

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“RASTREO FARMACOLÓGICO DE PLANTAS USADAS EN LA
MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CARINA HUERTA ZÁRATE

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No. Adq. ~~# 70855~~

No. Título

Clas. TS

G/5.32322

H887r



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“RASTREO FARMACOLÓGICO DE PLANTAS USADAS EN
LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
CARDIOVACULARES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CARINA HUERTA ZÁRATE

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODALES

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA
DIRECTOR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
SINODAL

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
SINODAL

Dr. LUIS GERARDO HERNÁNDEZ SANDOVAL
SINODAL

Alejandra Rojas M.
[Signature]
[Signature]
[Signature]

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Plantas medicinales de México	3
II.2 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México	3
II.3 Fisiología de los vasos sanguíneos	5
II.4 Estructura de la pared vascular	5
II.5 Endotelio	7
II.5.1 Estructura y funciones del endotelio vascular	7
II.5.2 Factores derivados del endotelio	9
II.6 Músculo liso	12
II.7 Matriz extracelular	13
II.8 Adventicia	13
II.9 Mecanismo de contracción de la musculatura lisa vascular	13
II.9.1 Bases bioquímicas de la contracción del músculo liso	13
II.9.2 Contracción del músculo liso	13
II.9.3 Regulación de la contracción por iones calcio	14
II.10 Especies seleccionadas para el rastreo farmacológico	15
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20

IV.1 General	20
IV.2 Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1 Materiales	21
V.1.1 Plantas objeto de estudio	21
V.1.2 Animales de experimentación	21
V.2 Métodos	21
V.2.1 Recolecta del material vegetal	21
V.2.2 Preparación de los extractos vegetales	21
V.2.3 Ensayo de aorta aislada de rata	22
V.2.4 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica	23
VI. RESULTADOS	24
VI.1 Evaluación del efecto de diferentes especies vegetales Empleadas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares sobre el tono de la aorta intacta de rata	24
VI.2 Determinación del efecto vasorelajante de los extractos de <i>P. calyculatus</i> , <i>P. serotina</i> y <i>C. murale</i> sobre el tono de la aorta intacta aislada de rata	24
VI.3 Evaluación del efecto relajante inducido por los extractos de <i>P. calyculatus</i> , <i>P. serotina</i> y <i>C. murale</i> sobre el tono de la aorta de rata sin endotelio	26
VI.4 Determinación del efecto contráctil inducido por los extractos de <i>S. rostratum</i> y <i>B. frutescens</i> en la aorta aislada de rata	28
VI.5 Determinación del efecto bifásico del extracto de <i>T. mexicana</i> Mediante el empleo del ensayo de aorta aislada de rata	30
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFIA	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Especies vegetales de la flora medicinal mexicana seleccionadas para el rastreo farmacológico	16
2	Efecto inducido por los extractos de las especies seleccionadas sobre el tono del músculo liso vascular	24
3	CE ₅₀ y E _{max} del efecto relajante inducido por los extractos de <i>P. calyculatus</i> , <i>P. serotina</i> y <i>C. murale</i> sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos	25
4	CE ₅₀ y E _{max} del efecto contráctil de <i>S. rostratum</i> y <i>B. frutescens</i> sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos	28
5	CE ₅₀ y E _{max} del efecto contráctil inducido por los extractos de <i>S. rostratum</i> y <i>B. frutescens</i> sobre el tono del músculo liso arterial en presencia y en ausencia de un bloqueador de canales de Ca ²⁺ voltaje dependientes tipo L	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales causas de mortalidad general en México	4
2	Mortalidad por enfermedades isquémicas e hipertensivas en México	4
3	Morbilidad por enfermedades isquémicas e hipertensión arterial en México	5
4	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos acuosos de <i>P. calyculatus</i> , <i>P. serotina</i> y <i>C. murale</i>	25
5	Curva concentración-respuesta del efecto relajante del extracto acuoso de <i>P. calyculatus</i> en ausencia (E-) y en presencia (E+) de endotelio vascular	26
6	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante inducido por los extractos acuosos de A) <i>P. serotina</i> y B) <i>C. murale</i> en ausencia (E-) y en presencia (E+) de endotelio	27
7	Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de los extractos acuosos de A) <i>B. frustecens</i> y B) <i>S. rostratum</i> en ausencia y en presencia de nifedipina o verapamilo	29
8	Curvas concentración-respuesta del efecto bifásico (A) y relajante (B), observado en presencia de nifedipina del extracto acuoso de <i>T. mexicana</i>	31

RESUMEN

La literatura herbolaria de México refiere el uso de varias plantas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la mayoría de estas especies no han sido investigadas. Por este motivo, se planteó la presente tesis que involucra un rastreo farmacológico preliminar de algunas de estas especies con el objeto de seleccionar candidatos idóneos para la obtención de moléculas novedosas que sirvan como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares.

Las especies que se seleccionaron para la realización del rastreo farmacológico fueron: *Chenopodium murale* (Chenopodiaceae), *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae), *Prunus serotina* (Rosaceae), *Bocconia frutescens* (Papaveraceae), *Talauma mexicana* (Magnoliaceae) y *Solanum rostratum* (Solanaceae). Estas plantas se eligieron a partir de una serie de especies vegetales empleadas en México para tratar diversas afecciones cardiovasculares.

Los extractos acuosos preparados a partir de *C. murale*, *P. calyculatus* y *P. serotina* producen relajación de la aorta. Los extractos de *B. frutescens* y *S. rostratum* aumentan el tono de la aorta y el extracto *T. mexicana* induce un efecto bifásico caracterizado por un aumento inicial en el tono vascular, seguido por una inhibición de la contracción inducida por fenilefrina. El extracto que presentó el mayor efecto relajante fue el de *P. calyculatus*, en tanto que el extracto *T. mexicana* presentó un efecto bifásico, en el que el efecto relajante fue también significativo.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas para tratar enfermedades es una práctica probablemente tan antigua como la humanidad, mientras que la medicina alopática es mucho más reciente, de tal manera que debe considerarse a los antiguos herbolarios como precursores de la medicina moderna. Tomando en cuenta que desde la antigüedad se han utilizado los remedios vegetales y hoy en día se producen fármacos en el laboratorio, se debe considerar que además de la medicina formal y de los medicamentos de patente, existen métodos terapéuticos que merecen ser revisados a la luz de los conocimientos científicos actuales.

La medicina tradicional, es decir, la medicina en la que se emplean fármacos de origen natural, ofrece tres ventajas principales sobre la medicina alopática:

- a) Representa un medio para procurar la salud, en forma eficaz, para el hombre en su propio ambiente sociocultural,
- b) Los recursos de los que hace uso son de fácil disponibilidad, principalmente en aquellas zonas rurales en las que el acceso a los servicios médicos hospitalarios es muy difícil, y
- c) Ofrece en términos económicos una alternativa para curar enfermedades a un costo menor.

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 ya que su uso se remonta a la época prehispánica, en la que numerosas plantas eran empleadas para tratar diversos padecimientos. Dos ejemplos representativos de especies vegetales utilizadas por los médicos prehispánicos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares son la *Chiranthodendron penthadactylon* y la *Magnolia mexicana* (*Talauma mexicana*). La primera de ellas, se empleaba para preparar una pócima que se bebía como tónico para el corazón. La segunda era utilizada para el tratamiento de malestares cardíacos.

En la actualidad, gran parte de la población mexicana, principalmente la de bajos recursos económicos que no tiene acceso a servicios médicos adecuados, hace uso de las plantas medicinales para el tratamiento de un sinnúmero de

enfermedades. Desafortunadamente, a pesar de la riqueza florística y la gran tradición en el empleo de plantas medicinales que existe en nuestro país, en México el porcentaje de las especies vegetales medicinales estudiadas desde un punto de vista científico es muy bajo. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones interdisciplinarias, en las que se aborde el estudio etnobotánico (botánico y antropológico), químico, farmacológico, clínico y económico de las plantas medicinales utilizadas por la población urbana e indígena de México, a fin de elucidar su posible beneficio terapéutico.

Actualmente, la metodología científica que se emplea para el estudio de las plantas medicinales involucra las siguientes etapas:

1. Estudio etnobotánico,
2. Estudio fitoquímico y
3. Estudio farmacológico.

En el estudio etnobotánico, se hace una investigación en las zonas en las que se utilizan las plantas medicinales, con el objeto de clasificarlas botánicamente y conocer su aplicación medicinal. El estudio fitoquímico permite conocer las sustancias que contienen las plantas y, de esta manera, se pueden encontrar nuevos principios activos. En tanto que los estudios farmacológicos y clínicos tienen como objetivo evaluar la actividad biológica de los compuestos obtenidos de las plantas.

Resulta evidente que en la actualidad sólo se tiene un conocimiento empírico de la gran mayoría de las especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana, ya que a la fecha no se han realizado estudios sistemáticos tendientes a validar científicamente su uso. En este contexto, se propone la presente tesis que tiene como meta principal la realización de un rastreo farmacológico de especies de la flora medicinal mexicana con el objeto de identificar fuentes potenciales de principios activos útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Todas las especies elegidas para su evaluación farmacológica gozan de reputación como agentes terapéuticos utilizados en diversas afecciones cardiovasculares.

II. ANTECEDENTES

II.1 Plantas medicinales de México

Se estima que en México existen cerca de 30,000 especies vegetales, de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista reportó que 3,000 tienen usos medicinales. Esto representa el 10% del total de la riqueza florística del país (Linares y col., 1994; Lozoya, 1999; Aguilar, 2001). En 1994, se elaboró un "Atlas de Plantas Medicinales" que representa una recopilación muy amplia de especies vegetales que tienen un potencial terapéutico benéfico y que son empleadas por diversos grupos étnicos de nuestro país (Argueta, 1994). A partir de la información contenida en este atlas y de diversas encuestas realizadas por investigadores del Instituto Mexicano del Seguro Social durante la última década, sobre el uso de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana, se tiene información que indica que aproximadamente el 78% de las plantas que prescriben los médicos tradicionales se emplean para tratar enfermedades cardiovasculares, infecciones respiratorias y de la piel, desórdenes gastrointestinales, dolor y diabetes (Bye, 1995; Lozoya, 1999).

II.2 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México

Con relación a las enfermedades cardiovasculares, es importante resaltar el hecho de que estas afecciones representan desde hace más de una década, la principal causa de mortalidad en nuestro país (Adame, 2000; Velázquez-Monroy y col., 2003).

En la figura 1 se muestran las principales causas de muerte en México. En primer lugar se encuentran las enfermedades del corazón (con una tasa de 69.1 por cada 100,000 habitantes) y en tercer lugar están las enfermedades isquémicas e hipertensivas (con una tasa de 50.5 por cada 100,000 habitantes) (DGE, 2001). Este comportamiento ha permanecido constante en la última década (Figura 2) y durante el año 2000, de las 437,667 defunciones registradas, el 15.7% (68,713) corresponden a enfermedades del corazón, de las cuales las isquémicas contribuyeron con el 64% (DGE, 2001).

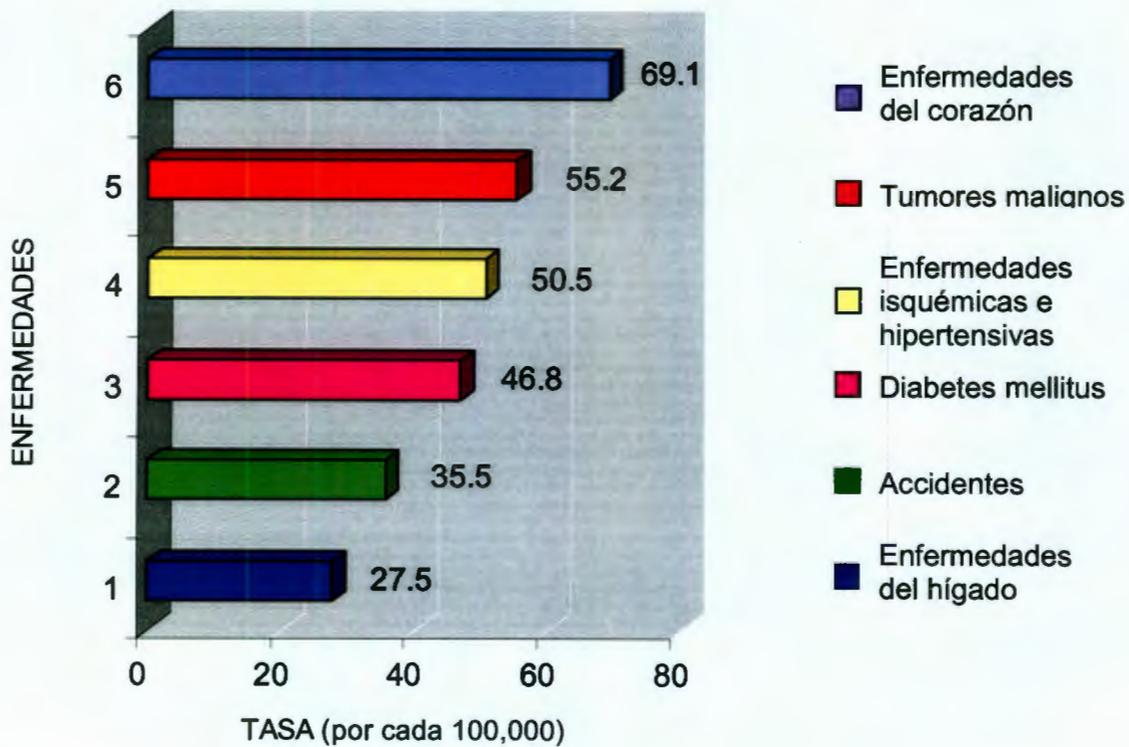


Figura 1. Principales causas de muerte general en México (2000) (DGE, 2001)

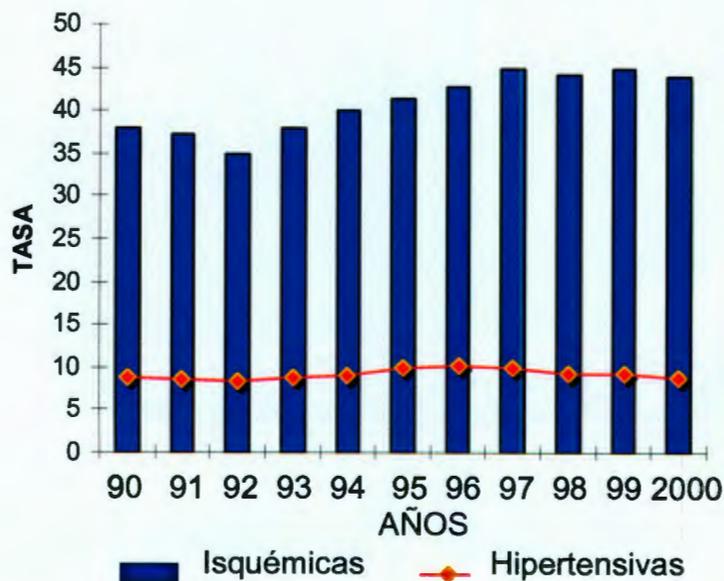


Figura 2. Mortalidad por enfermedades isquémicas e hipertensivas (1990-2000) (DGE, 2001)

Más aún, encuestas recientemente realizadas en México indican que el 60.5% de la población adulta mexicana presenta adicción al tabaco, obesidad, hipertensión arterial, diabetes e hipercolesterolemia, los cuales son factores de riesgo cardiovascular (Secretaría de Salud, 2002). Con respecto a la morbilidad (Figura 3), se reportó que en México hubo un incremento de casos de las patologías hipertensivas durante el periodo 96-97. Sin embargo, a partir de 1998, se ha observado un descenso en la incidencia de estas enfermedades (DGE, 2001).

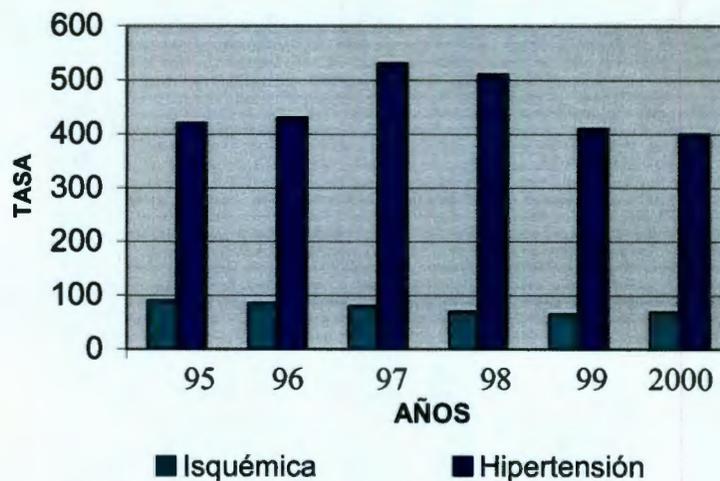


Figura 3. Morbilidad por enfermedad isquémica e hipertensión arterial (1995-2000) (DGE, 2001)

II.3 Fisiología de los vasos sanguíneos

En esta sección, 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 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. En forma dinámica, estos componentes modifican su forma, aumentan, disminuyen o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, manteniendo así la integridad del vaso en condiciones fisiológicas o participando en la alteración vascular que aparece en enfermedades como la hipertensión y la aterosclerosis (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 (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. En las arterias musculares, la íntima es más fina que en las arterias elásticas, y en las arterias de pequeño calibre y arteriolas está constituida básicamente por endotelio y una capa subendotelial muy estrecha (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).

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).

II.5 Endotelio

II.5.1 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 la media y la adventicia de los vasos sanguíneos; 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 (Dejana y col., 1995; Navarro-Cid y col., 1999; Ganong, 2000).

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, cabe destacar: 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 heparinoides sulfato, el factor de crecimiento transformante β ($\text{TGF}\beta$), 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 necesarias están firmemente unidas entre sí y 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).

El endotelio también regula la homeostasis y la trombosis mediante sus funciones antiplaquetarias, anticoagulantes y fibrinolíticas, así como la inflamación a través de la expresión de moléculas quimiotácticas y de adhesión. Ello hace del endotelio un verdadero sistema receptor y emisor de señales, que explica la razón por la que una hormona o la hemodinámica sanguínea pueden modificar la función vascular sin tener acceso directo a todos los componentes del mismo (Ganong, 1995; Navarro-Cid y col., 1999).

El endotelio constituye la interfase entre los compartimientos extravasculares. De hecho, es una barrera con permeabilidad selectiva al tamaño y la carga eléctrica que regula el flujo de macromoléculas entre la sangre y el espacio subendotelial (Navarro-Cid y col., 1999). En condiciones normales, el endotelio manifiesta una importante actividad antitrombógena mediante las acciones del NO y la PGI₂ que inhiben 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 endotelio vascular es capaz de producir diversas moléculas de adhesión que median las interacciones de los leucocitos con la pared vascular y que están relacionadas con la migración de éstos al espacio extravascular y participan de forma importante en las alteraciones inflamatorias asociadas a la propia pared. El NO es el factor endotelial con mayor capacidad antiadherente para leucocitos y monocitos (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, PGI₂ y EDHF, y las acciones constrictoras de la ET-1 y 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.5.2 Factores 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 (Colleman 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 (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: NOSe, isoforma constitutiva en las células endoteliales; NOSi, isoforma inducible presente en macrófagos y células musculares lisas; NOSn, isoforma neural constitutiva presente en el tejido nervioso y en estructuras medulares renales. Las NOSn y NOSi 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 activan por el Ca²⁺, sino que se induce su expresión por las citocinas (Schmidt y col., 1993; Fosterman y col., 1994; Li y Fosterman, 2000). El NO formado por el endotelio difunde hacia las células del músculo liso, en donde activa a la guanilato ciclasa (sGC) para producir cGMP; éste, a su vez, media la relajación del músculo liso vascular (Kamisaki y col., 1986; Humbert y col., 1990; Ignarro, 1990).

Asimismo, la hemoglobina inactiva al NO. Con el aumento súbito del flujo sanguíneo 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 inducen 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 con un electrón desapareado, que ocupa un orbital π antienlazante, y que por lo tanto es muy inestable, actuando 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 al endotelio (Moncada y Higgs, 1991).

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 restenosis y la lesión prostangioplástica (Pfeifer y col., 1999; Hofman y col., 2000).

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 PGI_2 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 (Beckman y col., 1994; Rubbo y col., 1996).

Otra sustancia liberada por el endotelio es el 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 dependientes de calcio y de ATP 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, del EDHF parece ser un mediador importante en la relajación dependiente del endotelio en las arterias mesentéricas de resistencia (Navarro-Cid y col., 1999).

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 similares de 21 aminoácidos; produciendo acciones biológicas con efectos cardiacos; estimulando una vasoconstricción intensa de las arterias coronarias y efectos inotrópico y cronotrópico positivos en el miocardio (Liu y col., 1997; Miwa y col., 1999).

La ET-1, como otros mediadores derivados del endotelio, se producen 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 inducida de ET. La hipoxia es otro estímulo importante para la producción de ET en el tejido vascular aislado, así como sujetos expuestos a la altitud. En particular, la trombina, la angiotensina II, la adrenalina, la vasopresina, el $TGF\beta$, los esteres 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.6 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, que difiere de ella en la manera en que inicia la contracción. La calmodulina 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, 1996).

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

II.7 Matriz extracelular

La estructura de la pared vascular, así como sus propiedades biomecánicas, dependen en gran medida de la matriz extracelular, que está compuesta por fibras elásticas y de colágeno incluidas en un gel compuesto por proteoglicanos, ácido hialurónico, glucoproteínas y agua. Un equilibrio adecuado entre los componentes de la matriz permiten mantener la integridad de la pared y la resistencia a roturas y hemorragias (Navarro-Cid y col., 1999).

II.8 Adventicia

Es una capa poco definida de tejido conectivo constituida por fibroblastos y haces de colágeno orientados longitudinalmente, así como por una red laxa de fibras elásticas delgadas y numerosas terminaciones nerviosas. Funcionalmente, se puede decir que la adventicia aísla el vaso de otros tejidos y proporciona el soporte de nervios y vasos que penetran en la pared de los vasos (Navarro-Cid y col., 1999).

II.9 Mecanismo de contracción de la musculatura lisa vascular

II.9.1 Bases bioquímicas de la contracción del músculo liso

El músculo liso contiene filamentos de actina y de miosina con características bioquímicas similares a las del músculo esquelético. El proceso contráctil es activado por iones calcio y la energía para la contracción es suministrada por la degradación del trifosfato de adenosina (ATP) o del difosfato de adenosina (ADP) (Kargacin y col., 1989; Huxley, 1996; Beckerle, 1998; Wendt, 2001).

II.9.2 Contracción del músculo liso

Durante mucho tiempo, no fue posible discernir, ni siquiera en micrografías electrónicas, una organización específica en la célula muscular lisa que pudiera explicar la contracción. Sin embargo, las técnicas recientes de microscopía electrónica sugieren que grandes cantidades de filamentos de actina están unidos a

los denominados cuerpos densos. Algunos de estos cuerpos están unidos a la membrana celular (Kargacin y col., 1989). Otros están dispersos en el interior de la célula y son mantenidos en su posición por un armazón de proteínas estructurales que unen estos cuerpos densos entre sí. Algunos de estos cuerpos densos de membrana de células contiguas, también están unidos entre sí por puentes intercelulares de proteína. Básicamente, la fuerza de contracción se transmite de una célula a la siguiente a través de estos enlaces (Holmes, 1997; Geeves y Holmes, 1999; Highsmith, 1999). Entre los numerosos filamentos de actina se intercalan unos pocos filamentos de miosina. Su diámetro es más de dos veces mayor que la de miosina. Parte de esta diferencia es causada por el hecho de que la razón de la longitud entre los filamentos de actina y los de miosina del músculo liso es mucho más elevada que en el caso del músculo esquelético, por lo tanto, aumenta la probabilidad de ver más filamentos de actina. No obstante, resulta impresionante la relativa escasez de filamentos de miosina respecto a los de actina (Highsmith, 1999).

II.9.3 Regulación de la contracción por iones calcio

Como es el caso del músculo esquelético, el acontecimiento iniciador de la contracción del músculo liso es un aumento de calcio intracelular. Este aumento puede ser causado por estimulación nerviosa de la fibra lisa, por estimulación hormonal, por distensión de la fibra, o incluso por cambios en el ambiente químico de la fibra (Williams y Fay, 1986; Guyton y col., 2001).

Las células musculares contienen una gran cantidad de una proteína reguladora denominada calmodulina. Aunque se trata de una proteína similar a la troponina (proteína reguladora del músculo esquelético), en cuanto que reacciona con cuatro iones de calcio, difiere de ella en la manera en que inicia la contracción. La calmodulina lo hace activando los puentes transversales de miosina. Esta activación, y la contracción subsiguiente, se produce según la siguiente secuencia:

- 1) Los iones de calcio se ligan a la calmodulina.

- 2) La combinación de calmodulina y calcio se une y activa a la miosina cinasa, una enzima que fosforila (Kamm y Stull, 1985; Somlyo y Somlyo, 1994; Heller y col., 2003).
- 3) Una de las cadenas ligeras de cada cabeza de miosina, denominada cadena reguladora, se fosforila por la acción de la miosina cinasa. Cuando esta cadena no está fosforilada, no se produce el ciclo de enlace-separación de la cabeza con el filamento de actina. Cuando la cadena reguladora está fosforilada, la cabeza tiene la capacidad de unirse al filamento de actina y seguir todo el proceso de los ciclos, de la misma manera que en el músculo esquelético, causando así la contracción muscular (Guyton y col., 2001; Heller y col., 2003).

II.10 Especies seleccionadas para el rastreo farmacológico

Las especies utilizadas en el presente trabajo para llevar a cabo las evaluaciones farmacológicas, se muestran en el Cuadro 1. Todas las especies vegetales fueron seleccionadas con base en los resultados obtenidos a partir de un estudio etnobotánico y bibliográfico realizado por investigadores de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.A.Q. Las especies (plantas completas) se recolectaron en el estado de Querétaro, durante el primer semestre del 2004 y se depositaron muestras de referencia en la colección etnobotánica del Herbario de Querétaro (QMEX).

Las especies *B. frutescens*, *P. calyculatus*, *T. mexicana* y *P. serotina* han sido objeto de estudios fitoquímicos y farmacológicos previos. En tanto que *C. murale* solamente ha sido estudiada desde un punto de vista fitoquímico. En ese estudio, se aislaron tres glicósidos de kaempferol a partir del extracto metanólico de *C. murale* (Gohar y col., 2002).

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>Chenopodium murale</i>	Quelite de pollo	Hipertensión, desórdenes gastrointestinales
<i>Psittacantus calyculatus</i>	Injerto anaranjado, Caballera, Chumpilla, Lirio parásito, Muérdago, Escápalo, Hoja de opinión	Angina de pecho, aterosclerosis, hipertensión
<i>Prunus serotina</i>	Capulín, Elocapulín (D.F.), Deze (Edo. Mex.), Shengua, Xenhua (Michoacán), Jumpa (Sonora)	Hipertensión, tos, diarrea y dolor abdominal, catarro, nubes en lo ojos, fiebres periódicas, afecciones respiratorias, disentería e insomnio
<i>Bocconia frutescens</i>	Gordolobo, Ts'ixte'(tenek) (San Luis Potosí)	Hipertensión y afecciones cardíacas, bronquitis, tuberculosis, tos, trastornos digestivos, anemia
<i>Talauma mexicana</i>	Yoloxóchitl (Hidalgo, México, Morelos), Anonillo (Yucatán), Flor de corazón (Oaxaca), Laurel (Morelos), Árbol de corazón, Magnolia mexicana.	Afecciones cardíacas, corrige arritmia, hipertensión, inflamación y dolor del corazón
<i>Solanum rostratum</i>	Abrojo, Colmillo de puerco, Espina amarilla, Flor del duraznillo, Hierba de la manca mula, Hierba del sapo, Huevo de chucho, Mala mujer, Ayohuixcle (Morelos), Iztecuete.	Enfermedades renales, empacho, trastornos digestivos, tos, inflamación, cólicos, desinfectar genitales y contra el cáncer y diabetes

Con respecto a los estudios efectuados con *B. frutescens*, en un análisis fitoquímico cualitativo se determinó que esta especie contiene alcaloides, saponinas, esteroides y triterpenos (Sánchez-Arreola y col., 2002). Otros estudios efectuados en las hojas de esta planta permitieron la purificación de diferentes alcaloides que incluyen: un tetrahidro-derivado de la columbamina, la coptisina, la iso-coripalmina, la corisamina, la alocriptopina, la protopina, la norqueleritrina, la rocadina, la sanguinarina y la norsanguinarina (Dopke y col., 1985; Argueta, 1994). De manera adicional, a partir de las raíces de *B. frutescens* se purificó la benzofenantridina, un alcaloide que bloquea los receptores AT1 de angiotensina II y los receptores ETA de endotelina 1. Esta actividad podría justificar el uso tradicional de esta planta para el control de la hipertensión (Caballero-George y col., 2002).

Por otra parte, en un estudio farmacológico efectuado recientemente, se determinó que el extracto etanólico de *P. calyculatus* produce una relajación, dependiente de la concentración, de la aorta aislada de rata. Esta relajación depende de la presencia de endotelio, lo cual sugiere que el efecto relajante inducido por el extracto de la planta involucra una modificación en la vía del óxido nítrico/GMP cíclico (NO/GMPc) (Rodríguez-Cruz y col., 2003). También se ha demostrado que el extracto acuoso obtenido de los tallos, hojas y flores de *P. calyculatus* presenta actividad hipoglucémica (Argueta, 1994).

La especie *T. mexicana* ha sido objeto de estudios farmacológicos desde hace varios años. En un primer estudio, se demostró que el extracto de las hojas de esta planta aumenta la frecuencia y la fuerza de las contracciones del miocardio (Raymond-Hamet, 1938). Un estudio farmacológico reciente indicó que el extracto acuoso de las hojas de *T. mexicana* presenta actividad hipertensora en gatos, cuando se administra por vía intravenosa. El mismo extracto también tiene propiedades vasoconstrictoras. En el Instituto Médico Nacional se llevaron a cabo algunos estudios clínicos en los que se evaluó el efecto de extractos acuosos preparados a partir de las semillas y la corteza de *T. mexicana*. Dichos estudios demostraron que el extracto de la planta aumenta la amplitud del pulso y regulariza y retarda las contracciones del corazón en pacientes con insuficiencia mitral. Se ha propuesto también que *T. mexicana* contiene compuestos que actúan de manera

similar a los glicósidos cardiotónicos (Argueta, 1994). En lo que respecta a los estudios químicos efectuados sobre esta especie vegetal, se ha determinado que las hojas, las semillas y la corteza contienen los alcaloides talaumina (Argueta, 1994) y liriodenina (Kametani y col., 1975). De la corteza, se han purificado esteroides (Collera, 1963) y un sesquiterpeno. En tanto que del tallo se purificó la 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (Kametani y col., 1975). A pesar de los estudios químicos y farmacológicos que se han hecho sobre *T. mexicana*, a la fecha se desconoce la naturaleza química de sus principios activos y su mecanismo de acción.

Con relación a *P. serotina*, a partir de esta especie se han purificado algunos triterpenos y compuestos fenólicos. Además, se ha determinado que las semillas, las hojas y la corteza de la planta contienen amigdalina, un glicósido cianogénico. De manera adicional, se determinó que el extracto acuoso preparado a partir de la corteza de *P. serotina* presenta un efecto antimicrobiano contra diversas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Argueta, 1994).

Con base en los antecedentes, 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, se desconoce el mecanismo de acción de dichos principios activos.

III. HIPÓTESIS

Los extractos preparados a partir de 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 *Chenopodium murale*, *Psittacanthus calyculatus*, *Prunus serotina*, *Bocconia frutecens*, *Talauma mexicana* y *Solanum rostratum* sobre el 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 Material

V.1.1 Plantas objeto de estudio

Las especies seleccionadas para su evaluación farmacológica fueron: *Chenopodium murale* (Chenopodiaceae), *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae), *Prunus serotina* (Rosaceae), *Bocconia frutescens* (Papaveraceae), *Talauma mexicana* (Magnoliaceae) y *Solanum rostratum* (Solanaceae).

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

C. murale, *P. serotina*, *P. calyculatus* y *S. rostratum* se recolectaron en el estado de Querétaro, *B. frutescens* se recolectó en Michoacán y *T. mexicana* se compró en el Mercado de Sonora. Se depositaron muestras de cada una de las especies en el herbario de Querétaro (QMEX). En esta etapa se contó con la participación de los Drs. Luis Hernández, 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 se secó y se pulverizó. Los extractos acuosos se prepararon, mediante una digestión a 60 °C durante 24 hrs 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

Las ratas 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, 5 mM D-glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Fostermann, 1994; Feelisch y col., 1999). 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 reposos (basal) de 1.5 gr 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 gr. 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 rango 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 concentración 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).

En los experimentos que involucran la presencia de bloqueadores de canales de calcio voltaje dependientes, el bloqueador se aplicó 20 min antes de la aplicación de la fenilefrina.

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

Se hicieron al menos seis evaluaciones para cada una de las concentraciones de los extractos de prueba. En cada caso se calcularon los promedios \pm SEM. 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}).

VI. RESULTADOS

V1.1 Evaluación del efecto de diferentes especies vegetales empleadas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares sobre el tono de la aorta intacta de rata

Los resultados del rastreo farmacológico de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares mostraron que los extractos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale* produjeron un efecto vasorelajante de la aorta aislada de rata, mientras que los extractos de *S. rostratum* y *B. frutescens* indujeron la contracción de la musculatura lisa arterial. Por otro lado, el extracto de la especie *T. mexicana* presentó un efecto bifásico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto inducido por los extractos de las especies seleccionadas sobre el tono del músculo liso vascular.

Especie vegetal	Efecto farmacológico observado
<i>Psittacantus calyculatus</i>	RELAJANTE
<i>Prunus serotina</i>	RELAJANTE
<i>Chenopodium murale</i>	RELAJANTE
<i>Solanum rostratum</i>	CONTRÁCTIL
<i>Bocconia frutescens</i>	CONTRÁCTIL
<i>Talauma mexicana</i>	BIFÁSICO

V1.2 Determinación del efecto vasorelajante de los extractos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale* sobre el tono de la aorta intacta aislada de rata

Los extractos acuosos de estas tres plantas produjeron una respuesta relajante de la musculatura lisa arterial, la cual fue dependiente de la concentración.

Las curvas concentración-respuesta del efecto relajante inducido por los extractos de estas plantas se muestran en la Figura 4. El efecto máximo (E_{max}) y la concentración efectiva media (CE_{50}) se muestran en el Cuadro 3.

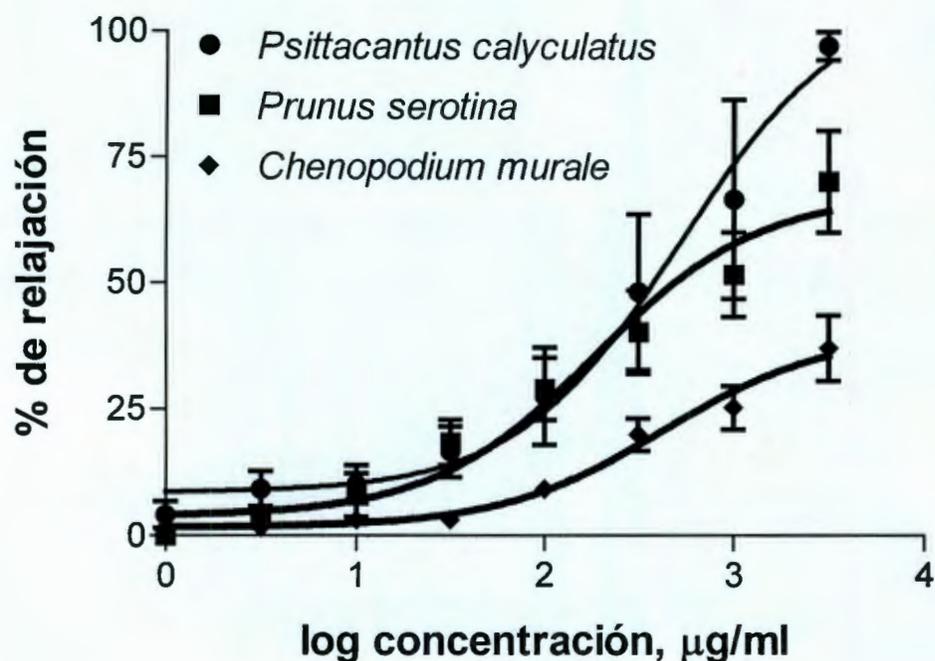


Figura 4. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los extractos acuosos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale*.

Cuadro 3. CE_{50} y E_{max} del efecto relajante inducido por los extractos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale* sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos.

Especie vegetal	CE_{50} (µg/ml)	E_{max} (%)
<i>Psittacantus calyculatus</i>	531.9 ± 2.8	97.22 ± 2.8
<i>Prunus serotina</i>	190.6 ± 1.9	70.24 ± 10.0
<i>Chenopodium murale</i>	440.2 ± 1.5	37.12 ± 6.6

Las CE_{50} calculadas para los extractos de las tres plantas que presentaron respuesta relajante fueron similares, mientras que el extracto de *P. calyculatus* produjo el mayor efecto máximo ($97.22 \pm 2.8 \%$).

VI.3 Evaluación del efecto relajante inducido por los extractos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale* sobre el tono de la aorta de rata sin endotelio

La determinación del efecto vasorelajante de extractos o compuestos de prueba en segmentos de aorta libre de endotelio, se emplea comúnmente para discriminar si el efecto relajante producido por estos extractos o compuestos involucra la inducción de la liberación de factores relajantes derivados de endotelio o es un efecto directo de las sustancias sobre los receptores membranales o canales iónicos de las células musculares lisas.

La eliminación del endotelio bloqueó, de manera significativa, el efecto vasorelajante del extracto de *P. calyculatus*, como se puede ver en la Figura 5.

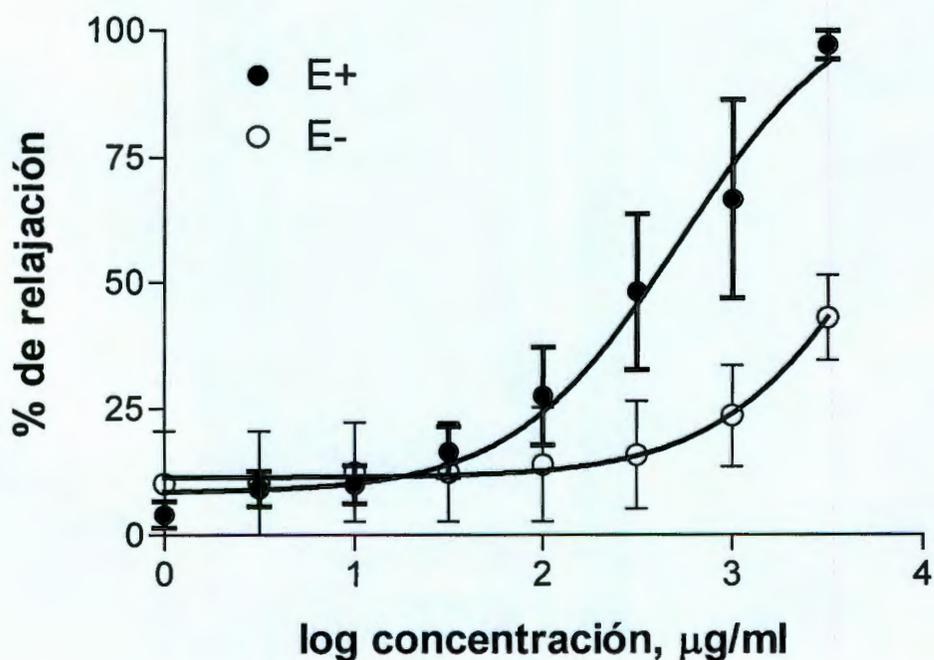


Figura 5. Curva concentración-respuesta del efecto relajante del extracto acuoso de *P. calyculatus* en ausencia (E-) y en presencia (E+) de endotelio vascular.

Este bloqueo se observa como un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta, en la cual también se muestra un decremento del efecto máximo. Los resultados de estos experimentos indicaron que el efecto relajante producido por el extracto *P. calyculatus* depende de endotelio. Los compuestos presentes en esta planta, posiblemente interaccionan con receptores endoteliales, resultando en la liberación de factores derivados de endotelio que producen la relajación del músculo liso arterial.

Por otro lado, los extractos acuosos de *P. serotina* y *C. murale* produjeron su efecto relajante de manera independiente de endotelio, ya que las curvas concentración-respuesta de ambos extractos no se modificaron de manera significativa cuando se eliminaron las células endoteliales (Figura 6).

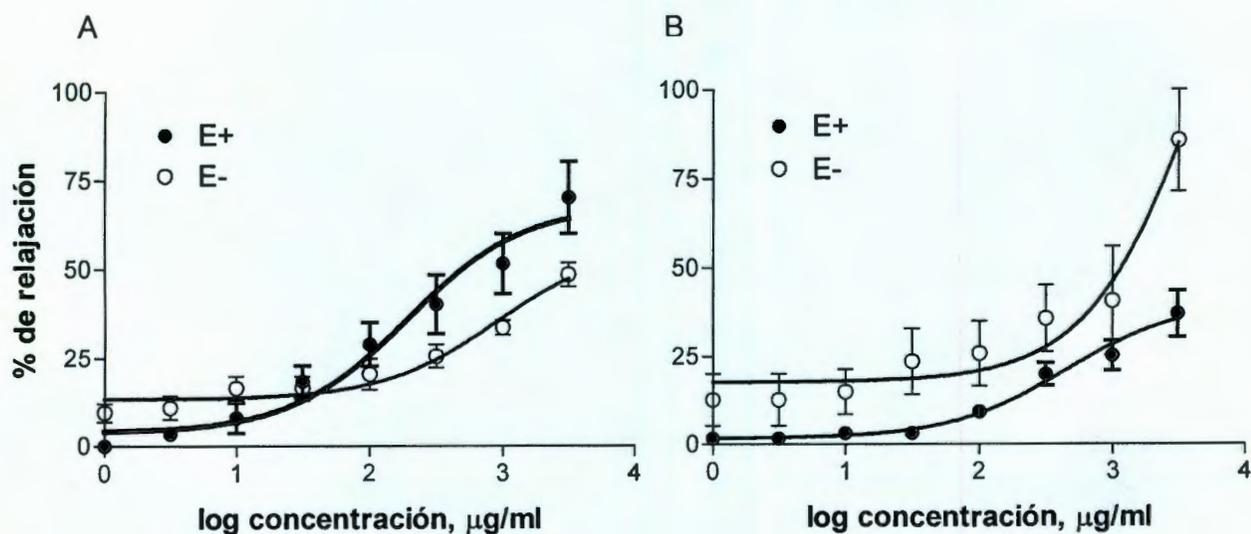


Figura 6. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante inducido por los extractos acuosos de A) *P. serotina* y B) *C. murale* en ausencia (E-) y en presencia (E+) de endotelio.

VI. 4 Determinación del efecto contráctil inducido por los extractos de *S. rostratum* y *B. frutescens* en la aorta aislada de rata

Los extractos acuosos de estas dos especies produjeron una respuesta contráctil en la musculatura lisa arterial, la cual fue dependiente de la concentración. Las curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de estas especies vegetales se muestran en la Figura 7.

E_{max} y la CE_{50} del extracto de *B. frutescens* resultaron ser mucho mayores que en el caso de *S. rostratum* (Cuadro 4).

Cuadro 4. CE_{50} y E_{max} del efecto contráctil de *S. rostratum* y *B. frutescens* sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos.

Especie vegetal	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	E_{max} (%)
<i>Solanum rostratum</i>	1249 ± 1.3	44.31 ± 6.3
<i>Bocconia frutescens</i>	0.07 ± 0.001	110.00 ± 9.6

La contracción de la musculatura lisa arterial puede ser inducida por compuestos que induzcan la liberación de factores vasoconstrictores derivados del endotelio o por compuestos que actúen directamente sobre receptores o canales iónicos localizados en la célula muscular lisa. Las células musculares lisas, así como otras células excitables poseen una gran cantidad de canales iónicos capaces de regular la concentración de calcio intracelular y, por lo tanto, la contracción de estas células. Por esta razón, se determinó en qué medida la presencia de nifedipina o verapamilo, bloqueadores de canales de calcio voltaje dependientes tipo L, afectaban el efecto contráctil inducido por los extractos acuosos de *S. rostratum* y *B. frutescens*.

Los resultados de estos experimentos mostraron que el verapamilo redujo la potencia del efecto del extracto de *B. frutescens* aproximadamente 257 veces ($CE_{50} = 18 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$; Figura 7 A).

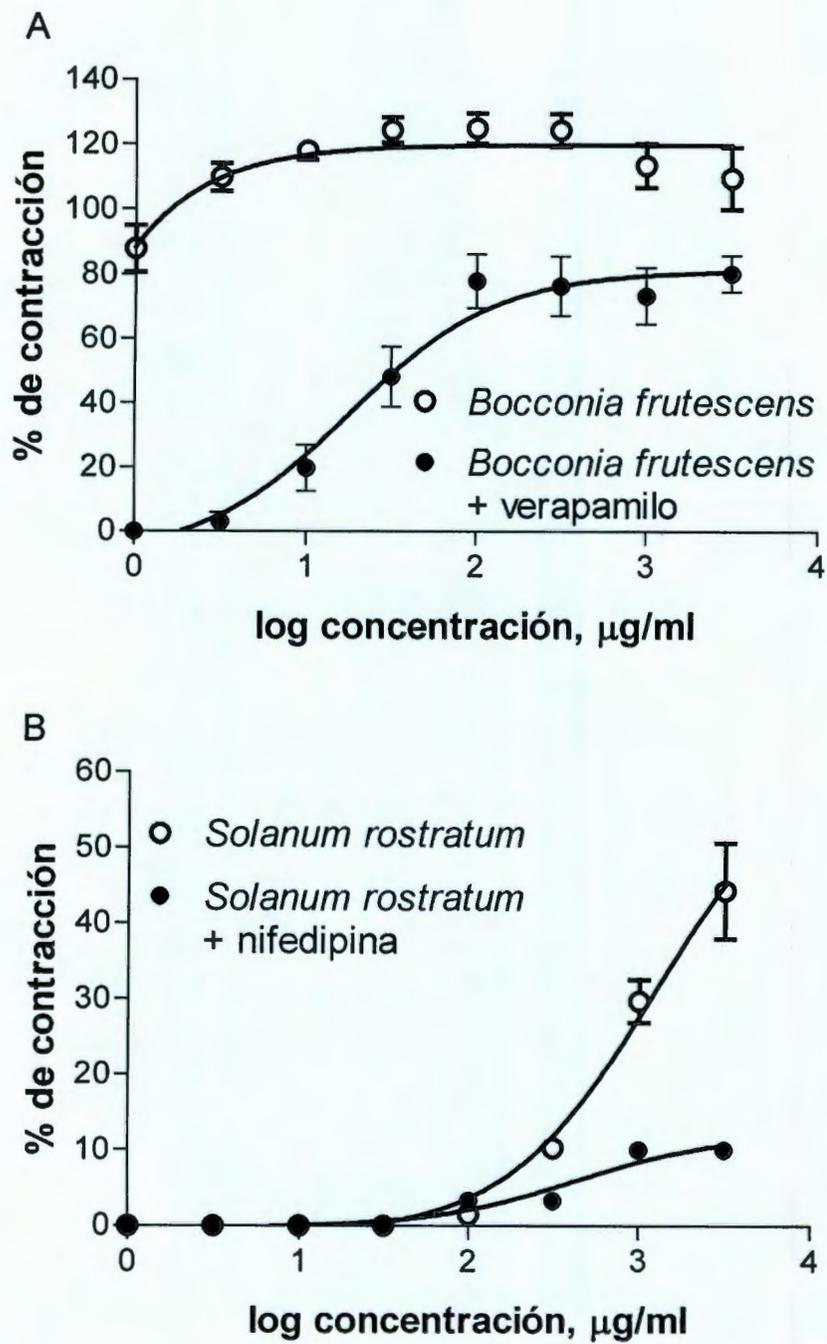


Figura 7. Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de los extractos acuosos de A) *B. frutescens* y B) *S. rostratum* en ausencia y en presencia de nifedipina o verapamilo.

La potencia del efecto del extracto de *S. rostratum* no se modificó de manera significativa en presencia de nifedipina. En el caso de *S. rostratum*, sin embargo, la nifedipina produjo un descenso significativo en el E_{max} ($10 \pm 0.6 \%$; Figura 7 B). Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. CE_{50} y E_{max} del efecto contráctil inducido por los extractos de *S. rostratum* y *B. frutescens* sobre el tono del músculo liso arterial en presencia y en ausencia de un bloqueador de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L.

Espece vegetal	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) control	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) bloqueador	E_{max} (%) control	E_{max} (%) bloqueador
<i>Solanum rostratum</i>	1249 ± 1.3	436 ± 1.3	44.3 ± 6.3	10 ± 0.6
<i>Bocconia frutescens</i>	$0.07 \pm$ 0.001	18 ± 1.4	110 ± 9.6	80.6 ± 5.6

VI.5 Determinación del efecto bifásico del extracto acuoso de *T. mexicana* mediante el empleo del ensayo de aorta aislada de rata

Esta especie vegetal produjo un respuesta bifásica en la musculatura lisa arterial, la cual consistió en una relajación inicial que llegó a su punto máximo a la concentración de $100 \mu\text{g/ml}$ ($E_{max} = 25.6 \pm 8.9 \%$), seguida de una disminución del efecto relajante (Figura 8 A).

El bloqueo de los canales de calcio voltaje dependientes con ayuda de nifedipina eliminaron por completo el efecto contráctil y permitieron la cuantificación del efecto relajante producido por el extracto acuoso de *T. mexicana*. La eliminación del efecto contráctil potenció de manera significativa el efecto relajante producido por el extracto, alcanzando de esta manera una eficacia cercana al 100% ($E_{max} = 89 \pm 6.7 \%$; $CE_{50} = 6.4 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$; Figura 8 B).

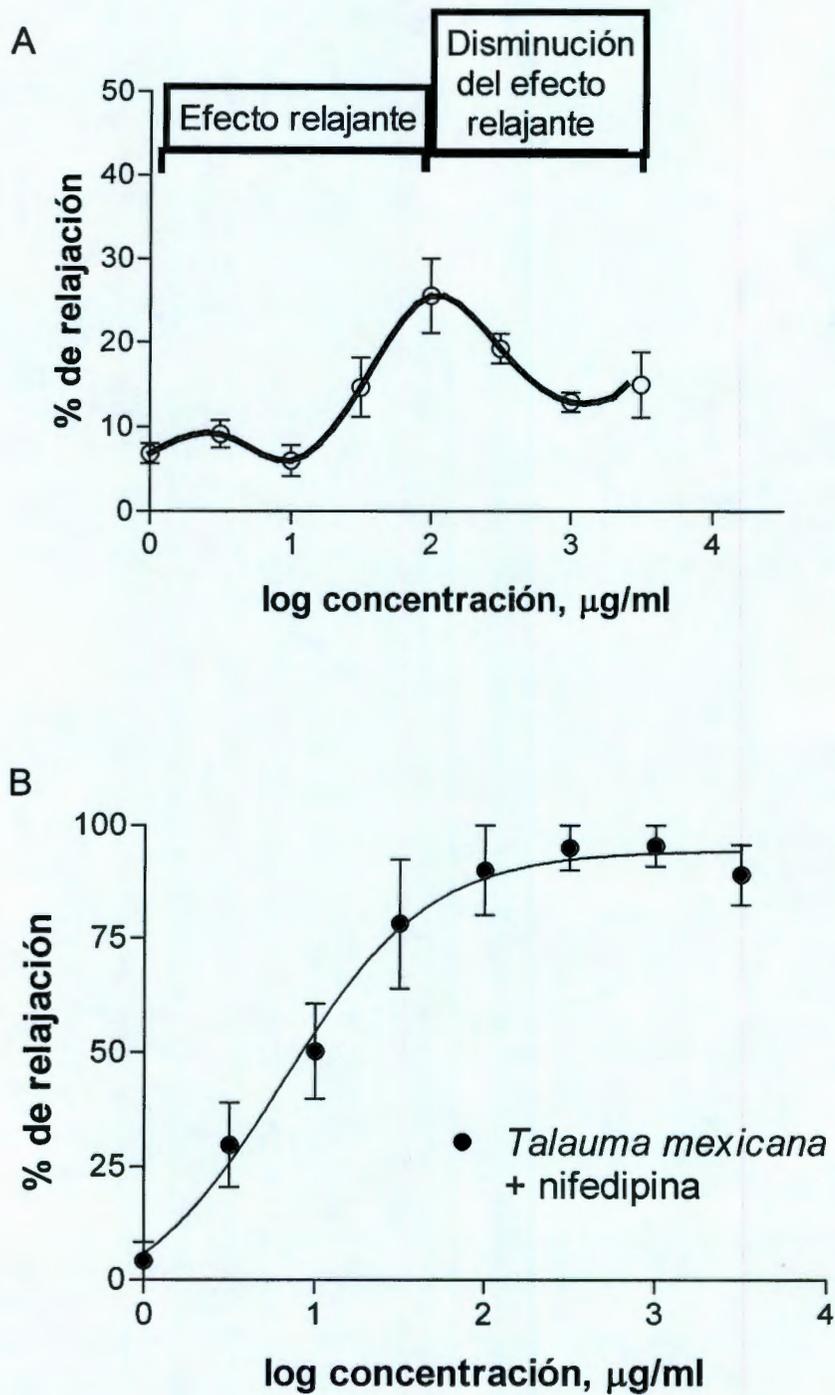


Figura 8. Curvas concentración-respuesta del efecto bifásico (A) y relajante observado en presencia de nifedipina (B), del extracto acuoso de *T. mexicana*.

VI. DISCUSIÓN

El objetivo fundamental planteado en la presente tesis fue la comprobación farmacológica del efecto vasoactivo 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 etnobotánico, 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 etnobotánicos de las especies vegetales para el tratamiento de diversos padecimientos cardiovasculares, 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 vasomotor. 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 las plantas evaluadas ejercen tres tipos de efectos sobre el tono del músculo liso arterial, que pueden ser un efecto relajante, un efecto contráctil o un efecto bifásico. Se encontró que los extractos acuosos de *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale* producen relajación de la aorta. En tanto que los extractos de *S. rostratum* y *B. frutescens* aumentan el tono de la aorta. Finalmente, el extracto de *T. mexicana* induce un efecto bifásico,

caracterizado por una fase inicial de relajación, seguida de una fase de aumento del tono vascular.

La Figura 4 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto relajante inducido por *P. calyculatus*, *P. serotina* y *C. murale*. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}). Aunque los valores de CE_{50} calculados para las tres plantas fueron similares, se observó que el extracto más potente fue el de *P. serotina* ($CE_{50} = 190.6 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$) y el menos potente fue el extracto de *P. calyculatus* ($CE_{50} = 531.9 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$). Por otra parte, con relación al valor de E_{max} , el cual está relacionado con la efectividad de las sustancias de prueba, se determinó que el extracto que era capaz de inducir un mayor efecto relajante fue el de *P. calyculatus*, con un valor de $E_{max} = 97.22 \pm 2.8 \%$ (Cuadro 3).

La inhibición de la contracción inducida por fenilefrina en la aorta producida 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.

En estos experimentos, se observó que la eliminación del endotelio bloqueó, de manera significativa, el efecto vasorelajante del extracto de *P. calyculatus* (Figura 5). Estos resultados indicaron que el extracto de esta especie contiene compuestos capaces de inducir la liberación de factores endoteliales vasorelajantes, ya que al eliminar el endotelio no se observó la relajación de la aorta. Los factores podrían ser el NO o la PGI_2 .

Los principales factores endoteliales vasorelajantes son el NO y la PGI_2 . El NO activa a su proteína receptora, la enzima sGC, lo cual resulta en una elevación de los niveles de GMPc (Rasmussen y col., 1990; Murad, 1994; Ibarra-Alvarado y col., 2002; Melichar y col., 2004; Molin y col., 2004). En tanto que la estimulación de los receptores a PGI_2 promueve la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), lo

cual da como resultado un incremento en los niveles de AMPc. El aumento en los niveles intracelulares de AMPc y GMPc inhibe la contracción del músculo liso vascular, mediante varios mecanismos que dan como resultado una disminución en los niveles de Ca^{2+} intracelular y una disminución en el grado de fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina (Lucas y col., 2000; Kamm y Stull, 2001).

En lo que se refiere al efecto vasorelajante inducido por los extractos acuosos de *P. serotina* y *C. murale*, éste fue independiente de la presencia del endotelio vascular (Figura 6). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el efecto relajante inducido por los extractos de estas plantas no involucra la liberación de factores endoteliales vasorelajantes y más bien sugieren que los principios activos de las dos especies actúan directamente en las células del músculo liso vascular. La acción relajante ejercida por los principios activos de 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 interaccionen 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.

Por otra parte, con relación a los dos extractos que indujeron un efecto contráctil sobre la aorta aislada de rata, se observó que el extracto de *B. frutescens* ($\text{CE}_{50} = 0.07 \pm 0.001 \mu\text{g/ml}$) resultó ser aproximadamente 18,000 veces más potente que el extracto de *S. rostratum* ($\text{CE}_{50} = 0.07 \pm 0.001 \mu\text{g/ml}$).

Con la finalidad de conocer si el efecto vasoconstrictor inducido por los extractos de las dos plantas dependía del calcio extracelular, se realizaron experimentos en los que se incubaron los tejidos durante 5 min con nifedipina ($1 \mu\text{M}$) o verapamilo ($1 \mu\text{M}$), bloqueadores de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, antes de agregar los extractos de prueba. Tanto la nifedipina, como el verapamilo interaccionan 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 el verapamilo redujo la potencia del efecto del extracto de *B. frutescens* aproximadamente 257 veces ($CE_{50} = 18 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$) (Figura 7 A). En el caso del extracto de *S. rostratum*, la nifedipina produjo un descenso significativo en el valor de la E_{max} ($44.3 \pm 6.3 \%$ al $10 \pm 0.6 \%$) (Figura 7 B). Estos resultados sugieren que los principios activos contenidos en los extractos de *B. frutescens* y *S. rostratum* provocan un efecto contráctil sobre el músculo liso arterial, mediante la inducción de un aumento en el influjo de Ca^{2+} al interior de la célula muscular, quizá mediante la activación directa o indirecta de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L. Este tipo de canales iónicos son activados a altos potenciales de membrana; se inactivan lentamente y se expresan en células del músculo liso, esquelético y cardíaco y son esenciales para el proceso de acoplamiento excitación-contracción (Tsiel y col., 1991).

Finalmente, el extracto acuoso preparado a partir de *T. mexicana* presentó un efecto bifásico sobre el tono del músculo liso arterial intacto de rata. Este efecto se caracterizó por una relajación inicial, seguida por una contracción sostenida (Figura 8 A). Ambos efectos, el relajante y el contráctil fueron débiles, debido posiblemente a que las dos respuestas se bloqueaban mutuamente. Por esta razón, se realizaron experimentos dirigidos a caracterizar, de manera independiente, el efecto contráctil y el efecto relajante. En primer término, se evaluó el efecto del extracto de la planta sobre la aorta de rata en presencia de nifedipina. En estos experimentos se observó que la nifedipina bloqueó completamente el componente contráctil de la respuesta producida por el extracto de *T. mexicana*, lo cual indica claramente que los principios activos de la planta que producen un aumento en el tono vascular, ejercen su efecto vasoconstrictor mediante un incremento en la entrada de Ca^{2+} al interior de las células del músculo liso vascular. Este aumento en el influjo de Ca^{2+} podría estar mediado por una activación directa o indirecta de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L. La eliminación de la fase contráctil del efecto bifásico producido por *T. mexicana* potenció, de manera

significativa el efecto relajante del extracto (Figura 8 B), lo cual confirma la suposición de que ambos efectos se bloqueaban mutuamente.

VIII. CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de *Bocconia frutescens*, *Chenopodium murale*, *Psittacanthus calyculatus*, *Prunus serotina*, *Solanum rostratum* y *Talauma mexicana* modifican el tono del músculo liso vascular.
- Los extractos de *C. murale*, *P. calyculatus* y *P. serotina* producen relajación de la aorta. Los extractos de *B. frutescens* y *S. rostratum* aumentan el tono de la aorta y el extracto de *T. mexicana* induce un efecto bifásico, caracterizado por una fase inicial de relajación, seguida de una fase de aumento del tono vascular.
- El extracto de *P. calyculatus* contiene compuestos capaces de inducir la liberación de factores endoteliales vasorelajantes.
- El efecto vasorelajante inducido por los extractos de *C. murale* y *P. serotina* no involucra la liberación de factores endoteliales vasorelajantes. Posiblemente, los principios activos de estas dos especies actúan directamente en las células del músculo liso vascular, quizá bloqueando la entrada de Ca^{2+} extracelular al interior de las células del músculo liso.
- Los principios activos contenidos en los extractos de *B. frutescens* y *S. rostratum* provocan un efecto contráctil sobre el músculo liso arterial, mediante la inducción de un aumento en el influjo de Ca^{2+} al interior de la célula muscular, quizá mediante la activación directa o indirecta de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L.
- El componente contráctil de la respuesta bifásica inducida por el extracto de *T. mexicana* es mediada principalmente por un incremento en la entrada de Ca^{2+} al interior de las células del músculo liso vascular.

- 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.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adame, J., Adame, H. 2000.** Plantas curativas del noroeste de México. 1era. ed., Castillo: 25-30.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E. 1994.** Plantas medicinales del herbario del Instituto mexicano del seguro social. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano, México:120-124
- Aguilar, A. 2001.** Plantas Medicinales del centro de México. Guías de México desconocido. México: 145-147
- Argueta, A. 1994.** Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1ra. ed., Instituto Nacional Indigenista, México: tomo I: 319-320, 580, tomo II: 842-843, 672-673, tomo III: 1402-1403.
- Beckerle, M. C. 1998.** Spatial control of actin filament assembly: lessons from listeria. Cell. Vol. 95: 741-748.
- Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. y Crow, J. P. 1994.** Oxidative chemistry of peroxynitrite. Methods in Enzymology. Vol. 233: 229-240.
- Bye, R. 1995.** Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 29: 65-82.
- Caballero-George, C., Vanderheyden, P. M. L., Apers, S., Van den Heuvel, H., Solis, P. N., Gupta, M. P., Claeys, M., Pieters, L., Vauquelin, G. y Vlietinck, A. J. 2002.** Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT1 and endothelin 1ETA receptors: Bioactive benzophenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. Planta medica. Vol. 68: 770-775.
- Colleman, R. A., Smith, W. K., Naruiya, S. 1994.** International union of pharmacology classification of protanoid receptors and their subtypes. Pharmacology Reviews. Vol. 46: 205-229.
- Collera, O., Walls, F., Garcia, F., Flores, S. E. y Herran, J. 1963.** Invetigation of the bark of *Talauma mexicana*. Boletín del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México. Vol.15: 38-40.
- 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.

Dejana, E., Corada, M. y Lampugnani, M. G. 1995. Endotelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal*. Vol. 9: 910-918.

Dirección General de Epidemiología (DGE). 2001.
www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RNICOPE.htm.

Dopke, W., Jimenez, V. y Salas, M. 1985. Alkaloid content of *Bocconia frutescens* Linn (papaveracea). *Zeitschrift fuer Chemie*. Vol. 25: 105-106.

Feelich, 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. m., 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.

Galle, J., Zabel, U., Hubener, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C., y Schmidt, H. H. 1999. Effects of the soluble guanylyl cyclase activatos, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *British Journal Pharmacology*. Vol. 127: 194-203.

Ganong, W. F. 2000. *Fisiología Médica*. 17a. ed., El manual moderno, México: 122, 657-661.

Geeves, M. A., Colmes, K. C. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annual Review Biochemistry*. Vol. 68: 687-728.

Godfraind, T., Miller, R. y Wibo, M. 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacology Reviews*. Vol. 38: 321-415.

Gohar, Ahmed A., Maatooq, Galal T., Niwa, Masatake. 2000. Flovonoides glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*. Vol. 53: 229-303.

Guyton, A. C., Hall, J. E., Ph, D. 2001. *Tratado de Fisiología Medica*. 10 ed., MacGraw-Hill Interamericana, México: 103-106.

- Heller, W. T., Krueger, J. K., Trehwella, J. 2003.** Further insights into calmodulin-myosin light chain kinase interaction from solution scattering and shape restoration. *Biochemistry*. Vol. 42: 10579-10588.
- Hifnawy, M. S., El-Hyatmy, Y. Y., Kenawy, S. A., Yossef, A. K. y Awaad, A. S. 1999.** Carbohydrate, lipid, protein and amino acid content of *Chenopodium murale*, *Cyperus alopecuroides*, *Desmostachya bipinnata*, and *Tamarix nilotica* cis allergic plants. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*. Vol. 37: 99-106.
- Higshmith, S. 1999.** Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP. *Biochemistry*. Vol. 38: 9791-9797.
- Hofmann, F., Ammendola, A. y Schlossmann, J. 2000.** Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of Cell Science*. Vol: 113: 973-983.
- Holmes, K. C. 1997.** The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Current Biology*. Vol. 7: 112-118.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fisher, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., Gausepohl, H., Frank, R. L., Schultz, G. y Bohme, E. 1990.** Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *European Journal 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-stimulate 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 and Toxicology*. Vol. 67: 1-7.
- Kametani, T., Terasawa, H., Ihara, M. y Iriarte, J. 1975.** Liriodenine from *Talauma mexicana*. *Phytochemistry*. Vol. 14: 1884-1885.
- 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.

- Kamm, K. E. y Stull, J. T. 1985.** The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 25: 593-620.
- Kamm, K. E. y Stull, J. T. 2001.** Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276: 4527-4530.
- 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. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 108: 1465-1475.
- Li, H. y Forstermann, U. 2000.** Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *Journal of Pathology*. Vol. 190: 244-254.
- Linares, E., Flores, B. y Bye, R. 1994.** Selección de Plantas Medicinales de México. 1era. ed., Limusa, México: 10-15.
- 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.
- Lozoya, X. 1999.** Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. *Research Unit in Pharmacology of Natural Products, National Center, Mexican Institute of Social Security, México city Ciba Foundation symposium 185: 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. *Pharmacology Reviews*. Vol. 52: 375-414.
- Melichar, V. O., Behr-Roussel, D., Zabel, U., Uttenthal, L. O., Rodrigo, J., Rupin, A., Verbeuren, T. J., Kumar, H. S. A. y Schmidt, H. H. 2004.** Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. Vol. 101:16671-16676.
- Miwa, S., Iwamuro, Y., Zhang, X. F., Enoki, T., Okamoto, Y., Okazawa, M. y Masaki, T. 1999.** Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Japanese Journal of Pharmacology*. Vol. 80: 281-374.

- Molin, J. C., Bendhack, L. M. 2004.** Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and independent mechanisms. *Vascular Pharmacology*. Vol. 42: 1-6.
- Moncada, S., Higgs, E. A. 1991.** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*. Vol. 21: 361-374.
- Murad, F. 1994.** Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Advances in Pharmacology*. Vol. 26: 1-5.
- Murad, F. 1996.** Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *The 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.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. y Hofmann, F. 1999.** Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 135: 105-149.
- Rasmussen, H., Keller, G. y Douglas, J. S. 1990.** Interactions between Ca^{2+} and cAMP messenger system in regulation of airway smooth muscle contraction. *American Journal of Physiology*. Vol. 258: L279-288.
- Raymond-Hamet. 1938.** Physiological action of the leaves of "yoloxochitl" (*Talauma mexicana* Don, Magnoliaceae), a cardioactive drugs from México. *Comptes Rendus des seances de la societe de Biologie et the ses filiales*. Vol. 132: 459-462.
- Risler, N. R., Miatello, R. M. y Cruzado, M. C. 2002.** La pared vascular en la hipertensión arterial. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*. Vol. 31: 315-320.
- Rodríguez-Cruz, M. E., L. Pérez-Ordaz, B. E., Serrato-Barajas, M. A., Juárez-Oropeza, D. Mascher y M. C. Paredes-Carbajal. 2003.** Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rata aortic rongs. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 86: 213-218.

- 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.
- Sanchez-Arreola, E., Maiti, R. K., Vazquez-Torres, M., Cruz-Topete, D. y Quirarte-Flores, E. E. 2002.** Preliminar study on pharmacognosy and phytochemistry of two Mexican medicinal plants, "gordolobo" (*Bocconia frutescens* L. [Papavaceae]). *Phyton*:107-111.
- 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.
- Secretaria de Salud. 2002.** bvs.insp.mx/componen/suirtual/bicce/vZn0203/03.htm.
- Somlyo, A. P. y Somlyo, A. V. 1994.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. Vol. 372: 231-236.
- Tsiel, R. W., Ellinor, P. T. y Horner W. A. 1991.** Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends in Pharmacology Sciences*. Vol. 12: 349-354.
- Velázquez-Monroy, O., Rosas Peralta, M., Lara Esqueda, A., Pastelin Hernandez, G., Castillo, C., Attie, F. y Tapia Conyer, R. 2003.** Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in México. Final outcomes from the National Health Survey 2000. *Archivos de Cardiología de México*. Vol. 73: 62-77.
- Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K. M. y Taylor, K. 2001.** Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Biochemistry*. Vol. 98: 4361-4366.
- 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.