



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

"Efecto de la santina y reynosina aisladas de *Tanacetum parthenium* sobre la respuesta contráctil del tejido vascular de aorta de rata"

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. Alejandra Orona Ortiz

TUTOR: Dr. Andrés Navarrete Castro
Facultad de Química

MÉXICO, D. F., noviembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal: Dr. Enrique Hong Chong
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario: Dra. Helgi Jung Cook

Sitio donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 126 del conjunto "E". Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Andrés Navarrete Castro

Sustentante: QFB. Alejandra Orona Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado (No. de Beca 257718).

Al financiamiento para la compra de animales y reactivos de los proyectos PAIP4390-18 y PAPIT IN210112.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por sus valiosos consejos y dirección en este proyecto.

Al Dr. José Luis Balderas López por el apoyo técnico otorgado en la identificación de los compuestos aislados.

Al Dr. José Calderón del Instituto de Química, por los estándares de los compuestos aislados.

Al pasante de Q.F.B. Israel González Soto por su apoyo en el aislamiento de los compuestos evaluados.

RESUMEN

La *Tanacetum parthenium* es una planta ampliamente distribuida y utilizada en la medicina tradicional mexicana para prevenir episodios de migraña, como antiinflamatoria, antipirética y antiespasmódica, entre otros. Entre sus componentes hay una gran variedad de moléculas entre las que destacan los flavonoides y las lactonas sesquiterpénicas, dentro de los cuales se encuentran la santina (flavonoide) y la reynosina (lactona sesquiterpénica). Ambos compuestos se encuentran como mayoritarios en el extracto de diclorometano de la planta, el cual posee una actividad inhibitoria de las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en el tejido aislado de aorta de rata. Siendo la santina y la reynosina, los compuestos mayoritarios de este extracto activo, en este trabajo se investigaron las propiedades antagonistas de estos compuestos para inhibir las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina utilizando el modelo de aorta de rata.

Se encontró que se requiere una menor concentración de santina (38.39 ± 1.45 $\mu\text{g/mL}$) y reynosina (34.83 ± 1.23 $\mu\text{g/mL}$) para inhibir al 50% las contracciones inducidas por fenilefrina en comparación con la concentración necesaria para inhibir al 50% las contracciones inducidas por serotonina (santina 372.52 ± 1.85 $\mu\text{g/mL}$ y reynosina 306.35 ± 2.23 $\mu\text{g/mL}$). Lo cual sugiere que el mecanismo de acción de ambos compuestos está relacionado con el antagonismo de receptores α_1 adrenérgicos. Durante los experimentos, tanto la santina como la reynosina, presentaron relajación del tejido a las concentraciones más altas. Adicionalmente, este es el primer trabajo en el cual se reporta la actividad de ambos compuestos sobre la inhibición de las contracciones del tejido vascular. Lo que sugiere que al menos en parte la actividad del *T. parthenium* se debe a la acción de estos dos compuestos, adicional al reportado para la partenólida. Por otro lado se tienen evidencias de que en esta planta está presente el flavonoide 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona, el cual se pensaba era un artefacto químico.

ABSTRACT

Tanacetum parthenium is wide distributed and used in Mexican traditional medicine to prevent migraine, as antiinflammatory, antipyretic and antispasmodic. Among its components comprise a variety of molecules, such as flavonoids and sesquiterpenelactones. Santin (flavonoid) and reynosin (sesquiterpene lactone) are the main compounds in dichloromethane extract of the plant, for which has been reported an inhibitory activity of contractions induced by serotonin and phenylephrine in isolated rat aorta. Being santina and reynosina, the main compounds of the active extract, in this study, both compounds were investigated as antagonists of contractions induced by serotonin and phenylephrine using the rat aorta model.

It was found that santin and reynosin require a lower concentration ($38.39 \pm 1.45 \mu\text{g/mL}$ and $34.83 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ respectively) to inhibit 50% of the contractions induced by phenylephrine than serotonin (santin $372.52 \pm 1.85 \mu\text{g/mL}$ and reynosin $306.35 \pm 2.23 \mu\text{g/mL}$). These results suggest that α_1 adrenergic receptor antagonism is involved in the action mechanism of both compounds. During the experiments, both reynosina and santin presented tissue relaxation at higher concentrations. In addition, this is the first work in which reports the activity of both compounds on the inhibition of vascular tissue contractions. It suggest that the activity of *T. parthenium* depends, at least in part, of these compounds. On the other hand, there are evidences of the presence of flavonoid 5,6-dihydroxy-3,7,4'-trimethoxy-flavone, therefore it is not a phytochemistry artefact.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
LISTA DE GRÁFICAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
1.INTRODUCCIÓN	13
2.MARCO TEÓRICO	14
2.1 <i>Tanacetum parthenium</i> .	14
2.2 Estudios sobre la actividad de <i>Tanacetum parthenium</i> .	16
2.3 Fitoquímica.	20
2.4 Satina.	30
2.5 Reynosina.	33
2.6 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular.	36
2.7 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular mediado por receptores adrenérgicos.	38
2.8 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular mediado por receptores de serotonina.	40
2.9 Interacción entre los receptores adrenérgicos y serotoninérgicos	44
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
4.HIPÓTESIS	45
5.OBJETIVOS	45

6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1 Procedimientos generales.	46
6.2 Material vegetal.	46
6.3 Aislamiento de los compuestos.	46
6.4 Animales de experimentación.	49
6.5 Modelo de órgano aislado.	49
6.6 Curva de inhibición de la contracción.	50
6.7 Fármacos y compuestos de referencia.	50
6.8 Tratamiento estadístico.	51
6.9 Cálculo del potencial antagonista.	51
7. RESULTADOS	52
7.1 Aislamiento e identificación de la santina y reynosina.	52
7.2 Efecto sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.	55
7.3 Efecto sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata.	60
7.4 Potencial Antagonista (pA_2').	63
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
9. CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73
ANEXOS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
CI50	Concentración Inhibitoria 50
CINC-1	Citocina Inducida Químico-atrayente de Neutrófilos-1
COX2	Ciclooxigenasa-2
DG	Diacilglicerol
EEDQ	N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
Erk1/2	Cinasa Regulada por Señalización Extracelular 1/2
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
iNOS	Sintasa de Óxido Nítrico inducible
IP3	Inositoltrifosfato
IP3K	Fosfatidil Inositol 3-quinasa
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
MAPK	Proteínquinasa Activada por Mitógeno
MaxiK	Canal Ca ²⁺ K ⁺ dependiente de voltaje
MLC	Cadena Ligera de Miosina
MLCK	Cinasa de la Cadena Ligera de Miosina
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero
PGE2	Prostaglandina E2
PI	Polifosfoinositidos
PKA	Proteínquinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteínquinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLC γ 1	Fosfolipasa C γ 1
PP2	4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(<i>t</i> -butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina
RhoK	Rho-cinasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Lactonas sesquiterpénicas del tipo germacranólida presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	21
Cuadro 2. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanólida presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	22
Cuadro 3. Lactonas sesquiterpénicas del tipo eudesmano presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	25
Cuadro 4. Cumarinas presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	25
Cuadro 5. Flavonoides presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	26
Cuadro 6. Terpenoides presentes en <i>Tanacetum parthenium</i> .	27
Cuadro 7. Desplazamientos químicos y multiplicidad de los espectros RMN ¹ H y RMN ¹³ C, de la santina.	53
Cuadro 8. Desplazamientos químicos y multiplicidad de los espectros RMN ¹ H y RMN ¹³ C, de la reynosina.	54
Cuadro 9. Porcentajes de contracción con fenilefrina, en presencia de santina a diferentes concentraciones.	56
Cuadro 10. Porcentajes de contracción con fenilefrina, en presencia de reynosina a diferentes concentraciones.	56
Cuadro 11. Porcentajes de contracción con fenilefrina, en presencia del extracto de diclorometano a diferentes concentraciones.	57
Cuadro 12. Porcentajes de contracción con fenilefrina, en presencia de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones.	59
Cuadro 13. Porcentajes de contracción con serotonina, en presencia de santina a diferentes concentraciones.	61
Cuadro 14. Porcentajes de contracción con serotonina, en presencia de reynosina a diferentes concentraciones.	62
Cuadro 15. Porcentajes de contracción con serotonina, en presencia de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones.	63
Cuadro 16. Potencial antagonista calculado para las contracciones inducidas por agonistas de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos α_1 .	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.	15
Figura 2. Estructura de la centaureidina, jaceidina y santina aisladas de <i>T. parthenium</i> .	31
Figura 3. Estructuras de la partenólida, cinaropicrina y solstitialin 13-acetato.	35
Figura 4. Mecanismo general de contracción y relajación del músculo liso vascular.	36
Figura 5. Incremento de la concentración de calcio intracelular por diferentes vías.	37
Figura 6. Mecanismo de relajación del músculo liso vascular por receptores β_2 adrenérgicos.	39
Figura 7. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por receptores adrenérgicos α_1 .	40
Figura 8. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por receptores adrenérgicos 5-HT _{2A} .	42
Figura 9. Diagrama de aislamiento de la santina y reynosina a partir del extracto de diclorometano de <i>Tanacetum parthenium</i> .	48
Figura 10. Estructuras de la reynosina, santamarina, partenólida y cinaropicrina.	65
Figura 11. Estructuras de la 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona y la santina.	68
Figura 12. Señales del espectro de RMN ¹ H correspondientes al H8 de la mezcla de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona.	68
Figura 13. Reacción de metilación con diazometano de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona.	69
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ /400MHz) del producto de reacción de metilación de la mezcla de flavonoides.	69

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto inhibitorio de la santina a diferentes Concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.	55
Gráfica 2. Efecto inhibitorio de la reynosina a diferentes Concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.	57
Gráfica 3. Efecto inhibitorio del extracto de diclorometano a diferentes Concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.	58
Gráfica 4. Efecto inhibitorio de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.	59
Gráfica 5. Efecto inhibitorio de la santina a diferentes Concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata.	60
Gráfica 6. Efecto inhibitorio de la reynosina a diferentes Concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata.	61
Gráfica 7. Efecto inhibitorio de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata.	62
Gráfica 8. Curvas del porcentaje de contracción del tejido aislado de aorta inducido por serotonina en presencia de santamarina y reynosina.	67
Gráfica 9. Curvas del porcentaje de contracción del tejido aislado de aorta inducido por fenilefrina en presencia de santamarina y reynosina.	68

1. INTRODUCCIÓN

La santina y la reynosina son compuestos presentes en las partes aéreas de plantas de la familia *Asteraceae*, a la cual pertenece *Tanacetum parthenium*. Esta planta es conocida mundialmente por sus propiedades antiinflamatorias, para disminuir la fiebre, como emenagogo y antiespasmódico, por lo que se utiliza para tratar dolores estomacales, menstruales, intestinales y reumáticos, así mismo, y de forma más importante se utiliza para prevenir episodios de migraña.

El *Tanacetum parthenium* L., se conoce en México como Santa María, es una planta utilizada y comercializada ampliamente en nuestro país, y se le puede encontrar en los jardines de las casas, para uso medicinal u ornamental.

Existen antecedentes que han demostrado la actividad inhibitoria del extracto de diclorometano de la Santa María sobre las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en el tejido aislado de aorta de rata. Sin embargo, a la fecha, no existen estudios realizados de la actividad individual de los componentes mayoritarios de este extracto sobre la capacidad contráctil del tejido vascular, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria de santina y reynosina sobre la respuesta contráctil del tejido de aorta en presencia de serotonina y fenilefrina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Tanacetum parthenium*.

Se le conoce comúnmente en México como: altamisa, altemisa, artamisa, bola de hilio, hierba de Santa María, Santa María, hierba santa, manzanilla grande, manzanilla romana, mastranzo, matlalí (Rzedowski y de Rzedowski, 1997).

Es una planta herbácea perene perteneciente a la familia *Compositae* (*Asteraceae*) (Figura 1) de hasta 80-100 cm de alto, muy aromática; pubérula en sus partes más jóvenes y glabrescente; posee tallos erectos, más o menos profusamente ramificados; hojas pecioladas, lámina de contorno general elíptico u ovado, hasta de 8-10 cm de largo, profundamente pinnatipartida con las divisiones a su vez irregularmente serradas o lobadas; cabezuelas dispuestas en corimbos terminales, heterógamas; involucro pateliforme, tiene de 35 a 70 brácteas, las exteriores son lineares, las interiores más largas y oblongas de hasta de 4 mm de largo con el receptáculo convexo a hemisférico; tiene de 10 a 21 flores liguladas o más, sus corolas son blancas con láminas oblongas de 2.5 a 8 mm de largo; las flores del disco son aproximadamente 250, sus corolas son de color amarillo, tubulosas, de 1.5 a 2 mm de largo, sus anteras son de 0.8 mm de largo; los aquenios son columnares, de 1.2 a 1.5 mm de largo, provistos de 5 a 10 costillas longitudinales, glabros; vilano en forma de corona dentada diminuta (Rzedowski y de Rzedowski, 1997).

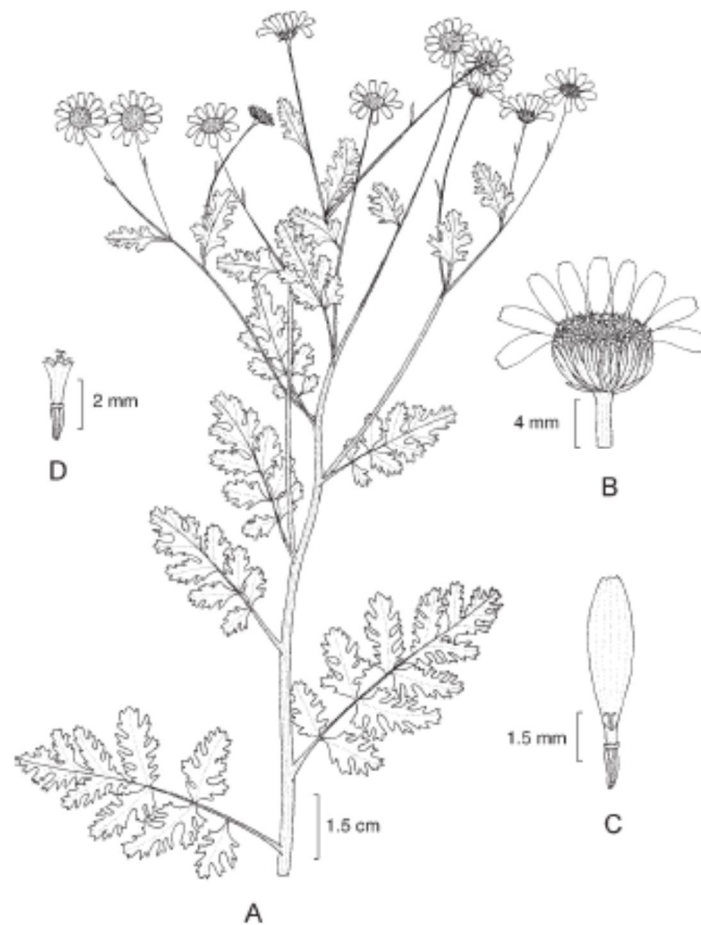


Figura 1. *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. A. rama con hojas y cabezuelas; B. cabezuela desprovista de una parte de las lígulas; C. flor ligulada; D. flor del disco (Rzedowski y de Rzedowski, 1997).

Es frecuentemente cultivada cerca de las casas como medicinal y ornamental. Crece a una altura de 1800-2550 msnm, florece durante todo el año. Su hábitat es en lugares perturbados, en bosques de pino y pino-encino de clima templado. Es nativa de Europa, Irán e Irak; en la actualidad es de amplia distribución mundial. En nuestro país se registra como espontánea de: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, México, D.F., Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Rzedowski y de Rzedowski, 1997; Vibrans, 2009).

Durante mucho tiempo fue conocida en la literatura como *Chrysanthemum parthenium*, sin embargo, en años recientes esta especie se ha considerado mejor ubicada en el género *Tanacetum* (Rzedowski y de Rzedowski, 1997).

Dentro de los usos tradicionales más comunes se emplea para aliviar trastornos de la menstruación, como emenagogo y antiespasmódico, durante el parto para acelerarlo y prevenir trastornos posteriores. La infusión también se emplea contra el cólico estomacal, dolor de estómago o intestinal, en casos de diarrea y disentería, como digestivo, antiemético y otros malestares estomacales y en lavados para la irritación de los ojos, además se utiliza para tratar dolores de cabeza y reumáticos, dolor de muelas, antiinflamatorio y para disminuir la fiebre (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Pareek *et al.*, 2011).

Durante décadas se ha utilizado la planta *Tanacetum parthenium* L. como tratamiento para prevenir los episodios de migraña. Las personas suelen comer de 2 a 3 hojas de la planta fresca diariamente para disminuir la frecuencia y severidad de los ataques (Kemper, 1999; Pareek *et al.*, 2011); al parecer, los extractos de esta planta tienen varios mecanismos de acción, dentro de los cuales se encuentran la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, disminución del espasmo del músculo liso vascular y bloqueando la secreción granular plaquetaria (Pareek *et al.*, 2011).

2.2 Estudios sobre la actividad de *Tanacetum parthenium*.

Existe una gran variedad de estudios que han demostrado su actividad antiinflamatoria. Se ha encontrado que tanto la planta completa como sus extractos inhiben la producción de prostaglandinas, principalmente del extracto obtenido con cloroformo, el cual es rico en lactonas sesquiterpénicas. Sin embargo, algunos estudios revelan que el mecanismo de acción involucrado no consiste en la inhibición de ciclooxigenasas o inhibición de la producción de ácido araquidónico, los cuales son dos de los principales blancos de acción de los

fármacos antiinflamatorios. En otros estudios se ha encontrado una reducción considerable de la actividad oxidativa asociada a neutrófilos (Pareek *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la tanetina, un flavonoide extraído de las hojas, flores y semillas de *T. parthenium*, inhibe la síntesis de prostaglandinas. Además, el extracto acuoso de la planta previenen la liberación de ácido araquidónico e inhibe la agregación plaquetaria estimulada por Difosfato de Adenosina (ADP) o trombina (Pareek *et al.*, 2011).

El extracto de cloroformo inhibe la liberación de histamina de los mastocitos peritoneales de rata. El mecanismo de acción aún no ha sido identificado, sin embargo, se cree que es mediante la entrada de calcio a la célula (Haynes y Foreman, 1987).

En un estudio *in vitro* se observó que la droga cruda de *Tanacetum parthenium* L. es capaz de disminuir significativamente la cantidad de serotonina liberada por las plaquetas de bovino, correlacionando su acción con la cantidad de lactonas sesquiterpénicas, partenólida y otras germacrólidas (Marleset *al.*, 1992). La partenólida incrementa la producción de plaquetas por los megacariocitos humanos a través de la inhibición del Factor Nuclear κ B (NF- κ B), esto es independiente del estrés oxidativo que se genera en respuesta al compuesto. Adicionalmente, el tratamiento con partenólida disminuye la activación de plaquetas provenientes de sangre periférica de seres humanos (Sahler *et al.*, 2011).

Esta planta inhibe algunas funciones de leucocitos y células del músculo liso vascular, aparentemente, algunos de estos efectos, son mediados por la partenólida, una de las principales lactonas sesquiterpénicas encontradas en la planta, y a la cual se le han atribuido la mayoría de sus efectos. Sin embargo, las preparaciones comerciales de *Tanacetum parthenium* tienen una gran variabilidad en el contenido de partenólida. No es concluyente de que este compuesto sea el único responsable de la actividad de esta planta, por lo que se cree que existen

otros compuestos responsables de los efectos terapéuticos de la planta (Heptinstall y Awang, 1998).

Las lactonas sesquiterpénicas son los principios activos de una gran variedad de plantas medicinales de la familia de las *Asteraceae*; poseen diversas actividades biológicas, como la inhibición de la liberación de serotonina o del factor NF- κ B, un regulador central involucrado en la transcripción de varios genes involucrados en la respuesta inmunológica y la inflamación (Humar *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008), lo cual podría dar fundamento a la actividad antiinflamatoria atribuida a la planta *Tanacetum parthenium*.

Existe evidencia en otros estudios que hacen referencia a las diversas actividades de la partenólida como anticancerígeno y para combatir la proliferación de bacterias, levaduras, hongos y algunos protozoarios. La partenólida induce alteraciones en la red de microtúbulos y la morfología nuclear al exponerse conjuntamente con paclitaxel sobre líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Miglietta *et al.*, 2004). Anderson y Bejcek demostraron que el tratamiento con partenólida de células de glioblastoma produce su apoptosis a través de las caspasas 3/7 sin suprimir la actividad del NF- κ B (Anderson y Bejcek, 2008). Se ha encontrado que inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y del género *Micobacterium*, además de que tanto el extracto hidroalcohólico, como la fracción de diclorometano de la planta disminuye la proliferación de *Leishmania amazonensis* (Pareek *et al.*, 2011).

Las investigaciones han demostrado que la partenólida inhibe de manera no competitiva los espasmos inducidos por serotonina en preparaciones de fondo gástrico aislado de rata. La partenólida, además, inhibe las contracciones del tejido del fondo del estómago inducidas por fenfluramina y dextroanfetamina, por lo que se cree que el mecanismo de acción no está involucrado con la inhibición directa de los receptores serotoninérgicos 5-HT₂, sino con el almacenamiento de serotonina en las neuronas intramurales del fondo gástrico (Béjar, 1996). Sin embargo, Weber y colaboradores (1997), encontraron que este mismo compuesto

desplaza de manera concentración-dependiente a la ketanserina (antagonista competitivo de receptores 5-HT₂) de las preparaciones de membranas de corteza cerebral de ratas y conejos. La investigación sugiere que la partenólida tiene función como un antagonista de baja afinidad a los receptores 5-HT₂.

Algunos estudios demuestran la actividad relajante de otras lactonas sesquiterpénicas, sobre el músculo liso de útero y aorta de rata, lo cual sugiere que la partenólida no sería el único compuesto al cual se le atribuirían las actividades biológicas de la planta, y probablemente compartan mecanismos de acción debido a las similitudes estructurales (Campos *et al.*, 2003).

Además, se ha observado que el extracto de cloroformo de las hojas de la planta inhibe la contracción y relajación de la aorta de conejo con fenilefrina, serotonina, angiotensina II y U46619 (un mimético de tromboxano). Esta inhibición fue concentración y tiempo dependiente, no competitiva e irreversible, además de ocurrir en presencia y ausencia de endotelio. Se comparó la inhibición de los extractos de hojas frescas y secas, obteniendo una mayor inhibición con el extracto realizado a partir de hojas frescas, lo cual se atribuyó a un mayor contenido de partenólida dentro de dicho extracto. Los experimentos realizados sugieren que los extractos clorofórmicos de las hojas de *Tanacetum parthenium* inhiben los espasmos del músculo liso a través del bloqueo de la apertura de los canales de potasio (Barsby *et al.*, 1992).

El extracto de diclorometano inhibe las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en aorta de rata, presentándose como un antagonismo no competitivo. Sin embargo, el aceite esencial de la planta no es capaz de inhibir las contracciones causadas por fenilefrina, en cambio sí lo hace con aquellas inducidas por serotonina de manera no competitiva (García-dela Cruz, 2007). Así mismo, el extracto de diclorometano obtenido de *T. parthenium* presenta una propiedad relajante de la musculatura lisa de aorta de rata (Medina, 2002).

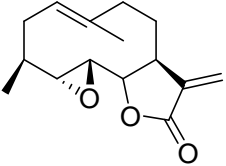
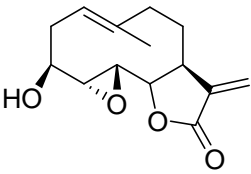
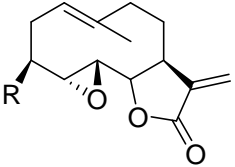
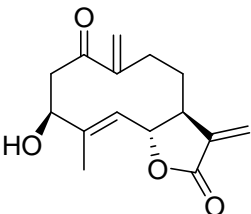
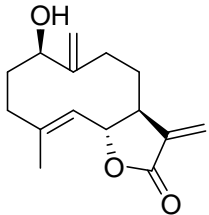
2.3 Fitoquímica.

Dentro de los metabolitos más importantes aislados de *T. parthenium* se encuentra la partenólida, de la cual se han realizado varios estudios sobre su actividad biológica, además de ser el compuesto marcador para determinar el control de calidad de las preparaciones farmacéuticas de esta planta (Bohlamn y Zdero, 1982).

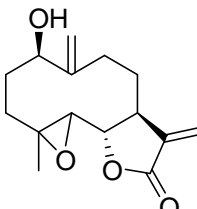
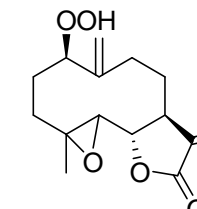
En 1965 Romo de Vivar y Jiménez, reportaron que las plantas que crecen en el valle de México carecen de partenólida. Sin embargo, en un estudio del 2006, se compara el contenido de este compuesto entre las plantas de origen estadounidense con ejemplares de los estados de Oaxaca y Puebla, donde se encontró la presencia del metabolito en un 0.28% y 0.25% respectivamente (Avula *et al.*, 2006), además de contener santina, reynosina y santamarina (Romo de Vivar & Jiménez *et al.*, 1965; Romo *et al.*, 1970; Rodríguez *et al.*, 1974; Williams *et al.*, 1995; Long *et al.*, 2003).

Existe evidencia para proponer que la partenólida no es el único compuesto activo de la planta, ya que se ha comprobado que no existe una relación directamente proporcional entre los efectos biológicos y el contenido de partenólida (Béjar, 1996). Desde el punto de vista fitoquímico, *T. parthenium* posee una gran diversidad de compuestos dentro de los cuales destacan flavonoides, terpenoides, lactonas sesquiterpénicas, entre otros. Algunos de los compuestos se ilustran en los Cuadros 1 al 6.

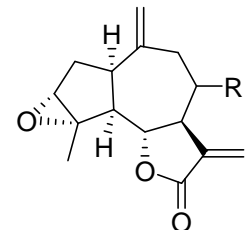
Cuadro 1. Lactonas sesquiterpénicas del tipo germacranólida presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Partenólida</p>	Partes aéreas Flores, hojas, tallos y raíces Hojas, flores y semillas Partes aéreas	Alemania Reino Unido EUA EUA	Bohlman y Zdero, 1982. Heptinstall <i>et al.</i> , 1992. Heptinstall <i>et al.</i> , 1992. Avula <i>et al.</i> , 2006.
 <p>3β-hidroxi partenólida</p>	Partes aéreas Partes aéreas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Groenewegen <i>et al.</i> , 1986
 <p>R=H Costunólida R=OH 3β-hidroxicostunólida</p>	Partes aéreas y semillas Hojas y semillas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.
 <p>3β-hidroxi anhidroverlitorina</p>	Semillas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.
 <p>Artemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.

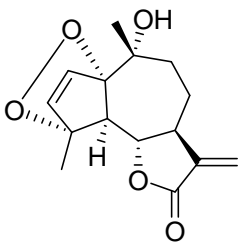
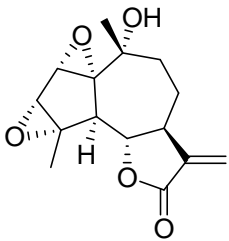
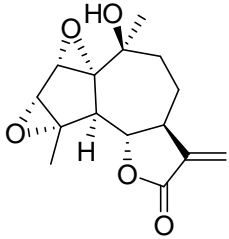
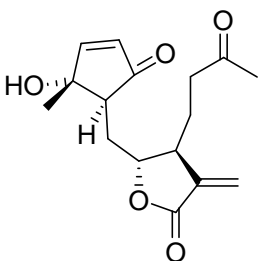
Cuadro 1. Lactonas sesquiterpénicas del tipo germacranólida presentes en *Tanacetum parthenium* (continuación).

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Epoxiartemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>Peroxido de epoxiartemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.

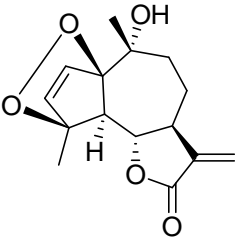
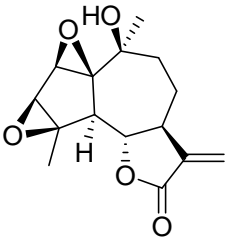
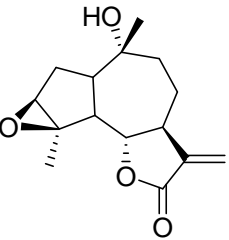
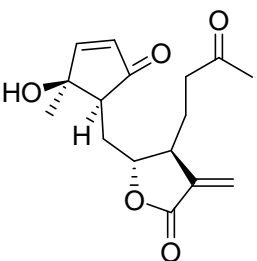
Cuadro 2. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanólida presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>R=OH 8α-hidroxiestafiatina R=OBui 8α-isobutiloestafiatina R=OAng 8α-angeloiloxiestafiatina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.

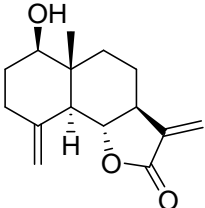
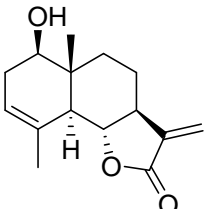
Cuadro 2. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanólida presentes en *Tanacetum parthenium* (continuación).

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Tanapartina-α-peróxido</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Begley <i>et al.</i> , 1989.
 <p>Canina</p>	Partes aéreas Hojas Partes aéreas	Alemania Reino Unido México	Bohlman y Zdero, 1982. Groenewegen <i>et al.</i> , 1986 Begley <i>et al.</i> , 1989. Romo <i>et al.</i> , 1970. Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.
 <p>10-epi-canina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>Secotanapartólida A</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Groenewegen <i>et al.</i> , 1986 Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.

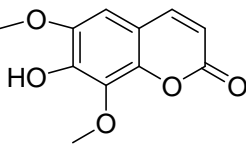
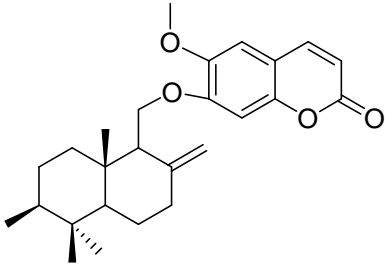
Cuadro 2. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanólida presentes en *Tanacetum parthenium* (continuación).

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Tanapartina-β-peróxido</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.
 <p>Artecanina</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Groenewegen <i>et al.</i> , 1986 Begley <i>et al.</i> , 1989.
 <p>3,5-epoxi- 8desoxicumambrina B</p>	Raíces	Sudamérica	Milbrodt <i>et al.</i> , 1997.
 <p>Secotanapartólida B</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Begley <i>et al.</i> , 1989

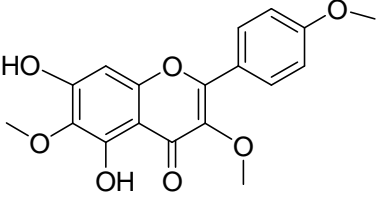
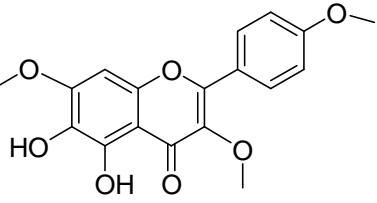
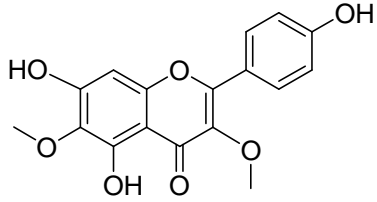
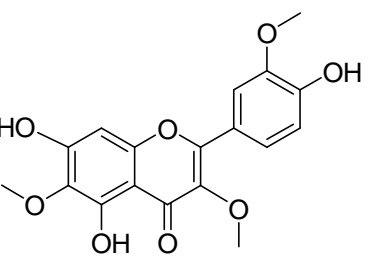
Cuadro 3. Lactonas sesquiterpénicas del tipo eudesmano presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Reynosina</p>	Partes aéreas Partes aéreas	México Alemania	Romo <i>et al.</i> , 1970. Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>Santamarina</p>	Planta seca	México	Romo de Vivar y Jiménez, 1965. Romo <i>et al.</i> , 1970.

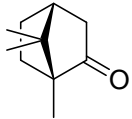
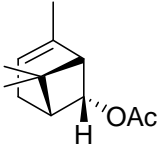
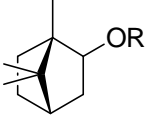
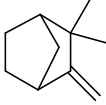
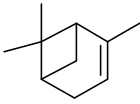
Cuadro 4. Cumarinas presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Isofraxidina</p>	Raíces	Polonia	Kisiel y Stojakowska, 1997.
 <p>9-epipectacol B</p>	Raíces	Polonia	Kisiel y Stojakowska, 1997.

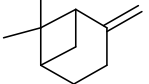
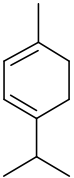
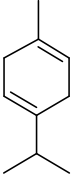
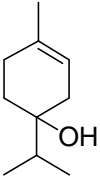
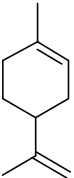
Cuadro 5. Flavonoides presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Santina</p>	Partes aéreas Partes aéreas	México Francia	Rodríguez <i>et al.</i> , 1974. Long <i>et al.</i> , 2003.
 <p>Tanetina</p>	Hojas, flores y semillas	Alemania	Williams <i>et al.</i> , 1995.
 <p>3,6,4'-trimetil éter del 6-hidroxicamferol</p>	Hojas, flores y semillas	Alemania	Williams <i>et al.</i> , 1995.
 <p>Jaceidina</p>	Partes aéreas	Francia	Long <i>et al.</i> , 2003.

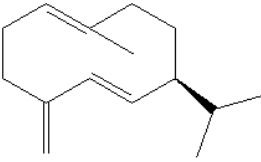
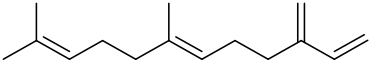
Cuadro 6. Terpenoides presentes en *Tanacetum parthenium*.

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Alcanfor</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi, <i>et al.</i> , 2010.
 <p>Acetato de crisantenilo</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>R=H Crisantenol R=Ac Crisantenol acetato R=AngCrisantenolangelato R=Val Crisantenolisovalerato</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996.
 <p>Camfeno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>α-pineno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.

Cuadro 6. Terpenoides presentes en *Tanacetum parthenium* (continuación).

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>β-pineno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>α-terpineno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>γ-terpineno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>4-terpineol</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.
 <p>Limoneno</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005. Izadi <i>et al.</i> , 2010.

Cuadro 6. Terpenoides presentes en *Tanacetum parthenium* (continuación).

Estructura	Parte de la planta estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Germacreno D</p>	Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Turquía	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>β-farneseno</p>	Raíces Partes aéreas	Alemania Reino Unido y Holanda México Irán	Bohlman y Zdero, 1982. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Medina, 2002. Izadi <i>et al.</i> , 2010.

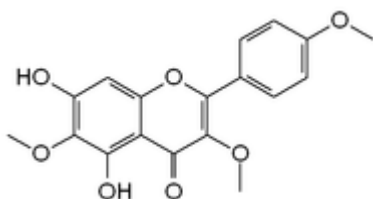
2.4 Santina.

Formula molecular: $C_{18}H_{16}O_7$

Peso Molecular: 344.31 g/mol

Nombre sistemático: 5,7-dihidroxi-3,6,4'-trimetoxi-flavona

Estructura:



La santina es una molécula del tipo flavonoide presente en varias plantas de la familia *Asteraceae*. Los flavonoides ejercen un amplio rango de actividades biológicas, dentro de las que destacan: protección vascular y hepática, actividad antiulcerosa, antiespasmódica, antisecretora, propiedades antidiarreicas, actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria, así como su conocida actividad antioxidante (Guerra *et al.*, 2006).

Se ha reportado que ciertos flavonoles exhiben propiedades contra diferentes tipos de radicales libres, además de inhibir la expresión de la Sintasa de Óxido Nítrico inducible (iNOS) y la Prostaglandina E2 (PGE2) sin citotoxicidad aparente. Parte de su mecanismo de acción es la inhibición del NF- κ B. Los resultados de investigaciones previas indican que a pesar de las similitudes estructurales de los flavonoides, poseen diferentes efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Wang *et al.*, 2006).

Williams y colaboradores, reportaron que el principal flavonoide aislado de *Tanacetum parthenium* es la santina, la cual inhibe dos de las principales enzimas que catalizan el metabolismo del ácido araquidónico (la Ciclooxygenasa y la 5-lipoxigenasa), en leucocitos peritoneales de rata. Se comparó la actividad inhibitoria de la santina y otros siete flavonoides aislados de *T. parthenium* y *T. vulgare*. La actividad de ambas enzimas se determinó indirectamente, midiendo

por radio-inmunoensayo la cantidad de tromboxano B₂ y leucotrieno B₄ formados. Los resultados de la investigación revelan que la santina tiene una capacidad inhibitoria mayor sobre ambas enzimas en comparación con los otros compuestos aislados (Williams *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1999).

En el 2006, se demostró nuevamente la capacidad inhibitoria de la santina sobre la Ciclooxygenasa-2 (COX2) y de la enzima iNOS, ambos efectos sustentan la actividad antiinflamatoria e inmuno-reguladora del compuesto (Guerra *et al.*, 2006).

En otro estudio se encontró que los flavonoides aislados de *T. parthenium* tienen la capacidad de inhibir la polimerización de tubulina, presentando una actividad antimitótica. También se encontró que las sustituciones en el anillo B, son fundamentales para que los compuestos presentaran dicha actividad. Los flavonoides aislados fueron la centaureidina, jaceidina y santina (Figura 2); los dos últimos presentaron una actividad 200 veces menor que la centaureidina (Long *et al.*, 2003); por lo que, resulta evidente que no todos los flavonoides poseen la misma actividad ni la misma potencia.

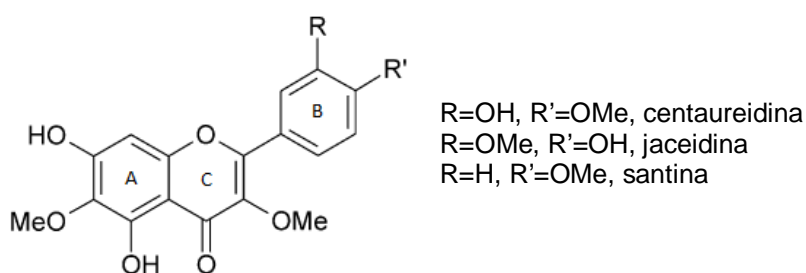


Figura 2. Estructura de la centaureidina, jaceidina y santina aisladas de *T. parthenium*.

La santina presenta, además, la capacidad de inhibir la enzima xantina oxidasa, la cual cataliza la reacción de oxidación de las xantinas, dando como productos principales ácido úrico y aniones superóxidos. La inhibición de la xantina oxidasa es un blanco terapéutico para el tratamiento de la hiperuricemia o mejor conocida como gota (Li *et al.*, 1999).

También se conoce que la santina inhibe el edema de oreja de ratón, utilizando el modelo de forbolmiristato acetato. Este modelo induce una respuesta inflamatoria en las orejas de ratón por activación de la Proteínkinasa C (PKC), lo cual sugiere una posible participación del compuesto en la inhibición de esta vía, sin embargo aún no se ha demostrado (Martínez *et al.*, 1997).

Además de su actividad antiinflamatoria y antioxidante, la santina inhibe el crecimiento *in vitro* de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosomacruzi*, y promastigotes de *Leishmania mexicana*. El compuesto presenta una mayor actividad tripanocida que leishmanicida (Sülzen *et al.*, 2007). Sin embargo, existen pocos estudios que revelen un efecto antiprotozoario de la santina.

Existe evidencia científica que demuestra la actividad relajante de los flavonoides sobre el músculo liso en tráquea de cobayo y aorta de rata (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011). Algunos de los estudios realizados indican que el mecanismo probable de acción está involucrado con la interacción directa entre estas moléculas y las fosfodiesterasas (Ko *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004) y la inhibición del influjo de calcio (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011).

2.5 Reynosina.

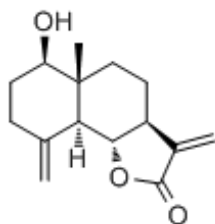
Formula molecular: C₁₅H₂₀O₃

Peso Molecular: 248.31 g/mol

Nombre sistemático:

6-hidroxi-5a-metil-3,9-bis(metilen)decahidronafto[1,2-b]furan-2(3H)-ona

Estructura:



La reynosina es una lactona sesquiterpénica del tipo eudesmanólida, aislada de varias plantas de la familia *Asteraceae*. Algunos experimentos han demostrado que las lactonas de tipo eudesmanólida y germacranólida son potentes inhibidores del NF- κ B no antioxidantes, mostrando una actividad antiinflamatoria (Bork *et al.*, 1997). Este factor transcripcional también juega un papel importante en la homeostasis celular, apoptosis y crecimiento tumoral (Rosselli *et al.*, 2012).

Existen varios trabajos donde se reporta la actividad citotóxica de esta molécula sobre el crecimiento de varios tipos de líneas celulares, con diferente especificidad y potencia, dependiendo del tipo de células tumorales en las cuales ha sido probada. En 1996 se aisló reynosina y otras lactonas de *Tanacetum praeteritum*, las cuales presentaron actividad inhibitoria del crecimiento celular de líneas tumorales de pulmón y colon. Estos mismos compuestos fueron probados contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Streptococcus beta-hemolítico*, y la levadura *Candida albicans*, sin embargo, no presentaron ningún efecto sobre su crecimiento (Gören *et al.*, 1996).

La reynosina inhibe el crecimiento de células de carcinoma orofaríngeo (células KB carcinoma), con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 4.3 μ g/mL (Hilmi *et*

al.,2003). Así mismo, se encontró que posee efectos inhibitorios sobre líneas celulares tumorales de hígado, cérvix, ovario y melanoma, mostrando una CI50 de 11, 7.5, 7.5 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Sun *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2008).

En un estudio de *T. vulgare*, se aislaron cinco lactonas con esqueleto de tipo eudesmanólida, las cuales presentaron actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de pulmón y células sanas, por lo que los autores concluyen que no serían compuestos viables para tratamientos contra células tumorales (Rosselli *et al.*, 2012).

Recientemente se ha propuesto un posible efecto hepatotóxico (Zhao *et al.*, 2012), en contraste, se ha demostrado una actividad hepatoprotectora de la reynosina inhibiendo la apoptosis inducida con tioacetamida (Lim *et al.*, 2013).

Al parecer la actividad antiinflamatoria de la reynosina involucra varios mecanismos de acción, uno de ellos es la inhibición del factor transcripcional NF- κB , y otro es la disminución en la liberación de citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y la CINC-1 (Citocina Inducida Químico-atrayente de Neutrófilos-1) (Cho *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1998). Aún no se sabe si la inhibición de estas citocinas es por interacción directa o sea a través de algún punto en su síntesis o en la transcripción del gen por inhibición del NF- κB .

Por otra parte, algunos estudios sugieren que las lactonas sesquiterpénicas (en general) poseen un efecto vasoactivo relacionado con la inhibición de la liberación de serotonina. Wagner y colaboradores (2008) realizaron un meta-análisis de los compuestos aislados de *Tanacetum parthenium*, para predecir a través de sus estructuras la actividad inhibitoria del NF- κB y de la liberación de serotonina. Aún no se sabe si estas dos acciones se encuentran relacionadas de alguna forma. Dentro de estos compuestos evaluados se encuentra la reynosina, la cual, según los resultados del meta-análisis, posee una actividad baja, sin embargo los resultados sólo son aproximaciones que pueden variar respecto a los resultados obtenidos *in vitro* o *in vivo*.

Respecto a la actividad de las lactonas sesquiterpénicas sobre del tejido vascular existe poca evidencia. En 1994 se reportó que la partenólida (lactona tipo germacranólida) y cinaropicrina (lactona tipo guayanólida) tienen un efecto relajante en anillos de aorta de conejo, posterior a la contracción con fenilefrina. Dicha actividad se presentó de manera irreversible, y se atribuyó a que ambos compuestos presentan un grupo metileno en la posición alfa de la γ -lactona (Figura 3). Además, el compuesto solstitialin 13-acetato que no posee este metileno, no presentó dicha actividad (Hay *et al.*, 1994). Cabe destacar que la reynosina también posee un metileno en la posición alfa de la γ -lactona, sin embargo no hay estudios sobre su actividad sobre el tejido de músculo liso vascular.

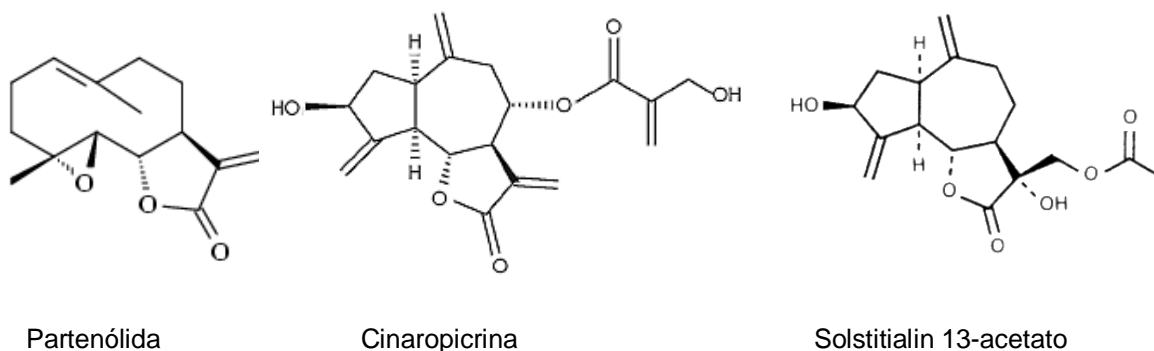


Figura 3. Estructuras de la partenólida, cinaropicrina y solstitialin 13-acetato.

2.6 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular.

La vasoconstricción está regulada principalmente por la activación de receptores, la despolarización de la membrana también puede desencadenar contracción, la cual ocurre una vez que la Cinasa de la Cadena Ligera de Miosina (MLCK) fosforila la Cadena Ligera de Miosina (MLC), permitiendo el entrecruzamiento de la miosina y los filamentos de actina (Lee *et al.*, 2004).

La contracción del músculo liso vascular (Figura 4) es iniciada por la activación de un receptor al unirse su agonista (norepinefrina, serotonina, angiotensina II etc.) o por algún mecanismo alternativo relacionado con el incremento de las concentraciones de calcio intracelular. Diferentes vías de señalización pueden favorecer la interacción Ca^{2+} -Calmodulina para estimular la fosforilación de la MLC. La sensibilización por Ca^{2+} de las proteínas contráctiles es señalizada por la vía RhoA/RhoCinasa (RhoK). Esta vía inhibe la desfosforilación de la MLC por la Fosfatasa de Miosina. En respuesta a la contracción el Óxido Nítrico (NO) es liberado desde las células endoteliales y causa vasodilatación a través de la inhibición de esta vía de señalización (Lee *et al.*, 2004).

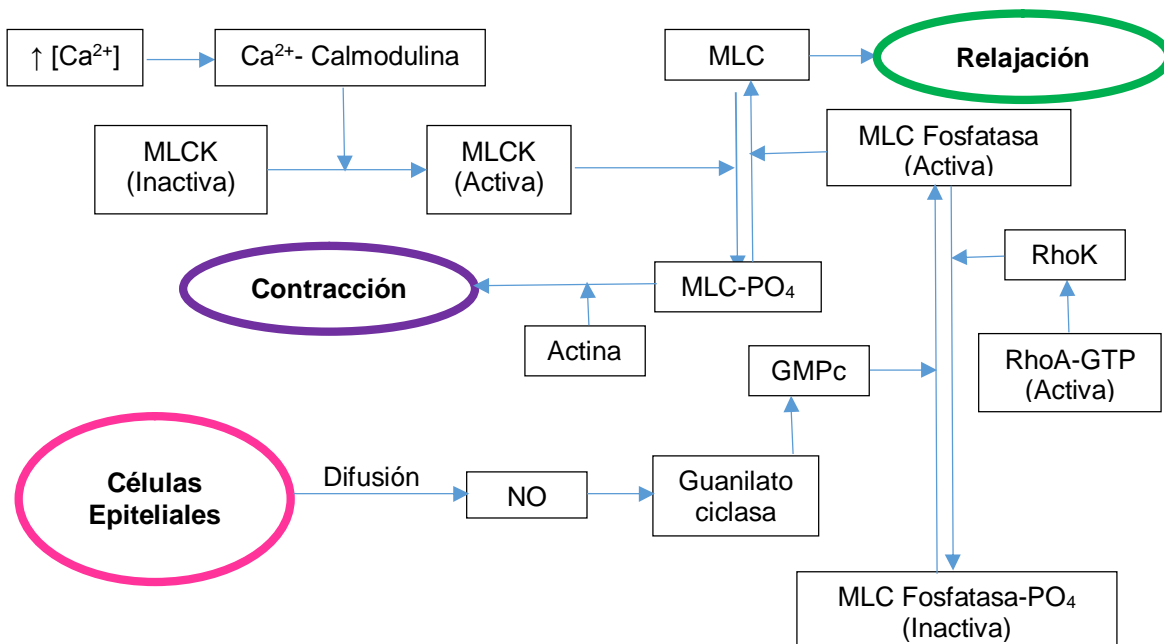


Figura 4. Mecanismo general de contracción y relajación del músculo liso vascular.

La concentración de Ca^{2+} dentro del citosol puede aumentar por dos vías principales (Figura 5), la primera liberando los depósitos de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y la segunda, a través de la entrada de este ión extracelular a través de la abertura de canales (Lee *et al.*, 2004).

Los agonistas de receptores acoplados a proteínas G estimulan la actividad de la Fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la formación de segundos mensajeros como el Inositoltrifosfato (IP_3) y el Diacilglicerol (DG) (Lee *et al.*, 2004).

La unión del IP_3 al retículo sarcoplásmico induce la liberación del Ca^{2+} almacenado. El DG junto con el Ca^{2+} activan la PKC, la cual promueve la fosforilación y apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L y de otras proteínas que favorecen la unión de los filamentos de actina para la contracción (Lee *et al.*, 2004).

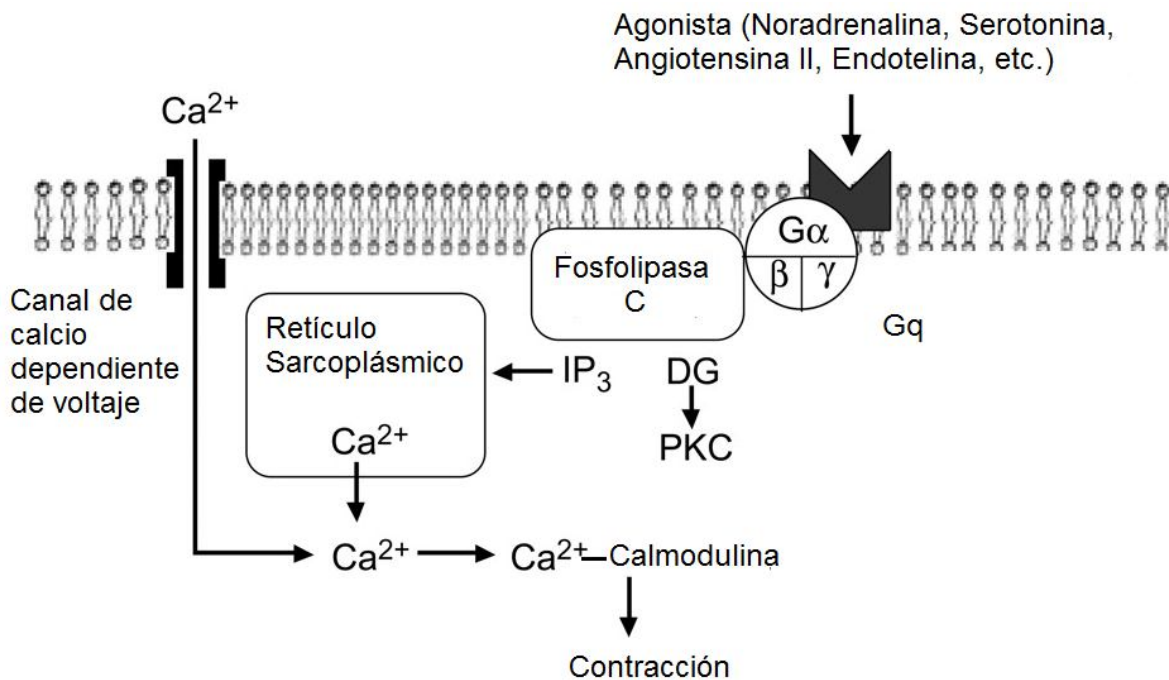


Figura 5. Incremento de la concentración de calcio intracelular por diferentes vías.

Como se ha mencionado, la activación de la MLCK es dependiente de Ca^{2+} . La MLC fosfatasa, desfosforila a la MLC favoreciendo la relajación del tejido (Figura 4). Cuando la MLC fosfatasa se encuentra fosforilada en la subunidad de unión a miosina, la enzima se encuentra inactiva, lo que permite una contracción sostenida. La Rho Cinasa (RhoK) es una serina/ treoninacinasas, encargada de fosforilar la MLC fosfatasa; los inhibidores de la RhoK, como el Fasudil y el Y-27632, bloquean su actividad permitiendo la relajación del músculo liso vascular (Lee *et al.*, 2004).

Así mismo, se ha postulado la participación del NO en la inhibición de la vía RhoA/RhoK dentro del mecanismo de relajación del músculo liso de aorta de rata (Chitaley & Webb, 2002; Ming *et al.*, 2002; Krepinsky *et al.*, 2003).

En un estudio, realizado por Carter y colaboradores, con segmentos de aorta de rata aislados, demuestran que las contracciones inducidas por estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 requieren la activación de la RhoK (Carter *et al.*, 2002).

2.7 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular mediado por receptores adrenérgicos.

La activación de los receptores adrenérgicos α y β desencadenan una serie de efectos sobre el sistema cardiovascular, incluyendo las respuestas cronotrópicas e inotrópicas sobre el miocardio y la vasoconstricción.

La vasodilatación se encuentra mediada por los receptores beta y la contracción por los receptores adrenérgicos alfa. Por lo menos tres subtipos de receptores beta (β_1 , β_2 , β_3) median las respuestas de relajación (Figura 6), al estar acoplados a proteínas Gs, lo cual activa la vía de señalización de Proteínacinasas dependiente de AMPc (PKA) (Delbin *et al.*, 2012).

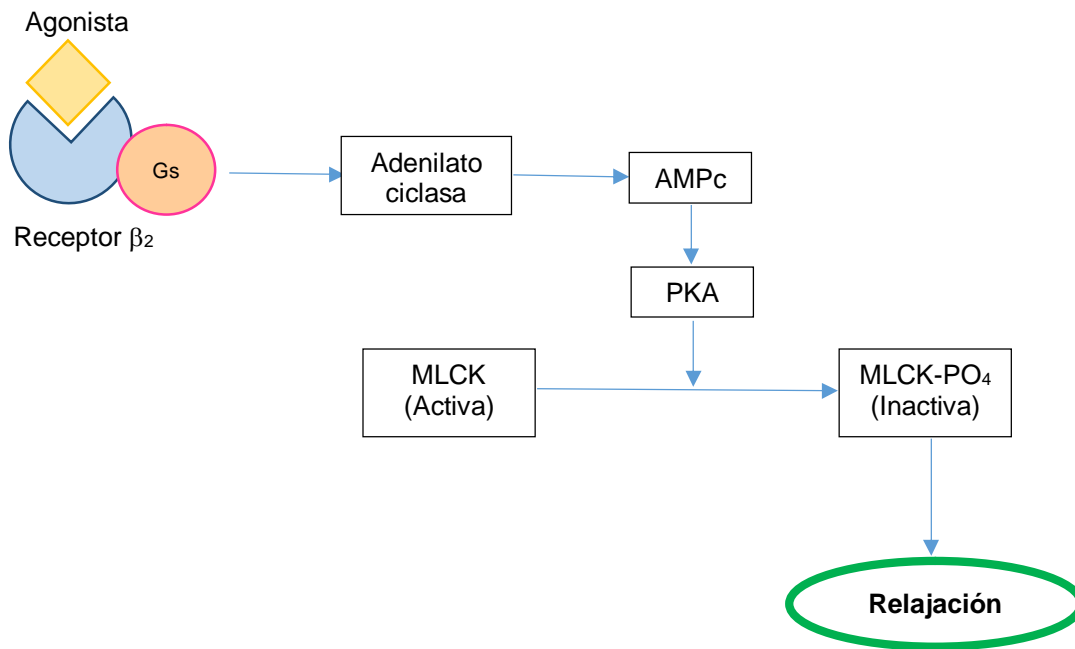


Figura 6. Mecanismo de relajación del músculo liso vascular por receptores β_2 adrenérgicos.

Se han identificado tres subtipos de receptores α_1 (α_{1a} , α_{1b} y α_{1d}) y tres α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}) (Cotecchia, 2010). Existe controversia en la identificación de los diferentes subtipos de receptores α -adrenérgicos en aorta de rata, en la cual sólo se han reconocido los α_{1A} y α_{1B} (Hussain & Marshall, 1997).

La activación de cualquier receptor α_1 , causa la hidrólisis de polifosfoinositidos (PI), catalizada por la PLC, debido a la activación de las proteínas Gq/11 a las cuales se encuentra acoplado el receptor (Figura7). Varios estudios muestran evidencia de que la estimulación de estos receptores adrenérgicos activan la vía PLC/MAPK (Proteíncinasa Activada por Mitógeno), así como la vía de señalización RhoK, las cuales se encuentran involucradas en el mecanismo de contracción del tejido vascular (Cotecchia, 2010).

Se sabe además, que las contracciones de la aorta torácica de rata, mediada por receptores α_1 , involucran la activación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico a través de la vía IP3K (Fosfatidilinositol 3-cinasa) y Erk1/2 (Cinasa Regulada por Señalización Extracelular 1/2) (Nagareddy *et al.*, 2009; Ulu *et al.*, 2010).

Aunque el mecanismo de contracción en el músculo liso vascular es compartido para los agonistas de receptores acoplados a proteínas G, existen algunas variantes dentro de las vías de señalización que desencadenan este efecto.

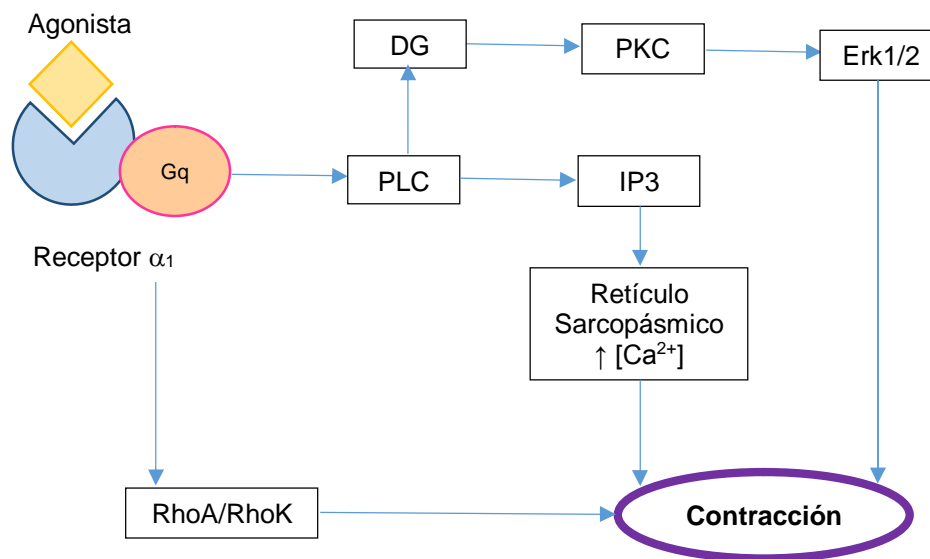


Figura 7. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por receptores adrenérgicos α_1 .

2.8 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular mediado por receptores de serotonina.

La serotonina (o 5-hidroxitriptamina, 5-HT) desempeña funciones biológicas diversas en el sistema cardiovascular, incluyendo agregación plaquetaria, bradicardia o taquicardia, hipertensión o hipotensión, así como vasoconstricción. La respuesta que desencadena la serotonina está relacionada con el subtipo y

número de receptores encontrados en el tejido blanco, así como por la vía de señalización involucrada.

Se han caracterizados al menos 15 subtipos de receptores 5-HT, que a su vez se incluyen en siete familias 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇; el receptor 5-HT₃ es un canal iónico y las demás familias son receptores acoplados a proteínas G. Los receptores de las familias 5-HT₁ y 5-HT₂ realizan un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular. Los receptores de tipo 5-HT₁ se encuentran acoplados principalmente a proteínas Gi/o, que impide la formación de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC), mientras que la familia 5-HT₂ se encuentra acoplada preferentemente a proteínas Gq/11, desencadenando las vías de señalización IP3/PKC, aumentando así la concentración de Ca²⁺ intracelular y favoreciendo la contracción del músculo liso (Delbin *et al.*, 2012).

Los receptores de serotonina juegan un papel importante en las funciones cerebrales y cardiovasculares. En los vasos sanguíneos la serotonina ejerce un potente efecto contráctil, el cual es mediado en aorta principalmente por el subtipo de receptores 5-HT_{2A} (Lu *et al.*, 2008).

En el caso de la aorta de rata, se ha encontrado la presencia del mRNA (Ácido Ribonucléico mensajero) de los subtipos de receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{1B} y 5-HT₇ (Lu *et al.*, 2008).

Estos receptores intervienen en diferentes respuestas del tejido aislado. Como se ha mencionado con anterioridad, el receptor 5-HT_{2A} es el encargado de producir vasoconstricción; algunos estudios sugieren que el subtipo 5-HT_{2B} está relacionado con la relajación de la vena yugular y la arteria pulmonar, sin embargo, también se ha propuesto que interviene en la contracción de la arteria mesentérica de ratas hipertensas; por otro lado, el subtipo 5-HT_{1B} regula la vasoconstricción cuando se encuentra en músculo liso y relajación cuando se encuentra en endotelio; el receptor 5-HT₇ está localizado en músculo liso e induce relajación del tejido vascular (Villazón *et al.*, 2002).

Las vías de señalización clásicas, en las cuales se encuentran involucrados los receptores 5-HT_{2A} (Figura 8), para inducir contracción del tejido vascular son por activación de las Src cinasas (Banes *et al.*, 1999), RhoK (Kandabashi *et al.*, 2002) y otras cinasas reguladas por señalización extracelular como la vía Erk/MAPK (Watts *et al.*, 2001; Ishinata *et al.*, 2002).

La 5-HT_{2A} induce la activación de Src y ésta a su vez activa la cascada de señalización Erk/MAPK para producir contracción del músculo liso vascular (Banes *et al.*, 1999). De acuerdo con los estudios realizados, estas vías de señalización se encuentran estrechamente relacionadas para desencadenar el efecto contráctil de la serotonina en vasos sanguíneos.

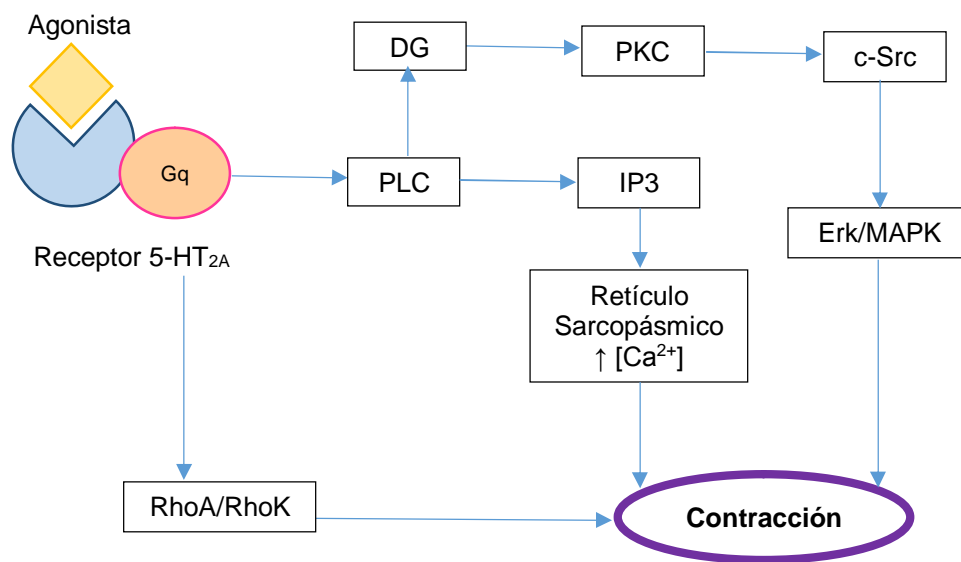


Figura 8. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por receptores adrenérgicos 5-HT_{2A}.

Lu y colaboradores han propuesto la participación de c-Src en el mecanismo de vasoconstricción mediado por 5-HT en aorta de rata. La c-Src es un miembro de la familia de tirosina cinasas Src que se encuentra en grandes cantidades en el músculo liso vascular, donde está implicada en la vía de señalización de contracción desencadenada por receptores de serotonina, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G (Lu *et al.*, 2008).

Además, se ha encontrado que la c-Src participa en las contracciones inducidas por Angiotensina II (Ang II) y los agonistas adrenérgicos α_1 , como la fenilefrina (Lu *et al.*, 2008). La c-Src se activa preferentemente por la 5-HT, seguida por la Ang II, el Tromboxano A2 y en las contracciones inducidas con fenilefrina se observa una activación casi nula de esta proteína cinasa (Lu *et al.*, 2008).

Utilizando un inhibidor de la cinasa c-Src como el 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (PP2), Lu y colaboradores encontraron un abatimiento casi total de las contracciones inducidas por serotonina y α -metil-5-HT, lo cual hace suponer una participación directa del subtipo de receptores 5-HT_{2A} en aorta (Lu *et al.*, 2008).

La activación de la c-Src se lleva a cabo antes que la RhoK en la cascada de señalización asociada a la contracción inducida por 5-HT (Lu *et al.*, 2008). Se ha encontrado que la contracción inducida por 5-HT en vasos mesentéricos de ratas hipertensas sin endotelio, es disminuída debido a la adición de Y-27632, un inhibidor de la RhoK (Weber y Webb, 2001).

Así mismo, la c-Src se encuentra involucrada en la fosforilación de los residuos de tirosina del canal Ca^{2+} K^{+} dependiente de voltaje (MaxiK), promoviendo la inhibición del canal y la contracción (Alioua *et al.*, 2002).

Es importante destacar que la vía por la cual participa la c-Src representa aproximadamente el 50% de la vasoconstricción, inducida por agonistas de receptores acoplados a proteínas G, en coronarias de seres humanos y en aorta de rata, donde el MaxiK contribuye con un 70-80% en esta respuesta (Alioua *et al.*, 2002), por lo que se puede deducir que casi el 100% de la contracción inducida por 5-HT es debida a la vía de señalización en la cual se encuentra involucrada la proteína cinasa c-Src (Alioua *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2008).

Se ha encontrado también una asociación funcional entre la c-Src con la Fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1), la cual ha sido demostrada en células hipotalámicas GT1-7, tras la estimulación con 5-HT (Kim *et al.*, 2006). Además, se sabe que la

estimulación de los receptores 5-HT₂ incrementa los niveles de IP favoreciendo la contracción en aorta de rata, por lo que se sugiere una interacción de estos receptores con la PLC, así como con la PKC (Roth *et al.*, 1986).

2.9 Interacción entre receptores adrenérgicos y serotoninérgicos.

Se ha observado sinergismo entre la serotonina y los agonistas alfa adrenérgicos en la respuesta contráctil de aorta, arteria femoral y arteria de oreja de conejo. Dentro de los tejidos enlistados, la arteria de oreja de conejo exhibe una farmacología atípica. Se sabe que la serotonina actúa sobre los receptores 5-HT₂, sin embargo, las contracciones inducidas por este neurotransmisor sobre la arteria de oreja, están mediadas principalmente por receptores α_1 (Movahedi *et al.*, 1995).

Estudios realizados por de la Lande (1992), demuestran que al probar un rango de concentraciones de serotonina, ésta amplifica la respuesta contráctil de agonistas adrenérgicos α de 4 a 10 veces; por otro lado, Murray y Purdy (1985), al revertir el orden de adición y colocar un rango de concentraciones del agonista α_1 se obtiene un incremento de hasta 1000 veces en la vasoconstricción mediada por serotonina.

Las interacciones cruzadas por agonistas y antagonistas de ambos tipos de receptores son conocidas desde hace décadas. En un estudio, realizado por Kalsner (1973), se probó la actividad antagonista del N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) sobre los receptores 5-HT y α -adrenérgicos en tiras de aorta de conejo, encontrando una inhibición en la respuesta de ambos tipos de receptores.

Debido a lo anterior, los compuestos evaluados en el presente estudio serán probados como antagonistas de ambos tipos de receptores, adrenérgicos y serotoninérgicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El extracto de diclorometano del *Tanacetum parthenium* ha mostrado actividad inhibitoria de las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina sobre el tejido aislado de aorta de rata. Dentro de los compuestos mayoritarios de dicho extracto se encuentran la santina, un flavonoide, y la reynosina, una lactona sesquiterpénica, de los cuales se desconocen sus efectos individuales sobre el tejido vascular, por lo que en este trabajo se consideró importante conocer la actividad inhibitoria de la santina y reynosina sobre la respuesta contráctil inducida con serotonina y fenilefrina, en el tejido vascular de aorta de rata.

4. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios santina y reynosina, aislados de *Tanacetum parthenium* L., inhibirán las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en aorta de ratas Wistar.

5. OBJETIVO

Evaluar el efecto inhibitorio de santina y reynosina sobre las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en aorta de rata.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Procedimientos generales.

Los espectros de masas (EM) (energía de ionización de 70 eV) se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5890. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron obtenidos usando un espectrómetro Varian modelo Unity INOVA a 400 MHz para RMN ^{13}C y para RMN ^1H .

6.2 Material vegetal.

Se compraron 35 Kg de la planta fresca en el Mercado de Sonora con el nombre de Santa María, en Enero de 2012.

La identificación botánica confirmó a la especie como *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip mexicana, realizada por la M. en C. Abigail Aguilar del Herbario Medicinal del IMSS, una muestra de la planta quedó almacenada, con el número de registro 13622.

6.3 Aislamiento de los compuestos.

Cinco kilogramos de hojas y flores de la planta seca y molida se colocaron a macerar en 32L de diclorometano tres veces por períodos de 72 horas cada uno. Los filtrados se reunieron y se concentraron, obteniéndose 734 g de extracto después de eliminar el diclorometano. La mitad de este extracto se fraccionó en una columna fase normal con 850 g de sílica gel 60 (0.063-0.200 mm, MERCK®) de 70x13 cm. Se recogieron fracciones de 400 mL, reuniéndose aquellas en las que estaban presentes los compuestos de interés, de acuerdo al monitoreo por cromatografía en placa fina con una muestra del compuesto puro.

La elución de la columna se realizó con hexano:acetato de etilo (90:10), hexano:acetato de etilo (80:20), hexano:acetato de etilo (75:25) y hexano:acetato de etilo (50:50).

La santina comenzó a cristalizar en las fracciones 43 a 52. Por otra parte, en las fracciones 53 a la 61 se observa la presencia de la mezcla de reynosina y santina en las cromatoplasmas, estas fracciones se juntaron y se evaluaron en el modelo de órgano aislado a la par que los compuestos por separado. La reynosina se aisló de las fracciones 62 a la 69, la cual precipitó como una mezcla de lactonas que más tarde se identificaron como reynosina y santamarina.

Para la purificación de la reynosina, primeramente se realizó una percolación con acetato de etilo, para quitar los pigmentos. Posteriormente, la fracción con la mezcla de santina y reynosina, se separó con una columna con sílica gel 60 (0.063-0.200 mm, MERCK®) (65 g) de 100 x 1.5 cm. Se recogieron fracciones de 150 mL; se eluyó con hexano y hexano:acetato de etilo (75:25). La santina comenzó a cristalizar en las fracciones 7 a 22. La mezcla de reynosina y santamarina comenzó a cristalizar en las fracciones 23 a la 34.

Para lograr la separación de la reynosina y la santamarina se colocó la muestra en una columna con 40 g de sílica gel 60 (0.063-0.200 mm, MERCK®) de 71 x 0.7 cm, desactivada con 10% de una solución al 1% de nitrato de plata (AgNO_3) en agua. La columna se eluyó con cloroformo y cloroformo:acetato de etilo (75:25).

La identificación de los compuestos aislados se verificó por medio de RMN y Espectrometría de Masas.

En la Figura 9 se muestra el diagrama para el aislamiento y purificación de la santina y la reynosina.

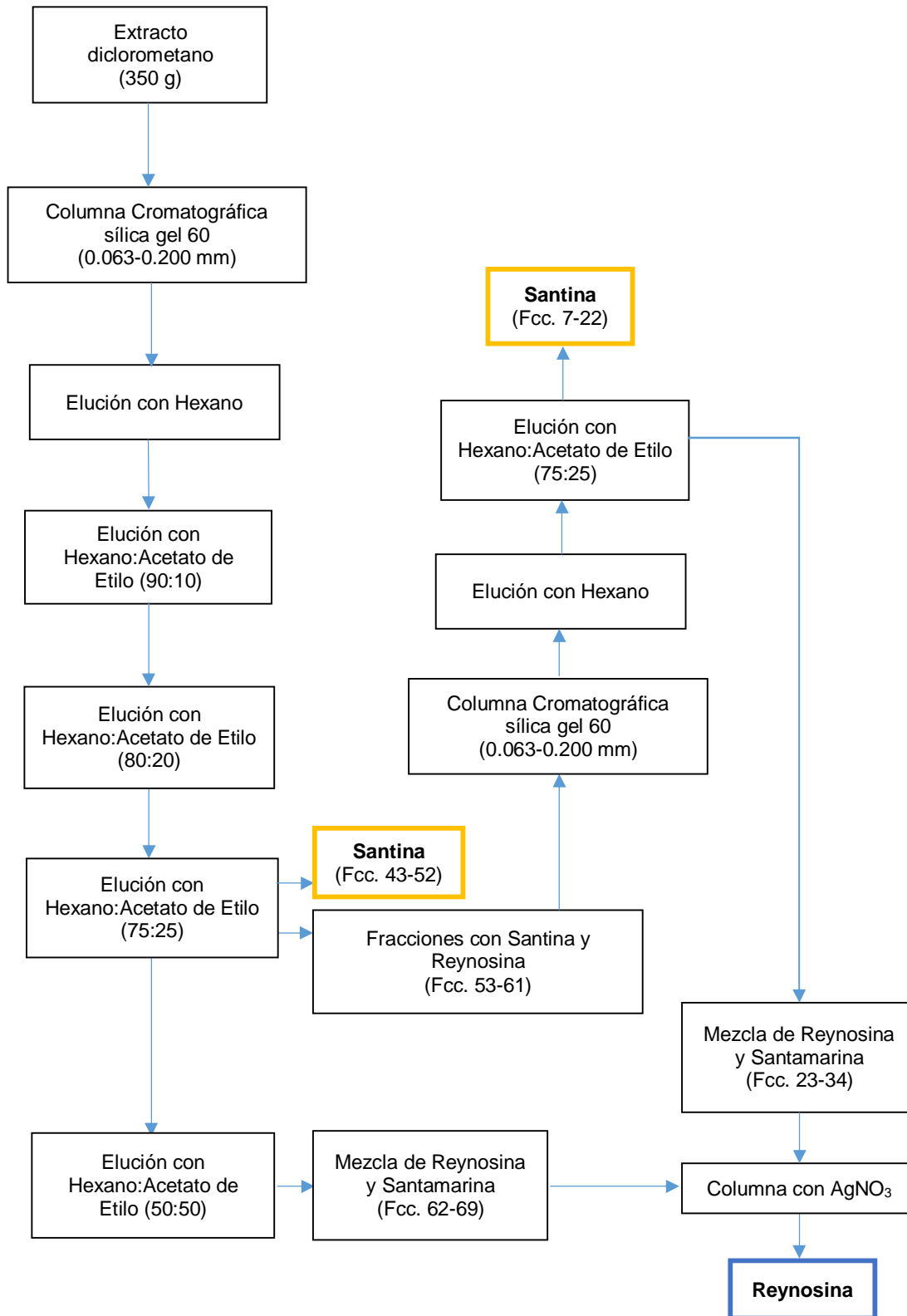


Figura 9. Diagrama de aislamiento de la santina y reynosina a partir del extracto de diclorometano de *Tanacetum parthenium*.

6.4 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho Wistar (n= 6 por cada curva) con un peso entre 175 a 200 g obtenidas de Harlan México (México), mantenidas a una temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y sometidas a ciclos de 12 horas de luz con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos en los que se involucró el uso de animales de laboratorio se realizaron siguiendo los lineamientos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) y de acuerdo a las reglas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.5 Modelo de órgano aislado.

Se utilizó un Poligrafo Biopack System modelo MP100-AC y para la obtención de los datos se empleó el software Acq Knowledge 3.8.2.

Los animales se sacrificaron en una cámara de CO_2 . Inmediatamente después, se disecó la primera mitad de la aorta y se cortaron aproximadamente 8 anillos de 2 a 3 mm de grosor. Los anillos se colocaron con ayuda de ganchos de nicromel dentro de una cámara llena con 10 mL de solución fisiológica Krebs-Henseleit a 37°C y aireación constante con una mezcla de 95% oxígeno, 5% CO_2 . Cada uno de los anillos de aorta se tensó a 4g de fuerza al inicio de cada evaluación.

Antes de los experimentos, los anillos aislados en la cámara se mantuvieron en estabilización durante una hora, con lavados cada 20 minutos. Posteriormente se estimularon en tres ocasiones con $100 \mu\text{M}$ de noradrenalina, para asegurar su viabilidad; a los 10 minutos después de cada estimulación se realizó un lavado.

El tejido se dejó reposar durante una hora con lavados cada 20 minutos, al finalizar el tiempo de estabilización se comenzó con los experimentos.

6.6 Curva de inhibición de la Contracción

Se realizó una curva de contracción acumulativa con serotonina (1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} , 3×10^{-5} , 1×10^{-4} , 3×10^{-4} M) o fenilefrina (1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} y 3×10^{-5} M) en cada uno de los canales, comenzando con la concentración más baja del fármaco y aplicando una concentración más alta al observar en el registro una contracción estable del tejido. Esta curva de contracción inicial se tomó como base para calcular el 100% de contracción del tejido en cada uno de los canales.

Después de realizada la curva de contracción se lavaron perfectamente los anillos y se dejaron reposar durante una hora, con lavados cada 20 minutos, hasta alcanzar nuevamente una línea basal constante.

En cada uno de los canales se aplicó una concentración diferente de compuesto, extracto o fracción (17.7, 30, 57, 100, 177 y 300 $\mu\text{g/mL}$); un tejido para cada una de las concentraciones, incubando durante 10 minutos para permitir su interacción con el tejido. En cada experimento se dejó uno o dos anillos como controles, a los cuales se aplicó solamente el vehículo (agua destilada con trazas de Tween 80). Pasado el tiempo de incubación, se construyó nuevamente una curva de contracción acumulativa con serotonina o fenilefrina (según fuese el caso), utilizando las mismas concentraciones empleadas que la curva de contracción inicial. De esta segunda curva se calculó el máximo de contracción alcanzado por el tejido, con respecto al 100% de la curva inicial.

6.7 Fármacos y compuestos de referencia.

La serotonina y la fenilefrina fueron obtenidas de Sigma-Aldrich®, los compuestos de referencia (santina y reynosina) fueron donados por el Dr. José Calderón del Instituto de Química de la UNAM.

6.8 Tratamiento estadístico

Se realizará un Análisis de Varianza de una vía seguido de la prueba *Post hoc* Dunnett con una significancia de $p \leq 0.05$., contrastando el valor del efecto máximo del control vs el valor del efecto máximo alcanzado en presencia de las diferentes concentraciones de los compuestos de prueba. .

Las gráficas y el análisis estadístico se llevaron a cabo utilizando los programas Graph Pad Prisma 5.0 o Sigma Plot 11.0.

6.9 Cálculo del potencial antagonista.

Para el caso de un antagonismo de tipo no competitivo se calcula el pA_2' con ayuda de una modificación a la ecuación de Schild:

$$\text{Log}(X-1) = b + m(-\text{Log}B)$$

Dónde:

$$X = A/A' = \frac{\text{(Efecto máximo del Agonista en ausencia del Antagonista)}}{\text{(Efecto máximo del Agonista en presencia de una concentración del Antagonista)}}$$

(Efecto máximo del Agonista en presencia de una concentración del Antagonista)

B = Concentración de Antagonista

b = Ordenada al origen

m = Pendiente cuando se cumple que $X = 2$, el $\text{Log}(X-1) = 0$, por lo que:

$$-b/m = (-\text{Log}B) = pA_2'$$

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento e identificación de la santina y reynosina

La santina se aisló como cristales amarillos (rendimiento de 0.04% con respecto a la planta seca).

En el espectro de masas (Anexo 1) se observa el pico del ión molecular igual a 344 uma, el cual corresponde con el peso molecular del flavonoide. La identificación de la molécula se realizó con ayuda de los espectros de RMN de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C), los cuales se presentan en los anexos de esta tesis (Anexo 2-3) y corresponden con los descritos en la literatura (Williams *et al.*, 1995).

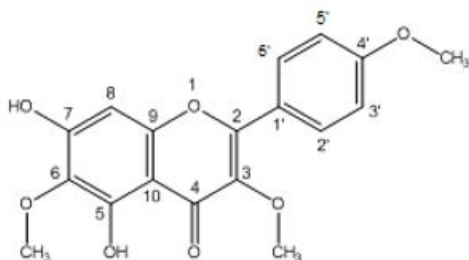
En el Cuadro 7 se muestran los desplazamientos y las asignaciones en RMN de cada uno de los átomos de hidrógeno y carbono para la molécula.

La reynosina se aisló como cristales obtenidos como agujas largas incoloras (rendimiento de 0.2% con respecto a la planta seca).

En el espectro de masas (Anexo 4) se observa el pico del ión molecular a 248 uma correspondiente al peso de la molécula del compuesto. La elucidación de la reynosina se realizó por RMN ^1H y RMN ^{13}C , así como con ayuda de los espectros bidimensionales de COSY, HSQC y HMBC (Anexo 5-9).

En el Cuadro 8 se muestran los desplazamientos químicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C , acorde con los datos descritos en la literatura (Fang *et al.*, 2005).

Santina



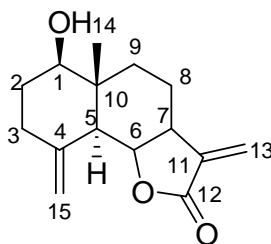
**Número de
átomo en la
molécula**

Santina

	$\delta, ^1\text{H}$	$\delta, ^{13}\text{C}$
2		161.68
3		151.76
4		179.18
5	12.93 (s)	154.90
6		152.22
7		129.94
8	6.55 (s)	93.04
9		138.39
10		106.19
1'		122.75
2'	7.02 (d)	114.06
3'	8.07 (d)	130.17
4'		156.11
5'	8.07 (d)	130.17
6'	7.02 (d)	114.06
CH ₃ -O-C4'	4.04 (s)	60.90
CH ₃ -O-C3	3.90 (s)	55.42
CH ₃ -O-C6	3.85 (s)	60.34

Cuadro 7. Desplazamientos y multiplicidad de los espectros RMN¹H y RMN ¹³C, de la santina.

Reynosina



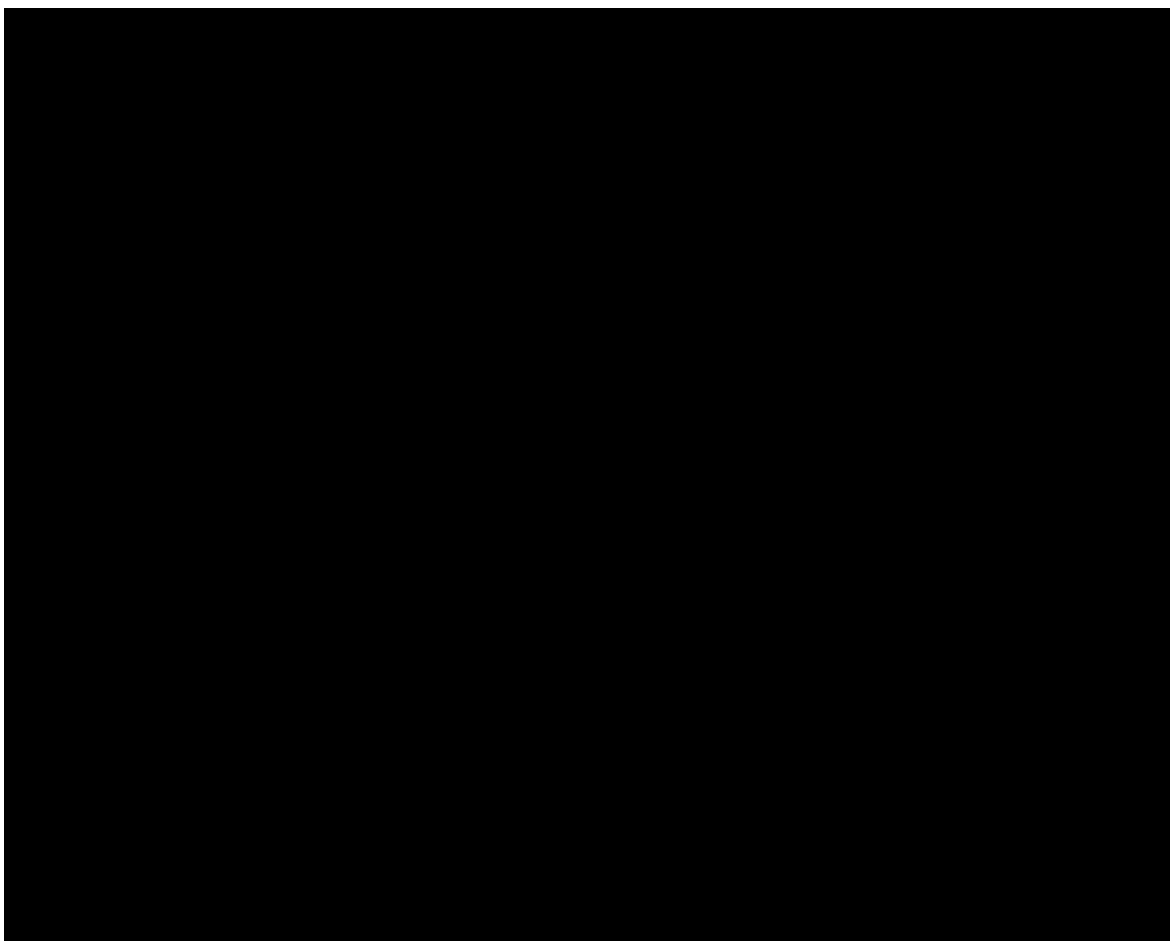
Número de átomo en la Molécula	Reynosina	
	δ , ^1H	δ , ^{13}C
1	3.53 (dd)	78.24
2	1.85 (m), 1.56 (m)	31.30
3	2.34 (m), 2.12 (m)	33.51
4		142.43
5	2.17 (d)	52.97
6	4.03 (t)	79.57
7	2.54 (tt)	49.60
8	2.09 (m), 1.58 (m)	21.45
9	2.06 (m), 1.36 (m)	35.69
10		42.97
11		139.23
12		170.63
13	6.09 (d), 5.43 (d)	117.07
14		11.63
15	4.99 (d), 4.86 (d)	110.67
CH ₃ -C10	0.82 (s)	
OH-C1	2.05 (s)	

Cuadro 8. Desplazamientos y multiplicidad de los espectros RMN¹H y RMN ¹³C, de la reynosina.

7.2 Efecto sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.

La santina (Gráfica 1), la reynosina (Gráfica 2), el extracto de diclorometano (Gráfica 3) y la fracción con ambos compuestos (Gráfica 4), presentaron un patrón de antagonismo de tipo no competitivo sobre contracciones inducidas con fenilefrina. La CE50 para la fenilefrina fue de $5.148 \pm 2.8 \times 10^{-7}$ M.

En todos los casos, la reynosina, el extracto y la fracción, mostraron un efecto irreversible, ya que al realizar lavados repetidos, después de la evaluación, la contracción no alcanzaba nuevamente el efecto máximo, por lo que no fue posible realizar la repetición del experimento con el mismo tejido.



Gráfica 1. Efecto inhibitorio de la santina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

Los porcentajes de contracción alcanzados por el tejido en presencia de las diferentes concentraciones de santina se muestran en el Cuadro 9.

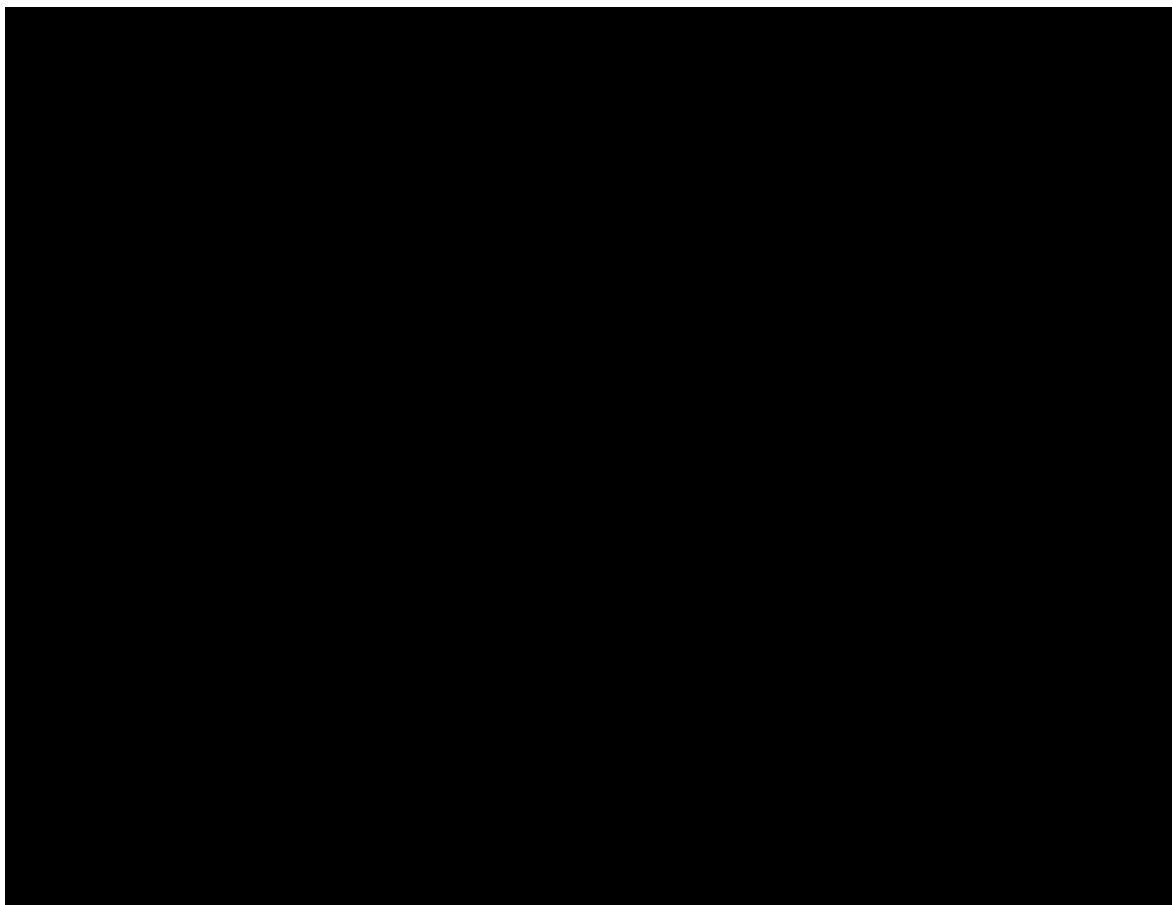
	<i>% Contracción</i>
<i>Fenilefrina</i>	91.5±3.06
<i>Fenilefrina + Santina 17.7 µg/ml</i>	77.38±8.03
<i>Fenilefrina + Santina 30 µg/ml</i>	52.87±6.48
<i>Fenilefrina + Santina 57 µg/ml</i>	23.34±1.54
<i>Fenilefrina + Santina 100 µg/ml</i>	18.07±0.72
<i>Fenilefrina + Santina 177 µg/ml</i>	9.13±0.54
<i>Fenilefrina + Santina 300 µg/ml</i>	-0.24±1.65

Cuadro 9. Porcentajes de contracción inducida por fenilefrina (3×10^{-5}), en presencia de santina a diferentes concentraciones.

En las gráficas de la reynosina y del extracto (ED) a las concentraciones de 177 y 300 µg/mL provocaron la relajación del tejido (Gráficas 2 y 3). Los porcentajes de contracción inducidos con fenilefrina, para cada una de las curvas, en presencia de reynosina y del extracto se muestran en los Cuadros 10 y 11.

	<i>% Contracción</i>
<i>Fenilefrina</i>	91.5±3.06
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 17.7 µg/ml</i>	73.32±2.57
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 30 µg/ml</i>	50.13±3.44
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 57 µg/ml</i>	27.46±1.47
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 100 µg/ml</i>	9.02±0.72
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 177 µg/ml</i>	-14.16±3.29
<i>Fenilefrina + Reynoldsina 300 µg/ml</i>	-0.24±1.65

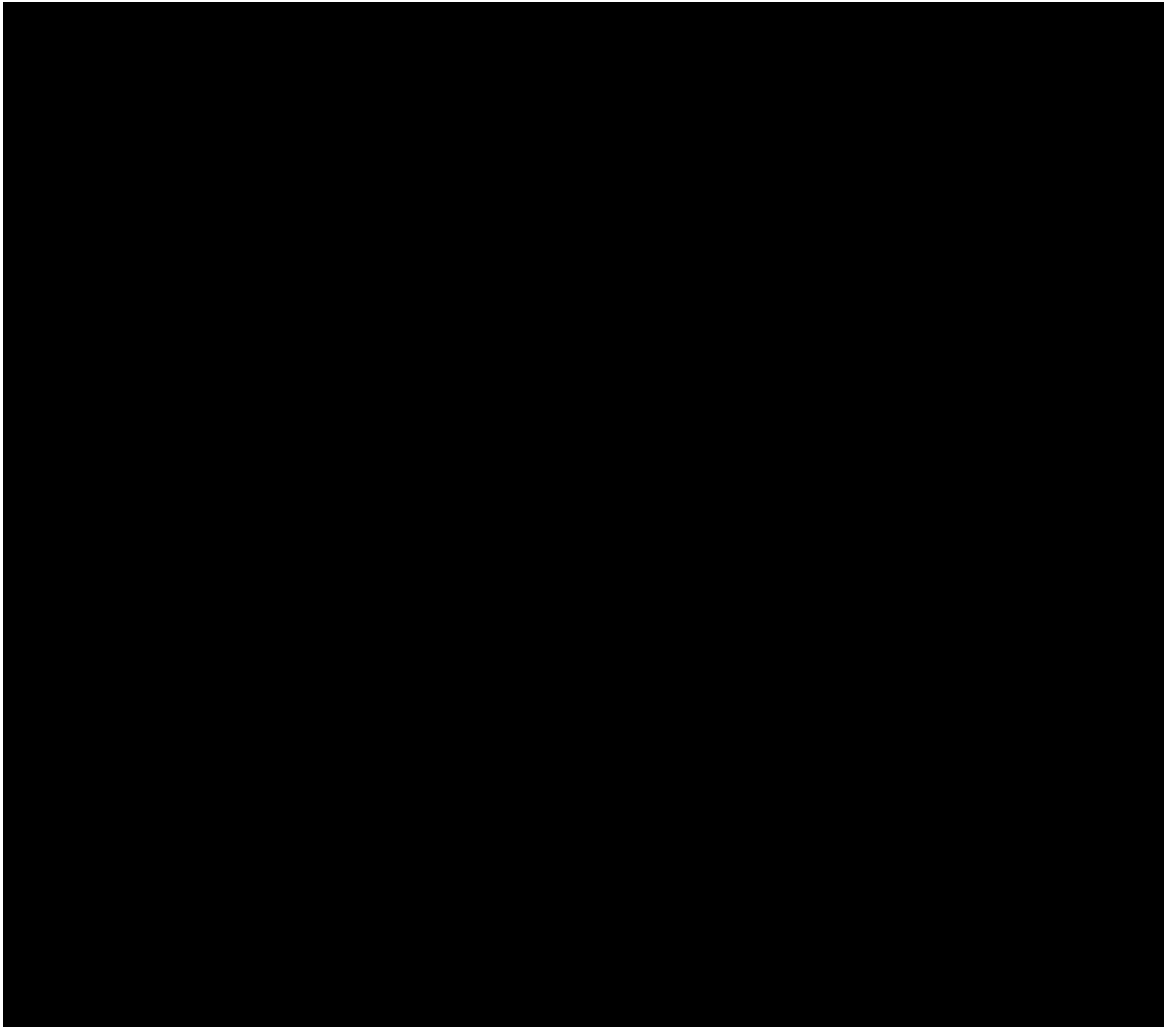
Cuadro 10. Porcentajes de contracción inducida por fenilefrina (3×10^{-5}), en presencia de reynosina a diferentes concentraciones.



Gráfica 2. Efecto inhibitorio de la reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANAEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

	<i>% Contracción</i>
<i>Fenilefrina</i>	91.5 \pm 3.06
<i>Fenilefrina + ED 17.7 μg/ml</i>	80.5 \pm 3.19
<i>Fenilefrina + ED 30 μg/ml</i>	64.23 \pm 1.78
<i>Fenilefrina + ED 57 μg/ml</i>	29.46 \pm 1.47
<i>Fenilefrina + ED 100 μg/ml</i>	23.08 \pm 4.73
<i>Fenilefrina + ED 177 μg/ml</i>	-11.02 \pm 5.38
<i>Fenilefrina + ED 300 μg/ml</i>	-25.23 \pm 1.63

Cuadro 11. Porcentajes de contracción inducida por fenilefrina (3×10^{-5}), en presencia del extracto de diclorometano a diferentes concentraciones.

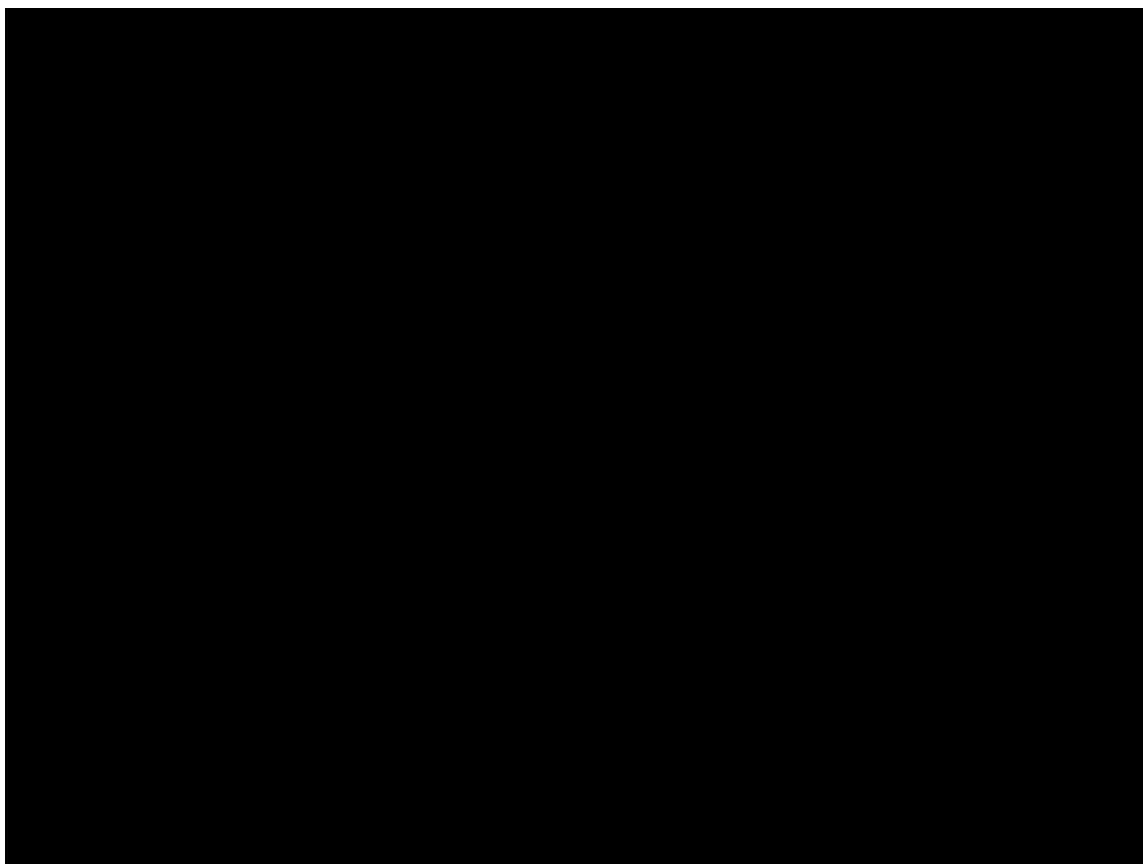


Gráfica 3. Efecto inhibitorio del extracto de diclorometano a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

En el caso de la fracción rica en santina y reynosina (FSR), los porcentajes de contracción alcanzados por cada una de las curvas a las diferentes concentraciones evaluadas, se presentan en el Cuadro 12.

	<i>% Contracción</i>
<i>Fenilefrina</i>	91.5±3.06
<i>Fenilefrina + FSR 17.7 µg/ml</i>	90.05±1.94
<i>Fenilefrina + FSR 30 µg/ml</i>	72.99±2.03
<i>Fenilefrina + FSR 57 µg/ml</i>	70.18±3.09
<i>Fenilefrina + FSR 100 µg/ml</i>	49.53±1.70
<i>Fenilefrina + FSR 177 µg/ml</i>	51.98±2.72
<i>Fenilefrina + FSR 300 µg/ml</i>	42.00±1.11

Cuadro 12. Porcentajes de contracción inducida por fenilefrina (3×10^{-5}), en presencia de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones.

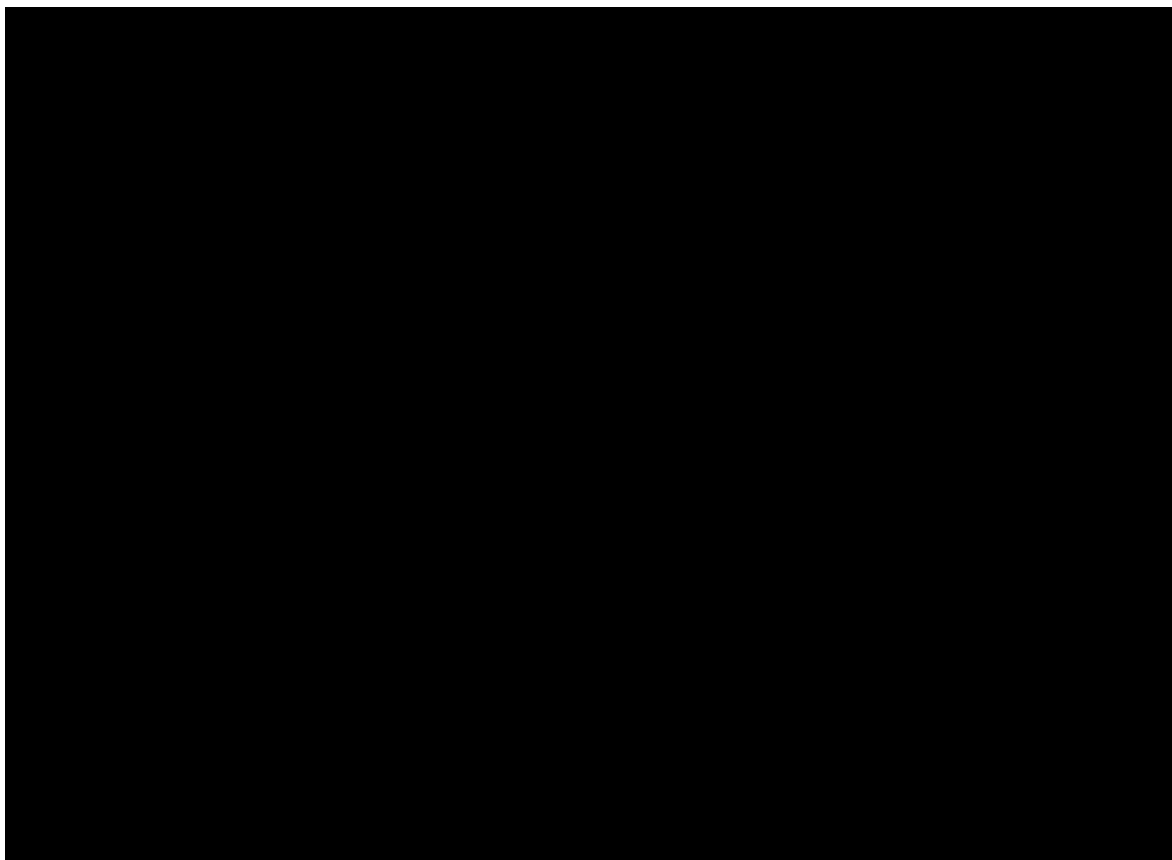


Gráfica 4. Efecto inhibitorio de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

7.3 Efecto sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata.

El patrón de las curvas de inhibición de la contracción inducida por serotonina, tanto para los compuestos como para la fracción fue de tipo no competitivo (Gráficas 5-7). La CE50 para la serotonina fue de $1.182 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ M, siendo 2.29 veces más potente la fenilefrina que la serotonina.

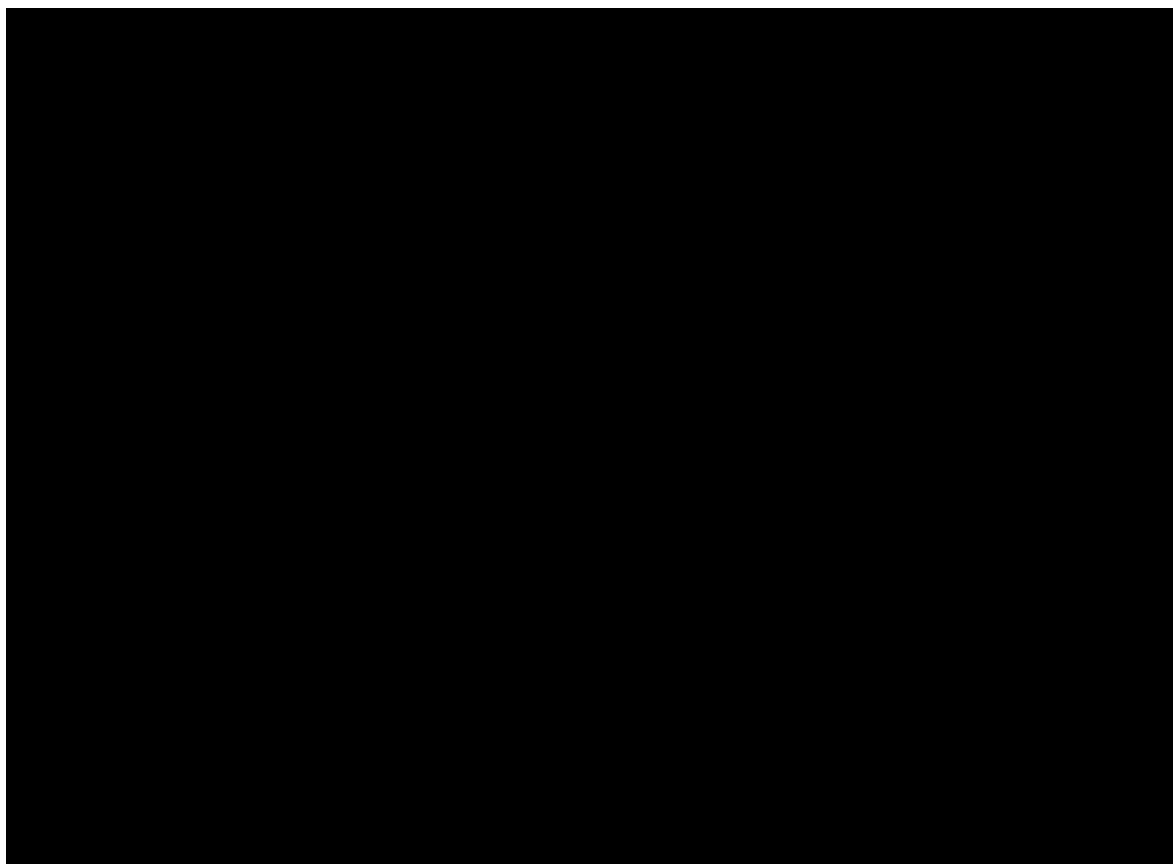
En los Cuadros 13 al 15 se presentan los máximos de contracción alcanzados por los tejidos, inducidos por serotonina, en presencia de santina, reynosina y la fracción con santina y reynosina, a diferentes concentraciones, respectivamente.



Gráfica 5. Efecto inhibitorio de la santina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

	<i>% Contracción</i>
<i>5-HT</i>	96.29±2.61
<i>5-HT + Santina 17.7 µg/ml</i>	91.63±11.00
<i>5-HT + Santina 30 µg/ml</i>	58.43±2.98
<i>5-HT + Santina 57 µg/ml</i>	45.02±8.76
<i>5-HT + Santina 100 µg/ml</i>	56.56±4.03
<i>5-HT + Santina 177 µg/ml</i>	63.39±6.40
<i>5-HT + Santina 300 µg/ml</i>	45.55±3.71

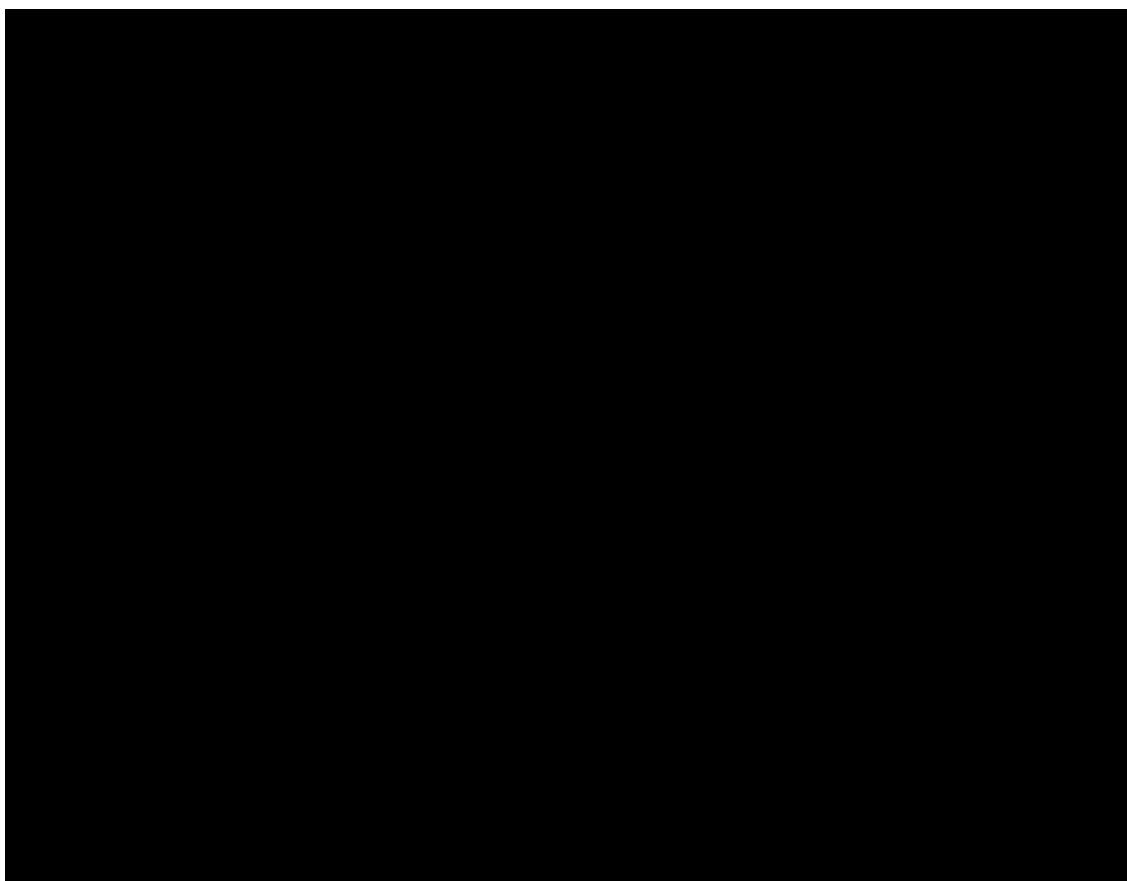
Cuadro 13. Porcentajes de contracción inducida por serotonina (3×10^{-4}), en presencia de santina a diferentes concentraciones.



Gráfica 6. Efecto inhibitorio de la reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

	<i>% Contracción</i>
<i>5-HT</i>	96.29±2.61
<i>5-HT + Reynosina 17.7 µg/ml</i>	92.17±3.27
<i>5-HT + Reynosina 30 µg/ml</i>	77.07±6.87
<i>5-HT + Reynosina 57 µg/ml</i>	88.10±4.69
<i>5-HT + Reynosina 100 µg/ml</i>	66.68±3.27
<i>5-HT + Reynosina 177 µg/ml</i>	59.30±3.33
<i>5-HT + Reynosina 300 µg/ml</i>	40.93±3.15

Cuadro 14. Porcentajes de contracción inducida por serotonina (3×10^{-4}), en presencia de reynosina a diferentes concentraciones.



Gráfica 7. Efecto inhibitorio de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata. * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

	% Contracción
5-HT	96.29±2.61
5-HT + FSR 17.7 µg/ml	77.92±3.17
5-HT + FSR 30 µg/ml	54.20±6.05
5-HT + FSR 57 µg/ml	40.37±5.07
5-HT + FSR 100 µg/ml	25.53±0.73
5-HT + FSR 177 µg/ml	22.44±3.49
5-HT + FSR 300 µg/ml	5.88±0.88

Cuadro 15. Porcentajes de contracción inducida por serotonina (3×10^{-4}), en presencia de la fracción con santina y reynosina a diferentes concentraciones.

7.4 Potencial Antagonista (pA_2 ').

En la Cuadro 16 se muestra un resumen de los potenciales antagonistas calculados al evaluar la actividad de la santina, la reynosina, el extracto y la fracción con ambos compuestos, al inhibir las contracciones inducidas con serotonina y fenilefrina.

Compuesto o extracto evaluado	Agonista Serotonina		Agonista Fenilefrina	
	$pA_2 \pm EEM$	Conc. ($\mu g/mL$)	$pA_2 \pm EEM$	Conc. ($\mu g/mL$)
Santina	-2.57±0.268	372.52±1.85 ^{*##}	-1.58±0.161	38.39±1.45 ^{**}
Reynosina	-2.48±0.348	306.35±2.23 ^{**}	-1.54±0.090	34.83±1.23 ^{**}
Extracto de diclorometano	-2.15±0.094	142.29±1.24 [*]	-1.65±0.092	45.26±1.23 [*]
Fracción con santina y reynosina	-1.63±0.099	43.03±1.25 ⁺	-2.19±0.237	156.92±1.72 ⁺

Cuadro 16. Potencial antagonista calculado para las contracciones inducidas por agonistas de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos α_1 . * $P < 0.05$ comparado con la fracción con santina y reynosina, + $P < 0.05$ comparado vs extracto, # $P < 0.05$ comparado vs reynosina (ANAEVA seguida de una prueba *Post hoc* Tuckey).

Se requiere una menor concentración de santina ($38.39 \pm 1.45 \mu\text{g/mL}$), reynosina ($34.83 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$) y extracto ($45.26 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$) para inhibir las contracciones inducidas con fenilefrina en comparación con la concentración de la fracción evaluada ($156.92 \pm 1.72 \mu\text{g/mL}$).

En cambio, la concentración de la fracción ($43.03 \pm 1.25 \mu\text{g/mL}$) necesaria para inhibir el efecto de la serotonina en el tejido, es menor que las concentraciones necesarias de santina ($372.52 \pm 1.85 \mu\text{g/mL}$), reynosina ($306.35 \pm 2.23 \mu\text{g/mL}$) y del extracto ($142.29 \pm 1.24 \mu\text{g/mL}$).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se demostró que tanto la santina como la reynosina inhibieron las contracciones de la aorta de rata inducidas por fenilefrina, y serotonina de tipo no competitiva. Ambos compuestos inhibieron con mayor potencia las contracciones mediadas por fenilefrina lo cual, sugiere que hay una mayor afinidad por los receptores adrenérgicos α_1 . El tipo de inhibición presentado en el caso de la lactona es de tipo irreversible para todos los casos. El extracto de diclorometano, de donde se aislaron estos compuesto, presentó mayor capacidad para disminuir el efecto máximo de la contracción inducida por fenilefrina que por serotonina, el cual fue de tipo no competitivo también. Este efecto es consistente con lo reportado por García-de la Cruz (2007).

Por otra parte, se encontró que la fracción rica en santina y reynosina presentó mayor actividad para inhibir las contracciones inducidas por serotonina que con fenilefrina. No existen reportes previos del efecto conjunto entre flavonoides y lactonas con actividad inhibitoria de la contracción del músculo liso, por lo que sería interesante evaluar la interacción de ambos compuestos sobre las contracciones de aorta inducidas por serotonina y agonistas adrenérgicos como la fenilefrina y dar consistencia a los resultados obtenidos, para lo cual se puede emplear el análisis isobolográfico.

El efecto del extracto como de la fracción rica en santina y reynosina, sugiere que el efecto inhibitor de las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina se deben al menos en parte a la presencia de estos dos compuestos.

Para las lactonas, partenólida y la cinaropicrina, se ha descrito efecto relajante sobre las contracciones inducidas con fenilefrina en anillos de aorta de conejo. Sin embargo, no existen estudios previos de otras lactonas, sobre la capacidad inhibitoria de las contracciones en aorta inducidas por este agonista (Hay *et al.*, 1994). Además, se sabe que la partenólida es un antagonista de baja afinidad de los receptores 5-HT₂ (Béjar, 1996). Sin embargo, no se sabe si otras lactonas poseen este mismo efecto. La reynosina al inhibir las contracciones en aorta por

serotonina, pudiera participar como un antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ (presentes en el tejido de aorta de rata y responsables de la contracción).

En la separación de reynosina se aisló otra lactona, llamada santamarina (Figura 10) cuya diferencia estructural es la posición de un doble enlace teniendo en común el anillo γ -lactónico. Para saber si estos cambios estructurales afectaban la actividad biológica, se realizó un experimento en el que se evaluó la capacidad de estas dos lactonas para inhibir la contracción de la aorta a una concentración de 100 μ g/mL, utilizando como agentes contráctiles serotonina y fenilefrina.

La santamarina fue más activa para inhibir las contracciones inducidas por serotonina (Gráfica 8), presentando un máximo de contracción de $38.82 \pm 11.94\%$ en tanto que reynosina fue más activa para inhibir las contracciones inducidas por fenilefrina, presentando un máximo de contracción de $9.02 \pm 0.72\%$ (Gráfica 9).

En un trabajo previo se reportó la actividad relajante de la partenólida y la cinaropicrina en anillos de aorta de conejo, después de haber contraído el tejido con fenilefrina (Hay *et al.*, 1994). El efecto se atribuyó a la presencia de un grupo metileno en la posición alfa de la γ -lactona en ambos compuestos (Figura 10). La reynosina y la santamarina presentan la misma característica en su estructura (Figura 10), lo cual podría relacionarse con el efecto relajante a concentraciones altas y posiblemente con el efecto inhibitorio de las contracciones presentado. Los resultados anteriores ponen de manifiesto la importancia de la posición del doble enlace endocíclico y exocíclico de las lactonas estudiadas. Se requieren estudios adicionales para poder definir de una manera más clara la importancia del doble enlace en la estructura de estas lactonas de tipo eudesmano.

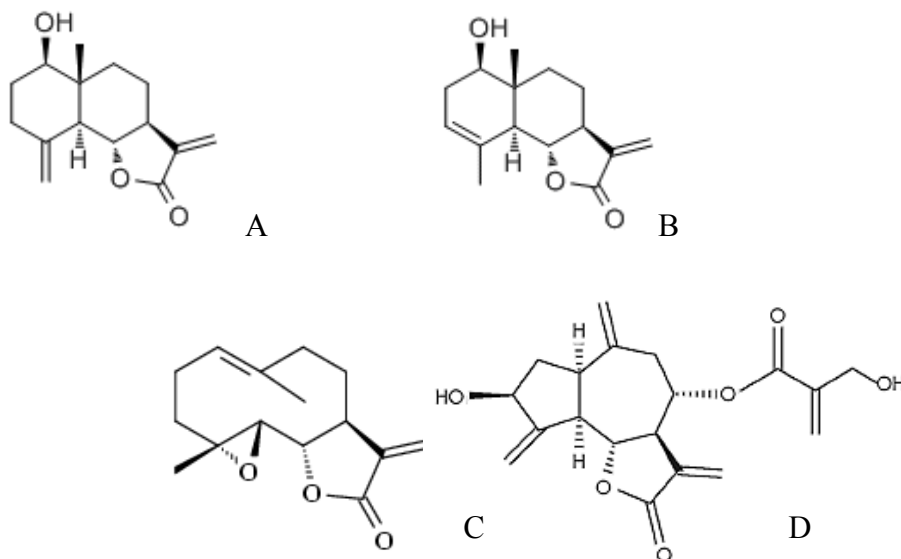
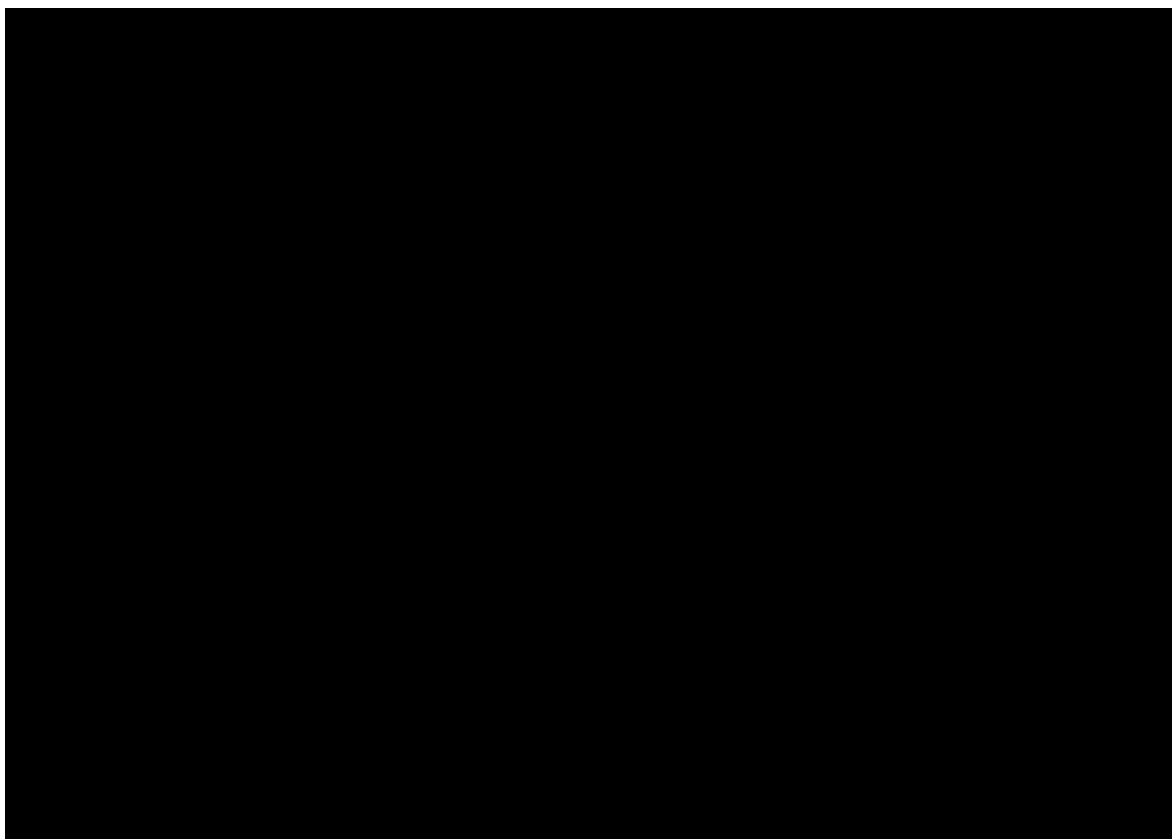
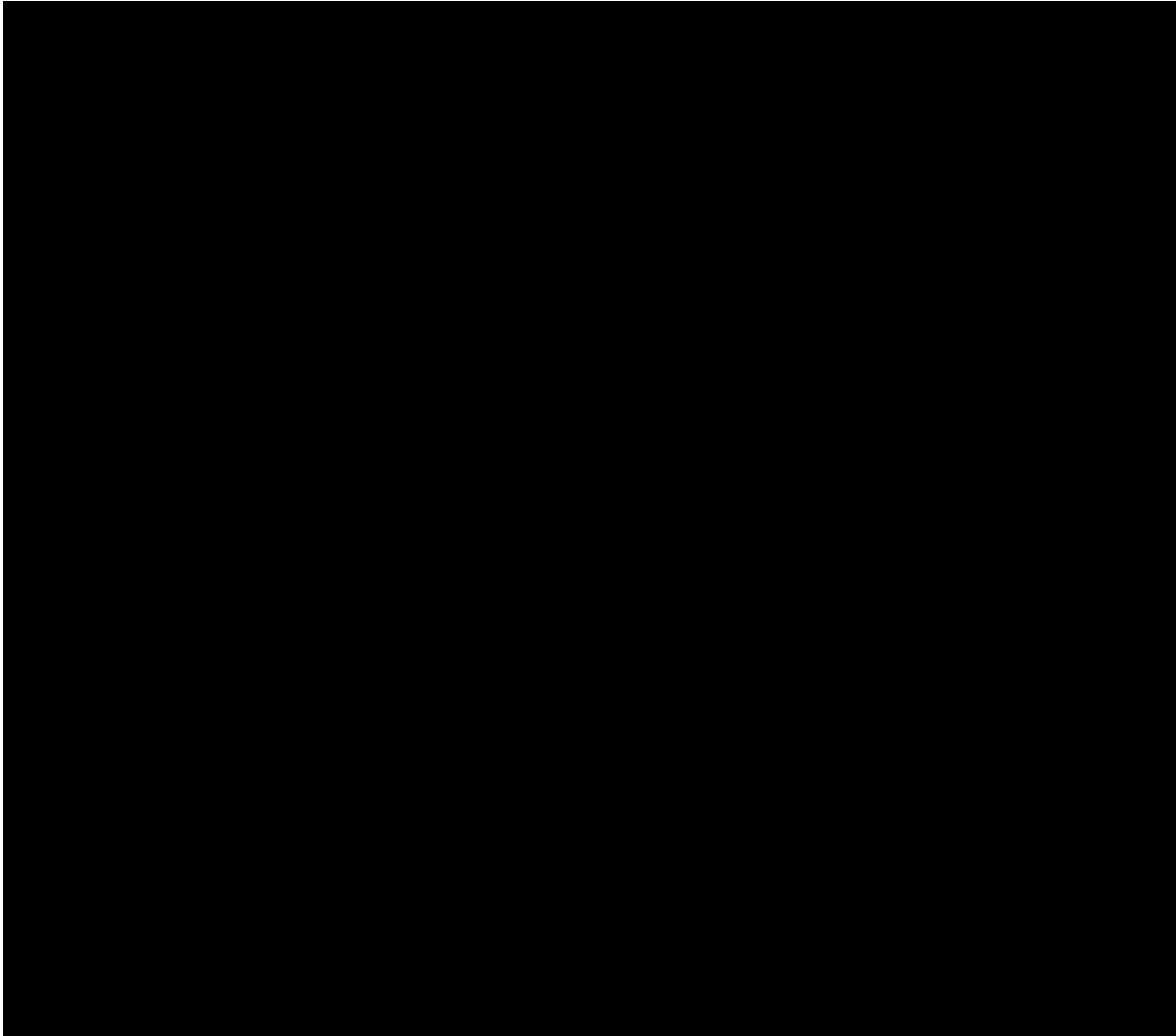


Figura 10. Estructuras de la reynosina (A), santamarina (B), partenólida (C) y cinaropicrina (D).



Gráfica 8. Curvas del porcentaje de contracción del tejido aislado de aorta inducido por serotonina en presencia de santamarina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y reynosina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $P < 0.05$ comparado contra el control (ANADEVA seguido de una prueba *Post hoc* Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.



Gráfica 9. Curvas del porcentaje de contracción del tejido aislado de aorta inducido por fenilefrina en presencia de santamarina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y reynosina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $P < 0.05$ comparado contra el control, † $P < 0.05$ comparado contra santamarina (*Post hoc* Dunnett). Cada punto representa la media \pm EEM, de al menos 6 repeticiones.

Por otro lado se sabe que varios flavonoides poseen un efecto relajante sobre músculo liso. En el mecanismo de acción más estudiado están involucradas las fosfodiesterasas y la inhibición del influjo de calcio (Ko *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011). La santina, además de inhibir la contracción por fenilefrina y serotonina, presentó relajación del tejido a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ cuando las contracciones fueron inducidas con fenilefrina (Gráfica 1). Sin embargo, se desconoce si existe un mecanismo para los flavonoides, que cause relajación del músculo liso, relacionado con la inhibición de la activación de los receptores α_1 .

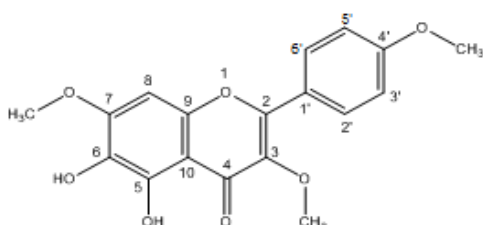
Este es el primer estudio en el que se reporta la actividad inhibitoria de santina y reynosina sobre las contracciones de aorta de rata inducidas por fenilefrina y serotonina. Siendo su efecto mayor para inhibir las contracciones de un agonista de los receptores α_1 .

Durante el análisis de los espectros de RMN, se observó la presencia de otro flavonoide en la muestra, el cual después de un análisis detallado se determinó que se trata de un isómero de la santina y se identificó como 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona (Figura 11), cuya diferencia estructural radica únicamente en la posición de un metoxilo. Este compuesto fue aislado con anterioridad por Williams y colaboradores en 1995 (Williams *et al.*, 1995), al cual dieron el nombre de *tanetina*. Sin embargo, este mismo grupo de investigación publicó en 1999 un artículo donde aseguran que la estructura de dicha molécula corresponde a la santina, retractándose de lo notificado cuatro años atrás (Williams *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1999). Ambas moléculas son similares en sus propiedades físicas y químicas, por lo que la separación de ambos compuestos es complicada. Sin embargo con el apoyo de los espectros de RMN se pudo evidenciar la presencia de los dos compuestos. Esto es importante ya que la presencia en la misma planta, tanto de santina como de 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona, fue evidente en este trabajo.

Al estudiar los espectros de RMN ^1H , se observó una señal parecida a un doblete que integraba para 2 protones, con un desplazamiento centrado a 6.53 ppm. Esta señal no coincidía con la estructura molecular de la santina, ni con el peso molecular encontrado en el espectro de masas (Anexo 1), por lo que se sospechó la existencia de un isómero y se procedió a la separación por recristalizaciones sucesivas.

En la mezcla existían dos tipos de cristales, unos con forma tetraédrica alargada y otros en formación de agujas en rosetas. Estos cristales se intentaron separar físicamente con ayuda de un estereoscopio. De acuerdo con las intensidades de las señales de los espectros, se lograron separar en una proporción 7:1 (Figura 12). Siendo su desplazamiento químico respectivo δ 6.51 y δ 6.55 ppm.

5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona



Santina

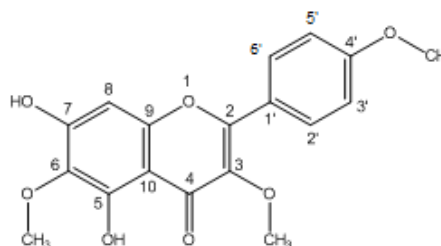


Figura 11. Estructuras de la 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona y la santina.

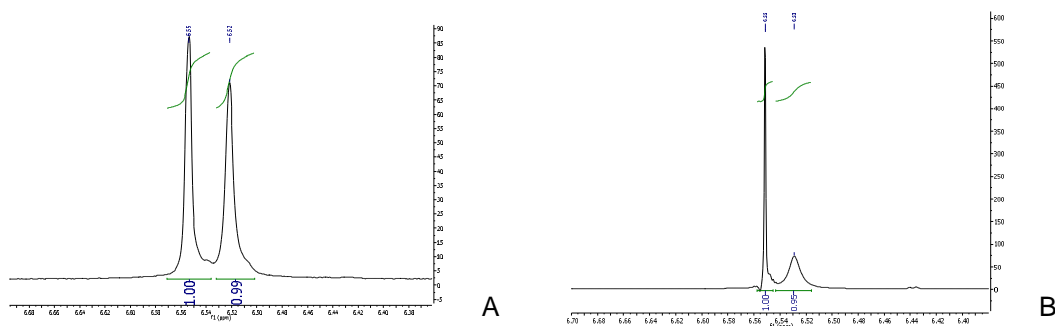


Figura 12. Señales del espectro de RMN ^1H correspondientes al H8 (δ : 6.51-6.55) de la mezcla de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona. Señales antes de separar los cristales (A), después de separar los cristales manualmente (B).

Con el propósito proporcionar mayor evidencia de la existencia de ambos isómeros, se realizó una reacción de metilación con diazometano a la mezcla de estos dos compuestos, obteniéndose un solo producto de reacción la 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxi-flavona (Figura 13). En el espectro de RMN ¹H (Figura 14) se observó un singulete a un δ 6.51ppm, que corresponde al hidrógeno de la posición número 8, así como las señales de 4 metoxilos a 3.87, 3.90, 3.93 y 3.96 ppm.

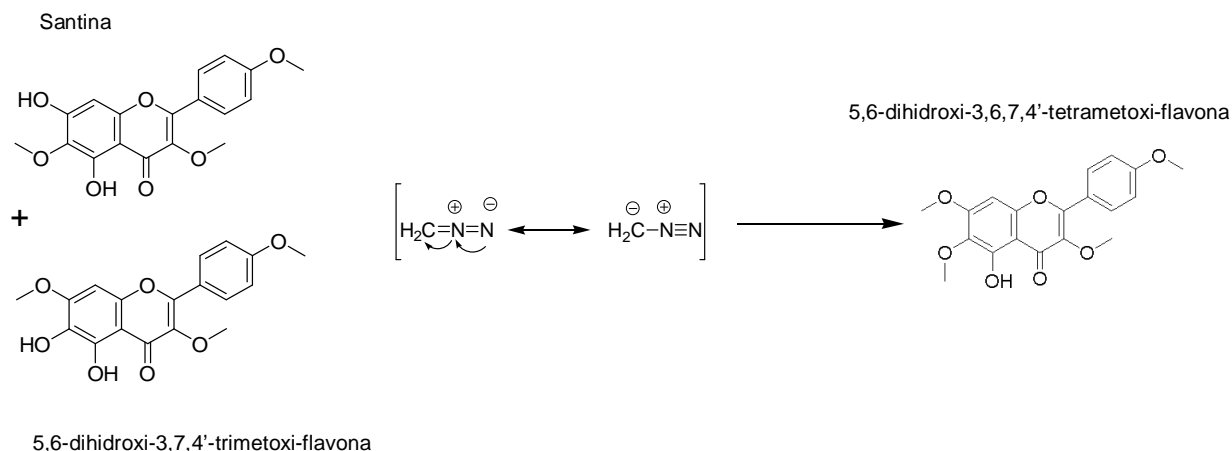


Figura 13. Reacción de metilación con diazometano de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona.

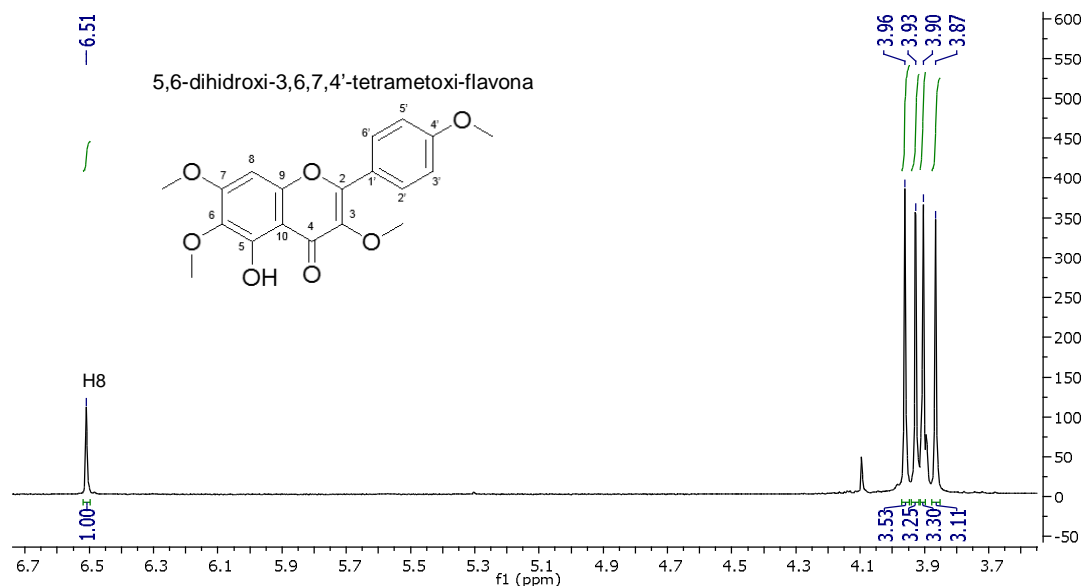


Figura 14. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃/400MHz) del producto de reacción de metilación de la mezcla de flavonoides. Se aprecian las señales de los cuatro metoxilos a un desplazamiento químico de 3.87 a 3.96 ppm, así como la señal a un δ 6.51 ppm, correspondiente al hidrógeno de la posición 8 en la molécula.

9. CONCLUSIONES

- La santina y la reynosina inhibieron de forma no competitiva la actividad contráctil del músculo liso de aorta de rata inducida por serotonina y fenilefrina, siendo mayor la capacidad de inhibir las contracciones de la aorta de rata inducidas por fenilefrina.
- La fracción que contiene la mezcla de santina y reynosina presentó mayor capacidad para inhibir las contracciones inducidas por serotonina en el tejido aislado de aorta de rata que los compuestos puros en forma individual, lo puede indicar un sinergismo.
- El efecto de inhibición de la contracción inducida por fenilefrina es mayor para la lactona reynosina que para su isómero santamarina, y es menor su efecto cuando las contracciones se inducen con serotonina.
- Se identificó la presencia de 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona en el *Tanacetum parthenium*, lo que confirma la existencia de este compuesto en la naturaleza.

Propuestas.

- Realizar un análisis isoblográfico para determinar si existe una interacción entre ambos compuestos utilizando serotonina y fenilefrina como agentes constrictores.
- Tanto la santina como la reynosina mostraron una capacidad relajante del tejido vascular a las concentraciones más altas (177 y 300 µg/mL), evaluadas en las curvas de contracción con fenilefrina. Por lo que sería interesante estudiar el o los mecanismos de acción por los cuales ejercen este efecto.
- La santina y la reynosina podrían ser evaluados utilizando agonistas de otros tipos de receptores encargados de regular el tono vascular, como los receptores para Angiotensina II, Histamina, Adenosina, etc.
- Separar la 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona para su posterior evaluación como inhibidor de las contracciones y su posible acción relajante del músculo liso en aorta de rata, comparando los resultados obtenidos con los de la santina.

REFERENCIAS

Akpulat A., Tepe B., Sokmen A., Daferera D. y Polissiou, M. (2005). Composition of essential oils of *Tanacetum argyrophyllum* (C. Koch) Tzvel. var. *argyrophyllum* and *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae) from Turkey. *Biochem Syst Ecol*;33:511-516.

Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M. M., Stefani E. y Toro L. (2002). Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Nat Acad Sci*.99:14560-14565.

Anderson N. K. y Bejcek B. E. (2008). Parthenolide induces apoptosis in glioblastomas without affecting NF-kappaB. *J Pharmacol Sci*.106:318-320.

Avula B., Navarrete A., Joshi V. C. y Khan I. A. (2006). Quantification of parthenolide in *Tanacetum parthenium* by LC-UV/LC-MS and microscopic comparasion of Mexican/US feverfew samples. *Pharmazie*.61:590-594.

Banes A., Florian J. A. y Watts S. W. (1999). Mechanisms of 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptor Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Vascular Smooth Muscle. *J Pharmacol Exp Ther*.291:1179-1187.

Barsby R. W., Salan U., Knight D. W. y Houlst, Jr. (1992). Feverfew extracts and parthenolide irreversibly inhibit vascular responses of rabbit aorta. *J Pharm Pharmacol*.44:737-740.

Begley M. J., Hewlett M. J. y Knight D. W. (1989). Revised structures for guaianolide alpha-methylenebutyrolactones from Feverfew. *Phytochemistry*, 28:940-943.

Béjar E. (1996). Parthenolide inhibits the contractileresponses of rat stomach fundus to fenfluramine and dextroamphetamine but not serotonin. *J Ethnopharmacol*.50:1-12.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009).[En línea] Disponible en:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7488> [Último acceso: 27 Marzo 2013].

Bohlman F. y Zdero C. (1982). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 21:2543-2549.

Bork P. M., Schmitz M. L., Kuhnt M., Escher C. y Heinrich M.(1997). Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.*402:85-90.

Campos M., Oropeza M., Ponce H., Fernández J., Jimenes-Estada M., Torres H. y Reyes-Chilpa R.(2003). Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolides D and E from *Vernonia liatroides*. *Biol Pharm Bull.*26:112-115.

Carter R. W., Begaye M. y Kanagy N. L. (2002). Acute and chronic NOS inhibition. *Am J Physiol*, 283:H1361-H1369.

Chitaley K. y Webb R. C. (2002). Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension.*39:438–442.

Cho J. Y., Park J., Yoo E. S., Baik K. U., JungJ. H., Lee J. y Park M. H. (1998). Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophage-like cells. *Planta Med.*64:594-597.

Choi J. Y., Choi E. H., JungH. W., Oh J. S., Lee W. H., Lee J. G., Son J. K., Kim Y. y Lee S. H. (2008). Melanogenesis inhibitory compounds from Saussureae Radix. *Arch Pharm Res.*31:294-299.

Cotecchia S. (2010). The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res.*30:410-419.

de la Lande I. S. (1992). Evidence for a 5-HT_{1.1} receptor mediating the amplifying action in the rabbit ear artery. *Br J Pharmacol.*107:550-555.

Delbin M. A., Silva A. S., Antunes E. y Zanesco A. (2012). Interacción entre las vías de señalización de receptores serotoninérgicos y β -Adrenérgicos en la arteria femoral de ratones. *Arq Bras Cardiol*.98:29-34.

Fang F., Sang S., Chen K. Y., Gossalau A., Ho C. T., Rosen R. T. (2005). Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurusnobilis*) *Food Chem*. 93:497-501

García-de la Cruz L. (2007). Efecto antagonista de *Tanacetum parthenium* sobre las contracciones inducidas por serotonina y fenilefrina en aorta de rata e identificación de sus componentes activos. Tesis de Maestría. UNAM.

Gören N., Woerdenbag H. J. y Bozok-Johansson C. (1996). Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Med*.62:419-422.

Groenewegen W. A., Knight D. W. y Heptinstall S. (1986). Compounds extracted from feverfew that have anti-secretory activity contain an alpha-methylene butyrolactone unit. *J Pharm Pharmacol*.38:709-712.

Guerra J. A., Molina M., Abad M. J., Villar A. M. y Paulina B. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum microphyllum*. *Int Immunopharmacol*.6:1723-1728.

Hay A. J., Hamburger M., Hostettmann K. y Hoult J. R. (1994). Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive alpha-methylenebutyrolactone functions. *Br J Pharmacol*.112:9-12.

Haynes N. A. y Foreman, J. C. (1987). The activity of compounds extracted from feverfew on histamine release from rat mast cells. *J Pharm Pharmacol*.39:466-470.

Hendriks H., Boss R. y Woerdenbag H. J. (1996). The essential oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. *Flavour Frag J*.11:367-371.

Heptinstall S., Awand D. V., Dawson B. A., Kindack D., Knight D. W. y May J. (1992). Parthenolide content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip). Estimation of commercial and authenticated feverfew products. *J Pharm Pharmacol.*44:391-395.

Heptinstall S. y Awang D. V. C. (1998). Feverfew: a review of its history, its biology and medicinal properties, and the estatus of commercial preparations of the herb. En: L. Lawson & R. Bauer, edits. *Phytomedicines of Europe, chemistry and biological activity*. Washington, D. C.: American Chemical Society. 158-175.

Hilmi F., Sticher O. y Heilmann J. (2003). New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Warionia saharae*. *Planta Med.*69:462-464.

Humar M., García-Piñeres A. J., Castro V. y Merfort I. (2003). Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T-lymphocytes in whole blood. *Biochem Pharmacol.*65:1551-1563.

Hussain M. B. y Marshall I. (1997). Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol.*122:849-858.

Ishinata A., Tasaki K. y Katano Y. (2002). Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta.. *Eur J Pharmacol.*445:247-256.

Izadi Z., Esna-Ashari M., Piri K. y Davoodi P. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) essential oil. *Int J Agr Biol.*12:759-763.

Jung J. H., Ha J. Y., Min K. R., Shibata F., Nakagawa H., Kang S. S., Chang I. M. y Kim Y. (1998). Reynosin from *Saussurea lappa* as inhibitor on CINC-1 induction in LPS-stimulated NRK-52E cells. *Planta Med.*64:454-455.

Kalsner S. (1973). Mechanism of potentiation by amines of non-equilibrium blockade of the α -adrenoceptor. *Br J Pharmacol.*47:386-397.

Kandabashi T., Shimokawa H., Mukai Y., Matoba T., Kunihiro I., Morikawa K., Ito M., Takahashi S., Kaibuchi K., Takeshita A. (2002). Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries.. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:243-248.

Kemper K. J. (1999). Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Longwood Herbal Task Force.* 1-18.

Kim H. S., Yumkham S., Choi J. H., Son G., Kim K., Ryu S., y Suh P. (2006). Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC gamma1 pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *J Endocrinol.*190:581-591.

Kisiel W. y Stojakowska A. (1997). A sesquiterpen coumarin ether from transformed roots of *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry.*46:515-516.

Ko W. C., Chen M. C., Wang S. H., Lai Y. H., Chen J. H. y Lin C. N. (2003). 3-O-methylquercetin more selectively inhibits phosphodiesterase subtype 3. *Planta Med.*69:310-315.

Ko W. C., Shih C. M., Lai Y. H., Chen J. H. y Huang H. L. (2004). Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*68:2087-2094.

Krepinsky J. C., Ingram A. J., Tang D., Wu D., Liu L. y Scholey J. W.(2003). Nitric oxide inhibits stretch-induced MAPK activation in mesangial cells through RhoA inactivation. *J Am Soc Nephrol.*14:2790 –2800.

Li H., Meng J. C., Cheng C. H., Higa T., Tanaka J. y Tan R. X. (1999). New guaianolides and xanthine oxidase inhibitory flavonols from *Ajania fruticulosa*. *J Nat Prod.*62:1053-1055.

Lee D. L., Webb R. C. y Jin L. (2004). Hypertension and RhoA/Rho-Kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension.*44:796-799.

Lim S., Lee S. J., Nam K. W., Kim K. H. y Mar W. (2013). Hepatoprotective effects of reynosin against thioacetamide-induced apoptosis in primary hepatocytes and mouse liver. *Arch Pharm Res.*36:485-494.

Long C., Sauleau P., David B., Lavaud C., Cassabois V., Ausseil F. y Massoit G. (2003). Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. *Phytochemistry.*64:567-569.

Lu R., Alioua A., Kumar Y., Kundu P., Eghbali M., Weisstaub N. V., Gingrich J. A., Stefani E. y Toro L. (2008). c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2A} receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Physiol.*586:3855-3869.

Marles R. J., Kaminski J. y Arnason T. (1992). A bioassay for inhibition of serotonin release from bovine platelets. *J Nat Prod.*55:1044-1056.

Martinez J., Silván A. M., Abad M. J., Bermejo P., Villar A. y Söllhuber M. (1997). Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. *J Nat Prod.*60:142-144.

Medina L. (2002). Estudio biodirigido de *Tanacetum parthenium* mexicana, como inhibidor de contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata Wistar. Tesis de Licenciatura., México, D.F.: UNAM.

Miglietta A., Bozzo F., Gabriel L. y Bocca C. (2004). Microtubule-interfering activity of parthenolide. *Chem Biol Interact.*149:165-173.

Milbrodt M., Schröder F. y Köning A. (1997). 3,4-beta-epoxy-8-deoxicumambrin B, a sesquiterpen lactone from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry.*44:471-474.

Ming X. F., Viswambharan H., Barandier C., Ruffieux J., Kaibuchi K., Rusconi S. y Yang Z. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol.*22:8467-8477.

Movahedi H., Le H. T., Spangford H. M. y Purdy R. E. (1995). Effect of alpha adrenergic agonist on the rabbit ear artery contraction to serotonin: enhanced response mediated by serotonergic1-like receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*272:364-370.

Murray D. L. y Purdy R. E. (1985). Potentiation of serotonergic receptor blockade by alpha-adrenoceptor antagonists. *Proc West Pharmacol Soc.*28:93-95.

Nagareddy P. R., Chow F. L., Hao L., Wang X., Nishimura T., MacLeod K. M., McNeill J. H. y Fernandez-Patron C. (2009). Maintenance of adrenergic vascular tone by MMP transactivation of the EGFR requires PI3K and mitochondrial ATP synthesis. *Cardiovasc Res.*84:368-377.

Pareek A., Suthar M., Rathore G. S. y Bansal V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium L.*): A systematic review.. *Pharmacogn Rev.*5:103-110.

Rodríguez J., Tello H., Quijano L., Calderón J., Gómez F., Romo J. y Ríos T. (1974). Flavonoides de plantas mexicanas aislamiento y estructura de la santina y de la glucoferida. *Revista Latinoamericana de la Química.* 43-53.

Rodríguez-Ramos F., González-Andrade M. y Navarrete A. (2011). Gnaphaliin A and B relax smooth muscle of guinea-pig trachea and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. *J Pharm Pharmacol.*63:926-935.

Romo de Vivar A. y Jiménez H. (1965). Structure of santamarine a new sesquiterpene lactone. *Tetrahedron.*21:1741-1745.

Romo J., Romo de Vivar A., Treviño R., Joseph-Nathan J. y Díaz E.(1970). Constituents of *Artemisa* and *Chrysanthemum* species-the structures of chrysartemins A y B. *Phytochemistry.*9:1615-1621.

Rosselli S., Bruno M., Raimondo F. M., Spadaro V., Varol M., Koparal A. T. y Maggio A. (2012). Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare ssp. siculum*. *Molecules.*17:8186-8195.

Roth B. L., Nakaki T., Chuang D. M. y Costa E. (1986). 5-Hydroxytryptamine₂ receptors coupled to phospholipase C in rat aorta: modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester. *J Pharmacol Exp Ther.*283:480-485.

Rzedowski J. y de Rzedowski G. C. (1997). Compositae. Tribu Anthemideae. Tanacetum. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes.*60:24-27.

Sahler J., Bernard J. J., Spinelli S. L., Blumberg N. y Phipps R. P. (2011). The Feverfew plant-derived compound, parthenolide enhances platelet production and attenuates platelet activation through NF- κ B inhibition. *Thromb Res.*127:426-434.

Sülsen V. P., Cazorla S. I., Frank F. M., Redko F. C., Anesini C. A., Coussio J. D., Malchiodi E. L., Martino V. S. y Muschietti L. V. (2007). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *Am J Trop Med Hyg.*77:654-659.

Sun C. M., Syu W. J., Don M. J., Lu J. J. y Lee G. H. (2003). Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of *Saussurea lappa*. *J Nat Prod.*66:1175-1180.

Ulu N., Gurdal H., Landheer S. W., Duijn M., Guc M. O., Buikema H. y Henning R. H. (2010). α 1-Adrenoceptor-mediated contraction of rat aorta is partly mediated via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol.*161:1301-1310.

Vibrans H. (2009). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. [En línea] Disponible en:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tanacetum-parthenium/fichas/ficha.htm#1.%20Nombres>

[Último acceso: 27 Marzo 2013].

Villazón M., Padín J. F., Cadavid M. I., Enguix M. J., Tristán H., Orallo, F. y Loza M. I. (2002). Functional characterization of serotonin receptors in rat isolated aorta. *Biol Pharm Bull.*25:584-590.

Wagner S., Arce R., Murillo R., Terfloth L., Gasteiger J. y Merfort I. (2008). Neural networks as valuable tools to differentiate between sesquiterpene lactones inhibitory activity on serotonin release and on NF-kappaB. *J Med Chem*.51:1324-1332.

Wang L., Tu Y. C., Lian T. W., Hung J. T., Yen J. H. y Wu M. J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*.54:9798-9804.

Watts S. W., Yang P., Banes A. K. y Baez M. (2001). Activation of Erk mitogen-activated protein kinase proteins by vascular serotonin receptors.. *J Cardiovasc Pharmacol*.38:539-551.

Weber J. T., O'Connor M. F., Hayataka K., Colson N., Medora R., Russo E. B. y Parker, K. K. (1997). Activity of Parthenolide at 5HT_{2A} receptors. *J Nat Prod*, 60:651-653.

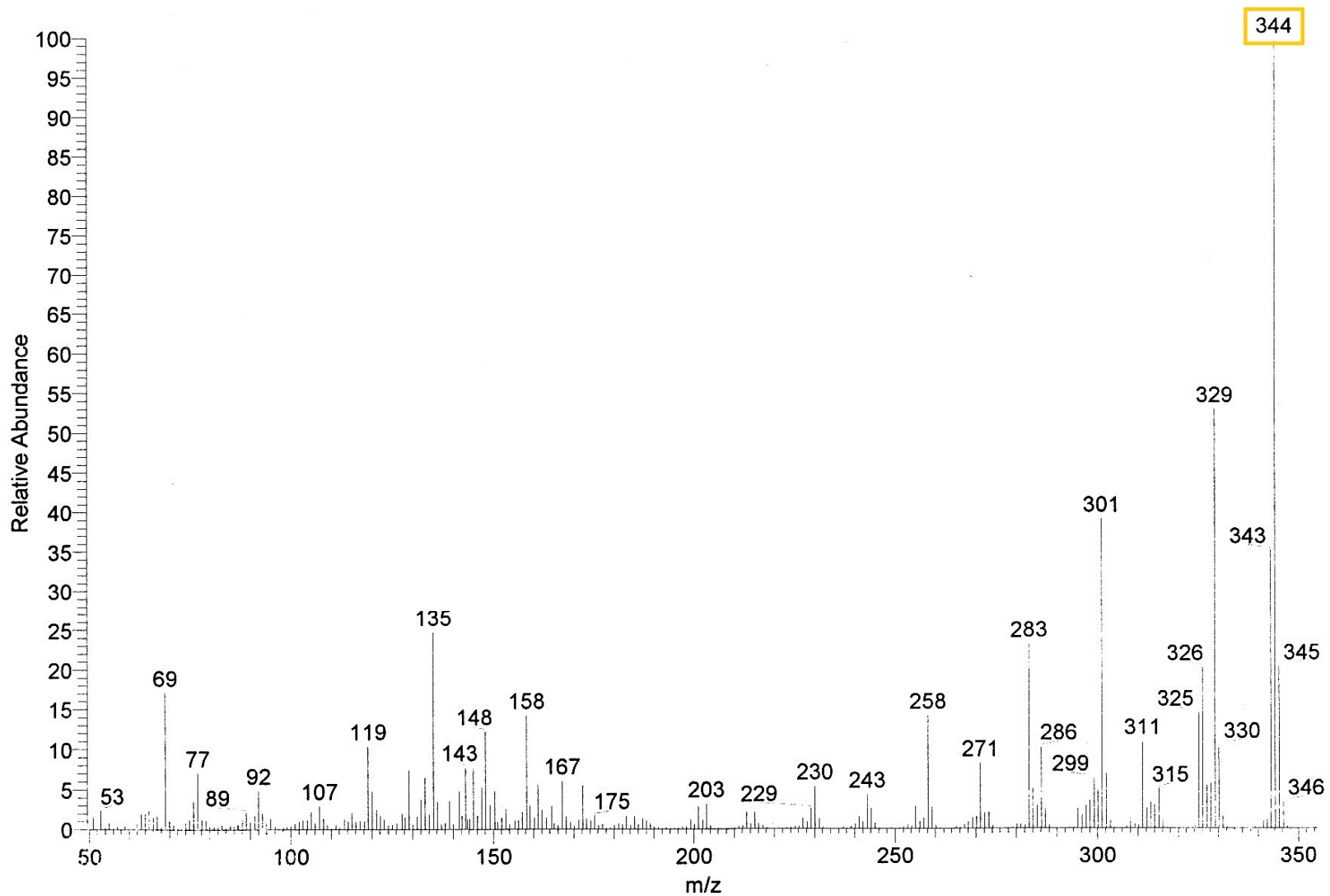
Weber D. S. y Webb R. C. (2001). Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor. *Pharmacology*.63:129-133.

Williams C. A., Houlst J. R. S., Harborne J. B., Geenham J. y Eagles J. (1995). A biological active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*.38:267-270.

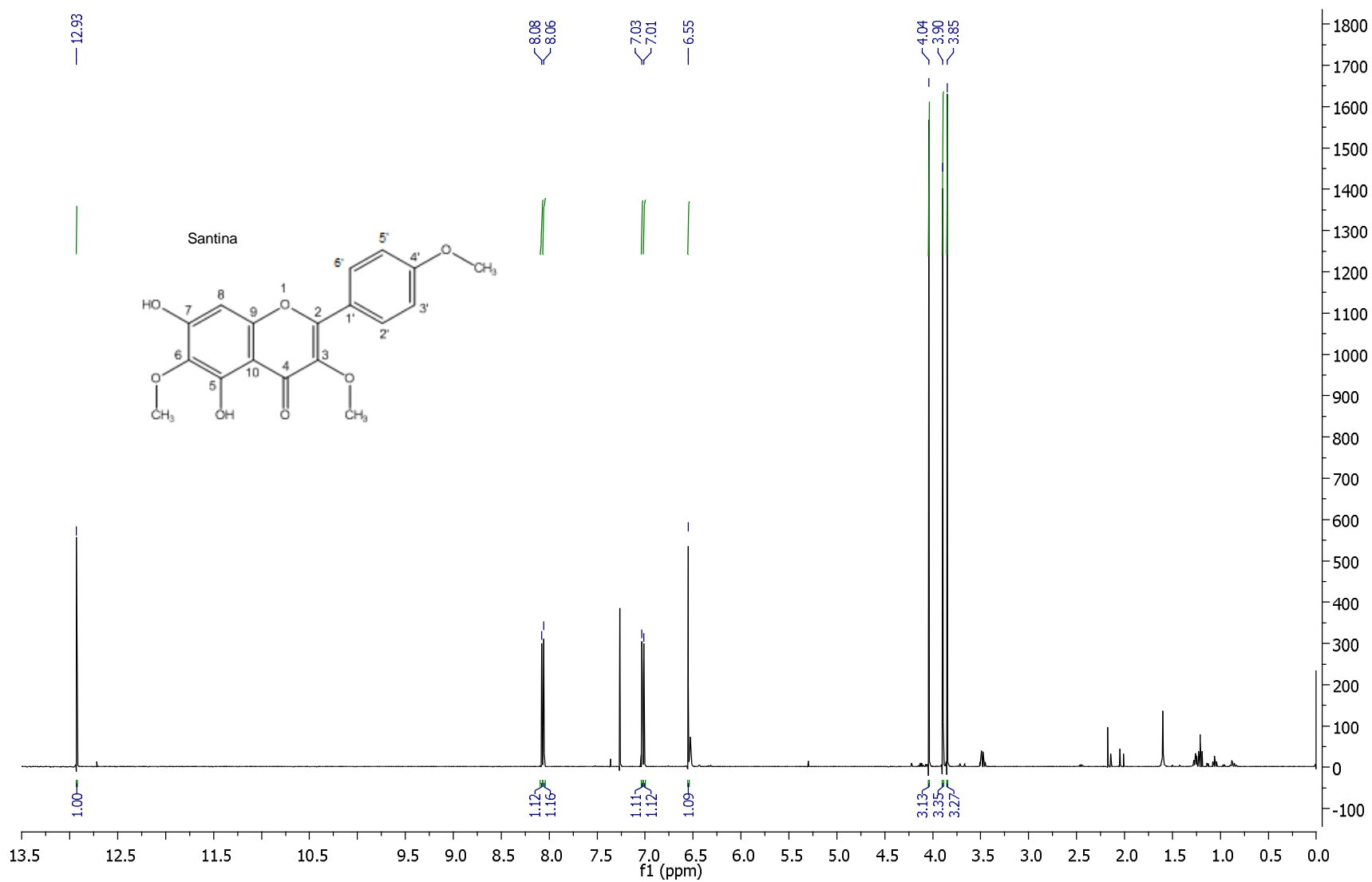
Williams C. A., Harborne J. B., Geiger H. y Houlst J. R. S. (1999). The favonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-infammatory properties. *Phytochemistry*.51:417-123.

Zhao X. P., Lu L., Hu B. y Wang S. F. (2012). [Screening and identifying hepatotoxic components in Aucklandiae Radix with GC-MS]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*.41:43-46.

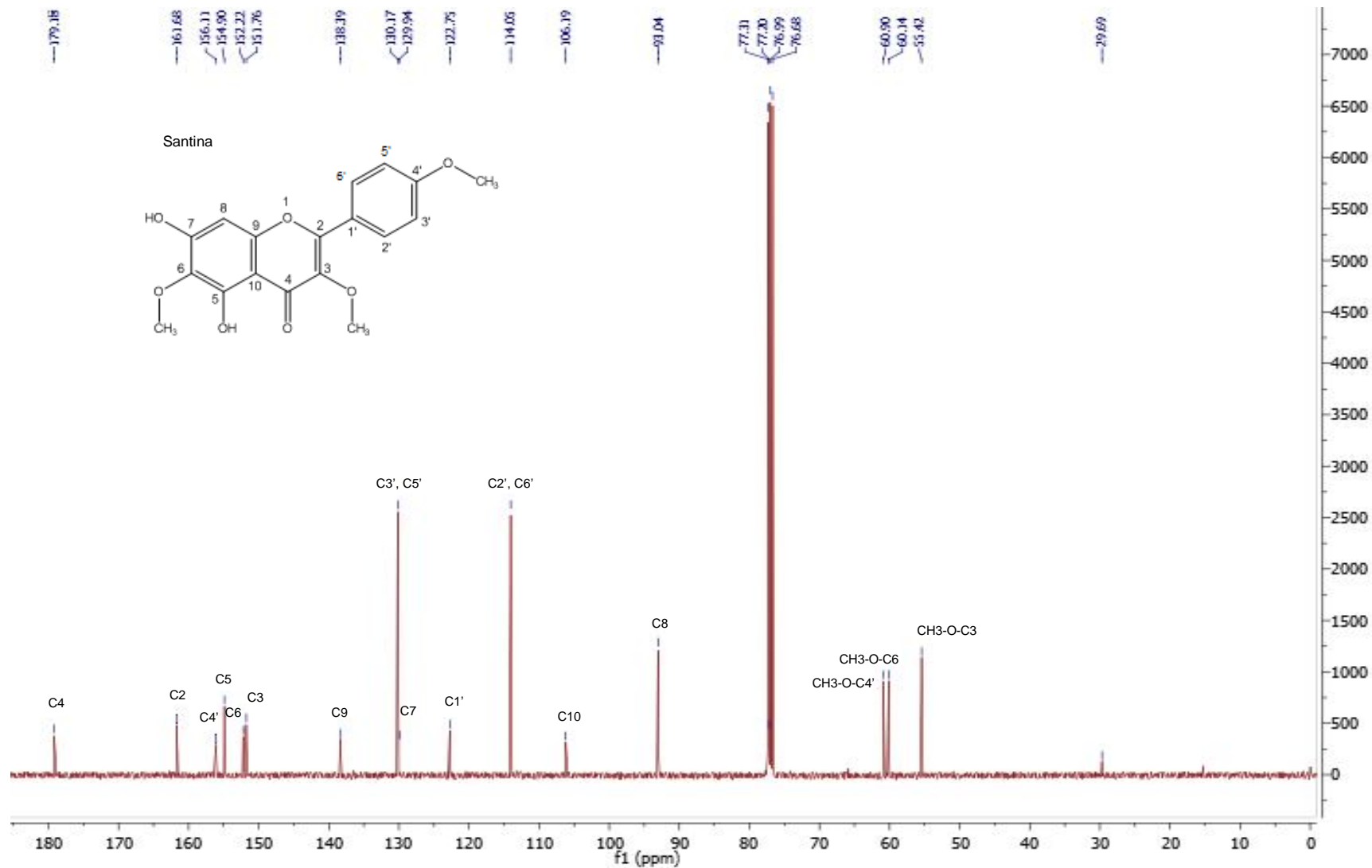
ANEXOS



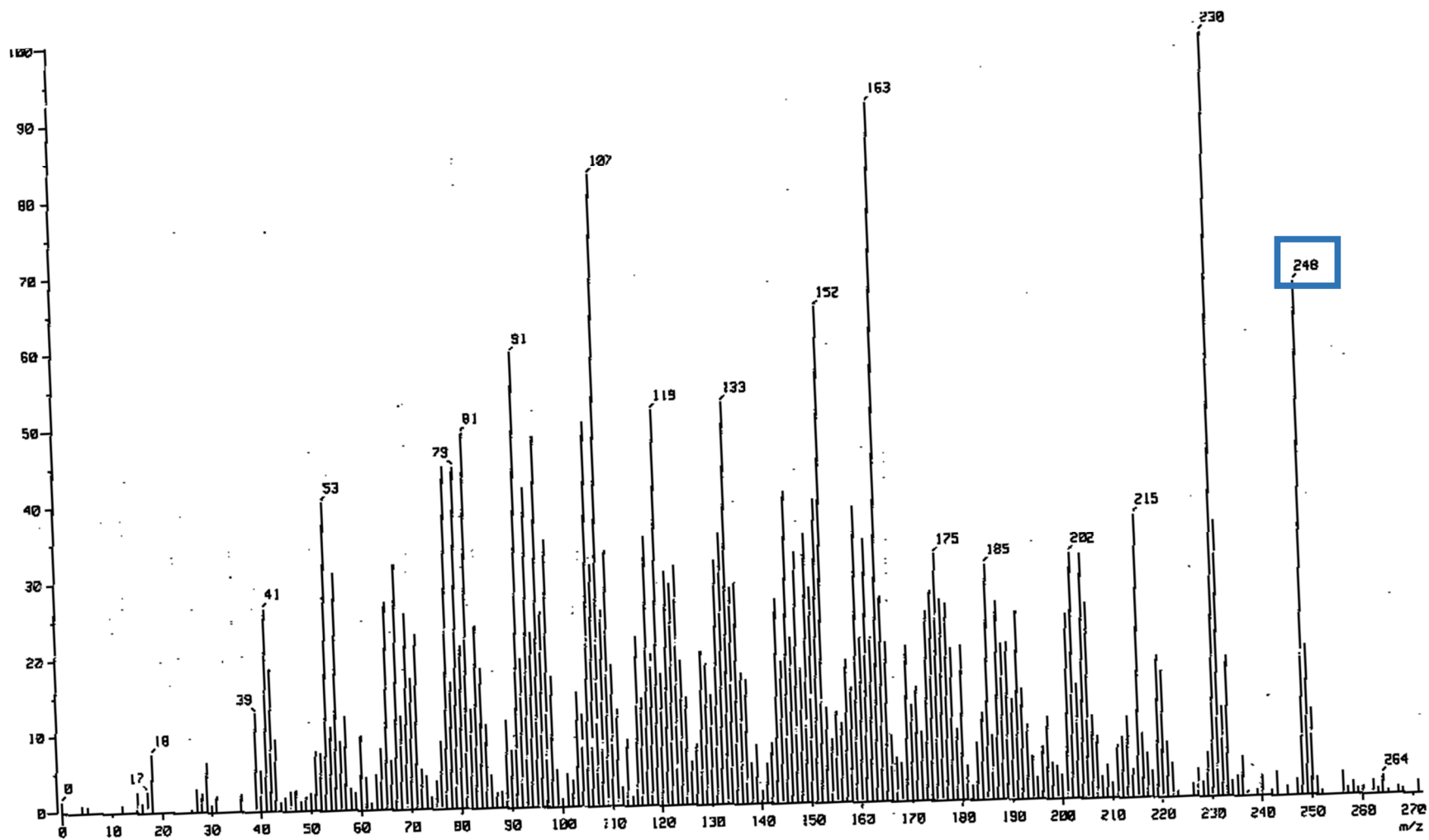
Anexo 1. Espectrometría de Masas (Impacto Electrónico/Introducción Directa) de la mezcla de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona. En el recuadro se muestra el ión molecular.



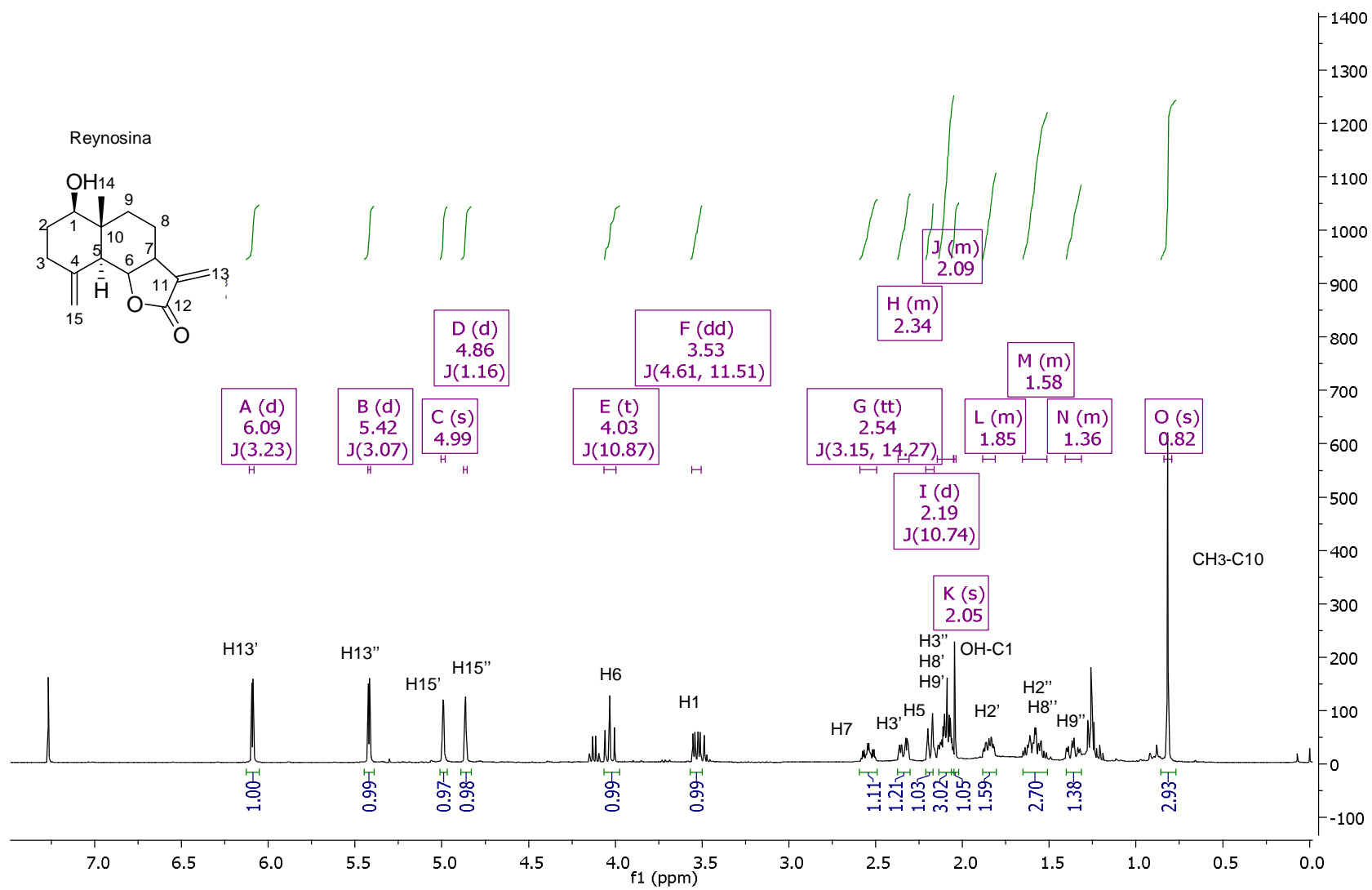
Anexo 2. Espectro de RMN ¹H (400MHz/CDCl₃) de la mezcla de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona. δ 6.55, H8 de la santina.



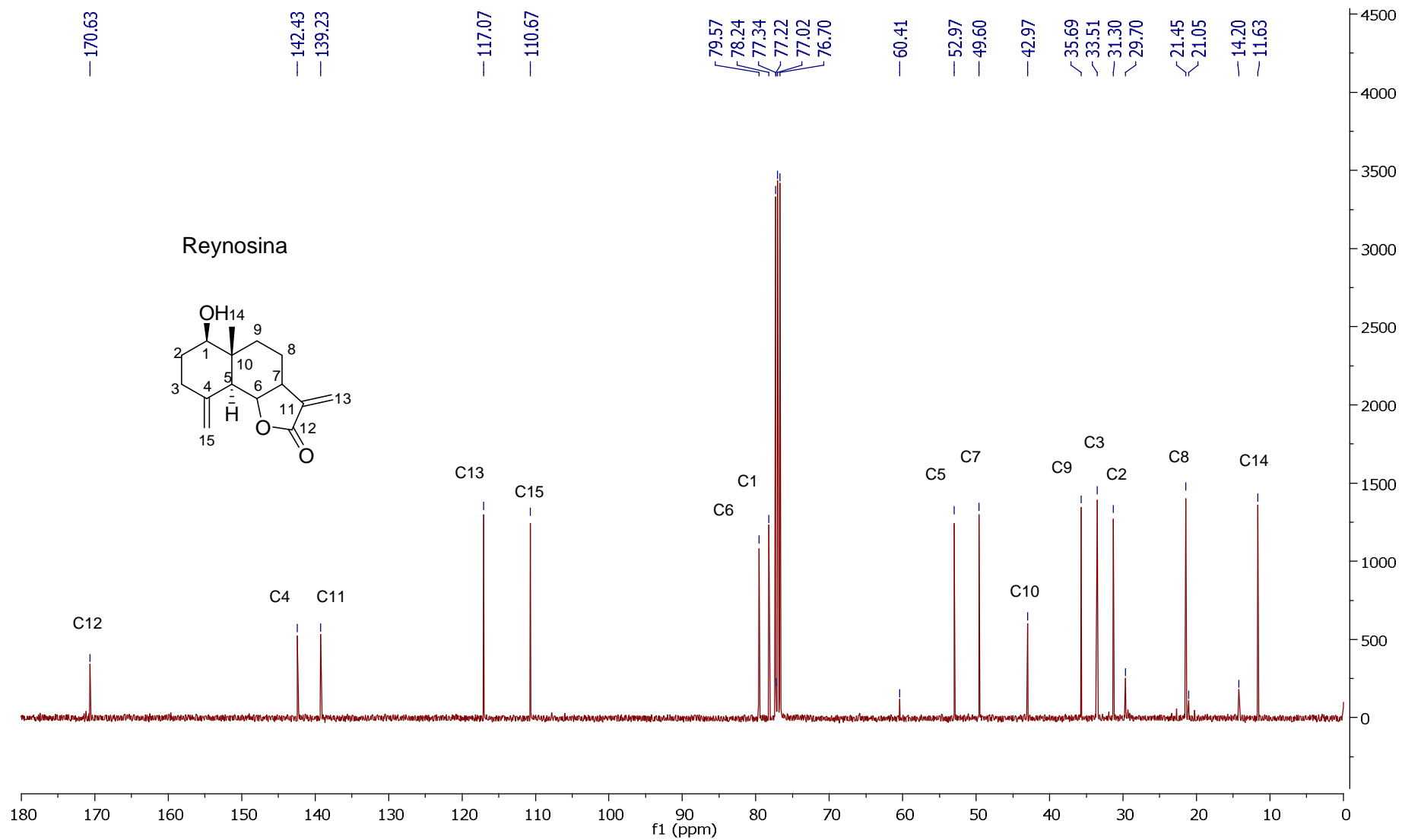
Anexo 3. Espectro de RMN ¹³C (400MHz/CDCl₃) de la mezcla de santina y 5,6-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona. Desplazamientos de carbonos asignados a santina.



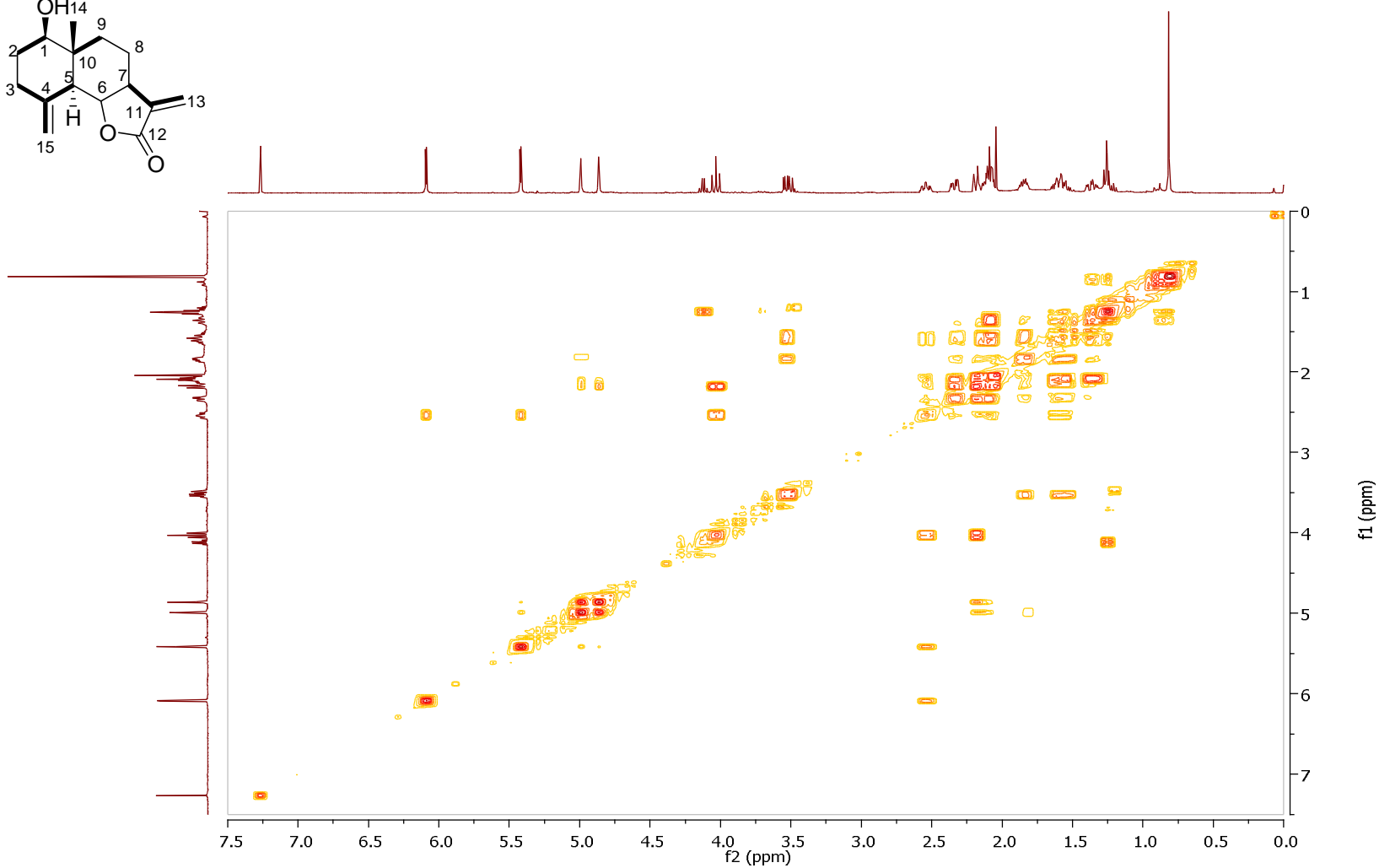
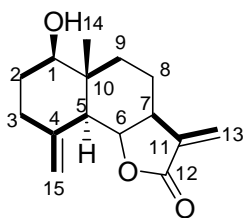
Anexo4. Espectrometría de Masas (Impacto Electrónico/Introducción Directa) de la resosina. En el recuadro se muestra el ión molecular.



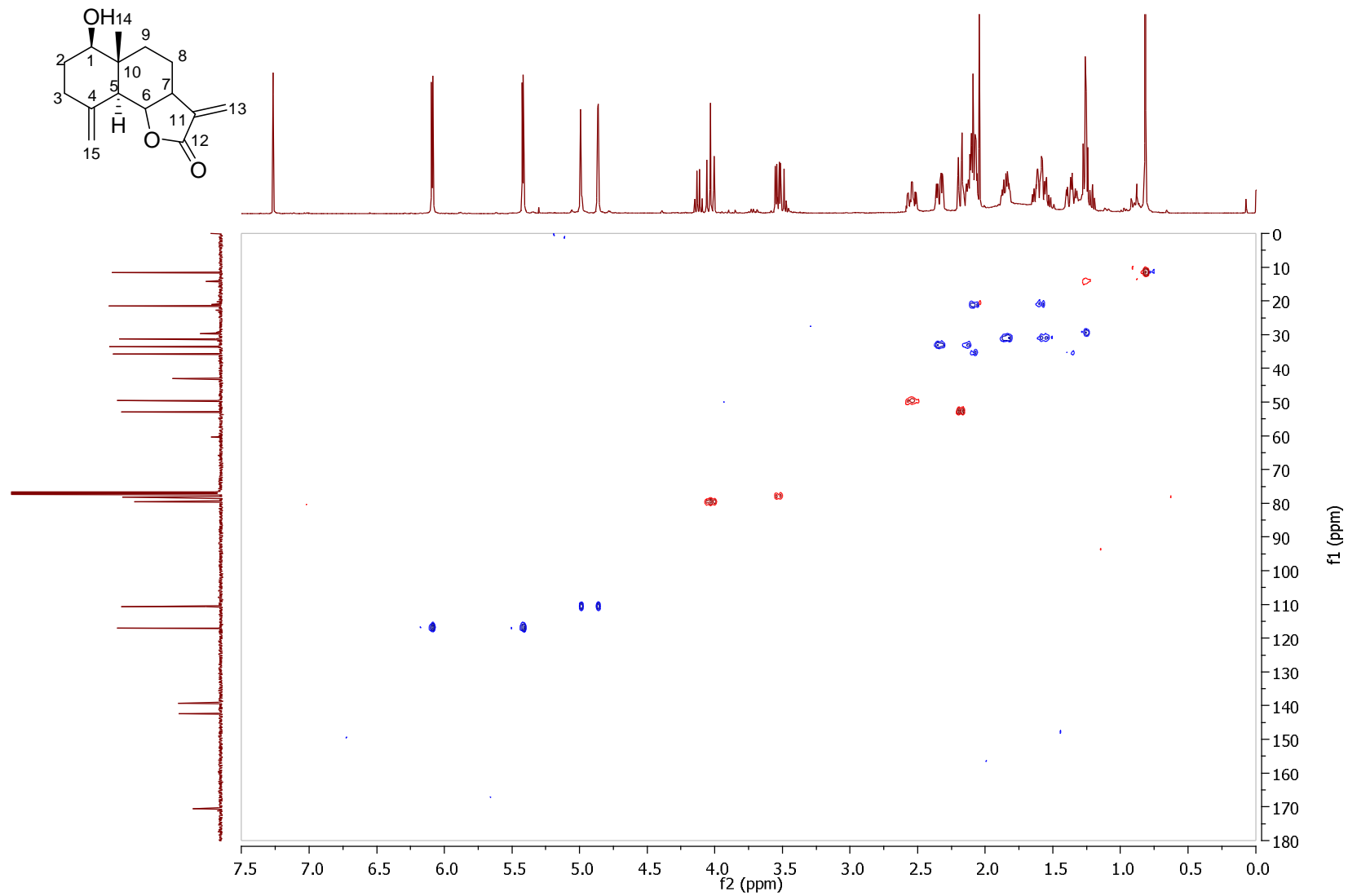
Anexo5. Espectro de RMN ¹H (400MHz/CDCl₃) de la reynosina.



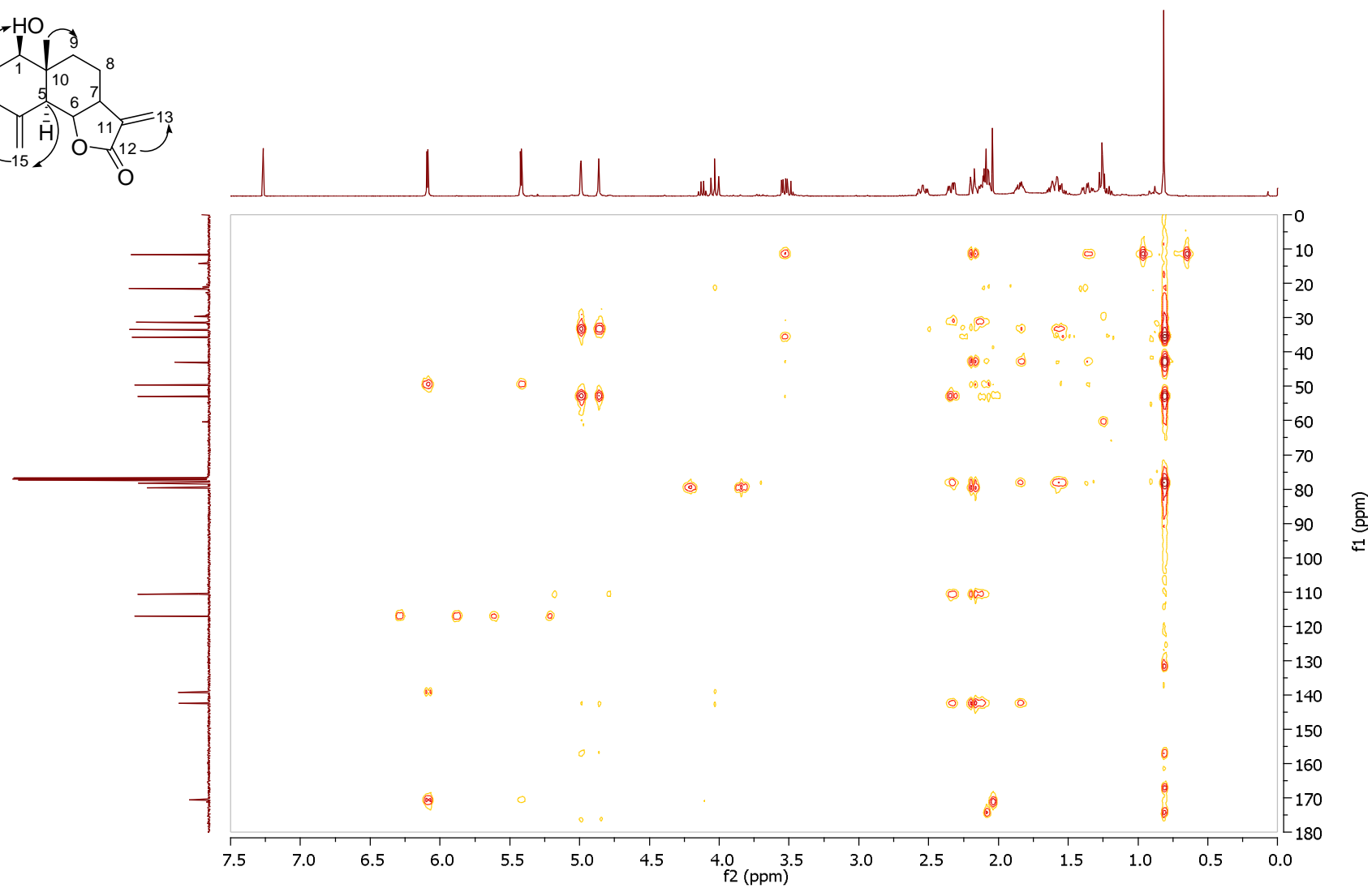
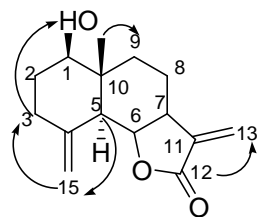
Anexo6. Espectro de RMN ¹³C (400MHz/CDCl₃) de la reynosina.



Anexo 7. Espectro de RMN COSY (acoplamiento H-H) de la reynosina (400MHz/CDCl₃).



Anexo 10. Espectro de RMN HSQC (acoplamiento C-H a un enlace) de la reynosina (400MHz/CDCl₃).



Anexo 8. Espectro de RMN HMBC (acoplamiento C-H a múltiples enlaces) de la reynosina (400MHz/CDCl₃).

