



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**“Efecto hipotensor y vasorelajante de la corteza  
del ahuehuate (*Taxodium mucronatum*)  
en la rata (*Rattus norvegicus*)”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:  
FLORES MARTÍNEZ LETICIA

DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero

ASESORA:  
Dra. Leticia Cruz Antonio



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FITOFARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, DURANTE EL PERIODO 2006-2007, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por los recursos proporcionados.*

*Al Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero por su ayuda en el trabajo experimental y escrito.*

*A la Dra. Leticia Cruz Antonio por su tiempo y ayuda.*

*A la M. en C. Araceli García, M. en C. Claudia Fabiola Martínez y QFB Enrique Escalera por sus observaciones y consejos.*

*A la M. en C Elna Páez y al QFB Juan Luis Escobar por la instrucción en los métodos desarrollados*

*A todos los que al compartir su conocimiento hicieron posible la realización de esta tesis.*

*A Mis Padres y Hermanos*

*Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre  
es que no todos ignoramos las mismas cosas.*

*ALBERT EINSTEIN*

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ABREVIATURAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
RESUMEN .....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	4
2.1. Hipertensión arterial sistémica .....	4
2.1.1. Epidemiología .....	4
2.1.2. Definición.....	5
2.1.3. Clasificación por niveles de presión arterial .....	6
2.1.4. Clasificación por estadios .....	6
2.1.5. Etiología.....	7
2.1.6. Fisiopatología .....	8
2.1.7. Tratamiento Farmacológico.....	9
2.1.7.1. Diuréticos.....	10
2.1.7.2. Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos .....	11
2.1.7.3. Bloqueadores $\alpha$ -adrenérgicos .....	11
2.1.7.4. Inhibidores de la ECA y antagonistas de la angiotensina II .....	11
2.1.7.5. Bloqueadores de canales de calcio.....	12
2.2. <i>Taxodium mucronatum</i> Ten. (Ahuehuete).....	13
2.2.1. Orígenes y Descripción .....	13
2.2.2. Hábitat .....	15
2.2.3. Historia.....	15
2.2.4. Etnobotánica.....	16
2.2.5. Estudios científicos.....	17
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
4 OBJETIVOS .....	20
4.1. General.....	20
4.2. Específicos .....	20
5 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	21
6 MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
6.1. Reactivos.....	22
6.2. Preparación de las soluciones.....	22
6.3. Colección y comprobación taxonómica .....	22
6.4. Preparación de extracto metanólico (EM) .....	22
6.5. Estudio del EM sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada.....	23
6.6. Estudio del EM en anillos de aorta aislada de rata. ....	24

6.7.	Estudio del EM sobre el lecho mesentérico aislado de rata .....	25
6.8.	Análisis estadístico .....	27
7	RESULTADOS .....	28
7.1.	Obtención de la corteza e identificación del <i>T. mucronatum</i> .....	28
7.2.	Rendimiento del extracto metanólico y sus características físicas.....	28
7.3.	Efectos del EM sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada.....	29
7.4.	Efecto del EM en anillos de aorta aislada de rata .....	32
7.4.1.	Estudios preliminares sobre el mecanismo de acción.....	36
7.4.1.1.	Influencia del cloruro de potasio sobre el efecto relajante del EM .....	36
7.4.1.2.	Influencia de atropina sobre el efecto relajante del EM.....	40
7.4.1.3.	Influencia de indometacina sobre el efecto relajante del EM .....	42
7.4.1.4.	Influencia de L-NAME sobre el efecto relajante del EM .....	44
7.4.1.5.	Influencia de loratadina sobre el efecto relajante del EM.....	46
7.4.1.6.	Influencia de propranolol sobre el efecto relajante del EM.....	48
7.5.	Efecto del EM sobre el lecho mesentérico aislado de rata.....	50
8	DISCUSIÓN.....	54
9	CONCLUSIONES.....	59
10	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	60
11	ANEXO .....	61
12	REFERENCIAS .....	64

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
$\bar{x}$	Media
AAAR	Anillos de Aorta Aislada de Rata
ACh	Acetilcolina
CE <sub>50</sub>	Concentración a la cual se obtuvo el 50 % de efecto máximo (Concentración Efectiva 50)
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
DM	Diabetes Mellitus
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECEA	Enfermedades Crónica Esenciales en el Adulto
EEM	Error Estándar de la Media
EM	Extracto Metanólico
FC	Frecuencia Cardíaca
g	gramo
h	hora
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
IMC	Índice de Masa Corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	kilogramo
KH	Solución Krebs-Henseleit modificada
L	Litro
LMAR	Lecho Mesentérico Aislado de la Rata
L-NAME	Nitro-L-arginina, metilester
M	Molaridad
min	minutos
mm Hg	milímetros de mercurio
NA	Noradrenalina
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión Arterial
PAM	Presión Arterial Media
PAS	Presión Arterial Sistémica
pH	potencial de Hidrogeno
Ss	Solución salina
UI	Unidades Internacionales

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Árbol de <i>T. mucronatum</i> .....	13
Figura 2. Hojas del <i>T. mucronatum</i> .....	14
Figura 3. Frutos del <i>T. mucronatum</i> .....	14
Figura 4. Estados de la República Mexicana en donde se utiliza al <i>T. mucronatum</i> .....	17
Figura 5. Imagen del montaje de la preparación de la rata anestesiada. ....	23
Figura 6. Imagen del montaje de la preparación de AAAR. ....	24
Figura 7. Representación esquemática de la experimentación con LMAR.....	26
Figura 8. Curvas dosis-tiempo del efecto producido sobre la PAM de la rata anestesiada, por la administración vía i.v. de una dosis de EM o de Ss.....	30
Figura 9. Curvas dosis-tiempo del efecto producido sobre la FC de la rata anestesiada, por la administración vía i.v. de una dosis de EM o de Ss.....	31
Figura 10. Gráfica digitalizada que ejemplifica los efectos obtenidos en un AAAR al estimularlo durante 5 ocasiones con NA y posteriormente con ACh .....	32
Figura 11. Contracción máxima estable alcanzada por una concentración de NA en AAAR con diferente funcionalidad endotelial >75 %, <45 % y 0 % probada con ACh .....	33
Figura 12. Gráfica digitalizada que ejemplifica los efectos obtenidos con concentración crecientes del EM en AAAR precontraídos con NA .....	34
Figura 13. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante del EM obtenidas en AAAR contraídos con NA y con un endotelio funcional >75 %, <45 % y 0 %. ....	35
Figura 14. Comparación de los promedios de las tensiones máximas alcanzadas por los AAAR con la adición de NA y KCl.....	37
Figura 15. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante del EM obtenidas en AAAR estimuladas con NA y KCl. ....	39
Figura 16. Gráfica digitalizada y comparativa de los efectos obtenidos con la adición de concentraciones crecientes y acumulativas del EM en AAAR precontraídos con NA con y sin algún tipo de bloqueador .....	40
Figura 17. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes y después de la administración de una concentración de atropina por 10 min, en AAAR estimulados con NA. ....	41

Figura 18. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes y después de la administración de una concentración de indometacina por 10 min, en AAAR estimulados con NA.....	43
Figura 19. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes y después de la administración de una concentración de L-NAME por 10 min, en AAAR estimulados con NA.....	45
Figura 20. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes y después de la administración de una concentración de loratadina por 10 min, en AAAR estimulados con NA.....	47
Figura 21. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes y después de la administración de una concentración de propranolol por 10 min, en AAAR estimulados con NA.....	49
Figura 22. Gráfica digitalizada de los efectos obtenidos en LMAR al estimularlos con concentraciones crecientes de NA.....	50
Figura 23. Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de NA sobre el LMAR obtenidas antes y después de la perfusión con EM o prazosina.....	51
Figura 24. Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de KCl sobre el LMAR obtenidas antes y después de la perfusión con EM o con nifedipina.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla I. Valores de referencia para la presión arterial en el humano.....	6
Tabla II. Etapas de la hipertensión arterial sistémica.....	7
Tabla III. Principales causas de hipertensión.....	8
Tabla IV. Medicamentos para el control de la hipertensión. ....	10
Tabla V. Partes de la planta con pruebas científicas de actividad biológica.....	18
Tabla VI. Compuestos químicos aislados del <i>T. mucronatum</i> . ....	18
Tabla VII. Valores promedio de la PAM registrados durante 60 min en ratas anestesiadas tratadas con Ss o con una dosis de EM.....	29
Tabla VIII. Valores promedio de la FC registrados durante 60 min en ratas anestesiadas tratadas con Ss o con una dosis de EM.....	29
Tabla IX. Valores promedio de la tensión máxima alcanzada por la adición de NA en AAAR que tienen una funcionalidad endotelial >75 %, <45 % y de 0 %, probada con ACh.....	33
Tabla X. Valores promedio de la tensión resultante después de la administración de concentraciones crecientes y acumuladas de EM, en AAAR que tienen una funcionalidad endotelial >75 %; <45 % y 0 % .....	34
Tabla XI. Estadística inferencial (prueba de Dunnett) realizada con los datos obtenidos con diferentes concentraciones del EM, entre los tres grupos de AAAR con diferente funcionalidad endotelial probada con ACh. ....	36
Tabla XII. Comparación de las tensiones máximas alcanzadas por los AAAR estimulados con dos vasoconstrictores diferentes NA y KCl. ....	36
Tabla XIII. Valores promedio y CE <sub>50</sub> de la relajación producida por la administración de concentraciones crecientes del EM en AAAR precontraídos con NA o KCl .....	38
Tabla XIV. Valores promedio y CE <sub>50</sub> del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de atropina .....	40
Tabla XV. Valores promedio y CE <sub>50</sub> del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de Indometacina.....	42

Tabla XVI. Valores promedio y $CE_{50}$ del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de L-NAME.....	44
Tabla XVII. Valores promedio y $CE_{50}$ del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de loratadina .....	46
Tabla XVIII. Valores promedio y $CE_{50}$ del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de propranolol .....	48
Tabla XIX. Valores promedio y $CE_{50}$ de la presión obtenida por concentraciones crecientes de NA administradas en LMAR antes y después de la perfusión con EM o prazosina.....	51
Tabla XX. Valores promedio y $CE_{50}$ de la presión obtenida por concentraciones crecientes de KCl administradas en LMAR antes y después de la perfusión con EM o nifedipina.....	52

---

---

## Efecto hipotensor y vasorelajante de la corteza del ahuehuete (*Taxodium mucronatum*) en la rata (*Rattus novvegicus*)”

### RESUMEN

En un estudio previo se mostró que un extracto metanólico (EM) obtenido de la corteza seca del *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete), posee actividad relajante del músculo liso de Anillos de Aorta Aislada de Rata (AAAR). El propósito de la presente investigación es caracterizar dicho efecto en AAAR, y correlacionarlo con la actividad del EM en el sistema cardiovascular de la rata anestesiada y sobre la Presión Arterial (PA) del Lecho Mesentérico Aislado de Rata (LMAR). En la rata anestesiada la administración i.v. [100 mg/kg] de EM produjo hipotensión inmediata de corta duración acompañada de bradicardia sostenida. En los AAAR contraídos con NA [100 nM] o con KCl [50 mM], el EM produjo relajación dependiente de la concentración ( $CE_{50}$  del EM = 409 y 484,57  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente), con remoción del endotelio o con pretratamiento de L-NAME [30  $\mu\text{M}$ ], el efecto vasorelajante se bloquea parcialmente. En adición a este mecanismo que involucra la participación de óxido nítrico (NO), se encuentra la posible producción de prostaglandinas en el anillo vascular, lo cual se pone de manifiesto al antagonizar la vasorelajación con indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M]. Parte del efecto hipotensor puede explicarse por una acción directa de al menos un componente del EM sobre el músculo liso arteriolar, ya que en el LMAR la perfusión de este extracto [0,05 mg/mL] bloqueó parcialmente las curvas concentración-respuesta realizadas con NA o KCl. La  $CE_{50}$  de NA fue de 200,4  $\mu\text{M}$  y con el EM de 489,4  $\mu\text{M}$ , mientras que para KCl fue de 190,48  $\mu\text{M}$  y con el EM de 314,5  $\mu\text{M}$ . Estos resultados demuestran que 1) el metanol extrae de la corteza del *T. mucronatum* mas de un compuesto con importante actividad vaso-relajante cuyo mecanismo de acción podría estar relacionado con la producción y/o liberación de NO y prostaglandinas; 2) al menos un componente del EM tiene actividad hipotensora que guarda estrecha relación con acciones directas sobre los vasos de resistencia arteriolar; 3) al menos un componente del EM tiene actividad bradicardizante la cual podría participar en el efecto hipotensor. La presente tesis aporta evidencias farmacológicas experimentales, preclínicas que fundamentan el estudio de la corteza de *T. mucronatum* como potencial fuente de nuevos medicamentos. Sin embargo, aún son estudios preliminares, y para un completo entendimiento de las acciones cardiovasculares que produce el EM, se requiere la separación de los principios activos y el estudio farmacológico de cada uno de ellos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La vida del humano esta íntimamente ligada a su ambiente, en particular a las plantas, las cuales, además de ser una fuente de alimentos, han sido utilizadas como remedios medicinales para conservar el estado de salud de la gente de todos los pueblos, incluido por su puesto México. Desde tiempos inmemorables la medicina tradicional mexicana ha empleado las plantas superiores como fuente de productos curativos,<sup>1</sup> y el conocimiento empírico derivado de esta practica, ha sido transmitido por generaciones hasta llegar a los misioneros viajeros españoles quienes los inmortalizaron en diversas obras monumentales como el códice De Martín de la Cruz y Badiano<sup>2</sup> Tan importante fueron las plantas superiores como remedios medicinales que en México a principios del siglo XX, constituían la base de prevención y curación de la mayoría de las enfermedades.<sup>3</sup> Con el progreso de la industria química farmacéutica y el incremento de la síntesis de nuevos productos, el interés científico por la flora medicinal disminuyó drásticamente durante gran parte del siglo XX.<sup>3, 4</sup> Sin embargo, ante la necesidad de mejores medicamentos el interés por las plantas resurgió en las últimas tres décadas. De hecho, el hombre ha mantenido vigentes su interés por entender y explicar las propiedades curativas de las plantas, ha desarrollado diversas disciplinas, como la química en cuya historia abundan los estudios destinados a identificar y purificar los constituyentes de los vegetales;<sup>5, 6</sup> la farmacología disciplina encargada de estudiar el sitio, el mecanismo de acción y la intensidad de los efectos con relación a las dosis administradas; la antropología que trata de entender los aspectos socioculturales que enmarcan el uso de las plantas medicinales, etc.<sup>7</sup>

Se estima que el número de plantas superiores (angiospermas y gimnospermas) en el planeta tierra es de 215 000 a 500 000. De estas plantas, cerca del 6 por ciento han sido valoradas científicamente para demostrar su actividad biológica, y 15 por ciento para determinar sus componentes químicos.<sup>8</sup>

La información científica sobre este campo se ha incrementado notoriamente; sin embargo, para una gran cantidad de extractos y sustancias de origen vegetal, no se cuenta con los estudios preclínicos y/o clínicos que permitan reconocer científicamente sus propiedades medicinales y tóxicas. Con métodos de tamizado más avanzados, se espera obtener la información científica necesaria para ubicar a las plantas medicinales dentro de un contexto científico que permita el uso racional.<sup>2,3</sup>

En la República Mexicana se registran más de 3 000 plantas medicinales<sup>9</sup> y con relación al sistema cardiovascular, más de 50 de ellas han sido referidas como activas en dicho sistema. Sin embargo, se carece de suficientes evidencias experimentales que avalen dichos efectos. Tal es el caso del *Taxodium mucronatum* (ahuehuete) árbol de importante significado en la vida cultural, social y medicinal del pueblo mexicano, al cual se le atribuyen propiedades curativas sobre el sistema cardiovascular aún no confirmadas.<sup>4</sup>

## 2. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### 2.1. Hipertensión arterial sistémica

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es uno de los factores de riesgo más significativo en el desarrollo y progresión de las enfermedades cardiovasculares.<sup>10, 11, 12</sup> Se estima que cada 4 segundos ocurre un síndrome coronario agudo<sup>12, 13</sup> y cada 5 segundos un accidente vascular cerebral en el mundo,<sup>14, 15</sup> padecimientos en donde la HAS, la obesidad, las hiperlipidemias, el sedentarismo, el tabaquismo, el alcoholismo, etc., tienen un papel determinante.<sup>14</sup> Desafortunadamente, en etapas tempranas de la HAS su diagnóstico está limitado porque el enfermo no refiere sintomatología, y cuando esta se presenta, ya existen problemas severos en diferentes órganos del cuerpo, incluyendo el sistema cardiovascular, que en la mayoría de los casos llevan a la muerte del paciente.<sup>10,12 16</sup> Por tal motivo el diagnóstico oportuno y el tratamiento temprano son cruciales para modificar favorablemente la historia natural de dichas enfermedades.

#### 2.1.1. Epidemiología

La HAS forma parte del conjunto de enfermedades crónicas no transmisibles denominadas “enfermedades crónicas esenciales del adulto” (ECEA) entre las que además se encuentran: la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), dislipidemias, obesidad y aterosclerosis. Estas enfermedades han demostrado un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas,<sup>16</sup> lo cual constituye un problema de salud pública mundial, pues ahora se reconoce a las ECEA como la primera causa mundial de morbilidad en el adulto.<sup>15, 17</sup>

En México la HAS es un problema de salud pública muy importante, se considera que de toda la población de la República Mexicana, el 80,8 % tiene algún tipo de hipertensión la cual se distribuye de la siguiente manera: 34,9 % con estadio I; 41,4 % con estadio II; y 4,5 % con estadio III.<sup>16</sup> Los pacientes mayores de 55 años son los que presentan mayor incidencia de HAS con un 91,5 % en estadio II y 4,5 en estadio III, es decir el 95,6 % de los individuos mayores de 55 años presentan hipertensión moderada o severa.<sup>16</sup>

La prevalencia de la HAS guarda estrecha relación con la edad, medio ambiente, estilo de vida, género y factores co-mórbidos, tales como diabetes, pues de toda la población diabética en

México (10,8 %), el 46,2 % de ella tiene hipertensión arterial, la obesidad (en individuos en donde el índice de masa corporal (IMC) es mayor a 30 kg/m<sup>2</sup>) existe un incremento en la prevalencia de HAS en todos los subgrupos de edad,<sup>10, 11, 16</sup> otros factores son dislipidemias, tabaquismo y predisposición genética.

Hoy en día existen numerosos medicamentos que se utilizan para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares,<sup>17, 18</sup> en especial para el control de la HAS.<sup>19, 20</sup> Sin embargo, la mayoría ocasionan efectos secundarios<sup>21</sup>. Además, su alto costo ocasiona un gasto público elevado. Tan solo en 1999 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) tuvo un gasto anual promedio de \$1 067, la medicina privada de \$2 868 y la población abierta invirtió \$701 por cada un individuo hipertenso atendido.<sup>16</sup> Ante esta realidad, son necesarios nuevos fármacos que resuelvan las limitantes de eficacia, seguridad y costos que tienen los fármacos antihipertensivos existentes.

El costo de la atención es millonario pues la HAS es un padecimiento únicamente controlable y no curable, por lo que se requiere de atención médica y tratamiento farmacológico de por vida.<sup>22</sup> Esto abre un gran campo de investigación en la búsqueda de nuevos fármacos en donde el presente proyecto se ubica.

### **2.1.2. Definición**

La regulación de la presión arterial (PA) es un mecanismo dinámico en equilibrio que mantiene un riego adecuado a todos los órganos, la presión arterial sistémica (PAS) esta regulada por factores hormonales, neuronales, metabólicos que están mutuamente relacionados y controlados por sistemas de regulación central, a través del Sistema Nervioso, y local a través de múltiples señales localizadas en diversos tejidos.<sup>19, 23</sup> La PAS en todos los individuos fluctúa durante todo el día como respuesta a diversos estímulos,<sup>17, 20</sup> tiende a aumentar por actividad física constante, ingesta de algunos alimentos y por la edad, todo ello sin exceder en condiciones de reposo, los valores considerados como límite de normalidad (130/90 mmHg).<sup>22, 24</sup>

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), el límite para definir a un paciente como hipertenso es > 130 mm Hg en la presión sistólica y/o > de 90 mm Hg en la diastólica.<sup>17-24</sup> Cuando los valores de un paciente se encuentren por encima de la "normalidad", antes de catalogarlo como hipertenso se debe descartar la posibilidad de que el incremento de la PA sea

transitorio. Por ejemplo el ejercicio reciente, la ingesta de café, té, o cualquier otra sustancia estimulante administrada previamente a la toma de la PA puede incrementar los valores, por tal motivo se deben realizar varias mediciones (2 ó 3 por semana) antes de establecer el diagnóstico definitivo de HAS.<sup>21, 24, 25.</sup>

Cuando se detecten cifras de PA limítrofes o levemente elevadas durante varias ocasiones, independientemente de la causa, debe ser un motivo de búsqueda intencionada del diagnóstico de HAS, porque la perfusión tisular puede estar comprometida. Además, es recomendable la búsqueda de otros factores de riesgo.<sup>22, 24</sup>

Nuevos conocimientos en relación con HAS indican que no sólo es el nivel numérico en mm Hg, lo que establece el riesgo, sino que existen otros factores que deben ser tomados en cuenta al momento de estratificar el riesgo del paciente. Las cifras de PA bien registradas, siguen siendo piedra angular en la graduación de riesgo, pero el enfoque debe ser integral.<sup>22</sup>

### 2.1.3. Clasificación por niveles de presión arterial

El nivel de PA es un importante parámetro para la prescripción y el abordaje terapéutico, siempre y cuando se tome en cuenta el contexto del enfermo. En la **Tabla I** se demarca la clasificación según el nivel de PA en mm Hg.<sup>20, 22, 24</sup>

**Tabla I.** Valores de referencia para la presión arterial en el humano.

Categoría	Presión diastólica/sistólica
Presión Arterial óptima	<120/80 mm de Hg
Presión Arterial normal	120-129/80-84 mm de Hg
Presión Arterial normal alta*	130-139/ 85-89 mm de Hg
Presión Arterial elevada o hipertensión	≥140/≥90 mm Hg

\* Si se trata de un paciente diabético con nefropatía (proteinuria) estas cifras deben ser consideradas como si fuera hipertensión y requiere tratamiento farmacológico.

Fuente: Hipertensión arterial en México Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. NOM-030-SSA2-1999

### 2.1.4. Clasificación por estadios

La clasificación por estadios se basa en las cifras de PA en mm Hg registrados tanto en la diastólica como en la sistólica (**Tabla II**).<sup>22, 24</sup> Si un paciente hipertenso de acuerdo con las cifras de presión detectadas cae en una categoría con la sistólica y en otra con la diastólica, se debe clasificar de acuerdo con el valor más alto de las dos.

**Tabla II.** Etapas de la hipertensión arterial sistémica.

Etapa	Hipertensión	Presión mm Hg	Características
I	Leve	140-159/90-99	El pronóstico de este grupo es muy bueno, el tratamiento se fundamenta en métodos no farmacológicos, como la disminución de peso, mejores hábitos alimenticios y ejercicio constante. Sin embargo, si el paciente tiene diabetes o daño renal con proteinuria, debe ser catalogado como hipertenso estadio II.
II	Moderada	160-179/100-109	Aparecen manifestaciones como es el aumento de triglicéridos, sodio, mayor lipólisis y un aumento considerable de glucosa. En general este grupo de pacientes difícilmente responde a un solo medicamento. Es conveniente señalar que si el paciente es además diabético con proteinuria, o bien hay evidencia de daño renal o a otro órgano blanco, el paciente debe ser considerado de riesgo mayor.
III	Severa	≥180/≥110	La HAS severa lesiona los vasos sanguíneos renales, cardiacos y cerebrales, además produce un aumento en la frecuencia de insuficiencia renal, enfermedad coronaria y embolia cerebral. El paciente amerita estudios especiales y debe ser valorado por un especialista. Por lo general difícilmente responden a un solo fármaco y no es raro que se requiera la combinación de más de 2 fármacos.

Fuente: NOM-030-SSA2-1999

### 2.1.5. Etiología

Aunque la HAS puede ser secundaria a otras enfermedades (**Tabla III**) solo en 10 al 15 % de los pacientes puede establecerse una causa específica de hipertensión<sup>25, 26</sup>, los demás casos representan una variedad conocida como hipertensión esencial o ideopática (de causa desconocida). Los antecedentes familiares de hipertensión aumentan la posibilidad de que un individuo desarrolle dicha enfermedad.<sup>18</sup> En la mayor parte de los casos, la PA elevada se relaciona con un aumento global en la resistencia al flujo de la sangre normal.<sup>18, 20, 21</sup>

La PA elevada suele provocarse por una combinación de varias anormalidades (multifactorial). Pruebas epidemiológicas señalan que factores hereditarios, estrés, factores ambientales así como alimenticios (aumento en el consumo de sal y decremento de potasio o calcio) y tabaquismo puede contribuir al desarrollo de hipertensión.<sup>18</sup> En poblaciones con poca ingesta de sodio al día no se detecta un aumento en la PA y son más propensos que los controles normales a sufrir elevaciones de PA después de consumir sal.<sup>21,27</sup>

**Tabla III.** Principales causas de hipertensión.

1. Hipertensión Primaria (esencial)
2. Hipertensión secundaria
  - A. Renales
    - i. Hipertensión renovascular
      - a. Enfermedad aterosclerótica
      - b. Enfermedad fibromuscular
    - ii. Enfermedad renal parenquimatosa
    - iii. Glomerulonefritis aguda
    - iv. Insuficiencia renal crónica
    - v. Pielonefritis crónica
    - vi. Hidronefosis
    - vii. Nefropatía diabética
    - viii. Nefrectomía
    - ix. Tumores productores de renina
    - x. Renopriva
    - xi. Retención primaria de sodio (síndrome de Liddle, síndrome de Gordon)
  - B. Endocrinas.
    - i. Síndrome de Cushing
      - a. Disfunción Hipotálamo-hipofisiaria
      - b. Tumor productor de ACTH
      - c. Neoplasia suprarrenal
    - ii. Aldosteronismo primario
      - a. Hiperplasia bilateral de la corteza suprarrenal
      - b. Adenoma de la corteza suprarrenal
      - c. Carcinoma de la corteza suprarrenal
    - iii. Feocrocitoma
      - a. Benigno vs. maligno
      - b. Único vs. Múltiple
      - c. Suprarrenal vs. extrasuprarrenal
    - iv. Acromegalia
      - v. Exceso de mineralocorticoide
    - vi. Hipertiroidismo
    - vii. Hiperparatiroidismo
    - viii. Exceso de hormona de crecimiento.
  - C. Anticonceptivos por vía bucal.
  - D. Hormonas exógenas.
  - E. Alimentos con tiamina e inhibidores de la aminooxidasa.
  - F. Coartación de la aorta y aortitis.

Fuente: Kaplan N. Hipertensión clínica (2004), Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics (2006).

La hipertensión esencial es cuatro veces más frecuente entre la población negra que entre la blanca, y es más frecuente entre los adultos de sexo masculino respecto a las mujeres de la misma edad.<sup>18</sup>

### 2.1.6. Fisiopatología

La HAS es una enfermedad multifactorial. Al lado del indudable componente genético, puede señalarse la influencia de los diversos mecanismos que intervienen en la regulación normal de

la PA. Los principales determinantes de la PA son el gasto cardiaco y la resistencia vascular sistémica. Estos factores son controlados por diferentes sistemas neurohormonales que involucran el riñón, el sistema nervioso autónomo, el corazón y los pulmones, entre otros. El riñón controla la PA a largo plazo, regula el sodio y el volumen de líquido extracelular<sup>21</sup> a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona. La estimulación de este sistema es prohipertensivo y ha dado origen a los términos hipertensión dependiente de volumen, según predomine la vasoconstricción por angiotensina o el aumento de volumen de líquido extracelular.<sup>21, 29</sup>

Recientemente se ha dado gran importancia a la regulación local del tono vascular, mediante la producción por el endotelio arterial de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. La alteración en la producción de estos factores contribuye a la fisiopatología de la HAS.<sup>29</sup>

### **2.1.7. Tratamiento Farmacológico.**

Por lo general la HAS leve se controla con dieta y ejercicio. La hipertensión moderada puede requerir un medicamento; y la grave requiere tratamiento con varios fármacos, que deben seleccionarse con base en su efectividad y a la menor producción de efectos adversos.

Todos los fármacos antihipertensivos tienen efectos adversos, como lo tienen la mayoría de los fármacos utilizados con otros fines terapéuticos, sin embargo en el caso de la hipertensión, los efectos adversos son especialmente importantes porque la mayoría de los pacientes hipertensos no tienen síntomas, y la aparición de estos, incomodan al paciente y son causa de abandono del tratamiento.

El tratamiento farmacológico antihipertensivo tiene como objetivos fundamentales retornar y mantener los valores de PA dentro de la normalidad.<sup>10, 11, 12</sup> Para ello se cuenta con una amplia gama de medicamentos que por diversos mecanismos de acción se clasifican como: diuréticos, bloqueadores  $\beta$ , inhibidores de la ECA, Antagonistas de la angiotensina II, bloqueadores de canales de calcio,<sup>26 29, 30</sup> bloqueadores alfa, los cuales repercuten en la hemodinámica cardiovascular (**Tabla IV**).<sup>18, 21</sup>

**Tabla IVI.** Medicamentos para el control de la hipertensión.

Tipos de antihipertensivos	Ejemplos	
Diuréticos	Bufetanida Furosemida Hidroclotiacida	Espironolactona Triantereno
Bloqueadores beta	Atenolol Labetalol Metropolol	Nadolol Propranolol Timolol
Inhibidores de la ECA	Benacepril Captopril Enalapril Fisinopril	Lisinopril Moexipril Quinapril Ramipril
Antagonistas de la angiotensina II	Losartán	Valsartán
Bloqueadores de canales de calcio	Amlodipina Diltiacem Felodipina Isradipina	Nicardipina Nifedipina Nisoldipina Verapamilo
Bloqueadores alfa	Doxazosino Prazosino	Terazosino Fentilamina
Otros	Clonidina Diazóxido Hidralacina	Alfametildopa Minoxidilo Nitroprusiato de sodio

Fuente: Kaplan N. Hipertensión clínica (2004), Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics (2006).

### 2.1.7.1. Diuréticos

La terapia con diuréticos a bajas dosis es segura y efectiva para prevenir el accidente vascular cerebral, infarto al miocardio e insuficiencia cardiaca.<sup>10, 11</sup> Los diuréticos más utilizados para el tratamiento de la HAS se clasifican en tres grandes grupos: tiazidas, diuréticos de asa y agentes ahorrados de potasio.<sup>12, 21</sup>

El mecanismo del efecto antihipertensivo de los diuréticos no se ha dilucidado por completo. La caída inicial de la PA en un inicio, se debe al incremento de la excreción de sodio y agua, lo cual disminuye el volumen extracelular, el gasto cardiaco y el flujo sanguíneo renal, sin embargo, en etapas posteriores se asocia una acción, no del todo comprendida, sobre el músculo liso arteriolar que probablemente tenga que ver con la modulación de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP.<sup>26, 30</sup>

El incremento en la incidencia de cardiopatías y la impotencia sexual son los efectos adversos más informados, la hiperuricemia que producen las tiazidas puede precipitar un ataque de gota, y la hiperglicemia contraindicar su uso en pacientes con DM.<sup>11</sup> Los calambres musculares son

consecuencia del desequilibrio hidroelectrolítico particularmente la hipocaliemia que en presencia de otros fármacos, como digoxina, puede ser mortal.<sup>20, 21</sup>

#### **2.1.7.2. Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos**

Este grupo de fármacos antihipertensivos es el segundo grupo más utilizado en la práctica clínica.<sup>10</sup> Su efecto benéfico parece deberse al antagonismo directo que ejercen fármacos como el metoprolol, atenolol, timolol etc.,<sup>11</sup> sobre los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. Al bloquearse estos receptores se disminuye la frecuencia cardiaca, la fuerza de contracción y la secreción de renina.<sup>18, 26</sup>

Entre los efectos adversos de los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos se encuentran: fatiga, letargo, insomnio, alucinaciones, alteración del metabolismo de lípidos al reducir las lipoproteínas de alta densidad.<sup>21</sup> La interrupción súbita del medicamento puede provocar hipertensión de rebote.<sup>26</sup>

#### **2.1.7.3. Bloqueadores $\alpha$ -adrenérgicos**

Los medicamentos pertenecientes a este grupo bloquean en forma competitiva a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  actúan sobre el componente efector de la unión neuroefectora simpática. Su mecanismo de acción tisular es por consiguiente la inhibición de la constricción de los vasos sanguíneos mediada por el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, de este modo disminuyen la resistencia vascular periférica y la PA al relajar el músculo liso arterial y venoso.<sup>10</sup> Estos medicamentos actúan como antagonistas y producen un cambio mínimo en el gasto cardiaco, en la perfusión renal y en la filtración glomerular.<sup>18</sup> Por lo tanto no producen taquicardia a largo plazo como tampoco aumento de la liberación de renina.<sup>26</sup>

Los efectos adversos son: hipotensión postural, vértigo, fatiga, cefaleas y somnolencia.<sup>18, 26</sup>

#### **2.1.7.4 Inhibidores de la ECA y antagonistas de la angiotensina II**

En condiciones de hipoxia tisular renal, la renina es liberada del aparato yuxtaglomerular a la circulación sanguínea, en donde por su capacidad enzimática, cataliza la conversión del sustrato angiotensinogeno al decapeptido angiotensina I. Este decapeptido es desdoblado mediante la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) al octapeptido angiotensina II, sustancia que interacciona con receptores localizados en la membrana celular de diversos tejidos como el muscular de los vasos de resistencia y glandular de la corteza suprarrenal. La

vasoconstricción arteriolar y la retención de líquidos producida por la liberación de la aldosterona incrementan la PA.<sup>10</sup> La inhibición de la ECA por fármacos como el captopril, enalapril, lisinopril etc. bloquean la producción de angiotensina II y el bloqueo del receptor de angiotensina II con fármacos como el losartán, valsartán etc.<sup>11</sup> impiden la acción vasoconstrictora y liberadora de aldosterona.<sup>11, 26</sup> Ambos mecanismos de acción explican el uso antihipertensivo de estos dos grupos de fármacos.

Los efectos adversos informados para los inhibidores de la ECA son: tos seca característica, erupción cutánea, fiebre, hipotensión, para los antagonistas del receptor a la angiotensina son: angioedema poco frecuente, potencialmente teratogénicos e insuficiencia renal con hipercaliemia.

#### **2.1.7.5. Bloqueadores de canales de calcio**

La concentración intracelular de calcio es importante para mantener el tono del músculo liso vascular y la contractilidad del miocardio. Ambas funciones son incrementadas por la apertura de los canales de calcio ubicados principalmente en las membranas de la célula y del retículo sarcoplásmico.<sup>18</sup> En general, los canales de calcio tipo L sensibles a voltaje, son particularmente importantes para regular la contracción del músculo liso y cardíaco. Los fármacos utilizados constituyen el grupo conocido como dihidropiridinas (nifedipina, verapamil, amlodipina etc.), y su mecanismo antihipertensivo se explica por bloquear la entrada de calcio al unirse a los canales de tipo L en el corazón y en el músculo liso de los vasos coronarios y periféricos.<sup>21</sup> Esto ocasiona disminución de la PA debida a la relajación del músculo liso, y en consecuencia dilatación de los vasos de resistencia arteriolar.<sup>29, 26</sup>

Los más comunes efectos adversos observados con este grupo de fármacos se deben a la excesiva vasodilatación e incluyen: mareos, hipotensión, cefalea, enrojecimiento de piel, parestesias en dedos de las manos y náuseas. También se ha informado de constipación, edema periférico, tos, dificultad respiratoria y edema pulmonar. Entre los efectos adversos poco frecuentes están: urticaria, somnolencia y ocasionalmente elevación de las pruebas de funcionamiento hepático.<sup>21, 29</sup> Es importante mencionar que los efectos depresores de las dihidropiridinas sobre el sistema de conducción y la contracción cardíaca, limitan su utilidad en pacientes con cardiopatías isquémicas.<sup>18, 26</sup>

## 2.2. *Taxodium mucronatum* Ten. (Ahuehuete)

### 2.2.1. Orígenes y Descripción

El ahuehuete es una especie endémica del pacífico, centro y sureste del territorio mexicano. Su presencia en México es tan antigua que los registros fósiles de polen son más antiguos a los 12 000 años.<sup>32</sup>

Conocido con el nombre común de Ciprés Mexicano, Ciprés de Moctezuma,<sup>2</sup> Sabino, bachil, ahuehuetl, quetzalhuehuetl (sabino precioso)<sup>33</sup> o Ahuehuete ("árbol viejo de agua" del náhuatl Huéhuetl, viejo, y Atl, agua),<sup>4</sup> Yaga guichiciña en lengua zapoteca (Oaxaca).<sup>35, 36</sup>

Pertenece al Reino: *Plantae*, Subreino: *Tracheobionta*, División: *Coniferophyta*, Clase: *Pinopsida*, Orden: *Pinales*, Familia: *Taxodiaceae*, Género: *Taxodium* y Especie: *mucronatum*.<sup>37</sup>



Figura 1. Árbol de *T. mucronatum*

El *T. mucronatum* es un árbol corpulento, de 20-30 m de altura;<sup>4, 32</sup> la corteza es de un color café rojizo y su follaje es verde brillante, penduloso y laxo, que al madurar cae en jirones largos

y anchos.<sup>34, 36</sup> Un tronco recto que se ensancha cerca de la base.<sup>36</sup> Las hojas de color verde y con nervadura principal muy notoria,<sup>39, 40</sup> son como hilos de 6-12 mm de largo que se reconocen por estar dispuestas alternadamente en dos hileras colocadas en el mismo plano sobre las ramillas<sup>41, 42</sup> (**Figura 1**).



**Figura 2.** Hojas del *T. mucronatum*.

Tiene flores sexuadas femenina y masculina.<sup>34, 36</sup> Sus robustas ramas (**Figura 2**) se extienden horizontalmente y se prolongan al dividirse sucesivamente en ramillas rematadas en racimos de frutos cónicos esponjosos,<sup>41, 42</sup> los cuales son de color verde azulado<sup>38</sup> (**Figura 3**). Como semilla genera conos de 2 cm de diámetro duros y aromáticos,<sup>4, 32</sup> presentes durante todo el año.<sup>39</sup>



**Figura 3.** Frutos del *T. mucronatum*.

Este árbol es muy longevo, hay ejemplares vivos con más de 2 000 años, como el célebre árbol del Tule, en Oaxaca, este ejemplar tiene el récord mundial como el árbol más grueso del planeta, ya que su diámetro es de 14,05 metros y tiene una altura de 41,85 metros. Para poder abarcar su tronco serían necesarias al menos 30 personas con los brazos extendidos.<sup>43</sup>

### **2.2.2. Hábitat**

Crece principalmente entre los 100 y los 180 metros sobre el nivel del mar, pero puede encontrarse en todos los lugares de clima cálido o semicálido a orillas de los ríos y arroyos en gran parte de la República Mexicana.<sup>38, 39</sup> Dependiendo del lugar, florece en los primeros meses del año o en los meses de mayo y junio.<sup>41, 42</sup>

El Ahuehuate presenta características de adaptación media fuera de su hábitat ideal, desarrollándose plenamente en climas subtropicales. Es un árbol de altos requerimientos de agua, prosperando en suelos aluviales profundos y con deficiente drenaje, prefiriendo aquellos sustratos con valores de pH por debajo de 7. La tierra de brezo o con altos contenidos de humus y cama de granulometría grande no absorbente, es el mejor sustrato para macetas que tienen fondo impermeable o con buena retención de agua.<sup>32</sup>

### **2.2.3. Historia**

En el siglo XVI el código florentino menciona a esta planta, sin indicar algún tipo de uso medicinal.<sup>44</sup> En el mismo siglo Francisco Hernández asegura: “la corteza es astringente, sana las quemaduras, la piel escoriada y corroída, cura las úlceras, favorece la cicatrización, estriñe el vientre, provoca la orina, su sahumero atrae a los fetos y secundinas. Las hojas curan la sarna y las hinchazones de las piernas, mitigan las inflamaciones y quitan las llagas de las mismas, previene de dolores de dientes, alean los temores vanos y sin fundamentos. La resina es sumamente acre, de un olor fortísimo y calorífica en cuarto grado, cura los dolores causados por el frío y alivia con rapidez la enfermedad articular, arroja la flatulencia, disipa las hinchazones de origen flemático, afloja los nervios distendidos por los humores espesos fortifica y fortalece”.<sup>45</sup>

A inicios del siglo XVII, Juan de Esteyneffer refiere “las agallas en cocimiento para gargantismo, en sahumeros contra los pujos, restregadas en las encías contra el mal de loanda. Las agallas o nueces molidas en pitita o bebidas para la menstruación excesiva, la hernia, heridas de pecho y como unción para fracturas”.<sup>46</sup>

A finales del siglo XIX Eleuterio González repite la información proporcionada por Hernández, y de la Farmacopea Mexicana cita lo siguiente: “se usa la corteza al interior como abortiva y diurética las hojas tópicamente contra la sarna y resolutivas, del leño se prepara un alquitrán, que se ha usado con ventaja en pomada para curar enfermedades de la piel”.<sup>47</sup>

Finalmente, en el siglo XX Alfonso Herrera refiere a la planta sin indicar uso medicinal. Luis Cabrera afirma que “el empleo del cocimiento ayuda a la desaparición de la dificultad para respirar, disminuye la tos, las funciones hepáticas mejoran, y favorecen la eliminación por diuresis, de los líquidos acumulados en los tejidos, constituyendo la hinchazón generalizada, disminuyendo la hipertensión. El cocimiento es ligeramente antiséptico y favorece la cicatrización de las heridas y úlceras”.<sup>48</sup>

#### **2.2.4. Etnobotánica**

Hoy en día, todas las partes de esta planta continúan utilizándose empíricamente en el tratamiento de la diarrea, y el cocimiento de la corteza y el fruto, junto con las hojas y los brotes, sirve para tratar las llagas y problemas de tipo circulatorio.<sup>4, 41, 49</sup>

En varios estados de la República Mexicana este árbol se utiliza como remedio para algunos padecimientos, por ejemplo en Guanajuato se toma el cocimiento preparado con las hojas y el tallo para tratar la diarrea; en Sonora se recomienda la corteza, la madera, los frutos<sup>40</sup> y el alquitrán para el mismo fin.<sup>41, 42</sup>

Así mismo, el cocimiento de la corteza, hojas, frutos y renuevos se recomienda para el tratamiento de llagas. Este mismo cocimiento se aconseja ingerirlo en ayunas, cuando hay problemas circulatorios. La forma de consumo incluye tomarlo durante tres días consecutivos, alternados por otros tres días de no ingesta.<sup>49</sup>

Otros padecimientos incluidos en las propiedades medicinales del ahuehuate son: las hemorroides, hidropesía, emenagogo, varices, infecciones de la piel, afecciones cardíacas y para regular la PA.<sup>4, 36</sup>



Fuente: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.

**Figura 4.** Estados de la República Mexicana en donde se utiliza al *T. mucronatum* por sus propiedades medicinales.

### 2.2.5. Estudios científicos

En la literatura científica consultada hay pocos estudios farmacológicos (**Tabla V**) y químicos (**Tabla VI**) realizados con el *T. mucronatum*. En uno de ellos se aíslan de la corteza de *T. mucronatum* las biflavonas: 7,4-dimetilamentoflavona, podocarpusflavona y amentoflavona, y se prueban sus potentes efectos inhibidores sobre la catepsina B humana, proteasa que ha sido implicada en la patología de numerosas enfermedades, incluyendo artritis y cáncer.<sup>50, 51</sup> Así mismo, en varios estudios científicos el compuesto 3-O-β-D-glucósido de quercetina se le ha comprobado efectos inhibitorios de las ciclooxigenasas<sup>52, 53</sup> que pueden explicar su efecto antiulcerante.<sup>54</sup> la amentoflavona es antagonista de la bradicinina<sup>51</sup> e inhibe la producción de NO en macrófagos<sup>55</sup> además de presentar propiedades anti-VIH.<sup>56</sup> La 3-O-β-D-glucósido de quercetina y la sciadopiticina tienen actividad diurética y antifúngica.<sup>57, 58</sup> Se informa también sobre la actividad inhibidora del extracto acuoso obtenido de la parte aérea de *T. mucronatum*, sobre el efecto contráctil de Noradrenalina (NA) en anillos de aorta aislada de la rata (AAAR).<sup>59</sup> En la **Tabla VI** se enlistan algunos compuestos aislados de esta planta, su nombre común, especie química y de que parte de la planta se aisló.<sup>60, 61, 62, 63</sup> La estructura y la información más importante se enlistan en el **Anexo**.

**Tabla V.** Partes de la planta con pruebas científicas de actividad biológica.

Parte estudiada	Disolvente	Actividad	Organismo de prueba
Parte aérea	Agua	Espasmolítica	Aorta de rata
Corteza	-	Inhibidor de catepsina B humana	Cultivo celular

Fuente: Plantas medicinales de México II, usos y actividad biológica (1999).

**Tabla VI.** Compuestos químicos aislados del *T. mucronatum*.

Nombre	Tipo de compuesto	Parte de la planta
Ácido 8, $\beta$ -hidroxipimar-15-en-19-oico	Diterpenoide	Hojas y frutos
Ácido tánico	Ácido orgánico	Corteza y toda la planta
Amentoflavona	Biflavona	Hojas
3-O- $\beta$ -D-glucósido de quercetina	Biflavona	Hojas
Criptomerina A	Biflavona	Corteza y toda la planta
Criptomerina B	Biflavona	Corteza y toda la planta
7,4-Dimetilamentoflavona	Biflavona	Hojas
Hinoquiflavona	Biflavona	Hojas
Isocriptomerina	Biflavona	Corteza y toda la planta
Nitrato de potasio	Sal inorgánica	Madera y hojas
Oxalato de calcio	Sal inorgánica	Madera y hojas
Podocarpusflavona A	Biflavona	Hojas
Sciadopitina	Biflavona	Hojas
Silicato de sodio	Sal inorgánica	Madera y hojas
Sulfato de potasio	Sal inorgánica	Madera y hojas

Fuente: Plantas medicinales de México II, usos y actividad biológica (1999). Las Plantas medicinales de México (1990).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La HAS es un factor de riesgo concomitante y determinante de la evolución y mal pronóstico de los enfermos con padecimientos cardiovasculares, renales y cerebrales.<sup>10, 11, 12</sup> Como problema de salud pública mundial, su adecuado y efectivo manejo conduciría a disminuir la mortalidad y a mejorar la calidad de vida de poblaciones. Sin embargo, a pesar de la amplia diversidad de medicamentos antihipertensivos, hoy día no se cuenta con un medicamento eficaz y seguro para lograr dicho objetivo. Porque, además de las reacciones adversas severas inherentes a la mayoría de los fármacos antihipertensivos, la cronicidad del tratamiento y el alto costo, dificultan la continuidad del tratamiento y en consecuencia, se fracasa en el propósito de llevar a la PA a valores considerados normales.<sup>20, 24</sup>

Por otra parte, México tiene una rica biodiversidad de flora y fauna, además de una larga tradición herbolaria de plantas empleadas para el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>3</sup> Estos hechos hacen creíble poder encontrar entre sus plantas autóctonas, compuestos activos que abran la posibilidad de iniciar el desarrollo de nuevos medicamentos. Para ello, es necesario: a) realizar estudios científicos preclínicos de cernimiento que permitan identificar plantas útiles en enfermedades relativamente “modernas”, como lo es la HAS, b) caracterizar la actividad biológica de la planta activa, y sobre todo, su seguridad y su eficacia y c) aislar e identificar el o los principios activos.

El *T. mucronatum* no cuenta con estudios etnobotánicos como remedio antihipertensivo, pero se cuenta con evidencias experimentales preliminares de estudios prospectivos de actividad hipotensora producida por un EM obtenido de la corteza de esta planta. La confirmación de este hallazgo, abre la posibilidad de estudiar una posible acción directa sobre el músculo liso vascular. Si esto fuera cierto, la presente investigación representaría la primera fase de investigación farmacológica sobre una planta que podría proporcionar nuevas sustancias vasodilatadores que podrían tener mejor eficacia y seguridad en el tratamiento de la HAS.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. General

- ⇒ Comprobar si el extracto metanólico obtenido de la corteza del *T. mucronatum*, tiene efecto sobre el sistema cardiovascular de ratas normotensas, y establecer si existe correlación de este efecto con los estudios en anillos de aorta aislada de rata y en el lecho mesentérico aislado de rata.

### 4.2. Específicos

- ⇒ Recolectar y depositar un espécimen de la planta en el herbario del IMSS.
- ⇒ Obtener un extracto metanólico con la corteza de *T. mucronatum*.
- ⇒ Evaluar la actividad del extracto metanólico de *T. mucronatum* sobre la presión arterial media y la frecuencia cardiaca en ratas anestesiadas
- ⇒ Evaluar el efecto de dosis crecientes del extracto metanólico en anillos de aorta aislados de rata
- ⇒ Evaluar la influencia de L-NAME, atropina, indometacina, propranolol y loratadina sobre el efecto de concentraciones crecientes del extracto metanólico administradas en anillos de aorta aislados de rata.
- ⇒ Evaluar el efecto del extracto metanólico sobre curvas concentración respuesta de NA y KCl en el lecho mesentérico aislado de rata.

## 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- La corteza de *T. mucronatum* posee actividad hipotensora, por lo que una extracción con metanol de dicha parte, permitiría obtener un extracto que modificaría la PAM y la FC de la rata anestesiada.
- El EM de la corteza de *T. mucronatum* con actividad sobre el sistema cardiovascular de rata, posee componentes que relajan el músculo liso de AAAR y del LMAR.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Reactivos

La  $\pm$  Noradrenalina (NA), indometacina, Nitro-L-arginina, metilester (por sus siglas en inglés L-NAME), loratadina, propranolol, ácido ascórbico, atropina, prazosina, nifedipina y el cloruro de acetilcolina (ACh) son de marca Sigma–Aldrich (St. Louis, MO USA). El carbonato ácido de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloruro de potasio (KCl), cloruro de Sodio (NaCl), dextrosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), metanol y el sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) son reactivos de marca J.T.Baker.

### 6.2. Preparación de las soluciones

La composición de la solución Krebs-Henseleit modificada (KH),<sup>64</sup> esta expresada en milimolar (mM) y es la siguiente: NaCl 121,40; KCl 4,70;  $\text{CaCl}_2$  2,50;  $\text{MgSO}_4$  1,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa monohidratada 11; ácido ascórbico 0,60. La solución se prepara en agua desionizada y es burbujeada con una mezcla de 95 % de  $\text{O}_2$  :5 % de  $\text{CO}_2$  (carbógeno) para mantener el pH a  $7,4 \pm 0,5$ .

La acetilcolina y la noradrenalina así como los bloqueadores y las disoluciones del EM fueron disueltas en solución de KH, la cual se preparó diariamente.

### 6.3. Colección y comprobación taxonómica

La corteza de *Taxodium mucronatum* se colectó en Santiago Tepetlapa, municipio de Tepoztlán, estado de Morelos, México. Un ejemplar de la planta se depositó en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) para ser identificado por la maestra Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario.

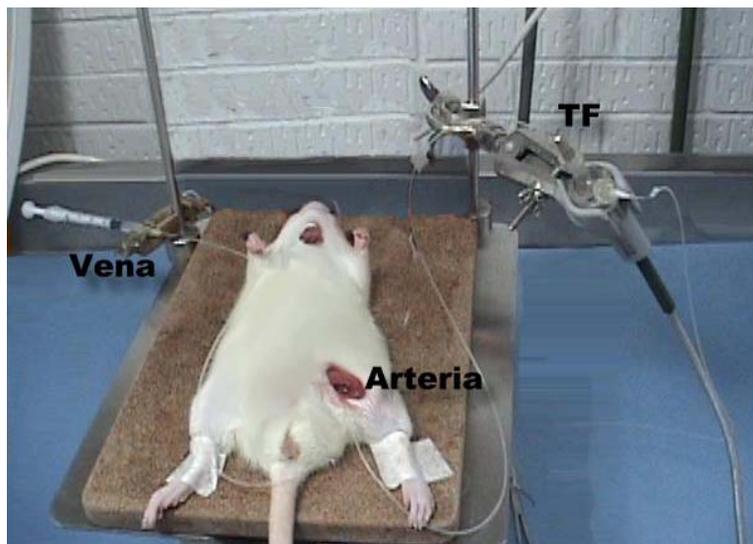
### 6.4. Preparación de extracto metanólico (EM)

La corteza del material recolectado se secó bajo la sombra a temperatura ambiente y previamente pulverizada, se maceró en metanol, el cual se sustituyó cada 24 h por un volumen similar de disolvente. El EM extraído, se evaporó a sequedad. Este procedimiento se repitió hasta que el residuo extraído, fue menor al 5 % del obtenido en la primera extracción.

## 6.5. Estudio del EM sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada

Los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a las guías oficiales nacionales<sup>65, 66</sup> e internacionales<sup>67</sup> de las buenas prácticas de investigación preclínica. Los experimentos se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa Wistar con un peso que va desde 250 a 300 g, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los animales utilizados fueron mantenidos bajo condiciones de alimentación, temperatura e higiene controladas con alimentación de Purina Chow y agua *ad libitum*.

Se conformaron 2 grupos de seis ratas cada uno. Cada una de las ratas de ambos grupos, se anestesió con pentobarbital [50 mg/kg] administrado por vía intraperitoneal (i.p.). Se colocaron tres cánulas: una en la tráquea para favorecer la respiración espontánea, otra en la arteria femoral para el registro directo de la PAM y de la FC, y la última en la vena femoral para la administración de la Solución salina (Ss) o de EM. La cánula arterial se conectó a un transductor de presión statham P.231D y la señal filtrada electrónicamente, se registró en un polígrafo Grass modelo 79 D. La FC se registró con un tacógrafo Grass 7P4 f accionado por otro canal del polígrafo en el que se registró la señal proveniente del canal de la PA. Ambas señales fueron enviadas a través de una computadora que contiene el software PREFRE-EME para almacenamiento de los registros. Estos fueron analizados y graficados por el programa Origin 7.5<sup>®</sup>.



**Figura 5.** Imagen del montaje de la preparación de la rata anestesiada para registro de PAM y FC.

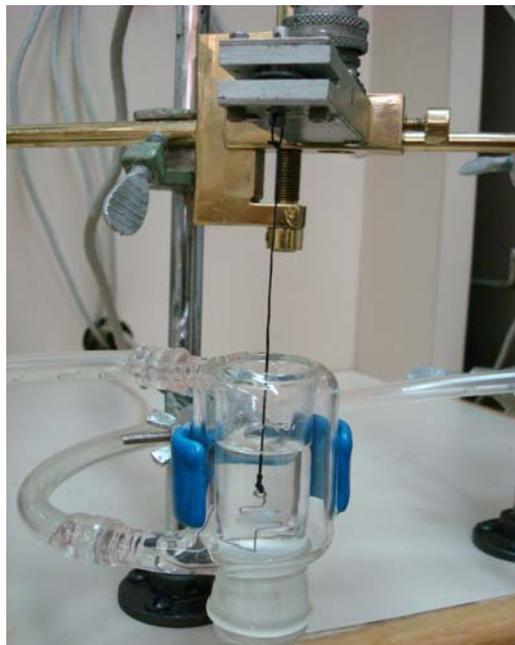
A cada una de las ratas del grupo 1 se les administró por vía intravenosa (i.v.), una dosis de EM. Para tal propósito, 100 mg de peso seco del extracto se disolvió en 1 mL de Ss y para obtener una solución lo suficientemente homogénea, se introdujo en un sonificador durante 5

min. Para evitar que residuos sólidos fueran administrados, la solución se centrifugo a 3000 rpm durante 5 min. En el grupo 2 cada rata recibió por vía i.v. una dosis de Ss de 0,1 mL por cada 100 g de peso corporal.

En todos los experimentos, la PAM y la FC se registró en forma continua desde la administración del EM o de la Ss hasta 60 min después. Los cambios en la PAM y en la FC producidos por el EM en grupo 1 (experimental) fueron comparados con los cambios observados en el grupo 2 (control).

### 6.6. Estudio del EM en anillos de aorta aislada de rata.

La rata previamente anestesiada con pentobarbital 50 mg/kg se dislocó en la región cervical para disección, aislamiento y extracción de la aorta torácica. Este vaso sanguíneo se colocó en solución de KH a 37°C, contenida en un recipiente con doble pared y burbujeada con carbógeno. La aorta removida de tejido graso y conectivo, se cortó en anillos de aproximadamente 5 mm de longitud. En el lumen de cada anillo se introdujeron dos ganchos de acero inoxidable. Uno de los ganchos se fijo en la base de una cámara para órgano aislado y el otro se ató a un hilo de seda fijado a un transductor de tensión FT03-C, el cual se conectó a un polígrafo Grass 79 Medical Instruments, Quince, USA, para registrar la contracción vascular bajo condiciones isométricas (**Figura 6**). Todas las cámaras contenían 3 mL de solución de KH termo regulada a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  con pH 7,4 y constantemente burbujeada con carbógeno.



**Figura 6.** Imagen del montaje de la preparación de AAAR.

Los AAAR se sometieron a una tensión basal de 1 g, la cual se ajustó durante 30 min. Transcurrido este tiempo, el tejido fue estimulado con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] hasta alcanzar la contracción máxima estable o meseta. Posteriormente se sustituyó la solución KH para recuperar la tensión basal de 1 g. Este procedimiento se repitió en cada ensayo las veces necesarias hasta que la contracción obtenida por la adición de NA, no aumentó significativamente con respecto a la estimulación anterior (5 estimulaciones con NA aproximadamente). La integridad del endotelio vascular se verificó al adicionar una concentración de ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M] en la última estimulación con NA. La funcionalidad del endotelio vascular se clasificó en base al por ciento de relajación obtenido con ACh. Posteriormente se removió la acetilcolina sustituyendo la solución de KH hasta recuperar la tensión basal.

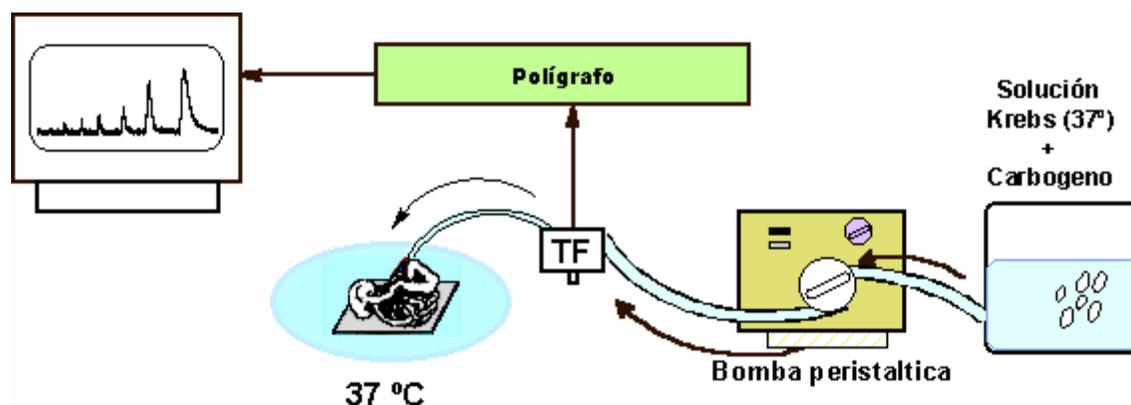
Los AAAR en estado basal (1 g de tensión) se contrajeron con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] o KCl [50 mM] y en el estado de la contracción estable (alcanzada la meseta) se procedió a adicionar 9 concentraciones crecientes y acumuladas del EM de *T. mucronatum*, las concentraciones finales en el baño son las siguientes: 3,1; 10; 31; 100; 310; 368; 417; 560 y 1000 [ $\mu\text{g/mL}$ ]. Los cambios en la tensión de los anillos, fueron enviados al polígrafo a través de un transductor de tensión que a su vez los envió a una computadora que contiene el software TENSION41 para almacenamiento de los registros. Los resultados contenidos en el software se gráfcaron con el programa Origin 7.5<sup>®</sup>

Para estudiar el mecanismo de acción del efecto relajante del EM, se realizaron curvas concentración-respuesta con el EM antes y 10 min después de agregar al baño y de forma independiente los siguientes tratamientos: propranolol [10 mM], L-NAME [30  $\mu\text{M}$ ], loratadina [1  $\mu\text{M}$ ], indometacina [0,10 mM], atropina [100 nM].

### **6.7. Estudio del EM sobre el lecho mesentérico aislado de rata**

Después de administrar por vía i.p. [1000 UI] de heparina por kg de peso corporal, las ratas se anestesiaron con pentobarbital [50 mg/kg] i.p. para realizar una incisión abdominal y disecar la arteria mesentérica superior y el lecho mesentérico<sup>68</sup> En el origen de esta arteria se colocó una cánula (PE-60) proveniente de una bomba peristáltica (Heidolph Pumpdrive 5006) para perfundir al LMAR con solución KH a 37°C, pH de 7,4 y burbujeada con carbógeno (**Figura 7**). La velocidad de perfusión se mantuvo a 5 mL/min, lo cual permitió que la PA se mantuviera entre 25-35 mm Hg (presión basal). La presión del líquido perfundido se registró a través de un

traductor P23XL acoplado a un polígrafo Grass 79 Medical Instruments Quince, USA, el cual a la vez se acoplo a una interfase que convertía la señal analógica a una digital. Esta señal fue enviada a una computadora en donde el programa PREFRE-EME capturaba y almacenaba los resultados registrados. Los cambios en el tono vascular del lecho mesentérico originados por las sustancias vasoconstrictoras administradas (NA o KCl), incrementaron la resistencia vascular a la perfusión de la solución KH, la cual fue registrada en el polígrafo como incrementos en mm Hg de la PA basal.



**Figura 7.** Representación esquemática del montaje del LMAR.

En el LMAR bajo condiciones estables y basales, se realizaron curvas concentración-respuesta de NA ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$  hasta  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  en progresión de medio logarítmico) o KCl (31 hasta 310 mM en progresión logarítmica) antes y después de agregar al líquido de perfusión el EM (0,05 mg/mL de KH), o el antagonista alfa adrenérgico prazosina [ $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ] o el bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{+2}$ : nifedipina [ $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ]. Estas dos últimas sustancias se utilizaron como controles positivos para demostrar que el incremento de la PA producido por concentraciones crecientes de NA o KCl en el LMAR es antagonizado en nuestras condiciones experimentales. El LMAR fue perfundido con el EM, prazosina o nifedipina adicionados a la solución de KH, 10 min antes de realizar las segundas curvas concentración-respuesta con NA o KCl.

Los registros obtenidos de PA fueron analizados por medio del software Origin 7.5<sup>®</sup>, para construir las curvas concentración-respuesta.

## 6.8. Análisis estadístico

En los experimentos realizados con la rata anestesiada, la significancia estadística de las diferencias encontradas en la PAM y en la FC del grupo experimental (tratado con EM) con respecto al grupo control (tratado con Ss), se determinó mediante la prueba de *t* de *student's*.

En los experimentos realizados en AAAR, se estableció la significancia de las diferencias entre tres grupos con diferente funcionalidad endotelial, realizando un ANOVA de una ruta con la subsiguiente aplicación de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con un control. El grupo de AAAR sin funcionalidad endotelial probada con ACh se considero el grupo control. El análisis de los antagonistas se realiza con una prueba de *t* de *student's* pareada, comparando las curvas concentración-respuesta antes y después de la adición del antagonista correspondiente.

Los cambios producidos por NA o KCl antes y después de perfundir el LMAR con EM, se compararon mediante una prueba de *t* de *student's* pareada,

El valor de probabilidad límite para establecer si las diferencias observadas tienen significancia estadística es de 0,05.

Todos los datos fueron graficados en el software Origin 7.5<sup>®</sup> o Excel y el análisis estadístico se realizó con Excel y el programa Statical Package for the Social Science (SPSS).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Obtención de la corteza e identificación del *T. mucronatum*.

El 1 de octubre de 2006 se recolectaron en Santiago Tepetlapa, municipio de Tepoztlán, estado de Morelos, México, 420 g de corteza de un árbol localizado en el centro del pueblo. El ejemplar de este árbol fue identificado en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la maestra Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario, como proveniente de:

Clase: *Pinopsida*

Orden: *Pinales*

Familia: *Taxodiaceae*

Género: *Taxodium*

Especie: *mucronatum*

Número de clasificación: 14134

### 7.2. Rendimiento del extracto metanólico y sus características físicas

El rendimiento obtenido de la maceración de la corteza del árbol pulverizada con metanol fue de 2 % con respecto al peso seco de la planta. Este producto denominado EM es un polvo amorfo, de color café claro con olor característico y ligeramente soluble en agua.

### 7.3. Efectos del EM sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada

Una dosis de 100 mg/mL de EM de *T. mucronatum* administrado por vía i.v. a ratas anestesiadas, produjo disminución inmediata de la PAM y sostenida de la FC. Observe que los valores básales de la PAM se recuperaron a los 10 min después de la administración del EM y en contraste, la FC se mantuvo por debajo de la basal hasta el final de los experimentos (durante 60 min). El promedio de los resultados registrados cada 10 min para la PAM y la FC con sus respectivos controles, se agrupan respectivamente en la **Tabla VII** y **Tabla VIII**.

**Tabla VII.** Valores promedio de la PAM registrados durante 60 min en ratas anestesiadas tratadas con Ss o con una dosis de EM [100 mg/kg].

Tiempo	TRATAMIENTO	
	Solución salina	Extracto metanólico
0	-1,667±1,667	-13,57±3,891
10	-1,667±1,667	-3,571±2,608
20	0,000±5,000	-2,857±4,480
30	13,333±8,333	-5,714±5,393
40	8,333±10,93	-5,714±4,809
50	10,00±10,00	-0,714±5,393
60	-8,333±6,009	5,714±4,932

Los resultados se expresan como la media de los cambios en la PAM ± el Error Estándar de la Media. ( $\bar{X} \pm EEM$ ); n=8.

**Tabla VIII.** Valores promedio de la FC registrados durante 60 min en ratas anestesiadas tratadas con Ss o con una dosis de EM [100 mg/kg].

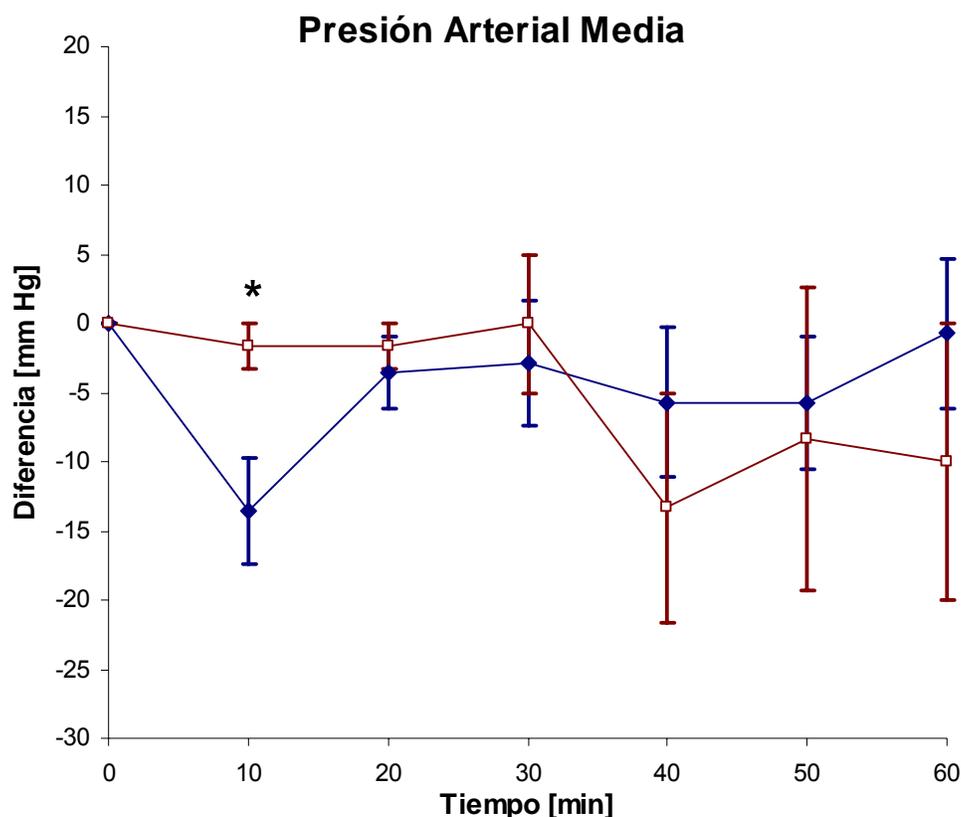
Tiempo (min)	TRATAMIENTO	
	Solución salina	Extracto metanólico
0	0,000±0,000	-15,00±6,655
10	0,000±0,000	-11,66±4,419
20	-3,333±3,333	-19,16±5,401
30	0,000±5,774	-12,50±7,906
40	-1,667±1,667	-11,66±9,386
50	0,000±0,000	-5,833±9,443
60	-10,00±10,00	-5,000±12,13

Los resultados se expresan como la media de los cambios en la PAM ± el Error Estándar de la Media; n=8.

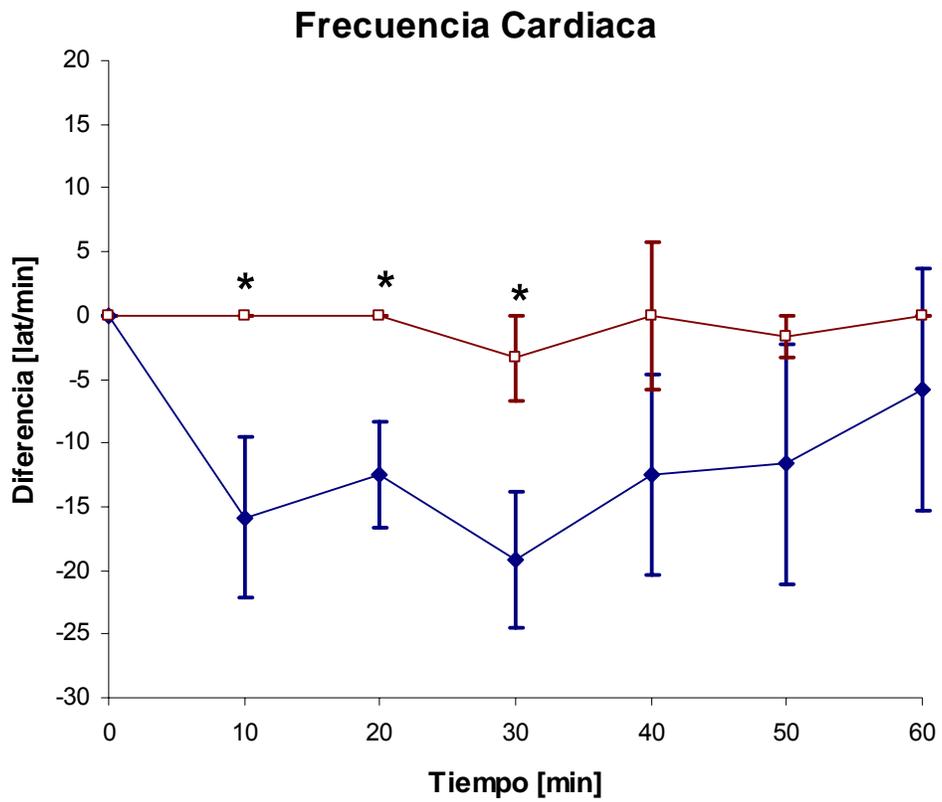
En la **Figura 8** y **Figura 9** se muestran gráficamente los efectos que el EM produjo sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada. En cada una de las gráficas hay dos curvas que representan los valores promedio de la PAM o FC en ratas tratadas con el EM o con Ss por vía i.v. El EM [100 mg/kg] produce una inmediata disminución en la PAM (**Figura**) que se acompaña de bradicardia inmediata y sostenida durante los 60 min que dura el registro (**Figura**).

El análisis mediante la prueba de *t student's* de las medias obtenidas con la administración de una dosis de EM o de Ss fue de  $t_{\text{Calc}} = 0,483$  con un valor crítico de 2,119 y un valor  $p = 0,483$ . Siendo la  $t_{\text{Calc}}$  menor que el valor crítico de  $t$  y la  $p > 0,05$ , el efecto del EM sobre la PAM de la rata anestesiada no es significativamente diferente con respecto al grupo control cuando se compara el total de valores obtenidos durante los 60 min de registro. Sin embargo, si las medias se comparan cada 10 min, el EM produce una disminución de la PAM significativa durante los primeros 10 min posteriores a su administración ya que el valor de  $t_{\text{Calc}} = 2,366$  y el de  $p = 0,032$

Para la FC el análisis mediante la prueba de *t student's* de las medias obtenidas con la administración de una dosis de EM o de Ss fue de  $t_{\text{Calc}} = 2,946$  con un valor crítico de 2,119 y un valor  $p = 0,019$  Siendo la  $t_{\text{Calc}}$  mayor que el valor crítico de  $t$  y la  $p < 0,05$ , el efecto del EM sobre la FC de la rata anestesiada es significativamente diferente con respecto al grupo control cuando se compara el total de valores obtenidos durante los 60 min de registro. Sin embargo, si las medias se comparan cada 10 min, el EM produce una disminución de la FC significativa solo durante los primeros 30 min posteriores a su administración.



**Figura 8.** Curvas dosis-tiempo del efecto producido sobre la PAM (mm Hg) de la rata anestesiada por la administración i.v. de una dosis de EM (-♦-) o de Ss (-□-). Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=7$ .

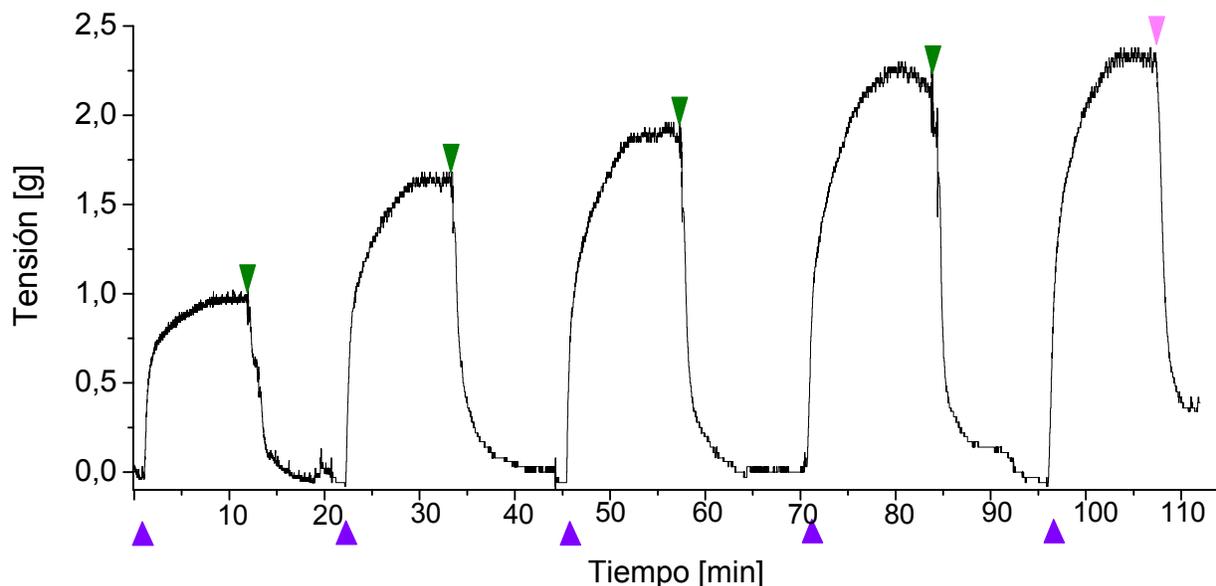


**Figura 9.** Curvas dosis-tiempo del efecto producido sobre la FC (Lat./min) de la rata anestesiada por la administración i.v. de una dosis de EM (-♦-) o de Ss (-□-). Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=7$ .

#### 7.4. Efecto del EM en anillos de aorta aislada de rata

Debido a la participación conocida del endotelio en las respuestas relajantes y contráctiles de los vasos sanguíneos, estudiamos el efecto del EM en 3 diferentes estados de funcionalidad endotelial, probada por la magnitud del efecto relajante producido por ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M]. Con funcionalidad: 1) >75 %, 2) <45 % y 3) 0 % de relajación de la respuesta contráctil máxima obtenida con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M].

La **Figura 10** es un ejemplo del procedimiento seguido para determinar la respuesta de los AAAR a una serie de estimuciones con NA. Observe que la tensión obtenida con cada estimulación de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] se va incrementando, hasta alcanzar la contracción máxima en la cuarta o quinta estimulación. Se indica también el momento en que se aplica ACh, y la intensidad de su efecto relajante, lo que indica la funcionalidad endotelial de los AAAR. Observe que en este ejemplo, la funcionalidad del endotelio vascular permitió que la ACh relajara al anillo de aorta precontraído con NA, en más del 75 %.



**Figura 10.** Gráfica digitalizada que ejemplifica los efectos obtenidos en un AAAR al estimularlo durante 5 ocasiones con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] (▲) previo lavado del anillo con KH (▼). Observe que en la última estimulación no se lavó y se le agregó ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M] (▼).

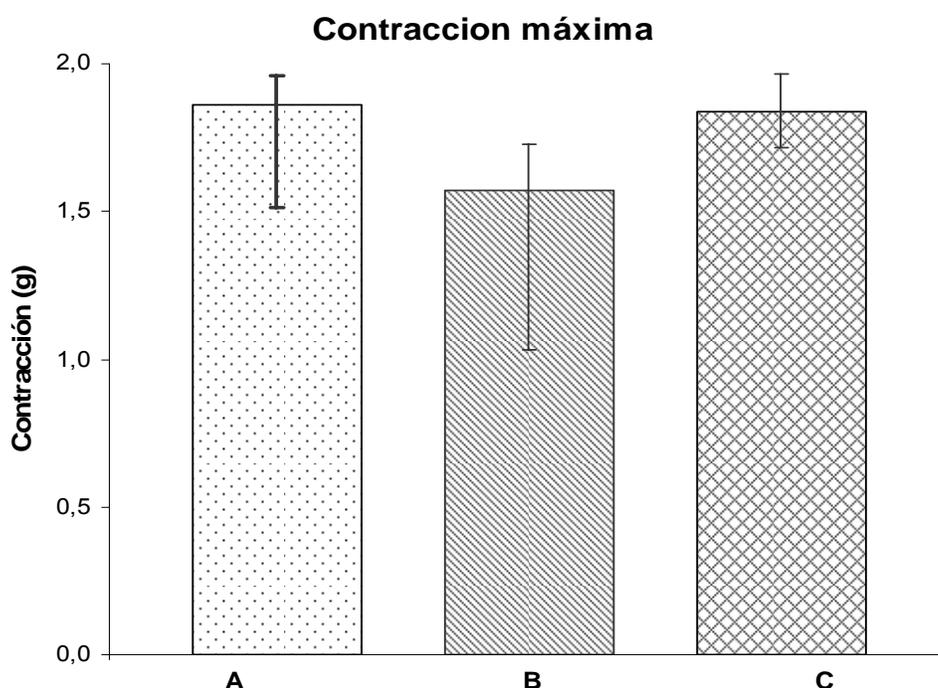
Los AAAR se distribuyeron, por los resultados de la funcionalidad endotelial en tres grupos, basados en la intensidad del efecto relajante de la ACh: 1) más del 75%, 2) menos 45% y 3) 0% de relajación. En la **Tabla IX** se resumen los valores promedio de las tensiones obtenidas con la última estimulación de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] así como de los valores máximos de la tensión alcanzada después de la administración de ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M] y el por ciento promedio de relajación.

**Tabla IX.** Valores promedio de la tensión máxima alcanzada por la adición de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] en AAAR que tienen una funcionalidad endotelial >75 %, <45 % y de 0 %, probada con ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M].

	CALIDAD ENDOTELIO VASCULAR		
	>75 %	<45 %	0 %
Tensión después de NA (g)	1,658 ±0,109	1,977±0,137	1,8258±0,1605
Tensión después de ACh (g)	0,246±0,0337	1,432±0,107	1,8258±0,1605
Relajación (%)	85,37±1,6405	26,98±3,565	0,000±0,000

Los resultados se expresan como la media de la tensión en gramos ± el error estándar de la media, se señala también el porcentaje de relajación promedio para cada uno de los tres grupos; (n=12).

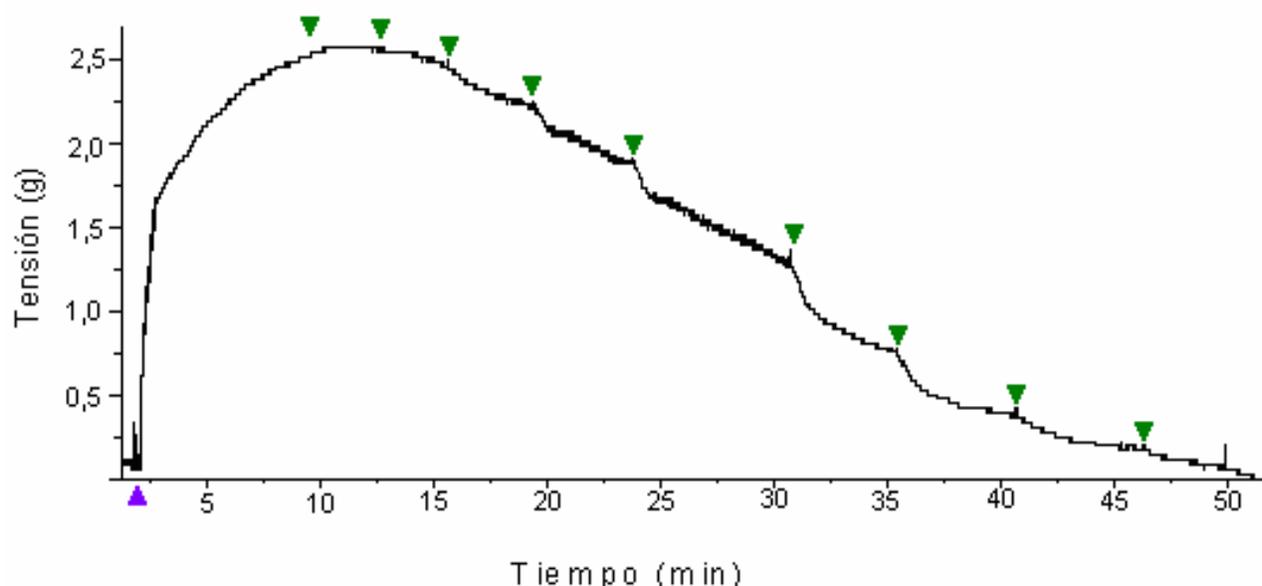
El análisis mediante la prueba de ANOVA de las respuestas obtenidas por la administración de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] fue de  $F_{\text{calc.}} = 1,119$  con un valor crítico de 3,284 y un valor  $p = 0,38$ . Siendo la  $F_{\text{Calc}}$  menor que el valor crítico de F y  $p > 0,05$  se prueba que la contracción en esta serie de experimentos es independiente de la funcionalidad del endotelio vascular. La representación gráfica de lo anterior se expresa en la **Figura**.



**Figura 11.** Contracción máxima estable alcanzada por una concentración de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] en AAAR con diferente funcionalidad endotelial >75 %(A), <45 %(B) y 0 %(C) probada con ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M].

Determinada la funcionalidad endotelial se procedió a la aplicación de concentraciones crecientes y acumuladas de EM a cada uno de los AAAR que conformaron los tres agrupamientos.

La **Figura 12** ejemplifica las respuestas obtenidas con la administración de concentraciones crecientes y acumuladas de EM.



**Figura 12.** Gráfica digitalizada que ejemplifica los efectos obtenidos con concentraciones crecientes (3,1; 10; 31; 100; 310; 368; 417; 560 y 1000 µg/mL) del EM (▼) en AAAR precontraídos con NA (▲) [ $1 \times 10^{-7}$  M].

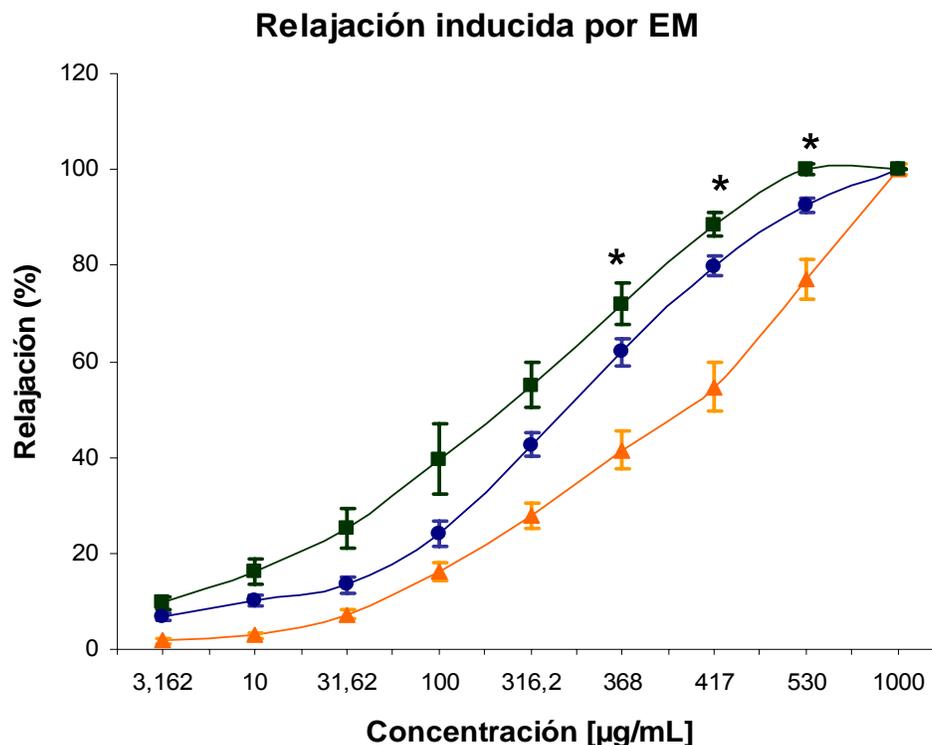
Los valores promedio y la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) del EM para relajar los AAAR con >75 %, <45 % y 0 % de funcionalidad endotelial probada con ACh [ $1 \times 10^{-6}$  M] se resumen en la **Tabla X**. Observe que se necesita una menor concentración del EM para relajar el 50 % de la contractilidad máxima producida con NA, cuando hay mayor funcionalidad endotelial.

**Tabla X.** Valores promedio y CE<sub>50</sub> de la tensión resultante después de la administración de concentraciones crecientes y acumuladas de EM, en AAAR que tienen una funcionalidad endotelial >75 %; <45 % y 0 %.

Concentración EM [µg/mL]	FUNCIONALIDAD DEL ENDOTELIO VASCULAR		
	>75 %	<45 %	0 %
Inicial	1,838±0,124	1,569±0,156	1,860±0,100
3,16	1,668±0,125	1,456±0,143	1,838±0,107
10,0	1,556±0,136	1,398±0,133	1,817±0,108
31,6	1,389±0,136	1,323±0,114	1,733±0,102
100	1,101±0,159	1,174±0,118	1,561±0,085
316	0,831±0,105	0,874±0,092	1,346±0,080
368	0,517±0,083	0,578±0,087	1,084±0,087
417	0,214±0,048	0,300±0,053	0,849±0,103
530	0,044±0,018	0,108±0,033	0,429±0,077
1000	00,00±00,00	00,00±00,00	0,035±0,020
CE <sub>50</sub> [µg/mL]	356,0±7,842	385,7±8,495	442,9±19,63

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación ± el Error Estándar de la Media; (n=12).

El efecto producido por la administración de concentraciones crecientes y acumuladas del EM en AAAR precontraídos con NA y que relajan con ACh en más de 75 %, menos 45 % y 0 %, y la comparación entre ellos se observa en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante del EM obtenidas en AAAR contraídos con NA y con un endotelio funcional >75 % (-■-), <45 % (-●-) y 0 % (-▲-). Las barras indican las desviaciones estándar y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=12$ .

El análisis mediante la prueba de ANOVA de las respuestas obtenidas por la administración de concentraciones crecientes del EM fue de  $F_{\text{calc}} = 17,825$  con un valor crítico de 3,023 entre los grupos de AAAR con diferente funcionalidad endotelial y  $F_{\text{calc}} = 103,76$  con un valor crítico de 1,908 entre las diferentes concentraciones administradas a los tres grupos de AAAR.

Ya que por ANOVA se encontró que **sí** existe diferencia significativa entre los tres grupos con diferente funcionalidad endotelial, se estableció mediante la prueba de Dunnett, entre que grupos y cuales concentraciones muestran diferencias estadísticamente significativas (**Tabla XI**).

**Tabla XI.** Estadística inferencial (prueba de Dunnett) realizada con los datos obtenidos con diferentes concentraciones del EM, entre los tres grupos de AAAR con diferente funcionalidad endotelial probada con ACh.

Funcionalidad endotelial	Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]								
	3,1	10	31	100	310	368	417	530	1000
<45 % vs. 0 %	0,2668	0,2913	0,3728	0,2156	0,0636	<b>0,0086*</b>	<b>0,000163**</b>	<b>0,00243**</b>	0,0928
0 % vs. >75 %	0,9855	0,8386	0,5472	0,4373	0,1450	<b>0,0335*</b>	<b>0,0016**</b>	<b>0,00013**</b>	0,0934

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,005$

Como podemos observar la respuesta relajante producida entre los grupos con funcionalidad endotelial >75 % y <45 % no tiene diferencia significativa en ninguna de las concentración, sin embargo ambos grupos tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control que no posee endotelio funcional (0%).

#### 7.4.1. Estudios preliminares sobre el mecanismo de acción

##### 7.4.1.1. Influencia del cloruro de potasio sobre el efecto relajante del EM

Con el propósito de iniciar estudios experimentales sobre el mecanismo de acción relajante del EM de la corteza de *T. mucronatum*, se determino si dicho efecto también se observa en AAAR precontraídos con KCl. En la **Tabla XII** se compara la estadística de las contracciones máximas alcanzadas por los AAAR al administrar NA o KCl.

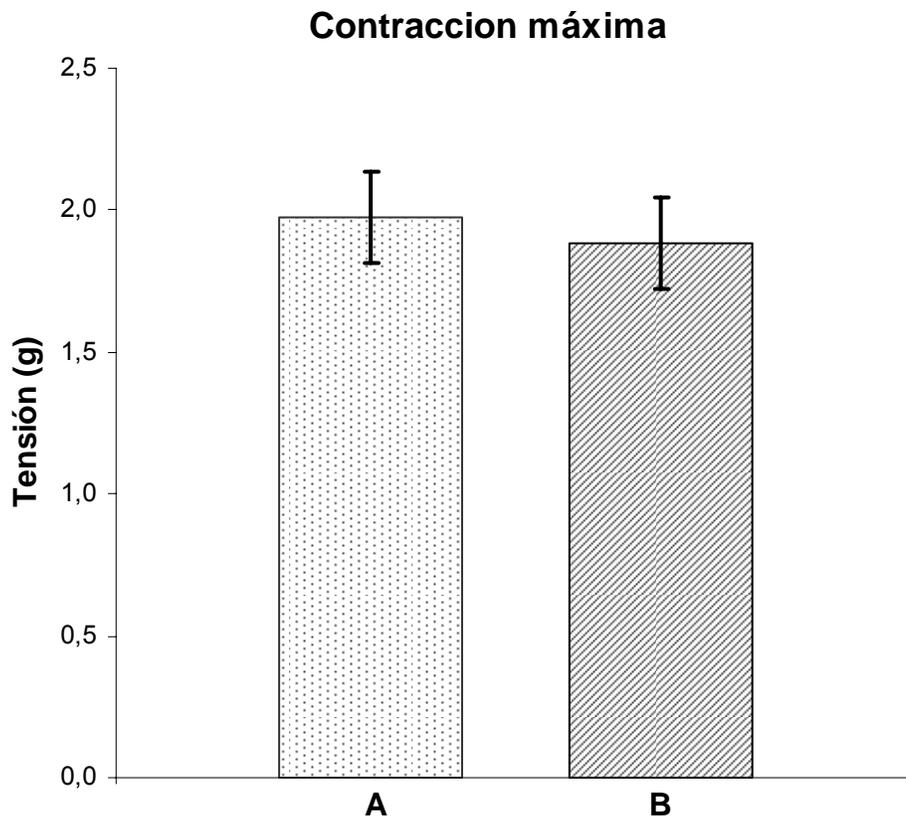
**Tabla XII.** Comparación de las tensiones máximas alcanzadas por los AAAR estimulados con dos vasoconstrictores diferentes NA y KCl.

TRATAMIENTO		<i>p</i>
NA [ $1 \times 10^{-6}$ M]	KCl [50 mM]	
1,978 $\pm$ 0,187	1,883 $\pm$ 0,161	0,556

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; n=10.

Observe que debido a la variabilidad en la intensidad de la contracción alcanzada por cada una de las sustancias contráctiles, no se obtiene diferencia significativa. Este hecho se observa con claridad en la **Figura 14** en donde se grafica el promedio de la contracción máxima de los AAAR contraídos con NA y con KCl.

El análisis mediante la prueba de *t student's pareada* de las respuestas contráctiles obtenidas por la administración de NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] y KCl [50 mM] fue de  $t_{\text{calc}} = 0,612$  con un valor crítico de 2,262 y una  $p > 0,05$  por lo que se confirma que las contracciones máximas producidas por la NA y KCl no son significativamente diferentes.



**Figura14.** Comparación de los promedios de las tensiones máximas alcanzadas por los AAAR con la adición de NA (A) y KCl (B). Las barras indican los EEM. (n=10).

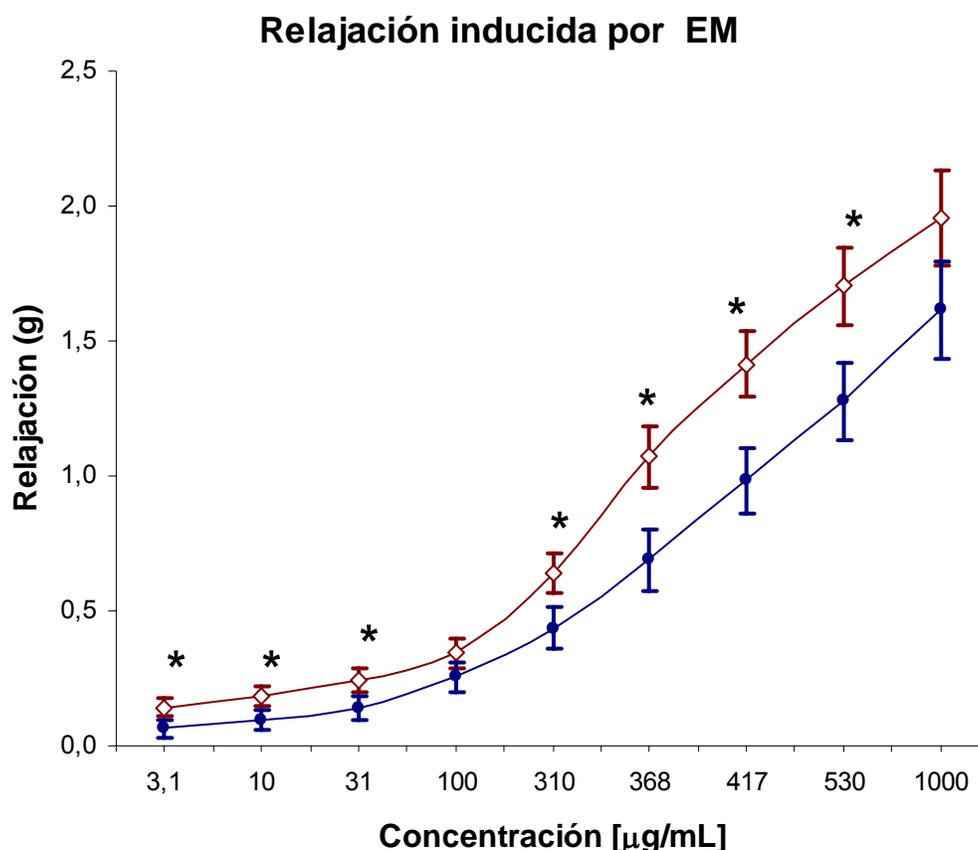
En la **Tabla XIII** se resumen los valores de tensión obtenidos por la relajación resultante después la adición de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR que fueron estimuladas con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] o KCl [50 mM] y el valor de  $p$  respectivamente. Además en la misma tabla se señala la concentración efectiva que disminuye al 50 % la máxima contracción lograda con la sustancia contráctil, la  $CE_{50}$  es moderadamente menor en los AAAR estimulados con NA que los estimulados con KCl.

**Tabla XIII.** Valores promedio y  $CE_{50}$  de la relajación producida por la administración de concentraciones crecientes del EM en AAAR precontraídos con NA [ $1 \times 10^{-6}$  M] o KCl [50 mM].

Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]	VASOCONSTRICTOR		<i>p</i>
	NA	KCl	
3,1	0,142 $\pm$ 0,032	0,064 $\pm$ 0,015	*0,033
10	0,186 $\pm$ 0,036	0,096 $\pm$ 0,0205	*0,043
31	0,240 $\pm$ 0,045	0,142 $\pm$ 0,0307	*0,045
100	0,343 $\pm$ 0,054	0,245 $\pm$ 0,047	0,158
310	0,640 $\pm$ 0,074	0,437 $\pm$ 0,060	*0,024
368	1,071 $\pm$ 0,112	0,678 $\pm$ 0,092	*0,011
417	1,415 $\pm$ 0,121	0,983 $\pm$ 0,118	*0,015
530	1,732 $\pm$ 0,147	1,277 $\pm$ 0,129	*0,040
1000	2,030 $\pm$ 0,171	1,654 $\pm$ 0,132	0,089
$CE_{50}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	409,7 $\pm$ 26,55	484,57 $\pm$ 11,22	*0,0195

Los resultados se expresan como la tensión media en g  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de t de *student's* pareada; n=10.

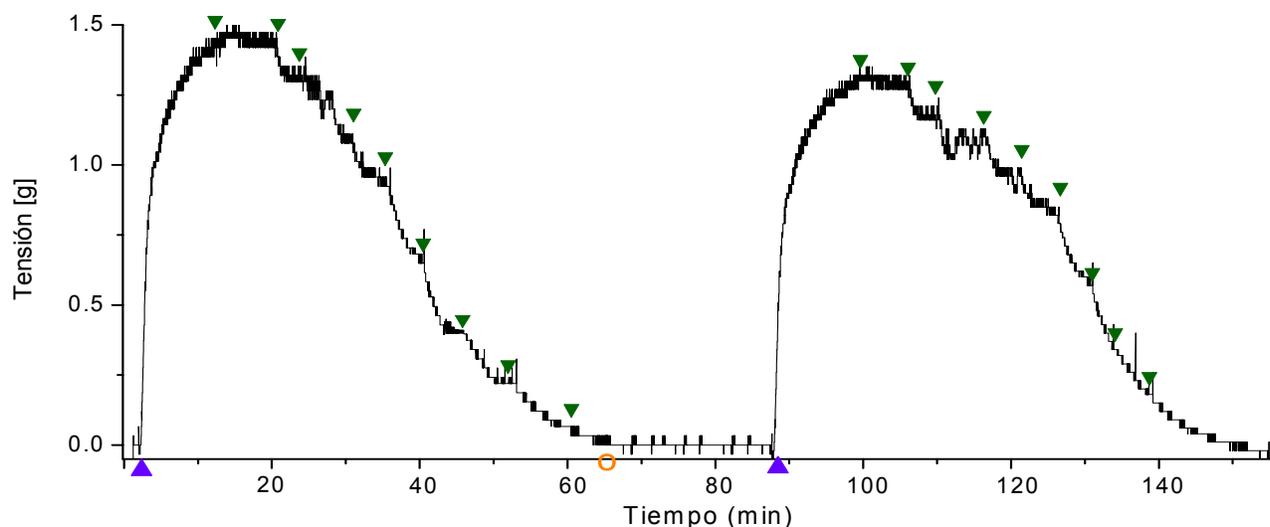
El análisis estadístico mediante *t student's pareada* de los resultados de concentraciones crecientes del EM en AAAR previamente estimulados con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] o KCl [50 mM], dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es mayor al valor crítico de 2,306 en siete de las nueve concentraciones. Ya que el valor de *p* fue menor de 0,05 en siete de las nueve concentraciones probadas se deduce que la relajación producida por el EM es significativamente diferente cuando los AAAR son estimulados con NA que cuando son estimulados con KCl. La **Figura 15** representa las curvas concentración respuesta en donde con más claridad se muestra dicha diferencia.



**Figura 15.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante del EM obtenidas en AAAR previamente contraídos con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] ( $\nabla$ ) o KCl [50 mM]. ( $\bullet$ ). Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=10$ .

Debido a que el EM relaja tanto los AAAR precontraídos con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] como con KCl [50 mM] no fue posible deducir el mecanismo de acción. Por tal motivo, se realizaron otros estudios preliminares para valorar la influencia de diferentes fármacos sobre dicho efecto relajante. Estos experimentos se realizaron sin importar la funcionalidad endotelial, ya que el EM relajó a los AAAR que tenían o no endotelio funcional. Es importante mencionar que para cada sustancia probada se tiene su respectivo control.

La **Figura 16** ejemplifica el efecto relajante observado con concentraciones crecientes y acumulativas del EM, en AAAR precontraídos con NA, antes y después de adicionar al baño una concentración de atropina [ $1 \times 10^{-7}$  M]. La misma secuencia de experimentación fue empleada para valorar el efecto de Indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M], L-NAME [ $3 \times 10^{-5}$  M], loratadina [ $1 \times 10^{-6}$  M] o propranolol [ $1 \times 10^{-4}$  M], sobre las curvas concentración respuesta construidas con el EM.



**Figura 16.** Gráfica digitalizada y comparativa de los efectos obtenidos con la adición de concentraciones crecientes y acumulativas del EM: 3,1; 10; 31; 100; 310; 368; 417; 560 y 1000 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (▼) en AAAR precontraídos con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] (▲) con y sin algún tipo de bloqueador (○), en este caso atropina.

#### 7.4.1.2. Influencia de atropina sobre el efecto relajante del EM

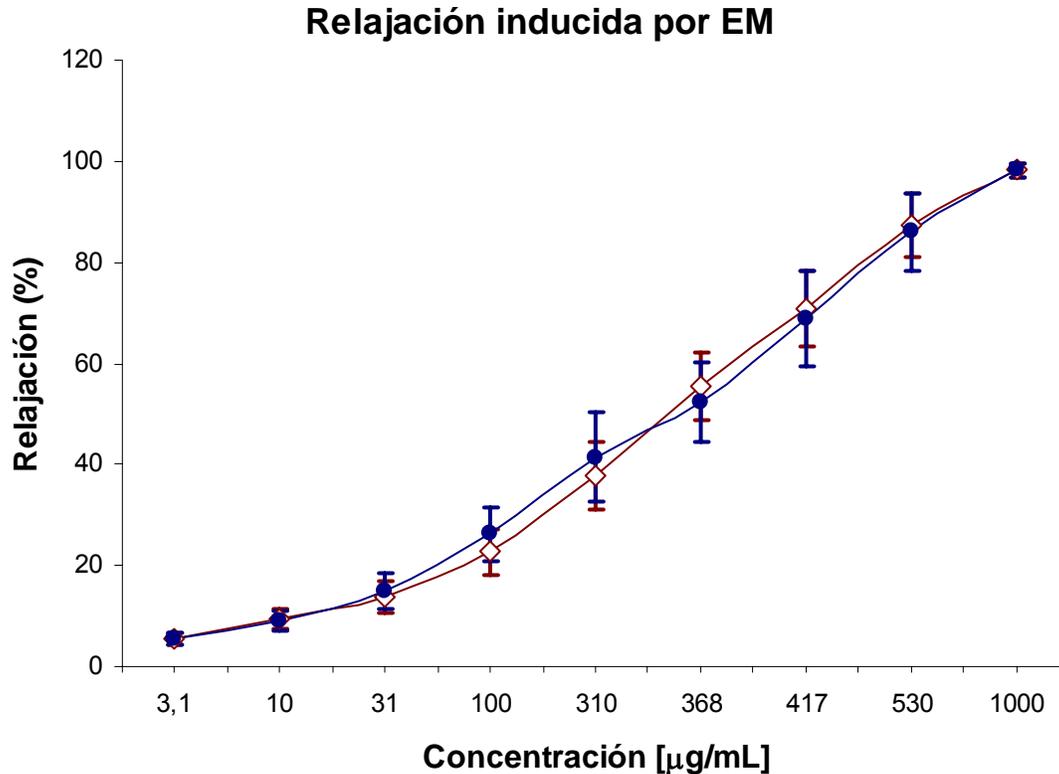
Los valores promedio del porcentaje de relajación obtenido con cada una de nueve concentraciones crecientes de EM en los AAAR antes y después de la adición atropina [ $1 \times 10^{-7}$  M] se expresa en la **Tabla XIV**. Además en la misma tabla se señalan los valores de  $p$  y las  $CE_{50}$ . Observe que la  $CE_{50}$  no se incrementa al adicionar atropina.

**Tabla XIV.** Valores promedio y  $CE_{50}$  del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de atropina [ $1 \times 10^{-7}$  M].

Concentración EM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	TRATAMIENTO		$p$
	Control	Atropina	
3,1	5,507 $\pm$ 1,169	5,609 $\pm$ 1,120	0,837
10	9,512 $\pm$ 1,929	8,9844 $\pm$ 1,9615	0,333
31	13,70 $\pm$ 3,064	14,85 $\pm$ 3,505	0,759
100	29,91 $\pm$ 9,968	26,18 $\pm$ 5,421	0,654
310	37,75 $\pm$ 6,680	41,39 $\pm$ 8,825	0,435
368	55,45 $\pm$ 6,779	52,32 $\pm$ 7,887	0,560
417	70,83 $\pm$ 7,455	68,83 $\pm$ 9,352	0,570
530	87,20 $\pm$ 6,264	86,05 $\pm$ 7,629	0,613
1000	98,29 $\pm$ 1,412	98,33 $\pm$ 1,377	0,573
<b><math>CE_{50}</math></b> [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	419,4 $\pm$ 36,64	425,7 $\pm$ 29,20	0,898

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de t de *student's* pareada. n=10.

El análisis mediante una prueba de *t student's pareada*, del porcentaje de relajación obtenido por la administración de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR con y sin tratamiento previo de atropina, dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es menor al valor crítico de 2,306 en todas las concentraciones. Ya que el valor de  $p > 0,05$  en todas las concentraciones se deduce que la adición de atropina no afecta de una manera significativa la relajación producida por el EM (**Figura 17**).



**Figura 1.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes ( $\triangle$ ) y después ( $\bullet$ ) de la administración de una concentración de atropina [ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ] por 10 min, en AAAR estimulados con NA. Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=10$ .

### 7.4.1.3. Influencia de indometacina sobre el efecto relajante del EM

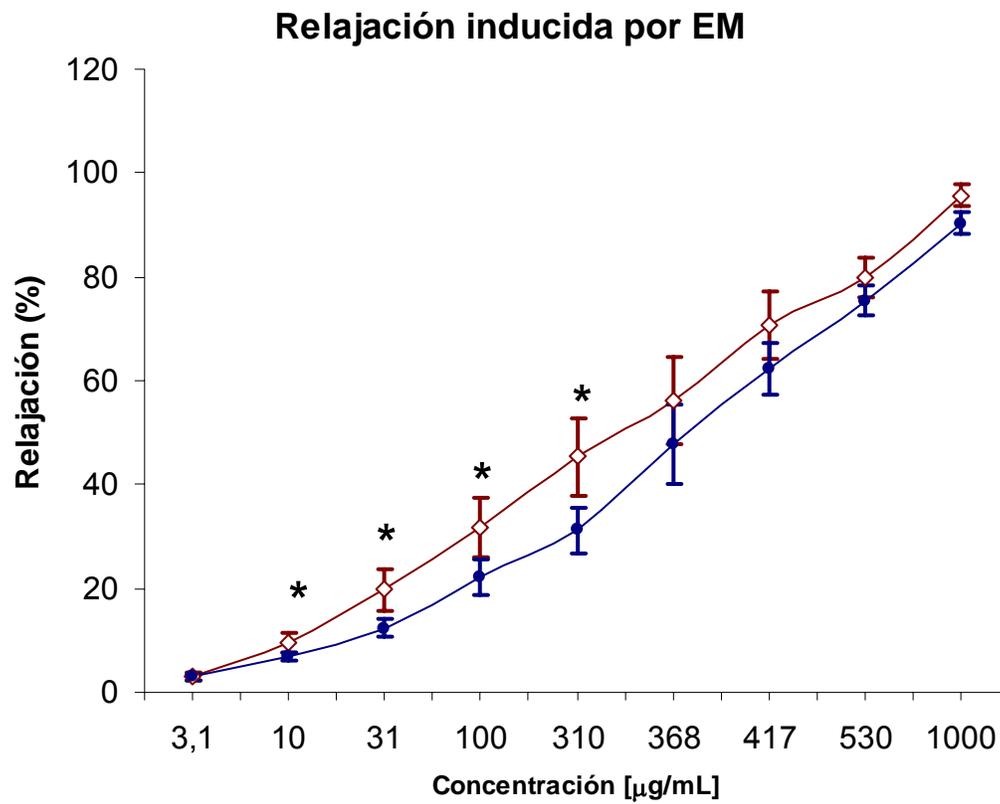
Los valores promedio del porcentaje de relajación obtenido con cada una de nueve concentraciones crecientes de EM en los AAAR antes y después de la adición indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M] se expresa en la **Tabla XV**. Además en la misma tabla se señalan los valores de  $p$  y las  $CE_{50}$ . Observe que la  $CE_{50}$  se incrementa al adicionar indometacina.

**Tabla XV.** Valores promedio y  $CE_{50}$  del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M].

Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TRATAMIENTO		$p$
	Control	Indometacina	
3,1	3,025 $\pm$ 0,712	3,002 $\pm$ 0,526	0,975
10	9,573 $\pm$ 1,775	6,909 $\pm$ 0,791	*0,046
31	19,79 $\pm$ 3,937	12,29 $\pm$ 1,747	*0,049
100	31,84 $\pm$ 5,694	22,15 $\pm$ 3,507	*0,033
310	45,29 $\pm$ 7,534	31,20 $\pm$ 4,399	*0,039
368	56,20 $\pm$ 8,312	47,74 $\pm$ 7,539	0,144
417	70,72 $\pm$ 6,371	62,29 $\pm$ 5,129	0,178
530	79,91 $\pm$ 3,950	75,43 $\pm$ 2,928	0,313
1000	95,72 $\pm$ 2,097	90,35 $\pm$ 1,978	0,266
<b><math>CE_{50}</math></b> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	419,6 $\pm$ 23,75	461,0 $\pm$ 19,82	0,205

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de  $t$  de *student's* pareada;  $n=7$ .

El análisis mediante una prueba de *t student's pareada* del porcentaje de relajación obtenido por la administración de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR con y sin tratamiento previo de indometacina dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es mayor al valor crítico de 2,306 en cuatro concentraciones de las nueve. Ya que hasta la concentración de 310  $\mu\text{g/mL}$  el valor de  $p$  es  $< 0,05$  se comprueba que la adición de indometacina sí afecta, aunque de un muy discreta, pero de una manera significativa la relajación producida por el EM. (**Figura 18**).



**Figura 18.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes ( $\nabla$ ) y después ( $\bullet$ ) de la administración de una concentración de indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M], en AAAR estimulados con NA. Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=7$ .

#### 7.4.1.4. Influencia de L-NAME sobre el efecto relajante del EM

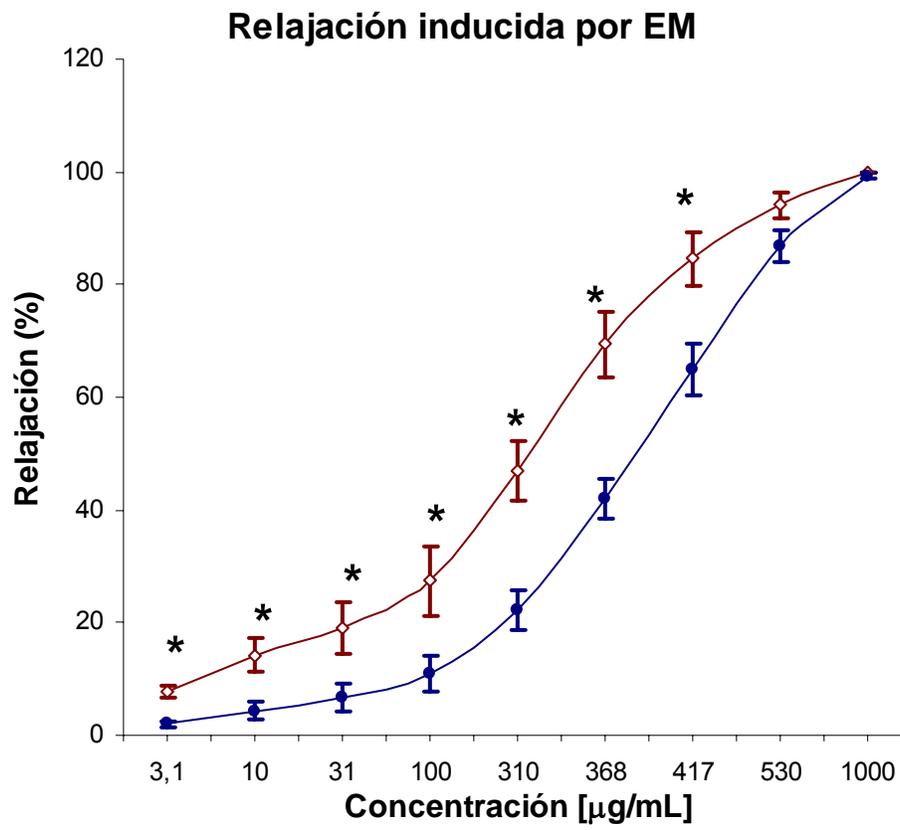
Los valores promedio del porcentaje de relajación obtenido con cada una de nueve concentraciones crecientes de EM en los AAAR antes y después de la adición L-NAME [ $3 \times 10^{-5}$  M] se expresa en la **Tabla XVI**. Además en la misma tabla se señalan los valores de  $p$  y las  $CE_{50}$ . Observe que la  $CE_{50}$  se incrementa al adicionar L-NAME

**Tabla XVI.** Valores promedio y  $CE_{50}$  del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de L-NAME [ $3 \times 10^{-5}$  M].

Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TRATAMIENTO		$p$
	Control	L-NAME	
3,1	7,808 $\pm$ 1,076	2,028 $\pm$ 0,599	*0,001
10	14,16 $\pm$ 2,975	4,379 $\pm$ 1,4451	*0,037
31	18,99 $\pm$ 4,637	6,677 $\pm$ 2,535	*0,047
100	27,49 $\pm$ 6,152	10,81 $\pm$ 3,1730	*0,045
310	46,96 $\pm$ 5,440	22,28 $\pm$ 3,498	*0,012
368	69,47 $\pm$ 5,852	42,09 $\pm$ 3,5713	*0,006
417	84,53 $\pm$ 4,634	64,89 $\pm$ 4,5947	*0,027
530	94,07 $\pm$ 2,331	86,81 $\pm$ 2,719	0,143
1000	100,0 $\pm$ 0	99,33 $\pm$ 0,667	0,351
<b><math>CE_{50}</math></b> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	373,8 $\pm$ 12,31	435,2 $\pm$ 12,22	*0,0033

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de  $t$  de *student's* pareada;  $n=8$ .

El análisis mediante una prueba de *t student's pareada* del porcentaje de relajación obtenido por la administración de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR con y sin tratamiento previo de L-NAME dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es mayor al valor crítico de 2,306 en las primeras siete concentraciones. Ya que el valor de  $p < 0,05$  en el mismo número de casos se comprueba que la adición de L-NAME sí afecta de una manera significativa la relajación producida por el EM. (**Figura 19**).



**Figura 19.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes ( $\diamond$ ) y después ( $\bullet$ ) de la administración de una concentración de L-NAME [ $3 \times 10^{-5}$  M], en AAAR estimulados con NA. Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=8$ .

#### 7.4.1.5. Influencia de loratadina sobre el efecto relajante del EM

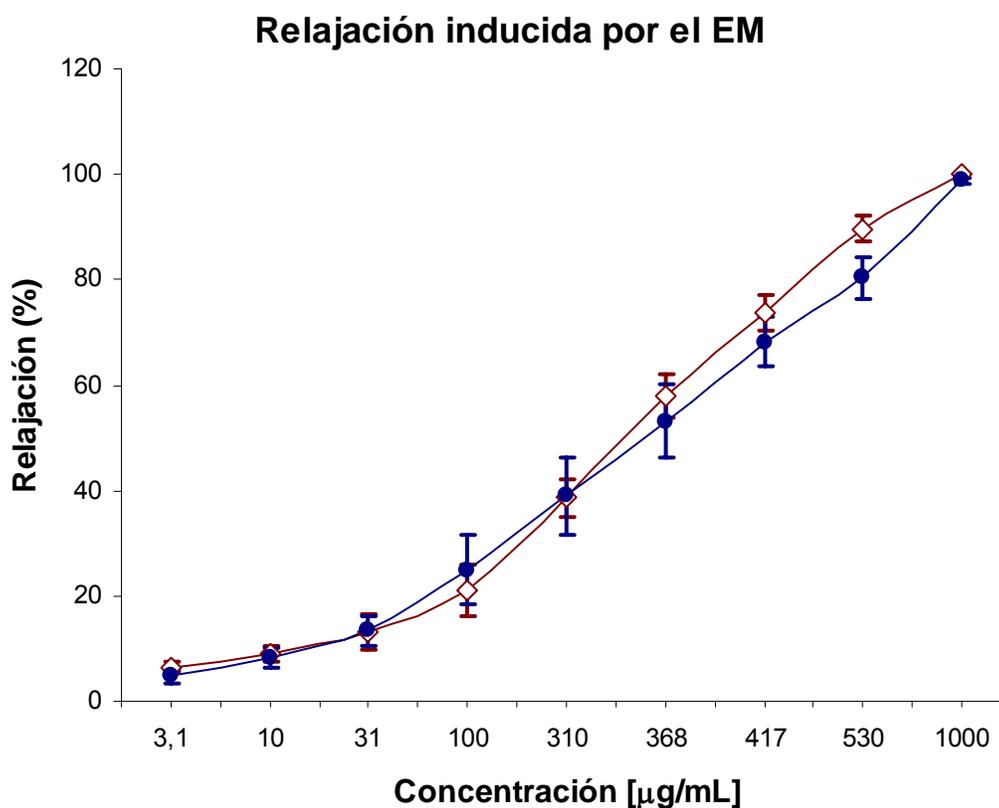
Los valores promedio del porcentaje de relajación obtenido con cada una de nueve concentraciones crecientes de EM en los AAAR antes y después de la adición de loratadina [ $1 \times 10^{-6}$  M] se expresa en la **Tabla XVII**. Además en la misma tabla se señalan los valores de  $p$  y las  $CE_{50}$ . Observe que la  $CE_{50}$  no se incrementa de una manera significativa al adicionar loratadina.

**Tabla XVII.** Valores promedio y  $CE_{50}$  del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de loratadina [ $1 \times 10^{-6}$  M].

Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TRATAMIENTO		$p$
	Control	Loratadina	
3,1	6,517 $\pm$ 1,020	4,828 $\pm$ 1,302	0,347
10	8,967 $\pm$ 1,528	8,387 $\pm$ 1,836	0,517
31	13,127 $\pm$ 3,385	13,41 $\pm$ 2,945	0,892
100	21,02 $\pm$ 4,819	24,90 $\pm$ 6,540	0,494
310	38,58 $\pm$ 3,675	38,98 $\pm$ 7,425	0,949
368	57,87 $\pm$ 4,078	53,20 $\pm$ 7,024	0,498
417	73,72 $\pm$ 3,318	68,12 $\pm$ 4,713	0,366
530	89,63 $\pm$ 2,396	80,32 $\pm$ 3,99	0,061
1000	100,00 $\pm$ 0,00	96,86 $\pm$ 1,150	0,072
<b><math>CE_{50}</math></b> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	397,9 $\pm$ 9,407	420,9 $\pm$ 18,37	0,289

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de  $t$  de *student's* pareada;  $n=8$ .

El análisis mediante una prueba de *t student's pareada* del porcentaje de relajación obtenido por la administración de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR con y sin tratamiento previo de loratadina dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es menor al valor crítico de 2,306 en todas las concentraciones. Ya que el valor de  $p > 0,05$  en todas las concentraciones se deduce que la adición de loratadina no afecta de una manera significativa la relajación producida por el EM (**Figura 20**Figura ).



**Figura 20.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes ( $\diamond$ ) y después ( $\bullet$ ) de la administración de una concentración de loratadina [ $1 \times 10^{-6}$  M], en AAAR estimulados con NA. Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=8$ .

#### 7.4.1.6. Influencia de propranolol sobre el efecto relajante del EM

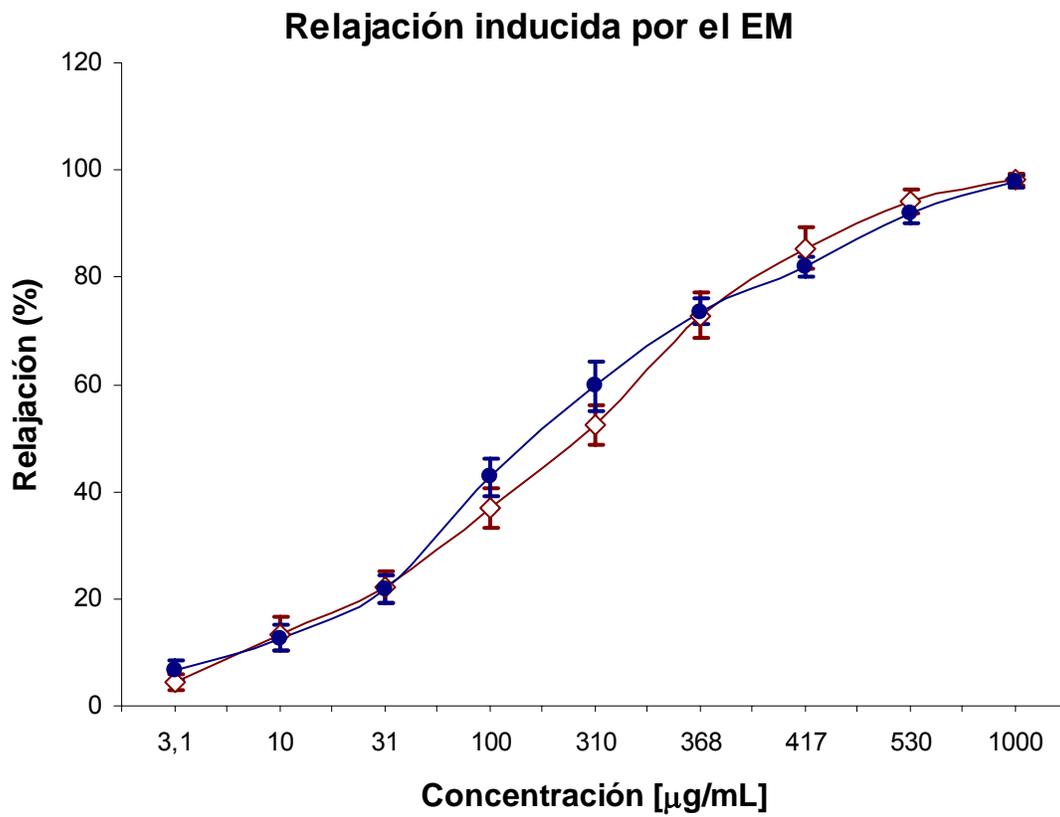
Los valores promedio del porcentaje de relajación obtenido con cada una de nueve concentraciones crecientes de EM en los AAAR antes y después de la adición propranolol [ $1 \times 10^{-5}$  M] se expresan en la **Tabla XVIII**. Además en la misma tabla se señalan los valores de  $p$  y las  $CE_{50}$ . Observe que la  $CE_{50}$  no se incrementa al adicionar propranolol.

**Tabla XVIII.** Valores promedio y  $CE_{50}$  del por ciento de relajación que los AAAR, previamente contraídos con NA, tuvieron después de la adición de concentraciones crecientes de EM; antes y después de la administración de una concentración de propranolol [ $1 \times 10^{-5}$  M].

Concentración EM [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TRATAMIENTO		$p$
	Control	Propranolol	
3,1	4,539 $\pm$ 1,511	6,712 $\pm$ 1,751	0,272
10	13,44 $\pm$ 3,019	12,69 $\pm$ 2,467	0,758
31	22,19 $\pm$ 3,102	21,82 $\pm$ 2,444	0,902
100	36,79 $\pm$ 3,658	42,66 $\pm$ 3,343	0,357
310	52,32 $\pm$ 3,743	59,68 $\pm$ 4,699	0,282
368	72,91 $\pm$ 4,091	73,62 $\pm$ 2,381	0,887
417	85,37 $\pm$ 3,937	82,02 $\pm$ 1,740	0,400
530	97,12 $\pm$ 3,37	93,16 $\pm$ 2,679	0,360
1000	106,5 $\pm$ 3,425	102,05 $\pm$ 2,882	0,347
<b><math>CE_{50}</math></b> [ $\mu\text{g/mL}$ ]	368,9 $\pm$ 1,662	368,1 $\pm$ 1,811	0,953

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de relajación  $\pm$  el Error Estándar de la Media; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de  $t$  de *student's* pareada;  $n=9$

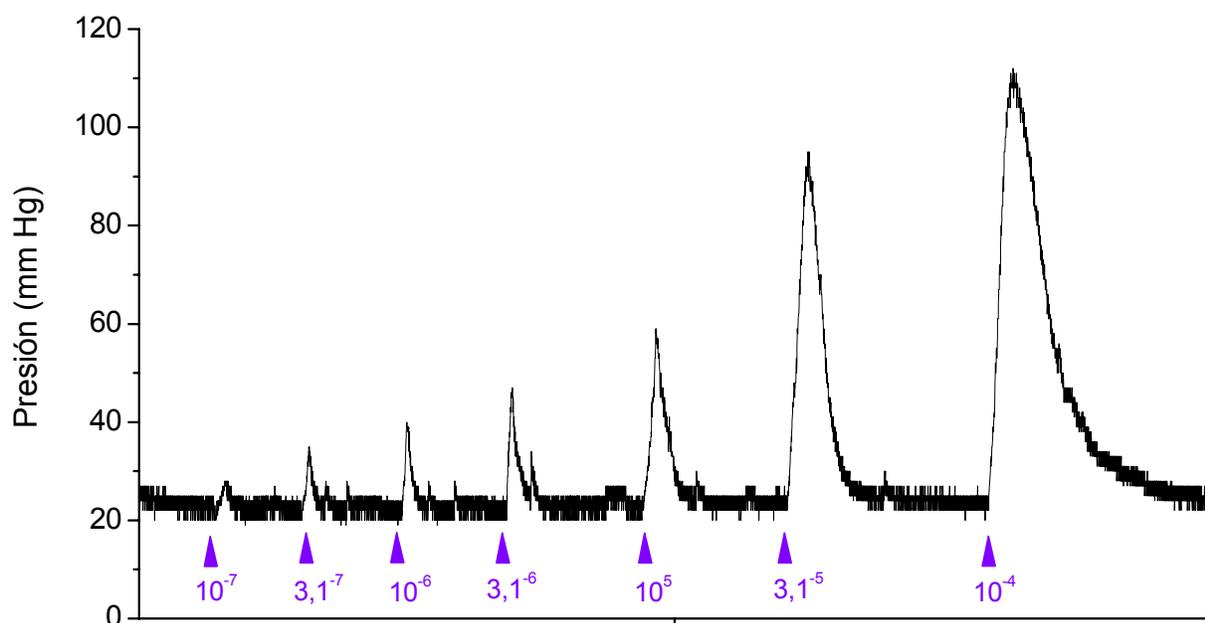
El análisis mediante una prueba de *t student's pareada* del porcentaje de relajación obtenido por la administración de nueve concentraciones crecientes del EM en AAAR con y sin tratamiento previo de propranolol dio como resultado que la  $t_{\text{calc}}$  es menor al valor crítico de 2,306 en todas las concentraciones. Ya que el valor de  $p > 0,05$  en todos los casos se comprueba que la adición de propranolol no afecta de una manera significativa la relajación producida por el EM. (**Figura 21**).



**Figura 212.** Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de EM, obtenidas antes ( $\diamond$ ) y después ( $\bullet$ ) de la administración de una concentración de propranolol [ $1 \times 10^{-5}$  M], en AAAR estimulados con NA. Las barras indican los EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=9$ .

### 7.5. Efecto del EM sobre el lecho mesentérico aislado de rata

La **Figura 22** ejemplifica la respuesta del LMAR a concentraciones crecientes de NA ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $3,1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3,1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3,1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) o KCl (31,62, 50,11, 79,43, 125,9, 199,52 y 316,20 mM). Observe que con cada administración de la concentración correspondiente de NA se produce un pico que señala el incremento de la resistencia vascular producida por la sustancia vasoconstrictora, lo cual se refleja en resistencia al flujo y en consecuencia, en incremento de la PA del LMAR.



**Figura 22.** Gráfica digitalizada de los efectos obtenidos en LMAR al estimularlos con concentraciones crecientes de NA ( $\blacktriangle$ ).

En la **Tabla XIX** se muestran los valores promedio de los efectos obtenidos con concentraciones crecientes de NA, sobre la PA del LMAR. Observe que la PA del LMAR se incrementa al adicionar concentraciones crecientes de NA y que este efecto en presencia del EM [0,05 mg/mL] o prazosina [1 nM] disminuye significativamente. Se observa también el valor de  $p$  obtenido cuando se comparan las respuestas de NA antes y después de adicionar al KH el EM. Además se indica las  $CE_{50}$  de este efecto noradrenérgico, antes y después de adicionar EM o prazosina. Observe que este valor es notoriamente mayor cuando se adiciona al líquido de perfusión EM y se incrementa aún más cuando se adiciona prazosina.

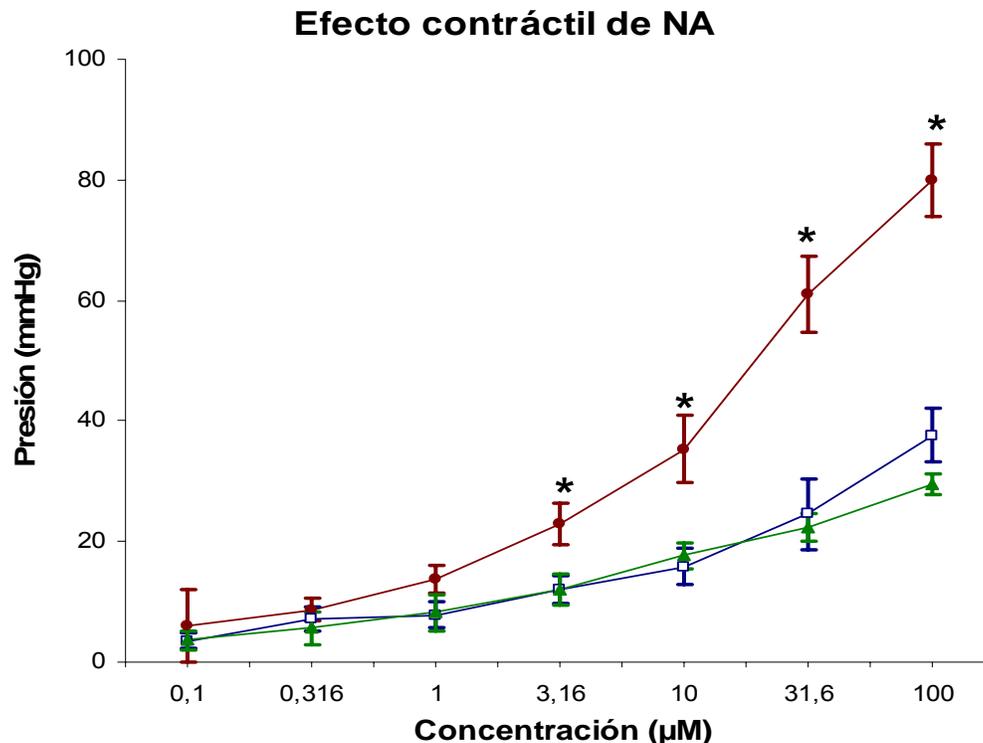
El análisis mediante una prueba de *t de student's pareada* de las respuestas obtenidas por la administración de concentraciones crecientes de NA obtenidas antes y durante de la perfusión de EM [0,05 mg/mL] sobre LMAR, dio como resultado que la  $t_{calc}$  es mayor al valor crítico de 2,447

en las ultimas cuadro administraciones. Ya que el valor de  $p$  es  $< 0,05$  se deduce que el EM antagoniza significativamente la respuesta a NA. En la **Figura 23** se visualiza de manera clara este resultado al construir las curvas concentración respuesta de los diferentes tratamientos. Observe que la prazosina, antagonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico y el EM, antagonizan el efecto de NA y tienen curvas concentración respuesta parecidas.

**Tabla XIX.** Valores promedio y  $CE_{50}$  de la presión obtenida por concentraciones crecientes de NA administradas en LMAR antes y después de la perfusión con EM [0,05 mg/mL] o prazosina [1 nM].

Concentración NA [ $\mu$ M]	TRATAMIENTO			$p$
	Control de NA	EM +NA	Prazosina+NA	
0,10	6,00 $\pm$ 1,183	3,500 $\pm$ 1,284	3,667 $\pm$ 1,563	0,232
0,316	8,667 $\pm$ 1,838	7,166 $\pm$ 1,990	5,667 $\pm$ 2,753	0,515
1,00	13,67 $\pm$ 2,305	7,833 $\pm$ 2,212	8,167 $\pm$ 2,960	0,116
3,16	23,00 $\pm$ 3,425	15,83 $\pm$ 2,982	12,00 $\pm$ 2,683	*0,025
10,00	35,33 $\pm$ 5,637	12,00 $\pm$ 2,191	17,67 $\pm$ 2,155	*0,018
31,6	61,00 $\pm$ 6,367	24,50 $\pm$ 3,250	22,33 $\pm$ 2,404	*0,003
100	80,00 $\pm$ 6,011	37,66 $\pm$ 4,410	29,50 $\pm$ 1,784	*0,001
$CE_{50}$ NA [ $\mu$ M]	200,4 $\pm$ 20,49	489,4 $\pm$ 65,63	539,4 $\pm$ 55,66	*0,002

Los resultados se expresan como la media de la presión (mm Hg);  $\pm$  el Error Estándar de la Media;  $p$  = control vs EM; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de t de *student's* pareada; n=6.



**Figura 23.** Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de NA sobre el LMAR obtenidas antes (-●-) y después de la perfusión con EM [0,05 mg/mL] (-□) o prazosina [1 nM] (-▲). Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ; n=6.

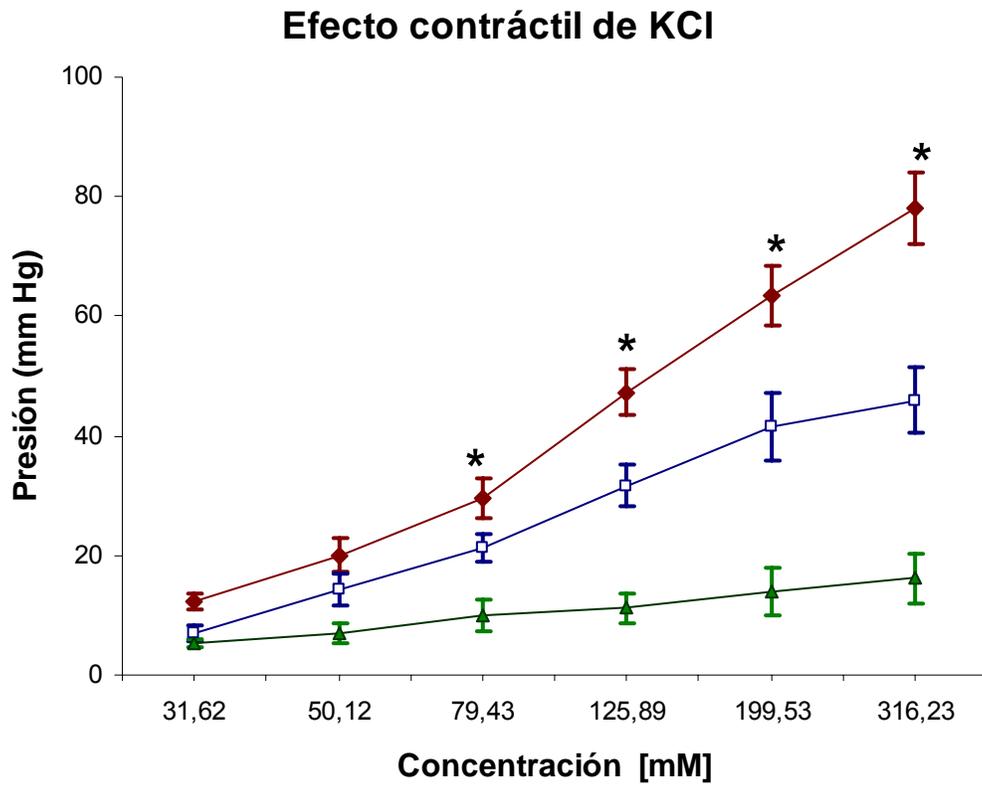
En la **Tabla XX** se muestran los valores de PA obtenidos con cada una de las seis concentraciones crecientes de KCl administradas al LMAR sin tratamiento, y el efecto que el EM [0,05 mg/mL] y nifedipina [1  $\mu$ M] provocaron sobre la curva de concentración-respuesta. Se observa también el valor de  $p$  conseguido por la comparación entre los datos del control vs. EM+KCl y la  $CE_{50}$  de KCl con los diferentes tratamientos. Nótese que la  $CE_{50}$  se incrementa al adicionar al líquido de perfusión EM y sobre todo nifedipina.

**Tabla XX.** Valores promedio y  $CE_{50}$  de la presión obtenida por concentraciones crecientes de NA administradas en LMAR antes y después de la perfusión con EM [0,05 mg/mL] o nifedipina [1  $\mu$ M].

Concentración KCl [mM]	TRATAMIENTO			$p$
	Control de KCl	EM +KCl	Nifedipina+KCl	
31,60	12,33 $\pm$ 1,302	8,833 $\pm$ 2,407	5,333 $\pm$ 0,617	0,142
50,12	20,00 $\pm$ 2,672	14,17 $\pm$ 2,557	7,000 $\pm$ 1,434	0,184
79,43	29,50 $\pm$ 3,021	21,33 $\pm$ 2,199	10,00 $\pm$ 2,354	*0,033
125,9	47,33 $\pm$ 3,453	31,67 $\pm$ 3,168	11,17 $\pm$ 2,395	*0,024
199,5	63,50 $\pm$ 4,675	41,50 $\pm$ 5,258	14,00 $\pm$ 3,586	*0,009
316,2	78,00 $\pm$ 5,524	46,00 $\pm$ 4,934	16,17 $\pm$ 3,850	*0,001
$CE_{50}$ [ $\mu$ g/mL ]	190,48 $\pm$ 14,48	314,5 $\pm$ 39,59	814,9 $\pm$ 89,21	*0,015

Los resultados se expresan como la media de la presión (mm Hg);  $\pm$  el Error Estándar de la Media;  $p$  = control vs EM; el \* indica significancia estadística utilizando la prueba de *t* de *student's* pareada;  $n=6$ .

El análisis mediante una prueba de *t* *pareada* de las respuestas obtenidas por la administración de concentraciones crecientes KCl obtenidas antes y durante de la perfusión de EM [0,05 mg/mL] sobre LMAR dio como resultado que la  $t_{calc}$  es mayor al valor crítico de 2,57 en las ultimas cuadro administraciones y el valor  $p$  sobrepasa el valor de 0,05 en las mismas, por lo que se comprueba que la adición de EM sí modifica significativamente la respuesta en las ultimas cuatro concentraciones de KCl. En la **Figura 24** además de la curva control y las curvas obtenidas durante la perfusión de EM [0,05 mg/mL] y nifedipina [1nM] se señalan las diferencias significativas de los datos obtenidos de la curva control contra los datos obtenidos cuando hay perfusión con el EM, mientras que la curva con nifedipina sirve para constatar que la contracción producida por el KCl se ve reducida por el bloqueo de canales de calcio.



**Figura 24.** Curvas concentración-respuesta del efecto contráctil de KCl sobre el LMAR obtenidas antes (◆), después de la perfusión con EM [0,05 mg/mL] (□) o con nifedipina [1 $\mu$ M] (▲). Las barras indican el EEM y el \*  $p < 0,05$ ;  $n=6$ .

## 8. DISCUSIÓN

En la rata anestesiada la administración i.v. de 100 mg/kg del EM obtenido de la corteza de *T. mucronatum*, produjo hipotensión arterial inmediata y de corta duración (10 min), y bradicardia sostenida que se mantuvo hasta el final del experimento (60 min). Estos efectos son discretos comparados con los efectos cardiovasculares producidos por extractos obtenidos de otras plantas.<sup>69</sup> Sin embargo, podrían ser significativos en un sujeto hipertenso moderado, y ser más intensos al separar el o los principios activos. Para estimar la importancia de este efecto moderado, debe considerarse que se está administrando una sola dosis de una mezcla de sustancias, que en su mayoría, son de estructura química y actividad biológica desconocida. Cabe la posibilidad que cuando se realice el fraccionamiento biodirigido del extracto, resulte en alguna sustancia activa con acciones antagónicas, que al ser separada de la fracción hipotensora, permitirá observar este efecto con mayor intensidad y duración.

La hipotensión (**Figura 8**) y la bradicardia (**Figura 9**) producidas por el EM no son producto de acciones reflejas, ya que el registro difiere completamente del típico patrón de taquicardia observado con fármacos antihipertensivos que actúan directamente sobre los vasos arteriolares de resistencia. La bradicardia producida por el EM hace pensar que al menos una sustancia posee acción directa sobre el corazón, pero con los resultados de la presente investigación no es posible determinar el sitio, y el mecanismo de acción de dicho efecto. Sin embargo, debido a la importancia del sistema nervioso autónomo sobre el sistema cardiovascular de la rata, se podría plantear entre otros mecanismos, una acción antagónica sobre los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos<sup>70</sup> o bien, estimulante sobre los receptores  $M_2$  colinérgicos<sup>11</sup>, ambos receptores ubicados en la membrana celular de las células especializadas de conducción del corazón. Además, y continuando con la hipótesis que el EM podría contener sustancias que modifican el sistema nervioso autónomo, es posible asociar el efecto hipotensor a una acción de tipo colinérgica sobre los receptores muscarínicos  $M_3$  localizados en las células endoteliales de los vasos arteriales de resistencia. Esto implicaría asumir que al menos una de las sustancias del EM al estimular dicho receptor endotelial, liberaría NO que al difundirse hacia el músculo liso vascular activaría a la enzima guanilato ciclasa para incrementar la formación de  $GMP_C$  a partir de GTP y en consecuencia, producir relajación del músculo liso arteriolar.<sup>71</sup> Este efecto vasodilatador es semejante al producido por acetilcolina<sup>72</sup> y podría explicar el efecto hipotensor fugaz producido por el EM. También podría pensarse en una acción adrenérgica sobre los receptores  $\beta_2$ , localizados en la membrana del músculo liso arteriolar. Como se sabe, estos

receptores se encuentran acoplados con la proteína G la cual se desdobra en subunidades al estimularse el receptor  $\beta_2$ , particularmente la subunidad alfa activa a la enzima adenilato ciclasa que cataliza la conversión de ATP a AMPc. Estos eventos metabólicos conducen a una vasodilatación.<sup>73</sup>

Con la finalidad de observar si hay acciones adrenérgicas y/o colinérgicas del EM sobre el tejido vascular, se emplearon AAAR como modelo experimental. Este modelo *in vitro* además de ser sensible a numerosas sustancias vasodilatadores y vasoconstrictoras, permite probar menores concentraciones del extracto y en consecuencia, economizar en el ya de por si bajo rendimiento (2 %) que se tiene del EM de *T. mucronatum*. Pero más que nada, al estudiar las acciones directas sobre el tejido vascular, evita todos los estímulos multifuncionales presentes en la rata íntegra. Es importante señalar que la preparación de los AAAR analiza los cambios del tono vascular, dado fundamentalmente por la contracción del músculo liso. Este tejido no tiene contracción espontánea pero en condiciones basales, posee actividad miogénica intrínseca. Para estudiar la influencia de sustancias contráctiles sobre su tensión, es necesario aplicar una fuerza local de 1g en su estructura. En estas condiciones, el EM no modificó el tono basal de los AAAR, con lo que se descarta la presencia, en el extracto, de alguna sustancia vasoconstrictora. En contraste, para observar el efecto de sustancias relajantes, los AAAR deben contraerse con alguna sustancia vasoconstrictora, para posteriormente adicionar la sustancia a prueba. El EM produce un importante y significativo efecto relajante dependiente de la concentración (desde 3,1 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), lo cual señala la presencia de al menos una sustancia vasorelajante (**Figura 12**).

La relajación del músculo liso vascular puede deberse al bloqueo de la apertura de los canales de calcio voltaje dependiente, o por las sustancias que activan la apertura de canales de potasio, que inducen la hiperpolarización del potencial de membrana e inhiben la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, con la consiguiente disminución de la concentración de calcio, lo que disminuye la capacidad de contracción del músculo liso.<sup>74</sup> Existen numerosas sustancias vasoconstrictoras con mecanismos de acción reconocidos científicamente, como por ejemplo: fenilefrina, angiotensina, serotonina etc. Sin embargo, en estudios preliminares la NA es las sustancias más empleada para incrementar la tensión de los vasos arteriales. Para postular una hipótesis que explique el efecto relajante del EM, hay que considerar el mecanismo de acción del efecto vasoconstrictor producido por NA, el cual esta asociado a la estimulación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes en el músculo liso vascular.<sup>75</sup> Estos receptores se encuentran acoplados a una proteína Gq la cual al ser estimulada, separa su

subunidad alfa y estimula la fosfolipasa C que incrementa la conversión de IP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol) a IP<sub>3</sub> (trifosfato de inositol) y a DAG (diacil glicerol). Estos dos mensajeros (IP<sub>3</sub> y DAG) aumentan la concentración del ión Ca<sup>+2</sup> en las células del músculo liso y en consecuencia, se produce una contracción que se caracteriza por dos fases. La primera sucede rápidamente y es debida al IP<sub>3</sub> que produce una salida abrupta del ión Ca<sup>+2</sup> desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma. Este ión calcio junto con el DAG, ocasionan la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la membrana celular, conformando la segunda fase lenta de la contracción.<sup>76, 77</sup> El efecto resultante de estos mecanismos es un incremento en la tensión vascular. Debido a que el EM se opone a esta acción adrenérgica, podría considerarse como posibles mecanismos de acción el antagonismo farmacológico sobre los receptores α<sub>1</sub> o la estimulación de los receptores β<sub>2</sub>. Estos receptores se encuentran acoplados a proteína Gs y su estimulación incrementa el AMPc que conduce a relajación vascular.<sup>78</sup> Desafortunadamente, el pretratamiento con propranolol [1x10<sup>-6</sup> M] no modificó la curva concentración-respuesta producida por el EM en los AAAR precontraídos con NA (**Figura 21**), por lo que se descarta que la relajación sea mediada por estimulación de los receptores β<sub>2</sub>. Por otra parte, el EM relaja también los AAAR precontraídos con altas concentraciones de KCl (**Figura 15**), ión que incrementa la apertura de canales de Ca<sup>+2</sup> sensibles a voltaje localizados en la membrana del músculo liso vascular.<sup>79, 80</sup>

La participación del sistema nervioso autónomo a través del sistema colinérgico también fue estudiada. Se conoce que la estimulación de los receptores colinérgicos M<sub>3</sub> localizados en el endotelio vascular, incrementan la entrada de Ca<sup>+2</sup> y en consecuencia la síntesis de NO a partir de L-arginina. Este receptor se encuentra acoplado a proteína Gq, y su estimulación incrementa la actividad de la enzima sintasa de NO que cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina y NO.<sup>81</sup> La posibilidad que el EM tuviera una sustancia con actividad colinérgica se analizó al adicionar atropina (antagonista de receptores muscarínicos<sup>82</sup>) a los AAAR que al ocupar los receptores muscarínicos endoteliales puede impedir la estimulación por algún componente del EM. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre los efectos relajantes producidos por el EM en AAAR precontraídos con NA y pretratados o no con atropina [1x10<sup>-7</sup> M]. (**Figura 17**)

Debido a que la participación del sistema nervioso autónomo no fue demostrada, y que la funcionalidad del endotelio incrementa significativamente la relajación producida por el EM, se buscó confirmar este hecho pretratando con L-NAME [1x10<sup>-4</sup> M] a los AAAR precontraídos con NA. Se sabe que el L-NAME inhibe la sintasa del NO y al disminuir este radical libre no se

estimula la guanilato ciclasa,<sup>83, 84</sup> disminuyendo los niveles citosólicos de calcio, y en consecuencia no se produce relajación del músculo liso vascular.<sup>85</sup> El efecto relajante del EM disminuye significativamente en presencia de L-NAME (**Figura 19**), lo cual indica que este extracto contiene alguna sustancia que involucra la síntesis y/o liberación del NO. Esto implica que parte de la relajación producida por el EM en AAAR se debe a la presencia del endotelio que involucra la liberación de NO. No habiendo conseguido que el efecto vasorelajante se bloquee por completo, se exploró la posibilidad que el EM tuviera acciones histaminérgicas<sup>86</sup> y/o prostaglandinérgicas.<sup>87</sup> El pretratamiento con loratadina no modifican la curva concentraciones respuesta producida por el EM en los AAAR precontraídos con NA (**Figura 20**). En contraste, el pretratamiento con indometacina antagoniza moderadamente pero significativamente parte del efecto vaso relajante del EM (**Figura 18**). Esto quiere decir que una posible liberación de prostaglandinas también esta involucrada en los efectos del EM.

En resumen el efecto relajante del EM de *T. mucronatum* se debe en parte: 1) al bloqueo de los canales o de algún sistema que controlan la movilización del calcio intracelular y extracelular 2) a la inhibición de la producción de NO en las células endoteliales de los AAAR y por último 3) a la modificación moderada en la síntesis de prostaglandinas.

Con el propósito de establecer si el mecanismo hipotensor se debe a una acción directa sobre la musculatura lisa de los vasos de resistencia, se realizaron curvas concentración-respuesta en el LMAR con NA (desde  $10^{-7}$  hasta  $10^{-4}$  M progresión de medio logaritmo) o KCl (desde 31 hasta 310 mM en progresión logarítmica). Estas curvas representan los valores de PA obtenidos antes y después de perfundir al LMAR con una solución de KH que contenía EM [0,05 mg/mL]. Los resultados confirman la hipótesis de que el EM posee una acción sobre el músculo liso arterial ya que la curva de NA como la curva de KCl son significativamente menores con la adición del EM. Es importante señalar que la determinación de la concentración empleada en estos experimentos, se ajusto a la concentración máxima que se puede disolver en la solución KH sin afectar la presión basal del LMAR. Por otra parte, no se adicionaron mayores concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  M de NA, porque la recuperación de los valores basales de PA del LMAR se prolonga y no es completa.

El hecho de que el EM halla bloqueado parcialmente el incremento de PA producido por NA y KCl, señala que en la corteza de *T. mucronatum* hay más de una sustancia con acciones relajantes que probablemente desencadenan más de un mecanismo de acción, el cual no fue estudiado en el LMAR. Sin embargo, el aplanamiento parcial de la curva concentración-

respuesta a NA fue similar en intensidad y en la pendiente a la curva concentración-respuesta en presencia de prazosina (**Figura 23**). Esto habrá la posibilidad de que algún componente del EM pudiera disminuir la PA del LMAR por una relajación muscular mediada por antagonismo en el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. En contraste, el aplanamiento de la curva concentración-respuesta a KCl producido por la perfusión de HK con EM fue de menor intensidad que el aplanamiento producido por la adición al KH de nifedipina (bloqueador del canal de  $Ca^{+2}$ ) (**Figura 24**). Esto muestra una menor actividad del EM sobre el mecanismo de acción responsable del incremento de PA producido por KCl.

La presencia de más un fenómeno vasorelajante hace pensar que el EM contiene más de un compuesto vaso-activo. En estudios fitoquímicos previos, diversos compuestos se han aislado de las hojas de *T. mucronatum*, entre los cuales destacan por su actividad biológica los flavonoides como la amentoflavona, inhibidor del factor nuclear que media la expresión del gen en la producción de sintasa de NO inducible por lipopolisacáridos.<sup>52, 53</sup> y la hinoquinoiflavona, amentoflavona como la 3-O- $\beta$ -D-glucósido de quercetina, inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2),<sup>52</sup> enzima que cataliza la conversión de araquidonato a prostaglandinas. Es interesante señalar que tanto la inhibición de la producción de NO, como la producción de prostaglandinas, participan en el efecto relajante que observamos con el EM. Sin embargo, no hay evidencia de que alguna de estas sustancias se halla aislado de la corteza del *T. mucronatum*, como tampoco hay evidencias experimentales que señalen acciones cardiovasculares de sustancias que si se han aislado de la corteza de esta planta (criptomerina A, criptomerina B e Isocriptomerina).<sup>50</sup>

Finalmente, el análisis de los resultados en conjunto demuestran que el efecto hipotensor del EM obtenido de la corteza de *T. mucronatum*, se debe a una acción relajante directa sobre el músculo liso arteriolar. Este hecho es fundamentado por la disminución de la PA del LMAR cuando se perfunde con el EM. A pesar que el mecanismo de acción vasorelajante no pudo determinarse de forma completa, y menos aún se logro la identificación de los principios activos, la presente investigación es importante porque por primera vez se estudia de manera sistemática, la actividad cardiovascular de esta planta lográndose integrar resultados obtenidos de modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. El estudio preclínico de esta planta apenas se inicia, y esta tesis aporta una valoración general que requiere de investigación farmacológica y química complementaria que determine el completo mecanismo de acción del efecto vasorelajante, y la o las sustancias responsables de dicho efecto.

## 9. CONCLUSIONES

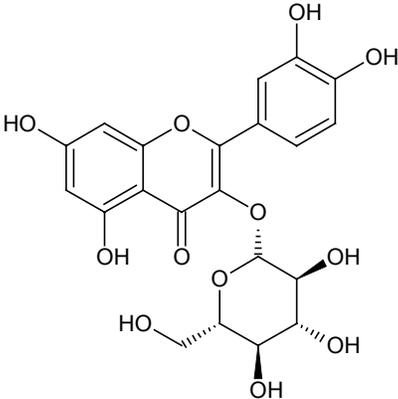
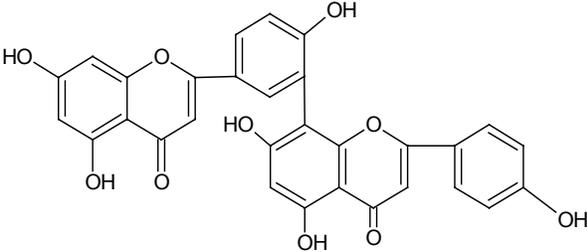
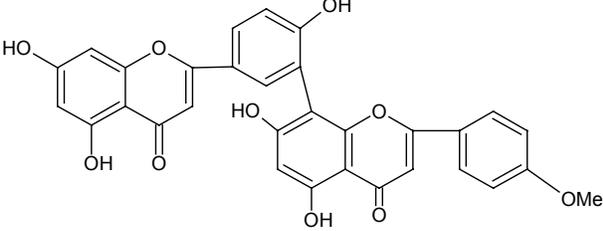
- ⇒ El rendimiento del EM obtenido por maceración de la corteza de *T. mucronatum* fue de 2 %.
- ⇒ El bajo rendimiento del EM, limita la administración i.v. de altas concentraciones en la rata anestesiada
- ⇒ El EM administrado por vía i.v. [100 mg/kg] a ratas anestesiadas, produce hipotensión moderada de corta duración, y bradicardia sostenida durante los 60 min que duro el registro.
- ⇒ El EM produce vasorelajación dependiente de la concentración y de la funcionalidad del endotelio vascular, en AAAR previamente contraídos con NA [ $1 \times 10^{-7}$  M] o con KCl [50 mM].
- ⇒ La  $CE_{50}$  del efecto relajante del EM es menor cuando los AAAR contraídos con NA, muestran mayor funcionalidad del endotelio vascular ( $CE_{50}=356,0$   $\mu\text{g/mL}$  con mas de 75%;  $CE_{50}=385,7$   $\mu\text{g/mL}$  con menos de 45% y  $CE_{50}=442,9$   $\mu\text{g/mL}$  con 0% de endotelio vascular funcional).
- ⇒ El pretratamiento de los AAAR con L-NAME [ $3 \times 10^{-5}$  M] o con indometacina [ $1 \times 10^{-4}$  M], bloquea parcialmente y de una manera significativa, el efecto relajante del EM. En contraste, el pretratamiento de los AAAR con propranolol [ $1 \times 10^{-4}$  M], loratadina [ $1 \times 10^{-6}$  M] o atropina [ $1 \times 10^{-7}$  M] no modifican significativamente el efecto relajante del EM.
- ⇒ Las curvas concentración-respuesta de NA [de  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M] o de KCl [de 31 mM a 310 mM] construidas con los datos de la PA del LMAR, se antagonizan significativamente cuando se realizan durante la perfusión del LMAR con 0,05 mg/mL del EM.
- ⇒ El EM contiene compuestos vasorelajantes que explican parte del efecto hipotensor producido por la administración i.v. de dicho extracto en ratas anestesiadas

## 10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

- ⇒ Las plantas superiores son fuente de sustancias activas, y para su estudio, debe considerarse el conocimiento popular de sus acciones terapéuticas ya que incrementa la posibilidad de resultados positivos.
- ⇒ Es necesario realizar estudios químico-farmacológicos para aislar, identificar y estudiar el o los principios activos, responsables de los efectos encontrados con la administración del EM completo.
- ⇒ Los resultados de la presente investigación, aún son preliminares para avalar el uso popular del *T. mucronatum* como un medicamento herbolario antihipertensivo.

## 11. ANEXO

Sustancias aisladas del *T. mucronatum*

Tipo de compuesto	Estructura Química
<p><b><u>Biflavona</u></b></p> <p><b>Número de CAS:</b> 482-35-9</p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            3-O-β-D-Glucopiranosido.            Quercetin 3- glucosido.            Glucosil-3-quercetin.            Isoquercetin.            Isoquercitrin.</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>21</sub> H<sub>20</sub> O<sub>12</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 464,382 g/mol</p> <p><b>Punto de fusión:</b> 238-242°C</p> <p><b>Parte de la planta:</b> Hojas</p>	
<p><b><u>Biflavona</u></b></p> <p><b>Número de CAS:</b> 1617-53-4</p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            Amenthoflavone.            Amentoflavona.</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>30</sub> H<sub>18</sub> O<sub>10</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 538,45 g/mol</p> <p><b>Punto de fusión:</b> 300°C</p> <p><b>Parte de la planta:</b> Hojas, corteza</p>	
<p><b><u>Biflavona</u></b></p> <p><b>Número de CAS:</b> 22136-74-9</p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            4-Monometilamentoflavone.            Podocarpusflavona A.</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>31</sub> H<sub>20</sub> O<sub>10</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 552,493 g/mol</p> <p><b>Punto de fusión:</b> 322-324°C</p> <p><b>Parte de la planta:</b> Hojas</p>	

Sustancias aisladas del *T. mucronatum*

continuación

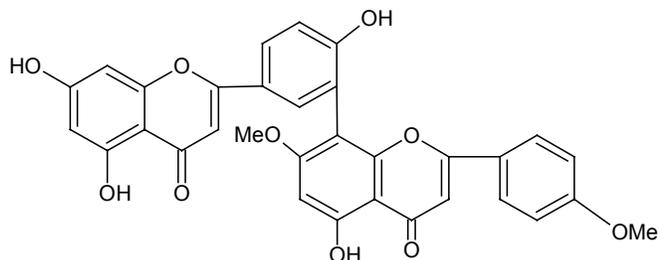
## Tipo de compuesto

## Estructura Química

**Biflavona****Número de CAS:** 34293-14-6**Nombres conocidos:**

3,8-Biflavone, Dimetilamentoflavone.

7,4-Dimetilamentoflavona.

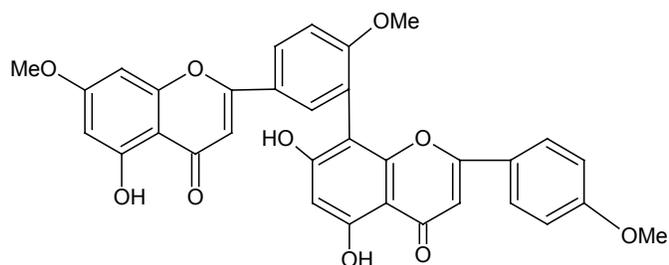
**Fórmula molecular:** C<sub>32</sub> H<sub>22</sub> O<sub>10</sub>**Peso molecular:** 566,51 g/mol**Punto de fusión:** 318-320°C**Parte de la planta:** Hojas**Biflavona****Número de CAS:** 521-34-6**Nombres conocidos:**

Sciadopitysin.

7,4',4'''-Trimethylamentoflavone.

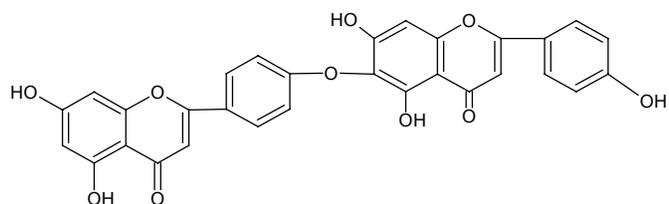
**Fórmula molecular:** C<sub>33</sub> H<sub>24</sub> O<sub>10</sub>**Peso molecular:** 580,547 g/mol**Punto de fusión:** 287-289°C.

295-297°C desc

**Parte de la planta:** Hojas**Biflavona****Número de CAS:** 19202-36-9**Nombres conocidos:**

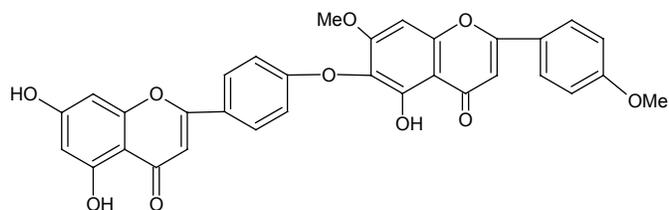
Hinoquinflavona.

Hinokiflavone

**Fórmula molecular:** C<sub>30</sub> H<sub>18</sub> O<sub>10</sub>**Peso molecular:** 538,466 g/mol**Punto de fusión:** 353-355°C desc.**Parte de la planta:** Hojas**Biflavona****Número de CAS:** 22012-98-2**Nombres conocidos:**

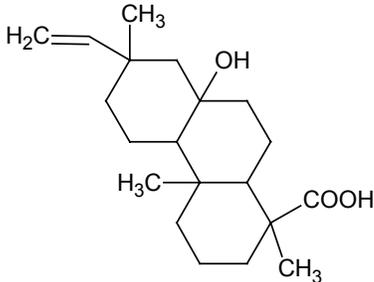
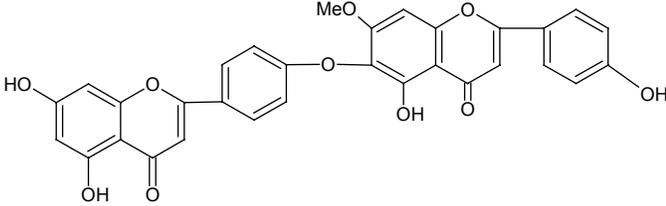
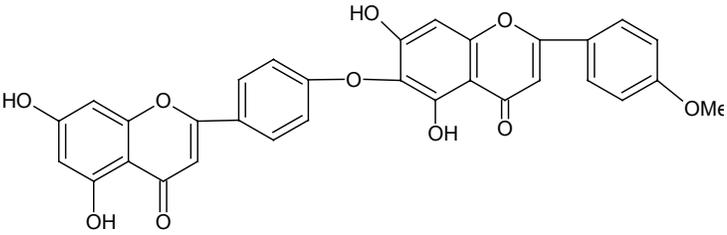
Cryptomerina B.

5,5'',7'''-Trihidroxiflavona.

**Fórmula molecular:** C<sub>32</sub> H<sub>22</sub> O<sub>10</sub>**Peso molecular:** 566,52 g/mol**Punto de fusión:** 302-303°C desc.**Parte de la planta:** Toda la planta

Sustancias aisladas del *T. mucronatum*

continuación

Tipo de compuesto	Estructura Química
<p><b><u>Diterpenoide</u></b></p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            Ácido 8, <math>\beta</math>-hidroxipimar-15-en-19-oico            15-Pimareno-8,19-diol</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>  <b>Peso molecular:</b> 320,471 g/mol  <b>Punto de fusión:</b> 186-187°C  <b>Parte de la planta:</b> Hojas y frutos</p>	
<p><b><u>Biflavona</u></b></p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            Isocryptomerina.            Monometilhinokiflavona.            Isocryptomerin</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>31</sub> H<sub>20</sub> O<sub>10</sub>  <b>Peso molecular:</b> 552,493 g/mol  <b>Punto de fusión:</b> 310°C desc.  <b>Parte de la planta:</b> Toda la planta</p>	
<p><b><u>Biflavona</u></b></p> <p><b>Número de CAS:</b> 22012-97-1</p> <p><b>Nombres conocidos:</b>            Cryptomerina A</p> <p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>31</sub> H<sub>20</sub> O<sub>10</sub>  <b>Peso molecular:</b> 552,493 g/mol  <b>Punto de fusión:</b> 308-310°C desc.  <b>Parte de la planta:</b> Toda la planta</p>	

Fuentes: Pan X. Bioorganic & Medical Chemistry (2005),<sup>51</sup> Chapman & Ha II/CRC, Dictionary of Natural Products,<sup>88</sup> Silva GL., *et al* Phytochemistry (1995),<sup>89</sup> Pelte A Tetrahedron Letters (1969)<sup>90</sup>.

## 12. REFERENCIAS

1. Camacho JR, Aguilar A, Lozoya X. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Rev. Med. IMSS* 1987; 25:283-291.
2. Cruz M, Badiano J. *The Badianus Manuscript, Codex Barberini, Latin 241, Vatican Library: An Aztec Herbal of 1552*. Baltimore, MD: Johns Hopkins Press 1940.
3. Lozoya X. *Plantas, Medicina y Poder (Breve Historia de la Herbolaria Mexicana)*. México: Pax; 1994. p 175.
4. Martínez M. *Las Plantas medicinales de México*. 6 ed. México: Ediciones Botas; 1990. p 29-32.
5. Domínguez X. *Métodos de investigación fotoquímica*. México: Limusa; 1985. p 273.
6. Estrada E, Linares E, Bye R, Biological diversity of medicinal plants in Mexico. *Phytochemistry of medicinal plants* 1995; 29: 65-82.
7. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: The link between Phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 1991; 30: 3864-74.
8. Farnsworth N. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. *J Ethnopharmacol* 1993; 38:145-152.
9. Linares E, Bye R. *Plantas medicinales de México usos y remedios tradicionales*. México: UNAM; 1999. p 9-11.
10. Smith M. *Farmacología*. Argentina: Médica Panamericana; 1993. p 564-565.
11. Brunton L, Lazo J, Parker K editores. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11 ed. USA: Mc Graw Hill; 2006. p 849-861.
12. Guyton A. *Arterial Pressure and Hypertension*. USA: Saunders; 1980. p 513.
13. World Health Organization. *Cardiovascular Diseases [en línea]*. Actualización 2007 [consultado abril 12 de 2007]. Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases](http://www.who.int/cardiovascular_diseases)
14. Murray C, López A. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1269-1276.
15. Rosas M. Hipertensión arterial en México. La hipertensión arterial en México y su relación con otros factores de riesgo. *Archivos de Cardiología de México* 2003; 73(1): S137-S140.
16. Velásquez O; Rosas M; Lara A; Pastelón G; Attie F; Tapia R; Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Archivos de Cardiología de México* 2002; 72(1): 71-84.

17. Rosas M, Lara A, Pastelín G, Velásquez O, Martínez J, Méndez A, *et al.* Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. Archivos de Cardiología de México 2005; 75(1): 96-111.
18. Mycek M, Harvey R, Champe P. Farmacología. USA: Mc Graw Hill; 2004. p 31-83, 215-229.
19. Baum T. Fundamental Principles Governing Regulation of Circulatory Funcion. 3 ed. USA: Antonaccion Raven Press; 1990.
20. Katsung B. Farmacología Básica y clínica. 9 ed. México: El Manual Moderno; 2005.
21. Clark W, Brater D, Jonson A. Farmacología medica. España: Mosby; 1993. p 172-189.
22. Rosas M, Pastelín G, Martínez J, Herrera-Acosta J. Hipertensión arterial en México guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. Archivos de Cardiología de México 2004; 74:134-157.
23. Berne R, Levy M. Fisiología. USA: Panamericana; 1986. p 517-560.
24. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la presión arterial.
25. World Hypertension. Measuring your blood pressure [en línea]. Actualizado junio 20 2006 [consultado diciembre 6 de 2006], Disponible en: <http://www.mco.edu/org/whl/bloodpre.html>
26. Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. Farmacologia integrada. España: Harcourt; 1992; p 78-182.
27. Freis E. Salt in hypertension and the effects of diuretics. Pharmacol Toxicol 1979; 81: 13.
28. Kaplan N. Hipertensión clínica. 4 ed. México: Waverly hispánica; 2004.
29. Rodríguez R. Vidrio H. Campos A. Guía de farmacología y terapéutica. México: McGrawHill; 2007. p 93-97.
30. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang and Dale's Pharmacology. 5 ed. China: Elsevier; 2003.
31. Short-term safety and tolerability of antihypertensive agents in Korean patients: an observational study. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2000; 9:603-9.
32. Bonsái global. La Web del bonsái. [en línea]. Actualización 2007 [consultado abril 16 de 2007]. Disponible en: <http://www.bonsaiglobal.com/fichasespecificas-108.php>
33. Quattrocchi U. Word Dictionary of plants names. Commun names, scientific names, eponyms, synonyms and etymology. USA: CRC. Press; 2000.

34. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista. 1994; p15-34.
35. Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. México: Fondo de Cultura Económica; 1979.
36. Márquez C, Lara F, Esquivel B, Mata R. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. México. Universidad Autónoma de México; 1999. p 13.
37. Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT\*<sup>mx</sup>) [en línea]. Actualización Noviembre 30 de 2006 [consultado diciembre 6 de 2006]. Disponible en [http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxastep?king=every&p\\_action=every&taxa=ahuehuete&p\\_format=&p\\_ifx=itismx&p\\_lang=es](http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxastep?king=every&p_action=every&taxa=ahuehuete&p_format=&p_ifx=itismx&p_lang=es)
38. Secretaria del medio ambiente del distrito federal. Árbol urbano [en línea]. Actualización mayo 14 2007. [consultado mayo 14 de 2007]. Disponible en <http://www.sma.df.gob.mx/dgrva/dva/PAV/arboladourbano/especies/TaxodiumMucronatumTen.html>
39. Baytelman B. Acerca de plantas y de curanderos: Etnobotánica y antropología médica en el estado de Morelos. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia; 1993.
40. Ruiz TJ. Expendio de plantas medicinales en un mercado de la ciudad de Morelia Michoacán. México: Escuela de biología UMSNH; 1984. p 30.
41. Estrada E. Las plantas medicinales y los sistemas tradicionales de curación del municipio de Dr Mora Guanajuato [tesis de licenciatura]. México: ENEP Iztacala UNAM; 1984. p 83.
42. López R, Hinojosa A. Catalogo de plantas medicinales Sonorenses [tesis licenciatura], Sonora México: Universidad de sonora; 1988. p 133.
43. Superarboles: Ahuehuete *Taxodium mucronatum* [en línea]. Actualizado 18 de febrero de 2007 [consultado 16 de abril de 2007]. Disponible en: <http://www.terra.es/personal6/dirkdigler/ahuehuete.htm>
44. Códice Florentino, 3 vols. México: Edición del Gobierno de la República; 1979.
45. Hernández F. Historia de las plantas de la Nueva España. Obras completas vol 2. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Imprenta universitaria; 1959.
46. Esteyneffer J. Florilegio medicinal de todas las enfermedades. 6 ed. 2 vols. México: Academia Nacional de Medicina; 1978.
47. González E. lecciones orales de materia medica y terapéutica. Nuevo León México: UANL; 1977. p 163.

48. Cabrera LG. Plantas curativas de México: propiedades medicinales de las más conocidas plantas de México, su aplicación correcta y eficaz. 5 ed. México: Ediciones Cicerón; 1958.
49. Sentíes A. Plantas medicinales y sistemas tradicionales de curación del Valle de Tehuacan puebla [tesis licenciatura]. México DF: Facultad de ciencias UNAM; 1984. p 119.
50. Yumei Z, Ninghua T, Ruirui J, Guangzhi Z, Changjiu J. Three bioactive biflavones isolated from *Taxodium mucronatum*. Yunnan Zhiwu Yanjiu 2005; 27(1): 107-110.
51. Pan X, Tan N, Zeng G, Zhang Y, Jia R. Amentoflavone and its derivatives as natural inhibitors of human Cathepsin B. Biorganic & Medical Chemistry 2005; 13(20): 5819-5825.
52. O'Leary KA, Pascual-Tereasa S, Needs PW, Yong-Ping B, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. Mutat Res 2004; 551(1-2): 245-54.
53. Banerjee T, Valacchi G, Ziboh VA, Van der Vliet A. Inhibition of TNFalpha-induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-kappaB activation in A549 cells. Mol Cell Biochem 2002; 238(1-2): 105-10.
54. Calvo TR, Lima ZP, Silva JS, Ballesteros KV, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, et al. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. Biol Pharm Bull 2007; 30(3): 451-9.
55. Yang JW, Pokharel YR, Kim MR, Woo ER, Choi HK, Kang KW, Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. J Ethnopharmacol 2006; 105(1-2): 107-13.
56. Lin YM, Anderson H, Flavin MT, Pai Y H. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. J. Nat. Prod 1997; 60: 884-8.
57. Krauze-Baranowska M, Wiwart M. Antifungal Activity of Biflavones from *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba*. Z. Naturforsch B 2003; 58: 65-69.
58. Reddy BP, et al. Ginkgetin, *Sciadopitysin*. Indian J. Chem. Sect. B 1996; 35: 283.
59. Perusquia M, Mendoza S, Bye R, Linares E, Mata R. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. J Ethnopharmacol 1995; 46(1): 63-9.
60. Khabir M, Catón F, Ansari W. Flavonoid glycosides from the leaves of *Taxodium mucronatum*. Journal of the Indian Chemical society 1986; 63(8): 781-2.
61. Ishratullah K, Rahman W, Okigawa M, Kawano N. Biflavones from *Taxodium mucronatum*. Phytochemistry (Elsevier) 1978; 17(2): 335.

62. Ramos A, Escamilla E, Calderón J, Rodríguez B.  $\beta$ -Hydroxypimar-15-en-19-oic acid from *Taxodium mucronatum*. *Phytochemistry* (Elsevier) 1984; 23(6): 1329-30.
63. Mongrand S, Badoc A, Patouille B, Lacomblez C, Chavent M, Cassagne C, *et al.* Taxonomy of Gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 2001; 58(1): 101-115.
64. Berlandinelli L, Belloni F, Rubio R, Berne R. Atriventricular Conduction Disturbances during Hipoxia. *Circ Res* 1980; 47(5): 684-691.
65. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental -Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
66. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
67. Guide for the care and Use of Laboratory Animals National Institutes of Health Publication 85-23, 1996.
68. Escobar JL. Aislamiento identificación y actividad farmacológica de los componentes vasoactivos de la *Argemone mexicana* [tesis de licenciatura]. México DF: FES Zaragoza UNAM. 2007.
69. Magos GA, Vidrio H. Pharmacology of *Casimiroa edulis*. Parte I. Blood pressures and heart rate effects in the anesthetized rat. *Planta Med* 1991; 57: 20-24.
70. Foody JM, Farrel MH Krumholz HM. Beta-blocker therapy in heraat failure: scientific review. *JAMA* 2002; 287: 883-889.
71. Dinerman JL Lowenstein CJ, Snyder SH. Moleculat Mechanisms of Nitric Oxide regulation. Potencial Relevance to Cardiovascular Disease. *Circ Res* 1993; 73(2): 217-222.
72. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine 1980; 288: 373-376.
73. Taussing R, Gildman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; 270: 1-4.
74. Weston AH, Edwards G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 47-54.
75. Allwood MJ, Cobbold AF, Ginsberg J. Peripheral vascular effects of noradrenaline isopropylnoradrenaline and dopamine *Br. Med Bull* 1963; 19: 132-136.
76. Weiss GB, Winqvist RJ, Silver PG. Vascular smooth Muscle and Vasodilators. *Cardiovascular Pharmacology. USA: Antonaccio, M J Raven Press; 1990.*

77. Somlyo AP, Somlyo AV. Smooth Muscle Structure and function. The Heart and Cardiovascular System. 2 ed. USA: Fozzard; 1992. p 1295-1316.
78. Bosch T, Medical treatment of portal hypertension. Digestion 1998; 59:547-555.
79. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Sato M, Amano K, *et al.* Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. Pharmacol 1997; 49(2): 157-230.
80. Weston AH, Edwards G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. Biochem Pharmacol 1992; 43: 47-54.
81. Cooke JP. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 1992; 90:1168.
82. Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. Crit Rev. Neurobiol 1996; 10: 69-99.
83. Lambert LE, French JF, Whitten JP, Baron BM, McDonald IA. Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol 1992; 216: 131-134.
84. Gross BB, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1991; 170: 823-829.
85. Waldman SA, Murad F. 1988. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: The guanylate cyclase-cyclic GMP system. J. Cardiovasc Pharmacol. 12: (Suppl5): S115-S118.
86. Lewis T, The blood Vessels of the Human Skin and Their Responses. Londres: Shaw & Sons; 1927.
87. Bergström S, Carlson LA, Weeks JR. The prostaglandins: a family of biologically active lipids. Pharmacol Rev 1968; 20:1-48
88. Chapman & Hall/CRC, Dictionary of Natural Products on CD-Rom Ver 15.1, 1982-2007.
89. Silva GL, Chai H, Gupta MP, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, *et al.* Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. Phytochemistry 1995. 40(1):129-34.
90. Pelte A, Warren R, Usmane J, Ilyas M, Rahman W. Use of solvent induced methoxy shifts as a guide to hinokiflavone. Tetrahedron Letters 1969; 49: 4259-63.