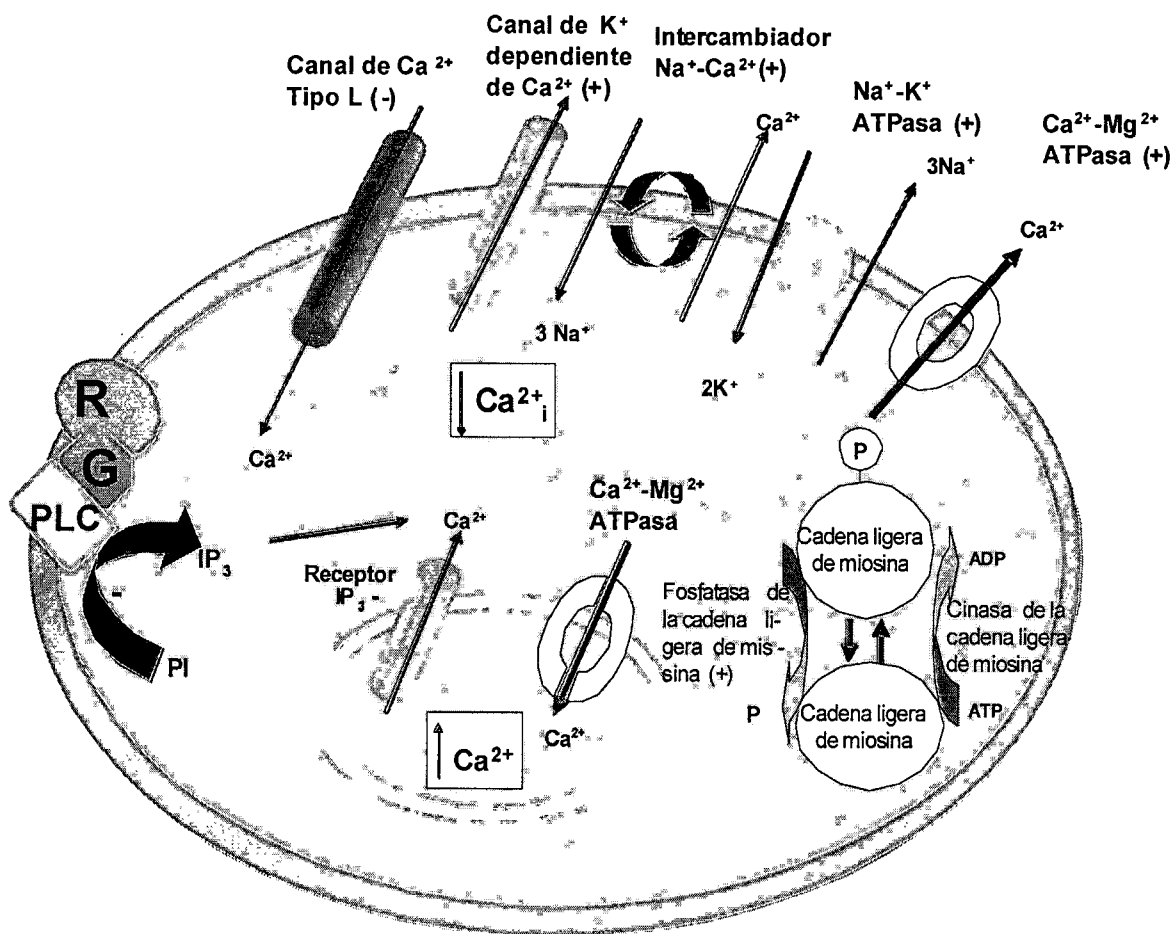


Figura 5. Regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula del músculo liso por medio del GMPc. Ver detalles en el texto. R = receptor acoplado a proteínas G, PLC = fosfolipasa C, PI = fosfatidil inositol, IP_3 = inositoltrifosfato, ADP = adenosin difosfato, ATP = adenosin trifosfato. Adaptado de Lucas y col., 2000.

III. HIPÓTESIS

Los extractos preparados a partir de las plantas usadas en la medicina tradicional de México para tratar enfermedades cardiovasculares modifican el tono del músculo liso vascular.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, el efecto de los extractos acuosos preparados a partir de *Desmodium grahami*, *Sechium edule*, *Magnolia* sp., *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* y *Chiranthodendron pentadactylum* sobre tono del músculo liso vascular

IV.2 Específicos

- ◆ Preparar los extractos acuosos de las plantas objeto de estudio
- ◆ Determinar el efecto de los extractos sobre el tono del músculo liso vascular de la aorta aislada de rata, intacta y sin endotelio
- ◆ Determinar la potencia del efecto farmacológico presentado por los extractos activos, mediante la comparación de sus respectivas concentraciones efectivas medias (CE₅₀)
- ◆ Realizar la caracterización farmacológica preliminar de los extractos activos con la finalidad de proponer su posible mecanismo de acción

V. METODOLOGÍA

V.1 MATERIALES

V.1.1 Plantas objeto de estudio

Las especies seleccionadas para su evaluación farmacológica fueron: *D. grahami*, *S. edule*, *Magnolia sp.*, *D. moldavica*, *A. mexicana* y *C. pentadactylum*

V.1.2 Animales de experimentación

Ratas de la cepa Wistar de ambos sexos (250-300gr)

V.2 MÉTODOS

V.2.1 Recolecta del material vegetal

Las especies vegetales seleccionadas se recolectaron en el Estado de Querétaro. Se depositaron muestras de cada una de las especies en el herbario de Querétaro (QMEX). En esta etapa se contó con la participación del Dr. Luis Hernández, la Dra. Mahinda Martínez y la M. en C. Valentina Serrano, investigadores de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.A.Q.

V.2.2 Preparación de los extractos vegetales

El material vegetal (50 g) se secó y se pulverizó en un molino. Los extractos acuosos se prepararon, mediante una digestión a 60° C durante 24 hr con agitación continua. Posteriormente, los extractos se liofilizaron hasta obtener un residuo deshidratado, el cual fue almacenado en refrigeración para su uso posterior.

V.2.3 Ensayo de aorta aislada de rata

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos, 250-300 g), las cuales fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital y sacrificadas por decapitación. Se removió la aorta torácica y se colocó en una solución fría de Krebs-Heinseleit (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 30 mM

NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 5mM D-glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Feelisch y col., 1999; Fostermann y col., 1994). En algunos casos el endotelio se removió mecánicamente (Galle y col., 1999; Ibarra-Alvarado y col., 2002). Los anillos de aorta se montaron en cámaras de incubación de 7 ml con solución de Krebs-Heinseleit a 37 °C, la cual se burbujeó constantemente con una mezcla de 95% O₂ / 5% CO₂.

Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass modelo FTO3 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8P.

El tejido se sometió a una tensión de reposo (basal) de 1.5 g y se dejó equilibrar por alrededor de 90 min. Una vez que el tejido alcanzó el equilibrio, los segmentos se pre-contrajeron con 700 µl de una solución de KCl 1 M durante 15 min, para estimular el músculo arterial. A continuación, se eliminó el KCl lavando 8 veces cada una de las cámaras. La aorta se dejó reposar hasta alcanzar nuevamente su tensión basal de 1.5 g. Una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con 25 µl de fenilefrina 280 µM.

Los extractos acuosos de las plantas se evaluaron en un intervalo de concentraciones de 1 µg/ml a 10,000 µg/ml. Las diferentes concentraciones de los extractos se disolvieron en agua tridestilada y se adicionaron a las cámaras de tejido aislado, 20 min después de haber inducido la contracción de la aorta con la fenilefrina. La respuesta inducida por cada una de las concentraciones de los extractos en la aorta se registró durante un período de 10 min y los cambios en la tensión producidos por los extractos de prueba se detectaron mediante transductores de fuerza (FTO3 Grass), acoplados a un polígrafo Grass. La información obtenida fue procesada por el programa PolyView (Grass). Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción alcanzada al adicionar la fenilefrina (Feelisch y col., 1999).

V.2.4 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica

Se realizaron al menos 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de los extractos de prueba. En cada caso se calcularon los promedios \pm S.E.M. Las diferencias entre las medias de dos grupos se estimaron, mediante una prueba de t de Student. Las curvas concentración-respuesta generadas en cada evaluación se graficaron y los datos experimentales se ajustaron, mediante un programa de ajuste no lineal (PRISMA 3.0). En cada caso se calcularon las concentraciones efectivas medias (CE_{50} ; la concentración que produce la mitad del efecto máximo) y el efecto máximo (E_{max} ; el efecto máximo producido por el extracto acuoso).

VI. RESULTADOS

VI.1 Evaluación del efecto sobre el tono de la aorta aislada de rata de los extractos acuosos preparados

El resultado del rastreo farmacológico de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares mostró que todas las especies estudiadas en este trabajo indujeron la relajación del músculo liso arterial. Las especies *C. pentadactylon* y *D. Moldavica* presentaron la mayor potencia (CE_{50}) y eficacia (E_{max} ; Figura 6 y Cuadro 2).

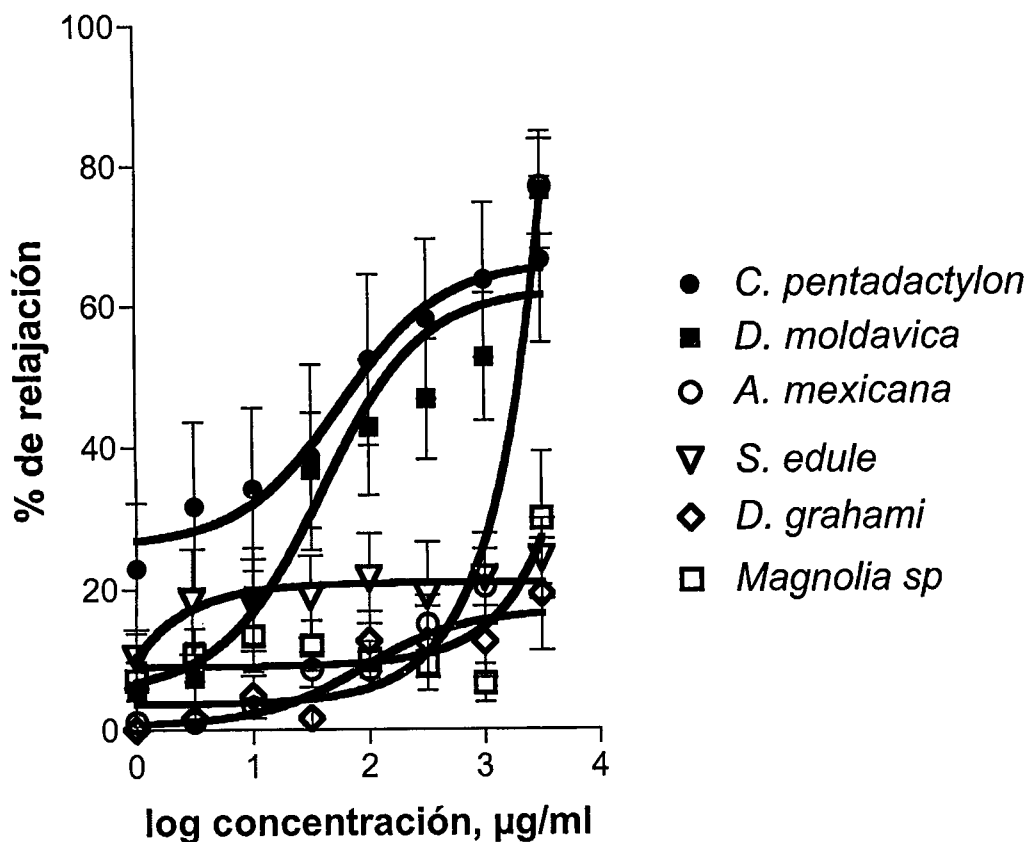


Figura 6. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos acuosos de las especies vegetales estudiadas

Las CE₅₀ para los extractos de *A. mexicana* y *Magnolia sp.* fueron muy grandes debido a que no se alcanzó un efecto máximo. Para obtener un efecto máximo sería necesario agregar cantidades muy grandes de extracto, lo cual no es posible, ya que a concentraciones mayores de 3,500 µg/ml, el extracto de todas las plantas precipita considerablemente. Por otro lado, los extractos de *S. edule* y *D. grahami* presentaron una potencia significativa, sin embargo, solo alcanzaron efectos máximos de 24.3 y 19.3 %, respectivamente. Los valores de E_{max} y CE₅₀ para cada extracto evaluado se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. CE₅₀ y E_{max} del efecto relajante inducido por los extractos de todas las especies estudiadas sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta de rata intacta

Especie vegetal	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)
<i>Dracocephalum moldavica</i>	39.27 ± 1.8	76.4 ± 8.4
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	58.59 ± 3.2	66.5 ± 11.8
<i>Sechium edule</i>	0.067 ± 0.0018	24.3 ± 5.6
<i>Desmodium grahami</i>	86.86 ± 4	19.3 ± 8
<i>Agastache mexicana</i>	No determinado	No determinado
<i>Magnolia sp.</i>	No determinado	No determinado

VI.2 Comparación del efecto de la acetilcolina y del extracto de *D. moldavica*

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que desencadena la relajación del músculo liso arterial, de una manera dependiente del endotelio vascular. La activación de receptores colinérgicos muscarínicos en el endotelio produce la liberación de factores vasorelajantes, tales como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂), los cuales activan receptores en la célula muscular lisa que dan como resultado la relajación del músculo liso (Stankevičius y col., 2003).

Para evaluar la potencia del extracto que presentó un mejor perfil de E_{max} y CE_{50} (*D. moldavica*), comparamos el efecto relajante del extracto de esta especie vegetal con el efecto vasodilatador producido por la ACh. Nuestros resultados indicaron que la ACh presentó una potencia mayor ($CE_{50} = 0.00034 \pm 0.00003$ $\mu\text{g/ml}$), más de un millón de veces, con relación a la presentada por el extracto de *D. moldavica* ($CE_{50} = 39.27 \pm 1.8$ $\mu\text{g/ml}$). Por otro lado, el E_{max} de la ACh (79.8 ± 8.6 %) fue similar a la presentada por el extracto de esta planta (76.9 ± 6.8 %) (Figura 7 y Cuadro 3).

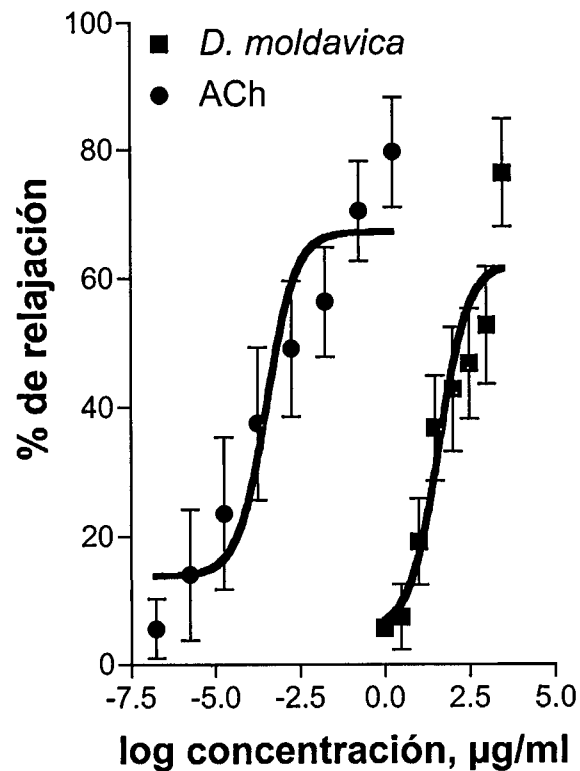


Figura 7. Curvas concentración-respuesta de la ACh y del extracto de *D. moldavica* que muestran la elevada potencia de la ACh con respecto al extracto de esta especie vegetal

La baja potencia del extracto de *D. moldavica* con respecto a la ACh se debe probablemente a que existen en el extracto una gran cantidad de compuestos, de

los cuales, los principios activos vasorelajantes representan solamente una pequeña fracción. También es probable que muchos de los compuestos presentes en el extracto pudieran tener un efecto contrario (vasoconstrictor), de manera que la acción resultante es un efecto vasorelajante de baja potencia.

Cuadro 3. Comparación del efecto vasorelajante de la acetilcolina y del extracto de *D. moldavica*

Especie vegetal o ACh	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)	Potencia
ACh	0.00034 ± 0.00003	79.8 ± 8.6	1
<i>D. moldavica</i>	39.27 ± 1.8	76.4 ± 8.4	8.7 X 10 ⁻⁶

VI.3 Efecto vasorelajante de los compuestos presentes en los extractos acuosos de *S. edule* y *A. mexicana* sobre la aorta libre de endotelio

La determinación del efecto vasorelajante de compuestos de prueba sobre el tono de la aorta de rata, en ausencia de endotelio, se lleva a cabo para determinar si las sustancias vasoactivas interaccionan de manera directa con receptores o canales iónicos localizados en la célula muscular lisa o si los compuestos de prueba activan receptores endoteliales, lo cual resulta en la liberación de factores vasorelajantes que disminuyen el tono vascular (Moncada y Higgs, 1991).

Los resultados de estas evaluaciones sugirieron que los extractos acuosos de *S. edule* y *A. mexicana* contienen compuestos que interaccionan directamente con receptores localizados en las células musculares lisas, ya que la ausencia de endotelio incrementó de manera significativa el efecto relajante de los extractos acuosos de *S. edule* y *A. mexicana* (Cuadro 4 y Figura 8).

Cuadro 4. CE₅₀ y E_{max} de los extractos acuosos de *S. edule* y *A. mexicana* en presencia y en ausencia de endotelio

Especie vegetal	Con endotelio		Sin endotelio	
	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)
<i>S. edule</i>	0.067 ± 0.002	24.3 ± 5.64	443 ± 26	100 ± 9.2
<i>A. mexicana</i>	No determinado	No determinado	4.066 ± 0.32	100 ± 11.1

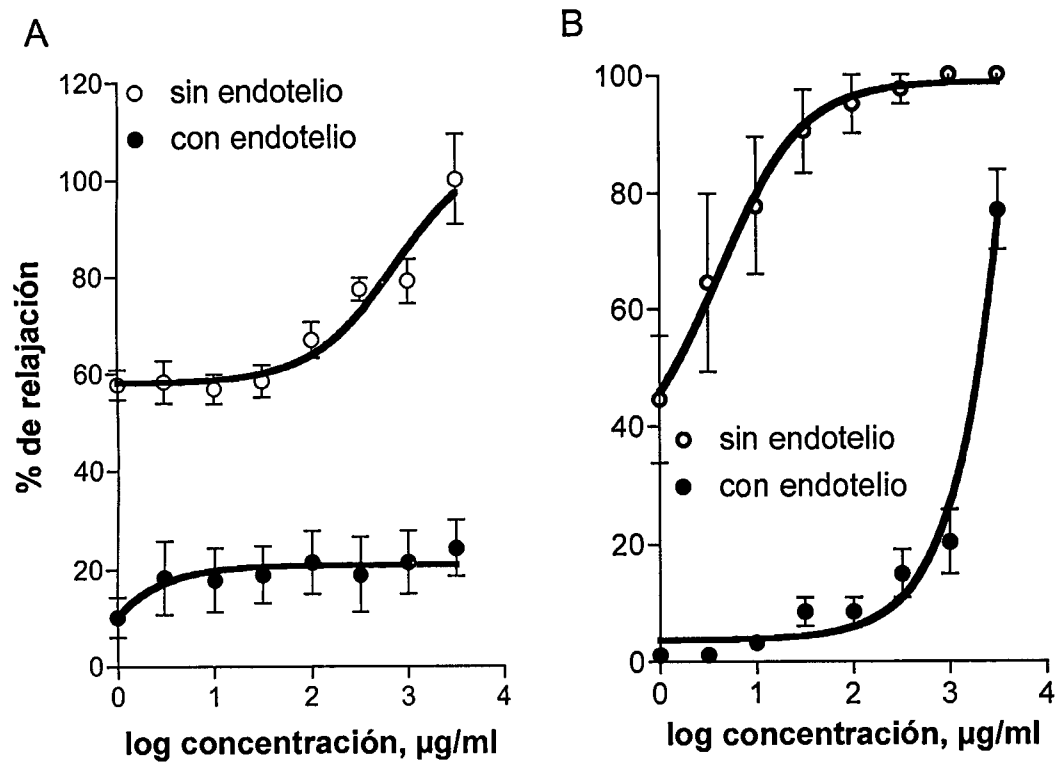


Figura 8. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos acuosos de A) *S. edule* y B) *A. mexicana*, en presencia y ausencia de endotelio

El incremento de la actividad relajante producida por los extractos de *S. edule* y *A. mexicana*, en ausencia de endotelio, puede ser causada por la dificultad de los principios activos vasorelajantes para alcanzar las células musculares lisas. Es posible que las células endoteliales dificulten el paso de los principios vasorelajantes al músculo liso vascular. Otra posibilidad es que los extractos de estas plantas contengan otro tipo de sustancias que al interactuar con receptores endoteliales inducen una vasoconstricción, la cual reduce de manera significativa el efecto vasorelajante de los compuestos que interactúan directamente con receptores o canales iónicos presentes en las células musculares lisas. De esta manera, cuando se elimina el endotelio, estos compuestos activan libremente sus receptores en el músculo liso vascular.

VI.4 Efecto vasorelajante de los compuestos presentes en *D. moldavica*, *Magnolia sp.* y *D. grahami* sobre el músculo liso arterial en presencia de nifedipina

El Ca^{2+} es el principal mensajero intracelular que regula el proceso de contracción muscular. Bajo condiciones normales, la concentración del Ca^{2+} en el citoplasma de la célula de músculo liso se encuentra relativamente baja, aproximadamente 140 nM. Un incremento de la concentración citoplasmática de este ión, 500-700 nM, desencadena el proceso de contracción muscular por diferentes mecanismos (Williams y Fay, 1986). Este incremento en la concentración puede deberse a la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática o a la liberación del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Tognarini y Moulds, 1997; Long y col., 2000). En la célula muscular lisa, existe una gran población de canales iónicos voltaje dependiente tipo L, a través de los cuales entra el calcio para generar la contracción muscular (Bolotina, 2000). Un posible mecanismo de acción responsable del efecto vasorelajante de los compuestos presentes en los extractos acuosos de *Magnolia sp.*, *D. moldavica* y *D. grahami* es el bloqueo de este tipo de canales iónicos. Por esta razón, se evaluó el efecto de los extractos de estas especies vegetales en presencia de nifedipina, un bloqueador de canales iónicos voltaje dependiente tipo L.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos indicaron que el extracto acuoso de *Magnolia sp.* no contienen compuestos que bloquean este tipo de canales de calcio, ya que no se observó una potenciación del efecto vasorelajante de los extractos sobre la aorta en presencia de nifedipina (Cuadro 5 y Figura 9).

Cuadro 5. CE₅₀ y E_{max} del los extractos acuosos de *Magnolia sp.*, *D. moldavica* y *D. grahami* en presencia y en ausencia de nifedipina

Especie vegetal	Sin nifedipina		Con nifedipina	
	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)	CE ₅₀ (µg/ml)	E _{max} (%)
<i>Magnolia sp.</i>	No determinado	No determinado	No determinado	No determinado
<i>D. moldavica</i>	39.27 ± 1.8	76.4 ± 8.4	49.27 ± 1.6	95.5 ± 3
<i>D. grahami</i>	86.86 ± 4	19.3 ± 8	919.3 ± 37	81.24 ± 8.2

Asimismo, en el caso del extracto acuoso de *D. moldavica*, no se observó una potenciación significativa del efecto vasorelajante hasta la concentración de 100 µg/ml. Sin embargo, por arriba de esta concentración, la nifedipina potenció el efecto vasodilatador del extracto de esta especie vegetal (Figura 10 A). Estos resultados sugieren que *D. moldavica* contiene compuestos que bloquean la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes tipo L. Esto no descarta la posibilidad de que existan otro tipo de compuestos que induzcan la relajación del músculo liso por otros mecanismos bioquímicos.

Por otro lado, la potenciación del efecto vasorelajante del extracto de la especie vegetal *D. grahami* en presencia de nifedipina, indicó que el extracto acuoso de esta planta contiene compuestos que bloquean el incremento de calcio en el interior de la célula muscular lisa, mediante el bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes tipo L (Figura 10 B).

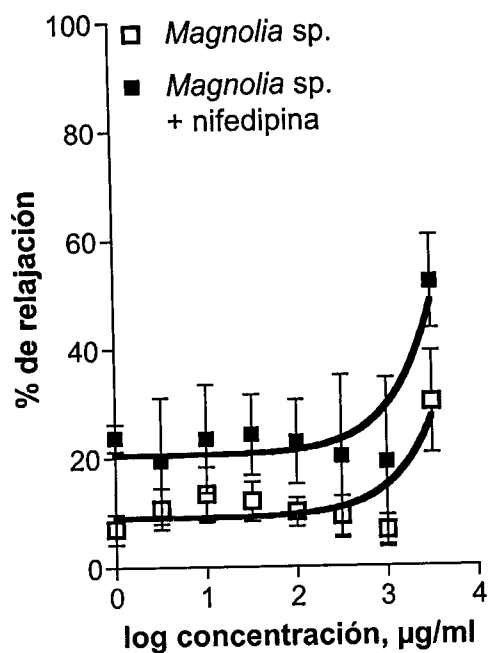


Figura 9. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante del extracto acuoso de *Magnolia sp.* en presencia y ausencia de nifedipina

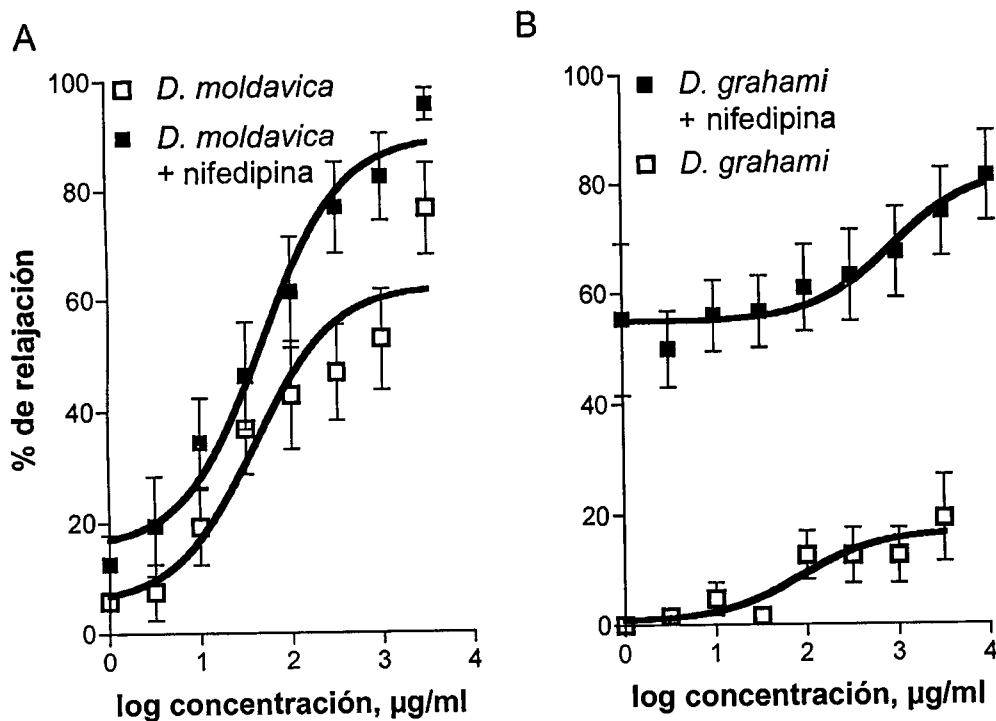


Figura 10. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorelajante de los extractos: A) *D. moldavica* y B) *D. grahami*, en presencia y ausencia de nifedipina

VII. DISCUSIÓN

El objetivo fundamental planteado en la presente tesis fue la comprobación farmacológica del efecto relajante de la musculatura lisa que se les atribuye a seis especies vegetales de amplio uso en la medicina tradicional de México. Las plantas se seleccionaron con base en un criterio etnomédico, el cual ha demostrado ser un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos productos naturales con propiedades farmacológicas interesantes.

Con base en los antecedentes etnomédicos de las especies vegetales para el tratamiento de diversos padecimientos cardiovasculares (*C. pentadactylon*, *D. moldavica*, *A. mexicana*, *S. edule* y *Magnolia sp.*) y gastrointestinales (*D. grahami*), el estudio farmacológico de las mismas se enfocó en determinar si las plantas contienen compuestos que modifican el tono del músculo liso vascular. Para tal fin, se evaluó el efecto de los extractos acuosos de las plantas objeto de estudio sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en la aorta aislada de rata. Los segmentos de aorta aislados constituyen un modelo sencillo que permite evaluar el efecto de sustancias de prueba sobre el tono vascular. La presencia de factores endoteliales y de otros mensajeros químicos que interaccionan con diversos receptores localizados en las membranas de las células endoteliales y musculares le proporciona una gran versatilidad a la preparación de aorta aislada. Además, la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en la aorta, hacen que este modelo sea muy apropiado para la evaluación preliminar de los efectos farmacológicos de los extractos de plantas y para el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de aislamiento de los principios activos.

Esta evaluación demostró que los extractos de todas las plantas evaluadas ejercen un efecto vasorelajante sobre el tono del músculo liso arterial, aunque la eficacia y la potencia de los diferentes extractos vegetales fueron muy diferentes. Estos resultados avalan, el uso etnomédico de estas especies vegetales. Los extractos que presentaron un mejor perfil de CE_{50} y E_{max} fueron *C. pentadactylon* y

D. moldavica. El extracto acuoso de *A. mexicana* presentó un comportamiento atípico, ya que no presentó un efecto relajante importante hasta que su concentración superó los 1,000 $\mu\text{g/ml}$. En este caso no fue posible obtener los valores de CE_{50} y E_{max} debido a que no fue posible completar la curva concentración-respuesta. Es importante mencionar que para completar dicha curva se requerirían concentraciones mayores, las cuales no son posibles de disolver en la cámara de tejido aislado. Asimismo, el efecto relajante producido por el extracto de *Magnolia sp.* fue muy débil en todo el rango de concentraciones empleado y se incrementó ligeramente a una concentración mayor de 1,000 $\mu\text{g/ml}$, por lo que no fue posible construir su curva concentración-respuesta completa. Finalmente, las curvas concentración-respuesta de los extractos acuosos de *S. edule* y *D. grahami* indicaron que ambos extractos no producen un efecto vasorelajante importante de la aorta de rata intacta (Figura 6 y Cuadro 2).

Para evaluar la potencia del efecto de un extracto se pueden comparar las CE_{50} del extracto vegetal con las del efecto farmacológico de la ACh. Es importante que las curvas concentración-respuesta con las que se obtiene la CE_{50} sean curvas sigmoideas con una E_{max} similar. Por esta razón, determinamos la potencia del extracto que presentó un mejor perfil de CE_{50} y E_{max} (*D. moldavica*) al comparar su efecto vasorelajante con el producido por la ACh, un neurotransmisor que activa una gran población de receptores colinérgicos muscarínicos en la célula endotelial. La activación de estos receptores desencadena la activación de la vía del óxido nítrico/GMP cíclico (NO/GMPc), lo cual resulta en la relajación del músculo liso vascular. Nuestros resultados indicaron que el efecto vasodilatador de la ACh fue aproximadamente un millón de veces más potente que el efecto vasorelajante producido por el extracto de *D. moldavica*. La baja potencia del efecto vasorelajante de este extracto vegetal, en relación con la potencia de la ACh podría deberse a que el extracto posee cantidades muy pequeñas de principios activos vasorelajantes potentes. Es posible también que el extracto vegetal de esta planta contenga compuestos que dilaten la aorta con una potencia baja. Otra posibilidad es que el extracto contenga una gran cantidad de principios activos con efectos contrarios (vasorelajación y vasoconstricción) de manera que el efecto final sea una

sumatoria de efectos que se reflejan como un efecto vasorelajante más débil. Para saber las características farmacológicas del o los principios activos presentes en esta especie vegetal es necesario, primero realizar el estudio fitoquímico para aislar dichos principios y después hacer su caracterización farmacológica.

El efecto inhibitorio de la contracción inducida por fenilefrina en la aorta inducido por los tres extractos relajantes, no proporcionaba ninguna información con relación al mecanismo de acción de los mismos. Por tal motivo, con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de los extractos, se decidió investigar su efecto sobre la aorta sin endotelio vascular con el objeto de detectar si la actividad relajante de los extractos involucraba la liberación de factores endoteliales que inducen relajación del músculo liso vascular o si los principios activos contenidos en los extractos actuaban directamente sobre receptores o canales iónicos localizados en las células musculares lisas. Por ejemplo, si un principio activo produce su efecto vasorelajante al interaccionar con receptores en la célula endotelial, este efecto disminuirá notablemente o desaparecerá por completo cuando se elimine el endotelio vascular. Por otro lado, si el principio activo interacciona con receptores en la célula muscular lisa, la eliminación de las células endoteliales no modificará su efecto vasodilatador. Nuestros resultados mostraron que la eliminación del endotelio, ni disminuyó ni mantuvo el efecto vasorelajante de los extractos de *S. edule* y *A. mexicana*. La ausencia de endotelio, más bien, incrementó de manera notable el efecto relajante de estos extractos, lo cual sugiere que los compuestos activos presentes en ambos extractos interaccionan directamente con receptores o canales iónicos presentes en la célula muscular lisa (Figura 8). Estas observaciones también sugieren que las células endoteliales dificultan el paso de los principios activos a las células musculares lisas o que los extractos contienen otro tipo de compuestos que, al interaccionar con el endotelio en la aorta intacta, producen la liberación de factores vasoconstrictores derivados de endotelio que contrarrestan notablemente el efecto vasorelajante de los compuestos que actúan a nivel de músculo liso.

La acción relajante ejercida por los principios activos contenidos en las plantas puede deberse, ya sea a un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} extracelular al

interior de las células del músculo liso o a una interferencia con los procesos metabólicos mediados por este catión en las células musculares. También es posible que los principios activos de ambas plantas interactúen con receptores membranales o intracelulares u otras biomoléculas presentes en las células del músculo liso que están involucradas en los mecanismos de transducción de señales que regulan la contracción muscular.

Con la finalidad de conocer si el efecto vasorelajante de los extractos de las plantas *Magnolia sp.*, *D. moldavica* y *D. grahami* involucraba un bloqueo de la entrada de calcio extracelular, se realizaron experimentos en los que se incubaron los tejidos durante 5 min con nifedipina (1 μ M), un bloqueador de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, antes de agregar los extractos de prueba. La nifedipina interactúa con sitios específicos en la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, inhibiendo el influjo de Ca^{2+} en las células excitables del músculo liso (Godfrain y col. 1986). En estos experimentos, se encontró que la nifedipina incrementó la eficacia del efecto vasoactivo de los extractos de *D. moldavica* y *D. grahami*, pero no tuvo un efecto significativo en el caso del extracto de *Magnolia sp.* (Figuras 9 y 10). Los resultados obtenidos con el extracto de esta última especie vegetal sugieren que esta planta carece de compuestos activos que bloqueen este tipo de canales iónicos. En contraste con los resultados obtenidos con el extracto de *Magnolia sp.*, los extractos de las especies vegetales *D. moldavica* y *D. grahami*, parecen contener compuestos que bloquean los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. La nifedipina no potenció el efecto relajante del extracto de *D. moldavica* hasta que la concentración se elevó por arriba de los 100 μ g/ml. Este comportamiento sugiere que esta planta contiene compuestos que bloquean este tipo de canal de calcio, pero que su efecto se observa hasta que la concentración es suficientemente elevada para contrarrestar el efecto vasoconstrictor de otras sustancias vasoactivas. Existe también la posibilidad de que los principios activos contenidos en esta especie bloqueen este tipo de canales con una baja especificidad. De manera inesperada, la nifedipina potenció notablemente el efecto vasodilatador del extracto de *D.*

grahami. Esta planta se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren que esta especie contiene compuestos que inducen la relajación del músculo liso arterial, posiblemente mediante el bloqueo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L y los principios activos provenientes de esta planta podrían potencialmente ser empleados también para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

El estudio farmacológico de los extractos de plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana, realizado en esta tesis, avala su uso etnomédico y representa el primer paso antes de llevar a cabo el aislamiento de los principios activos responsables del efecto vasorelajante. Estudios subsecuentes con los compuestos aislados, podrían conducir al desarrollo de nuevos fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, las cuales ocupan el primer lugar de causa de muerte en nuestro país.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana*, *Sechium edule*, *Desmodium grahami* y *Magnolia sp.* relajan el músculo liso vascular.
2. Los extractos con mejor perfil de CE_{50} y E_{max} fueron los de *C. pentadactylon* y *D. moldavica*. Esta última especie resultó ser aproximadamente un millón de veces menos potente que la acetilcolina.
3. Los extractos de *S. edule* y *A. mexicana* contienen compuestos capaces de interactuar con receptores o canales iónicos localizados en las células musculares lisas para producir la relajación de los vasos sanguíneos.
4. El efecto vasorelajante inducido por el extracto de *Magnolia sp.* fue muy bajo y no involucró la participación de canales voltaje dependientes tipo L.
5. Los principios activos contenidos en los extractos de *D. moldavica* y *C. pentadactylon* provocaron un efecto vasorelajante sobre el músculo liso arterial, mediante un bloqueo directo o indirecto de la entrada de calcio al interior de la célula muscular lisa.
6. Los resultados derivados del presente estudio confirman que el empleo de una estrategia de investigación interdisciplinaria permite corroborar las propiedades farmacológicas de plantas medicinales de reconocido uso etnomédico, que podrían constituir nuevas alternativas con validez científica para la resolución de problemas primarios de salud pública.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, S., Kanaide, H. y Nakamura, M. 1990.** Front-surface fluorometry with fura-2 and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 101: 545-52.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, M.E. 1994.** Plantas medicinales del herbario del Instituto mexicano del seguro social. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano, México: 21-22.
- Andriantsitohaina, R., Lagaud, G. J., Andre, A., Muller, B. y Stoclet, J. C. 1995.** Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. *American Journal of Physiology*. Vol. 268: H1223-H1231.
- Argueta, A. 1994.** Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Primera ed., Instituto nacional Indigenista, México. Tomo I: 393-394, 644-645; tomo II: 775-776, 927-929; y tomo III: 1355-1356.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. y Crow, J. P. 1994.** Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymology*. Vol. 233: 229-240.
- Bennett, B. M. & Waldman, S. A. 1995.** Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation. In *Physiology and Pathophysiology of the Heart*. ed Sperelakis, N. pp. 975-998. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Blayney, L. M., Gapper, P. W. y Newby, A. C. 1991.** Inhibition of a receptor-operated calcium channel in pig aortic microsomes by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Biochemical Journal*. Vol. 273: 803-806.
- Bolotina, V. M. 2000.** Nitric oxide and ion channels. En: *Nitric oxide and the cardiovascular system*. Loscalzo, J., Vita, J. A. (Eds.). Humana Press, New Jersey: 85-103.
- Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P., Giulumian, A. D. y White, R. E. 1997.** Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *American Journal of Physiology*. Vol. 273: H76-84.

- Chen, Y., Lin, K. y Shiao, M. 2001.** Magnolol, a potent antioxidant from *Magnolia officinalis*, attenuates intimal thickening and MCP-1 expression after ballon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbits. *Basic Research in Cardiology*. Vol. 96:353-363.
- Christ, J. G. y Brink, P. R. 2000.** Gap junctions in isolated rat aorta: evidence for contractile responses that exhibit a differential dependence on intercellular communication. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 33: 423-429.
- Coleman, R.A., Smith, W.L., Naruiya, S. 1994.** International union of pharmacology classification of prostanoid receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews*. Vol. 46: 205-229.
- Cordell, G. A. 2000.** Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. Vol. 55: 463-480.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. y Snader, K. M. 1997.** Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. Vol. 60: 52-60.
- Dejana, E. Corada, M. y Lampugnani, M. G. 1995.** Endotelial cell-to-cell junctions. *FASEB Journal*. Vol. 9: 910-918.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. y Schmidt, H. H. 1999.** The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Molecular Pharmacology*. Vol. 56: 243-253.
- Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. y Kleinert, H. 1994.** Nitric oxide synthase oxide and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Molecular Pharmacology*. Vol. 23: 1121-1131.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B. y Keef, K. D. 1999.** Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274: 10927-35.
- Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y. y Shigekawa, M. 1991.** Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 266: 12337-41.

- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C. y Schmidt, H. H. 1999.** Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 127: 195-203.
- Ganong, W. F. 2000.** *Fisiología Médica*. 17a. ed. El manual moderno, México: 122, 657-661.
- Godfrain, T. 1986.** Calcium entry blockade and excitation contraction coupling in the cardiovascular system (with an attempt of pharmacological classification). *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. Vol. 58 (suppl. 2): 5-30.
- Gordon, E., Guppy, L. y Nelson, M. 2000.** The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Medical Journal*. Vol. 49: 27-31.
- Guyton, A. C. y Hall, J. E. 2001.** *Tratado de Fisiología Médica*. 10 ed., MacGraw-Hill Interamericana, México: 103-106.
- Hofmann, F., Ammendola, A. y Schlossmann, J. 2000.** Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of Cell Science*. Vol: 113: 973-983.
- Holcapek, M., Jandera, P., Zderadicka, P. y Hrubá, L. 2003.** Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oil using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. Vol. 1010: 195-215.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fisher, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K.D., Gausepohl, H., Frank, R. I., Schultz, G. y Bohme, E. 1990.** Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 190: 273-278.
- Huxley, H. E. 1969.** The mechanism of muscular contraction. *Science*. Vol. 164: 1356-1366.
- Ibarra-Alvarado, C., Galle, J., Melichar, V. O., Mameghani, A. y Schmidt, H. H. 2002.** Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Molecular Pharmacology*. Vol. 61: 312-319.

- Ignarro, L. J. 1990.** Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacology & Toxicology*. Vol. 67: 1-7.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2005.** www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol (última actualización: octubre 2006).
- Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmeri, J. A., Kuno, T., Chnag, B. Y., Waldman, S. A. y Murad, F. 1986.** Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 261: 7236-7241.
- Kargacin, G. J., Cooke, P. H., Abramson, S. B. y Fay, F. S. 1989.** Periodic organization of the contractile apparatus in smooth muscle revealed by the motion of dense bodies in single cells. *Journal of Cell Biology*. Vol. 108: 1465-1475.
- Komalavilas, P. y Lincoln, T. M. 1996.** Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271: 21933-21938.
- Kotani, A., Kojima, S. y Hakamata, H. 2005.** Determination of Honokiol and Magnolol by HPLC with electrochemical Detection and its application to the Distribution Analisis in Branches and Leaves of *magnolia obsuata*. *Chemical Parmacology Bulletin*. Vol. 53: 319-322.
- Li, H. y Forstermann, U. 2000.** Nitric oxide in the patogénesis of vascular disease. *Journal of Pathology*. Vol. 190: 244-254.
- Li, J. y Sing, Y. 2001.** Studies on chemical constituents from *Dracocephalum moldavica* L. *Ahohgguo Zhong Yao Za Zhi*. Vol. 10: 697-698.
- Liu, H., Xiong, Z. y Sperelakis, N. 1997.** Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Vol. 29: 1411-1421.
- Long, W., Zhang, L., Longo y L. D. 2000.** Cerebral artery sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} stores and contractility: changes with development. *American Journal of Physiology*. Vol. 279: R860-R873.

Lozoya, X. 1994. Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. In *Ethnobotany and search of new drugs*. Ciba Foundation Symposium, Chichester: 130-152.

Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. y Waldman, S. A. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*. Vol. 52: 375-414.

McDaniel, N. L., Chen, X. L., Singer, H. A., Murphy, R. A. y Rembold, C. M. 1992. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *American Journal of Physiology*. Vol. 263: C461-7.

Mittermier, R. A. 1988. Biodiversity. En: *Primate diversity and the tropical forest*. E. O. W. y F. M. P. (eds.). National Academy Press, Washinton, D. C.: 145-154.

Miwa, S., Iwamuro, Y., Zhang, X. F., Enoki, T., Okamoto, Y., Okazawa, M. y Masaki, T. 1999. Ca^{2+} entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Japanese Journal of Pharmacology*. Vol. 80: 281-374.

Molina, M., Tellez, P. y Martínez, E. 2000. Agastache mexicana may produce angiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine*. Vol. 3: 199-203.

Moncada, S. y Higgs, E. A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*. Vol. 21: 361-374.

Murad, F. 1996. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Journal of the American Medical Association*. Vol. 276: 1189-1192.

Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., Maeso, R. y Lahera, V. 1999. Fisiología de pared vascular. En: *Tresguerras, J.A.F., Aguilar, E., Cachofeiro, M.D. (Eds.), Fisiología humana*, McGraw-Hill Interamericana, México: 525, 532-539.

Perusquia, M., Mendoza, S. Bye, R., Linares, E. y Mata, R. 1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five mexican medicinal plants on solated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 46: 63-69.

Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. y Hofmann, F. 1999. Structure and fuction of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of Physiology, Bichemistry and Pharmacology*. Vol. 135: 105-149.

- Quiroz, C. 2000.** Recetario de medicina tradicional de Morelos. Instituto Nacional Indigenista. México: 19-21 y 25-28.
- Risler, N. R. , Miatello, R. M. y Cruzado, M. C. 2002.** La pared vascular en la hipertensión arterial. *Revista Argentina de Cardiología*. Vol. 31: 315-320.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., serrano, V. y Pacheco, S. 1999.** Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*. Vol. 6: 361-671.
- Rubbo, H., Darley-Usmar, V. y Freeman, B. A. 1996.** Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chemical Research in Toxicology*. Vol. 9: 809-820.
- Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J. R. y Keef, K. D. 1998.** Modulation of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circulation Research*. Vol. 82: 557-65.
- Rzedowski, J. 1993.** Diversity and origins of phanerogamic flora of México. In T. P. Ramamoorthy, R. B., A. Lot and J. Fa, eds. (ed.), *Biological diversity of México: origins and distribution*. Oxford University Press, New York: 129-144.
- Schmidt, H. H., Lohmann, S. M. y Walter, U. 1993.** The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1178: 153-175.
- Schmidt, H.H. y Walter, U. 1994.** No at work. *Cell*. Vol. 78: 919-925.
- Stankevičius, E., Kėvelaitis, E., Vainorius, E., Simonsen, U. 2003.** Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina*. Vol. 39: 333-341.
- Tamaoki, J., Tagaya, E., Nishimura, K., Isono, K. y Nagai, A. 1997.** Role of $Na(+)-K+$ ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 122: 112-116.
- Tognarini, D. P. y Moulds, R. F. W. 1997.** Intracellular Ca^{2+} and contractile responses to $\alpha 1$ -adrenoreceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 322: 31-36.
- Tsai, S., Huang, D. y Hong, C. 1996.** Myocardial protective effect of honokiol: an active component in *Magnolia officinalis*. *Planta Medica*. Vol. 62: 503-506.

Williams, D. A. y Fay, F. S. 1986. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin-2. *American Journal of Physiology*. Vol. 250: C779-C791.

Velázquez-Monroy, O., Rosas Peralta, M., Lara Esqueda, A., Pastelin Hernandez, G., Castillo, C., Attie, F. and Tapia Conyer, R. 2003. [Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico. Final outcomes from the National Health Survey 2000]. *Archivos de Cardiología de México*. Vol. 73: 62-77.