



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Chamaecyparis lawsoniana*
SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO Y
AORTA DE RATA INDUCIDO POR DIFERENTES AGONISTAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Jordy Aguilar Morales

DIRECTOR DE TESIS

Edgar Flores Soto

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021





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: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: Ruth Bustamante García

SECRETARIO: Edgar Flores Soto

1er. SUPLENTE: Daniela Rebollar Ramos

2° SUPLENTE: Edgar Ricardo Vázquez Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, FACULTAD DE MEDICINA,
UNAM**

ASESOR DEL TEMA: Dr. Edgar Flores Soto

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Héctor Solís Chagoyan

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: Jordy Aguilar Morales

(Nombre y firma)

Contenido	
Listado de abreviaturas	4
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCION	8
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i> (CL)	9
Músculo liso.	13
Mecanismos que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ y llevan a la contracción.....	15
Acople farmacomecánico: contracción del MLVA vía receptores metabotrópicos.	16
Acople electromecánico: contracción del MLVA inducida por despolarización de la membrana plasmática.	17
Mecanismo de relajación del músculo liso.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	20
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS	20
General.....	20
Particulares	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Recolección de la Planta	21
Procedimiento de la Extracción Metanólica.....	21
Sistema de registro de órganos aislados.	22
Patch Clamp	24
Técnicas en la fijación de voltaje	24
Registros de la actividad eléctrica en célula completa.....	26
FÁRMACOS	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
BILBIOGRAFÍA	46

Listado de abreviaturas

2-Aminoetoxidifenil borato	2-APB	Gramo	g
Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina-metasulfónico	HEPES	Hidróxido de cesio	CsOH
Ácido Etilendiaminotetraacético	EDTA	Histamina	HIS
ATPasa de calcio de membrana plasmática	PEMCA	Intercambiados sodio calcio	NXC
ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico	SERCA	Interleucina 6	IL6
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Ion bario	Ba ²⁺
Cadena ligera de miosina	CLM	Ion calcio	Ca ²⁺
Calcio intracelular	[Ca ²⁺] _i	Ion potasio	K ⁺
Calcio intracelular basal	(b[Ca ²⁺] _i)	Ion sodio	Na ⁺
Carbacol	CCH	Kilogramo	Kg
Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L	CCDV-L	KiloHertzio	KHz
Canal operado por el almacén	SOC	Litro	L
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	CL	Medio esencial mínimo	MEM
Cinasa de cadena ligera de miosina	MLCK	Mega ohmios	MΩ
Cinasa de RhoA	ROCK	Micromolar	μM
citocromo oxidasa	COX	Milimolar	mM
Cloruro de bario	BaCl	Músculo liso de vías aéreas	MLVA
Cloruro de calcio	MgCl ₂	Nanomolar	nM
Cloruro de Magnesio	CaCl ₂	Organización mundial de la salud	OMS
Cloruro de potasio	KCl	Óxido nítrico sintasa	iNOS
Cloruro de sodio	NaCl	Oxígeno diatómico	O ₂
Diacilglicerol	DAG	Picofaradio	pF
Dióxido de carbono	CO ₂	Potencial de Hidrógeno	pH
Difosfato de adenosina	ADP	Proteincinasa C	PKC
Difosfato de guanosina	GDP	Receptor acoplado a proteína G	GPCR
Dosis letal 50	DL50	Receptor de IP3	RIP ₃

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	EPOC	Revoluciones por minuto	rpm
Epinefrina	EPI	Canales catiónicos inespecíficos	ROC
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF- α	Sulfato de magnesio	MgSO ₄
Factor nuclear kB	NF-Kb	Tetraetilamonio	TEA
Fosfatasa de cadena ligera de miosina	MLCP	Trifosfato de adenosina	ATP
Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato	PIP2	Trifosfato de adenosina de sodio	ATP Na ⁺
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	Trifosfato de guanosina	GTP
Fosfolipasa C beta	PLC β	Trifosfato de inositol	IP3
Grado centígrado	°C	Voltio	V

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<i>C. lawsoniana</i> Imagen tomada (Menéndez Valderrey, 2017)	11
2	Foto del vale registrado en el herbario nacional (original)	11
3	Músculo liso vascular	13
4	Músculo liso traqueal	13
5	Acoples excitación contracción farmacomecánico / electromecánico	18
6	Proteínas que mantienen los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$	19
7	Registros originales del vehículo	29
8	Efecto del Extracto metanólico de <i>C. lawsoniana</i> sobre la contracción inducida por KCl y TEA en el músculo liso traqueal de Cobayo.	31
9	Efecto del Extracto metanólico de <i>C. lawsoniana</i> disminuyendo significativamente la contracción inducida por la histamina en los anillos traqueales de cobayo.	33
10	Las contracciones traqueales inducidas por carbacol no se modifican por la adición de <i>C. lawsoniana</i> en la respuesta máxima o por la pre incubación de <i>C. lawsoniana</i> .	35
11	Efecto del extracto de <i>C. lawsoniana</i> dependiente de la concentración disminuye las contracciones inducidas por KCl y Epinefrina.	37
12	Efecto del extracto metanólico de <i>C. lawsoniana</i> sobre las corrientes de Ca^{2+} (CCDV-L) en los miocitos aórticos y traqueales.	39

RESUMEN

La familia Cupressaceae incluye 12 especies que se consideran arboles medicinales, sus aceites esenciales se utilizan como terapia alternativa o coadyuvante para el dolor de cabeza, los resfriados, la tos y la bronquitis. La *Chamaecyparis lawsoniana* (*C. lawsoniana*) pertenecen a la familia Cupressaceae y son comúnmente encontrados en zonas urbanas. Se evaluó el efecto del extracto metanólico de *C. lawsoniana* en músculo liso vascular de rata y traqueal de cobayo; el extracto se obtuvo por maceración de hojas de *C. lawsoniana* en proporción de peso a volumen de 1: 3 con metanol absoluto para obtener un extracto crudo, este extracto metanólico fue empleado en órganos aislados utilizando anillos traqueales de cobayo, lo cuales se contrajeron con cloruro de potasio 60 mM, tetraetilamonio 10 mM, histamina 10 μ M y carbacol 1 μ M y en anillos aórticos de rata que se contrajeron con epinefrina 1 μ M. Una vez que se alcanzó la contracción máxima, se añadió extracto de *C. lawsoniana* a las cámaras de baño de órganos de 5 mL hasta una concentración final de 9.32, 18.75, 37.5, 75 o 150 μ g/mL. El bloqueo de *C. lawsoniana* sobre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L se estudiaron en miocitos traqueales y aórticos a través de la técnica de Patch Clamp. Todas las concentraciones usadas del extracto metanólico de *C. lawsoniana* disminuyeron las contracciones traqueales inducida por cloruro de potasio, tertaetilamonio e histamina, pero no por carbacol. En la aorta, *C. lawsoniana* exhibió un efecto relajante sobre cloruro de potasio y contracciones inducidas por epinefrina y en miocitos traqueales y aórticos, la *C. lawsoniana* disminuyo significativamente las corrientes de calcio del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L.

INTRODUCCION

El uso tradicional de productos botánicos como medicina alternativa o terapia paliativa para el tratamiento de diversas enfermedades, sigue siendo una fuente de conocimiento farmacológico nuevo y valioso. Aunque las plantas pueden representar un peligro potencial para la salud, las que se usan en las prácticas de medicina tradicional pueden ser efectivas, menos tóxicas y de bajo costo (Organización Mundial de la Salud, 2004). Los Medicamentos alternativos para el tratamiento de enfermedades bronquiales y vasculares, se han convertido en área de oportunidad por su bajo costo y generar la idea, a veces equivocada, de no contener ninguna sustancia “artificial” existe una tendencia mundial a volver a las plantas medicinales tradicionales para tratar diversas patologías

Recientemente ha sido reportado por varios grupos de investigadores que en las grandes ciudades y zonas urbanas a menudo se relaciona la contaminación ambiental con la dificultad respiratoria y problemas cardiovasculares (Trnjar et al., 2017; Bai et al., 2018; Honda et al., 2018; An et al., 2018), pero también, se ha asociado de forma positiva que las caminatas periódicas que se realizan en los bosques y parques de estas ciudades podrían reducir significativamente la presión arterial (B. J. Park et al., 2010; Q. Li et al., 2011) y facilitar la función respiratoria (Lee y Lee, 2014). Esto, debido a mecanismos benéficos para la salud, como la respiración de los aceites volátiles esenciales de los árboles (Ohtsuka, Yabunaka y Takayama, 1998). Se ha demostrado que la inhalación de "aceites esenciales" obtenidos de *Juniperus Virginiana*, un miembro de la familia *Cupressaceae*, actúa regulando el sistema nervioso autónomo, función del sistema independientemente

de la vía sensorial olfativa (Dayawansa et al., 2003; Umeno et al., 2008). A este respecto, muchos miembros de esta familia botánica son ampliamente explorados por sus propiedades fitofarmacológicas. Por ejemplo, los estudios de *Cupressus sempervirens* señalan que sus hojas secas se pueden emplear para aliviar el dolor de estómago, así como para tratar la diabetes, y sus frutos secos se pueden usar como antiinflamatorios y para aliviar el dolor de muelas y la laringitis, así como un anticonceptivo y un astringente (Mascolo et al., 1987). El género *Chamaecyparis*, otro miembro de la familia *Cupressaceae*, comprende ocho especies de coníferas de madera y ornamentales de hoja perenne y existen pocos estudios que evalúan el potencial fitofarmacológico de este género. Hasta ahora se ha reportado que algunos compuestos activos del extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* como los terpenos, terpinen-4-ol, α -terpineol, sabineno, alcanfor, el δ -cadineno, el α -pineno, podrían ser los responsables del bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (CCDV-L), no obstante, la posible actividad de este género en células musculares lisas vasculares y el musculo liso traqueal no ha sido evaluado (Tucker & Karchesy, 2000; Emami et al., 2009; Maia-Joca et al., 2014; Santos et al., 2011).

***Chamaecyparis lawsoniana* (CL)**

Chamaecyparis spp. son plantas perennes nativas de América del Norte y Asia oriental y las especies más grandes, el ciprés de Lawson, el cedro de Port Orford o el pino de jengibre (*C. lawsoniana*) pueden tener hasta 60 m (200 pies) y aproximadamente 2 m (70 pulgadas) de diámetro. Las hojas son escamosas de 3–

5 mm de largo, opuestas en pares, estrechamente adheridos a las ramillas, con estrechas marcas blancas en la parte inferior, las hojas laterales son mucho más largas que las hojas faciales. Las flores son monoicas, diminutas, en los extremos de las ramillas. Los conos femeninos son globosos, verdes al principio, pero se vuelve marrón cuando madura, unos 8 mm diámetro, con 6–10 escalas, cada una de las cuales tiene 2–5. Crece en el suroeste de Oregón y el norte de California y es apreciado principalmente por su madera picante aceitosa (Ohmann, 1984). Esta especie se introdujo en México, donde está bien adaptada y se cultiva como árbol de navidad y con fines ornamentales, las zonas de producción de ciprés de Lawson se encuentran en el estado de Puebla principalmente en la parte sur del municipio de Xicotepec, debido a que las condiciones de clima son favorables para este tipo de coníferas. La recolección se realiza en los meses de noviembre a diciembre (invierno) a fin de contar con plantas vigorosas, debido a que las condiciones climáticas son las necesarias para su desarrollo. (Hernández, 2006).

Los principales componentes de las Hojas de *C. Lawsoniana* en aceites esenciales son: Terpinen-4-ol, Sabinene, alcanfor, Citronelol, γ -terpineno, diterpenos, Ferruginol, Pisiferol y su epímero 5-episiferol, formosanoxide, ácido transcomunicado, torulosal, sesquiterpeno acetato de oplopanonilo y la germacrano 4b-hidroxigermacra-1 (10) -5-dieno (Rastogi *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 2007).



Fig. 1 *C. lawsoniana* Imagen tomada (MENÉNDEZ VALDERREY, 2017)



Fig. 2 Foto del vale registrado en el herbario nacional (ORIGINAL)

La *C. lawsoniana* (Fig. 1 y 2) es empleada en medicina tradicional, aunque ha sido muy poco reportada, en la literatura homeopática se ha utilizado clínicamente para tratar el dolor severo en el estómago, cicatrices queloides, tumores, lipoma de muslo, verrugas, y también tiene efectos antioxidantes, propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas. (Baburaj *et al.*, 2010)

Otra especie de *Chamaecyparis Obtusa* reduce la producción de prostaglandina E2 y expresión de TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) y COX2mRNA (RNA mensajero de la ciclooxigenasa 2) en las células mononucleares de sangre

periférica estimuladas por lipoproteínas en ratas. El β -Thujaplicin, un activo constituyente de *Chamaecyparis Obtusa*, inhibe la producción de PGE₂, IL-6 (interleucina 6) y TNF- α , así como la expresión de iNOS (óxido nítrico sintasa), COX2 y NF- κ B (Factor nuclear κ B). Estos efectos antiinflamatorios de *Chamaecyparis Obtusa* pueden brindar oportunidades para el desarrollo de un nuevo fitofármaco coadyuvando a procesos fisiopatológicos. (Lim et al., 2015).

No obstante, el poco conocimiento de las actividades Fito-farmacológicas de *C. lawsoniana* y dado que ha sido utilizado en medicina tradicional en otros procesos patológicos, es importante indagar en las células musculares lisas vasculares y el músculo liso traqueal, lo cual podría facilitar nuevas alternativas Fito-terapéuticas para la relajación de ambos músculos.

A continuación, se describe aspectos generales del músculo liso y los mecanismos de la contracción de los músculos lisos (vascular y traqueal).

Músculo liso.

MUSCULO LISO VASCULAR



Fig. 3 Músculo liso vascular

Imagen tomada de (Torres, 2019)

MUSCULO LISO TRAQUEAL

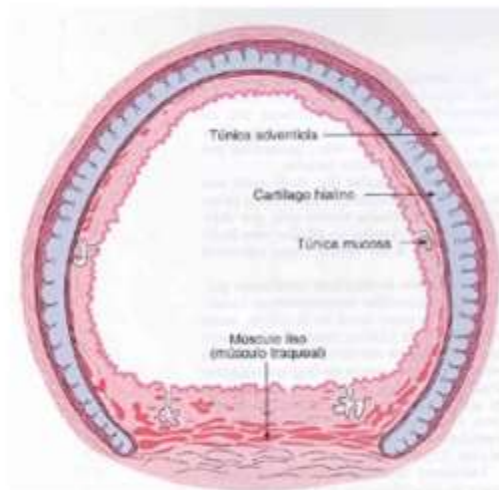


Fig. 4 Músculo liso traqueal

Imagen tomada de (Kasjan, 2013)

Las capas de células musculares lisas conforman las paredes de numerosos órganos y tubos en el organismo, incluyendo los vasos sanguíneos y la tráquea (Fig. 3 y 4).

Las células musculares lisas vasculares carecen del patrón estriado en bandas que se observa en el músculo cardíaco y el esquelético. Reciben inervación neural del sistema nervioso autónomo. El fenotipo contráctil del músculo liso está bajo control neurogénico y hormonal, capaces de actuar mediante mecanismos autocrinos o paracrinos. Las células musculares lisas vasculares pueden desarrollar contracciones tónicas y fásicas en respuesta a cambios físicos y químicos, estas células utilizan la interacción actina-miosina para desarrollar la contracción, donde

iones de calcio son responsables del inicio de la contracción. Sin embargo, el control de la actividad contráctil varía considerablemente en los diferentes tipos de músculos, dependiendo de su función y localización. La principal función del músculo liso vascular es la regulación de la presión arterial, la cual depende de la fuerza impulsora del gasto cardíaco y el tono vascular (Federico Renna and Miguel Miatello, 2013).

El músculo liso de las vías aéreas (MLVA) tiene características estructurales especializadas, que junto con sus mecanismos de regulación son la base para una función respiratoria normal. Se extiende a lo largo de la tráquea, se bifurca en bronquios primarios, derecho e izquierdo, y que se dirigen a los pulmones respectivos; éstos se dividen repetidas veces, asemejando un árbol invertido, por lo que suele llamarse árbol traqueobronquial. Se pueden diferenciar dos tipos de contracciones: las contracciones fásicas espontáneas, que son únicamente evidentes en el periodo embrionario (en el útero) y están implicadas en el desarrollo de las vías respiratorias; y las contracciones tónicas, siendo las respuestas a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos a lo largo de la vida del individuo, su efecto es sobre el calibre de las vías respiratorias, la regulación del flujo de aire, y en los reflejos protectores. (Lam, Lamanna and Bourke, 2019)

El músculo liso en reposo, es el equilibrio que existe entre la contracción y la relajación, lo cual permite un tono de tensión basal. La concentración de Ca^{2+} basal intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) es alrededor de 100-150 nM (nanomolar), (Bianca Bazán-Perkins et al., 2003; Carbajal et al., 2005; Flores-Soto et al., 2017; Flores-Soto et

al., 2013; Montaña & Bazán-Perkins, 2005; Montaña et al., 2011). El músculo liso es activado cuando la concentración citosólica del ion Ca^{2+} se incrementa por la liberación desde el retículo sarcoplásmico, así como por la entrada desde el espacio extracelular a través de diferentes canales o receptores, se inicia el fenómeno de la contracción (Flores-Soto et al., 2017; Flores-Soto et al., 2013).

Mecanismos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y llevan a la contracción.

Existen dos fuentes de Ca^{2+} para aumentar las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y son las siguientes: **1)** El retículo sarcoplásmico, es el reservorio más importante de Ca^{2+} . En su interior, el Ca^{2+} alcanza concentraciones de 5-10 mM, contrastando con los 100-150 nM del medio citoplasmático. La liberación de este ion se inicia por la activación del receptor de trifosfato de inositol (IP_3) y del receptor de rianodina. **2)** La otra fuente es el Ca^{2+} extracelular que ingresa al interior de la célula a través de diferentes canales membranales tales como: los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), los canales regulados por el receptor o canales catiónicos inespecíficos (ROC), y los canales de entrada capacitativa u operados por el retículo sarcoplásmico (SOC).

En el músculo liso se han descrito dos mecanismos de acople excitación/contracción (Figura 5), uno fármaco-mecánico y otro electromecánico. (Janssen *et al.*, 2001)

Acople fármaco-mecánico: contracción del músculo liso de vías aéreas (MLVA) vía receptores metabotrópicos.

Este acople se da por la unión de agonistas broncoconstrictores (acetilcolina, histamina, bradicinina, leucotrienos, sustancia P, ATP, serotonina, etc) con sus receptores de membrana acoplados a la proteína G trimerica (GPCR, por sus siglas en inglés) que, después de la unión al agonista, se separa en subunidades α y $\beta\gamma$ mediante intercambio de nucleótidos desde la subunidad α desde difosfato de guanosina (GDP, inactivo) a trifosfato de guanosina (GTP, activo). La subunidad $Gq\alpha$ activa, promueve la activación de la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$) que hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2), formando dos mediadores intracelulares o segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El DAG permanece embebido en la membrana plasmática y ejerce diferentes efectos celulares: puede activar ácido araquidónico o bien activar a la cinasa de proteína C (PKC, llamada así por su dependencia al Ca^{2+}), ambos procesos activan otras cascadas de señalización (Janssen *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2001). Por otra parte, el IP_3 se acopla a sus receptores (RIP_3) que están situados en la membrana del retículo sarcoplásmico, promoviendo la liberación de Ca^{2+} generando la formación del complejo Ca^{2+} -Calmodulina y la fosforilación de la CLM en la serina 19 (ser 19). La miosina fosforilada cataliza, en presencia de actina, la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín difosfato (ADP) y la liberación de energía posibilita el desplazamiento de los filamentos de actina a lo largo de la miosina, iniciando el proceso de contracción muscular (Janssen *et al.*, 2004; Horowitz *et al.*, 1996; Bazán-Perkins, *et al.*, 1998; Montaña & Bazán-Perkins, 2005; Somlyo &

Somlyo, 2003; Sue-Goo, 2001; Bonner, 1984; Berridge, Bootman and Roderick, 2003; Berridge, 2016)

Acople electromecánico: contracción del MLVA inducida por despolarización de la membrana plasmática.

La membrana plasmática del MLVA tiene un potencial de reposo de -60 mV, el cambio en el potencial de membrana debido al movimiento o entrada de iones hacia el espacio intracelular (principalmente del ion sodio, Na⁺) provoca la despolarización. El potencial de membrana toma valores menos negativos (más positivos) (Janssen, L. J., Hague, C. and Nana, R. ,1998)

El acople opera a través de cambios en el potencial de membrana plasmática producidos por cambios químicos (altos niveles del ion potasio, K⁺) o eléctricos (pulsos despolarizantes). La despolarización genera la apertura de los canales de Ca²⁺ tipo L dependientes de voltaje (CCDV-L), permitiendo un incremento en la [Ca²⁺]_i formando el complejo Ca²⁺/calmodulina, lo que lleva al proceso de relleno de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico y contracción (Montaño, Barajas-Lopez and Daniel, 1996; Flores-Soto *et al.*, 2013).

Acoples excitación-contracción farmacomecánico/ electromecánico

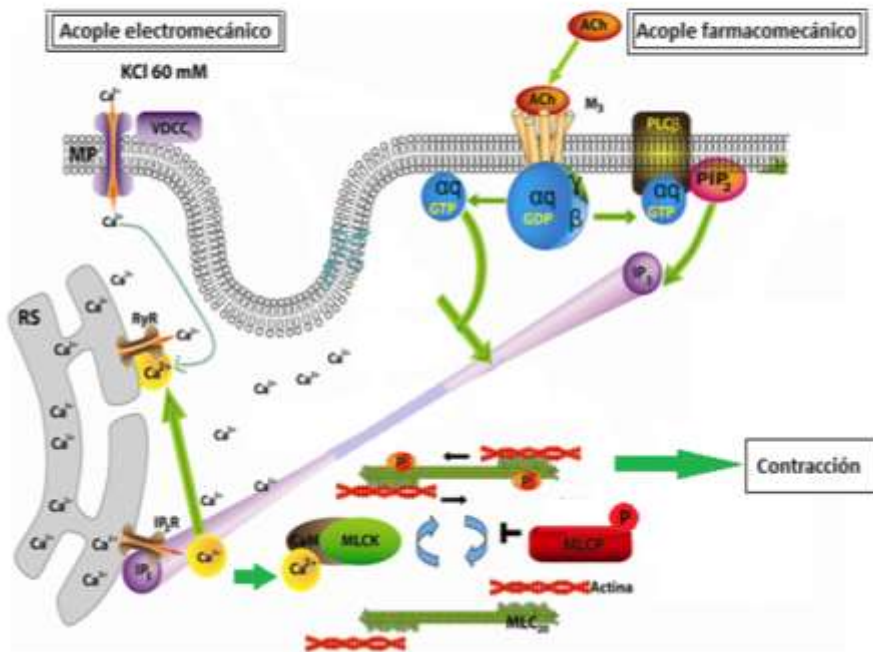


Fig.5 Acoples excitación contracción farmacomecánico / electromecánico realizada por el equipo de investigación en asma (Flores Soto Edgar y Montañó Ramírez Luis Manuel).

Mecanismo de relajación del músculo liso.

La relajación del músculo liso se produce como resultado de la separación del estímulo contráctil o por la acción directa de un fármaco que estimula la inhibición del mecanismo contráctil (por ejemplo, el salbutamol). Independientemente, la disminución $[Ca^{2+}]_i$ a niveles basales inactiva ROCK, permitiendo que la MLCK desfosforile a la cadena ligera de la miosina y el músculo se relaje.

Existen al menos tres transportadores responsables de mantener las $[Ca^{2+}]_i$ en alrededor de 100 nM: 1) la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) que funciona transportando Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular; 2) la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (SERCA) que transporta Ca^{2+} del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico. Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico y 3) el intercambiador Na^+/Ca^{2+} en su fase normal (NCX), cuya función principal es sacar Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir Na^+ del espacio extracelular al citoplasma como se muestra en la Fig. 6. Por otro lado, las proteínas que aumentan las $[Ca^{2+}]_i$ se encuentra bloqueadas o inactivas. Ejemplo; RIP3, SOC, ROC, CCDV-L. Bajo este contexto general, la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ (calcio intracelular) genera la relajación del músculo liso.

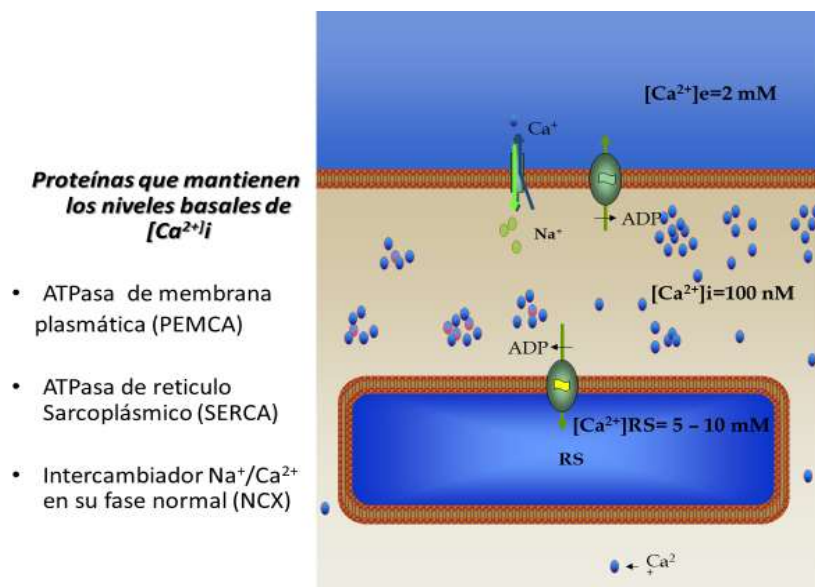


Fig.6 Proteínas que mantienen los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ realizada en el laboratorio de investigación en asma (Flores Soto Edgar y Montaña Ramírez Luis Manuel).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El uso tradicional de productos botánicos como medicina alternativa o como coadyuvante para el tratamiento de diversas enfermedades sigue siendo una fuente de nuevos y valiosos conocimientos farmacológicos. Por lo tanto, es de suma importancia observar los efectos fitofarmacológicos del extracto de *C. lawsoniana*, como una posibilidad en la relajación del músculo liso coadyuvando al proceso respiratorio e hipertensión arterial.

HIPOTESIS

La contracción del músculo liso traqueal y vascular inducido por diversos agonistas, es bloqueado por el extracto metanólico de *C. lawsoniana* induciendo la relajación vía el bloqueo de los CCDV-L.

OBJETIVOS

General

Determinar si el extracto metanólico de *C. lawsoniana* induce la relajación del músculo liso vascular de rata y del músculo liso traqueal de cobayo contracturado previamente por cloruro de potasio, tetraetilamonio, epinefrina, histamina y Carbacol.

Objetivos particulares

Obtener el extracto de las hojas secas a base de metanol.

Caracterizar la relajación del músculo liso traqueal y de aorta con el extracto *C. lawsoniana*.

Determinar si el extracto de *C. lawsoniana* bloquea las corrientes de Ca^{2+} tipo L dependientes del voltaje (CCDV-L) mediante electrofisiología.

Analizar los resultados cuantitativamente del efecto del extracto metanólico de *C. lawsoniana* sobre la contracción de los músculos lisos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la Planta

La *C. lawsoniana* (The Plant List, 2013), es conocida también como ciprés de Lawson, cedro de Port Orford, se recolectó en el estado de Puebla durante los meses de noviembre, diciembre y enero cuando las plantas son vigorosas (Hernández-Padilla en 2006), en Chignahuapan, Tlaxtepec: Lat. 19.83710 N; Largo. -98.034370 W. Para su identificación botánica, el material biológico se depositó en el Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología, UNAM (Vale 1453965).

Procedimiento de la Extracción Metanólica.

Las hojas secas de *C. lawsoniana* se trituraron, pero no se molieron y los aceites esenciales se extrajeron con metanol absoluto en una proporción de peso: volumen (300 g/0.9 L) de 1: 3 a 20 ° C. El disolvente del extracto líquido se eliminó completamente por evaporación a temperatura ambiente. Las soluciones utilizadas en este estudio se prepararon disolviendo este material extraído en metanol a una concentración final de 25 mg/mL.

Sistema de registro de órganos aislados.

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía de Principios para el cuidado y uso de los animales vertebrados en Investigación y capacitación publicado por la Sociedad de Fisiología Americana. El manejo de los animales y su sacrificio se realizó de acuerdo a la norma: NOM-062-Z00-1999. Los desechos de los diversos experimentos se manejaron conforma a las normas NOM-085-SERMANAT-2011 y la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-200, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo. El número de proyecto aprobado por el CICUAL: IN204319.

Se sacrificaron cobayos machos (n total= 38) de 300-400 g de la cepa Hartley y ratas de la cepa Wistar (n total= 22) de 100-150 g con una dosis letal de pentobarbital sódico por vía peritoneal (35 mg/kg), se extrajo la tráquea y la aorta respectivamente y fue finamente disecada y colocada en una caja de disección donde posteriormente se eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente, todo este proceso fue realizado en solución de Krebs-Ringer en condiciones que aseguraban la integridad de la tráquea y la aorta. Inmediatamente la tráquea y la aorta fue seccionada en ocho segmentos (~3 milímetros), cada segmento se colocó en una cámara de órganos aislados de 10 mL de capacidad con la solución Krebs-Ringer con la siguiente composición: 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 glucosa, y 2 CaCl₂ (mM). Las preparaciones se mantuvieron a 37°C y se burbujearon continuamente con 5% CO₂ y 95% O₂ a un pH de 7.4.

Cada segmento se sujetó a un transductor de fuerza isométrica modelo FT03 (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema amplificador de las señales Cyberamp 380 (Axon Instruments, Foster City, C.A, EUA) y a una interfaz análogo-digital Digitada 1440 A (Axon Instruments). Los registros se almacenaron en una computadora y se analizaron con el software AxoScope versión 10.2 (Axon Instruments, Foster City. CA, EUA).

Los segmentos traqueales y de aorta se equilibraron a una tensión inicial de 1 g durante 45 minutos (tiempo basal). Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon tres veces con 60 mM de KCl hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Posteriormente, se siguió con el protocolo experimental que a continuación se señala.

Para evaluar el efecto relajante de *C. lawsoniana*, se pre-contracturaron anillos traqueales con KCl 60 mM, TEA 10 mM, HIS 10 μ M o CCH 1 μ M. Se probaron concentraciones únicas de 8,9, 18,75, 37,5, 75 o 150 μ g / mL de extracto metanólico de *C. lawsoniana* en diferentes preparaciones. En otros experimentos, las aortas torácicas se pre-contracturaron con EPI 1 μ M o KCl 60 mM y se agregaron el extracto metanólico de *C. lawsoniana* a la misma concentración, como se mencionó anteriormente. Los resultados se expresan como porcentaje de la tercera respuesta de KCl, cabe mencionar que debido a que 37.5, 75 y 150 μ g/mL de CL indujeron una inhibición casi total de la contracción por HIS en miocitos traqueales y KCl en miocitos vasculares, decidimos bajar la concentración del extracto metanólico de CL, utilizando 8.9, 18.75 y 37.5 μ g/mL, La adición del mayor volumen de metanol

empleado (30 μ L, 0.03%) a las preparaciones de tejido no modificó las contracciones traqueales a KCl o TEA, ni las contracciones aórticas a KCl o EPI. (Campos-Bedolla *et al.*, 2005).

En el siguiente diagrama se muestra breve esquema del proceso



Patch Clamp

Técnica de fijación de voltaje.

Obtención y cultivo de miocitos traqueales de cobayo.

Los tejidos traqueales de cobayos y de aorta de rata fueron obtenidos como se describió en el procedimiento anterior e inmediatamente se realizó la disección del músculo liso traqueal y de la aorta de rata, en una cámara de disección que contenía

solución de Krebs-Ringer. Al músculo se le eliminó el tejido conectivo y epitelio bajo microscopio estereoscópico y se sometió a una disgregación enzimática y mecánica transfiriéndolo a una solución Hanks (GIBCO) que contenía 0.05 unidades de papaína (56 mg/mL, Worthington) y 2 mg de L-cisteína (sigma) durante diez minutos a 37 °C. El pH de la solución enzimática fue ajustado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃). A continuación, el tejido fue lavado con solución de Leibovitz (L-15, GIBCO) para remover el exceso de enzimas y posteriormente se incubó en una solución Hanks que contenía 1 mg/mL de colagenasa tipo I (Worthington) y 0.5 mg/mL de proteasa (Sigma) durante 10 min. a 37 °C. Una vez transcurridos los diez minutos, los tejidos fueron aspirados y liberados hacia la solución enzimática con una pipeta Pasteur (20 veces) para permitir la disociación de los miocitos. Después se incubaron los tejidos nuevamente en la solución colagenasa-proteasa por otros diez minutos y se realizó el mismo procedimiento para la disociación mecánica hasta que se observaran células bajo el microscopio. La actividad enzimática fue detenida añadiendo 5 mL de solución de Leibovitz y se centrifugó a 600 rpm durante 5 min, retirando el sobrenadante y añadiéndose nuevamente solución L-15 y centrifugándose. Los botones celulares fue re-suspendido en 6 mL de medio esencial mínimo (MEM, GIBCO) que contenía suero fetal bovino , 2 mM L-glutamina, 10 U/mL-1 penicilina, 10 µg/mL-1 estreptomina y 15 mM de glucosa, para posteriormente distribuir el medio con las células en cajas multipozos (Falcon Becton Dickinson) (colocando aproximadamente 1 mL de medio por pozo, en 6 pozos), a los cuales previamente se les colocó en el fondo un cubreobjetos impregnado con colágena estéril de cola de rata. Los pozos se mantuvieron en una

atmósfera humidificada (incubadora con dióxido de carbono al 5%) a 37 °C durante un periodo de 48 horas para posteriormente registrar mediante la técnica de fijación de voltaje la actividad eléctrica de las células.

Registros de la actividad eléctrica en célula completa.

Las células musculares de tráquea de cobayo y de aorta de rata fueron cultivadas y registradas mediante la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje de membrana como se describe a continuación:

El cubreobjetos con los miocitos traqueales de cobayo y de aorta de rata fueron adheridos y trasladados a una cámara de registro que fue constantemente perfundida con un volumen de 0.5-1 mL de solución externa para la medición de las corrientes entrantes de ion bario (se utilizó Ba^{2+} como acarreador de carga y como sustituyente de Ca^{2+} , ya que este último ion es capaz de modular su misma y otras corrientes, contaminando la señal) a una velocidad de perfusión de 1.5 mL/min con la siguiente composición (mM): 136 NaCl; 11 glucosa; 10 HEPES; 0.1 ácido niflúmico; 5 $BaCl_2$; 6 CsCl; 5; 11 glucosa; 10 HEPES). La solución fue ajustada a un pH=7.4 con CsOH a temperatura ambiente (~ 21 °C). Dicha cámara de registro fue adaptada sobre la base del objetivo de un microscopio de luz invertido (Zeiss modelo IP03).

Los microelectrodos que se utilizaron para el registro de fijación de membrana fueron fabricados con capilares de borosilicato (1B200F-6 glass, Word Precision Instruments, Sarasota, FL), utilizando para ello un estirador de pipetas (P-87, Sutter

Instruments Co, Novato, CA). La resistencia de los electrodos se encontraba entre 3 y 6 M Ω .

La capacitancia de la punta antes y después del acceso a la célula fue compensada, aplicando pulsos cuadrados despolarizantes mediante un Amplificador Axopatch (modelo 200A, Axon Instrumenst). Para asegurar que cada célula fuera isopotencial durante el procedimiento de fijación de voltaje, fueron excluidos los registros cuyos valores de capacitancia sobrepasaban los 80 pF (pico Faradio), utilizando el intervalo entre 30 y 50 pF como criterio de inclusión. Se realizaron las mediciones de las corrientes de Ba²⁺ utilizando los filtros del amplificador de 1-5KHz con una frecuencia de digitalización de 2-5 kHz. La solución de la pipeta de registro (solución interna), contaba con los siguientes componentes (mM): 130 CsCl; 2 MgCl₂ 2;10 EDTA; 10 HEPES; 3.6 ATP-Na; 1.9 GTP. La solución fue ajustada a un pH= 7.4 con CsOH a temperatura ambiente.

Las corrientes totales se registraron por medio de su activación con un protocolo de estimulación previamente cargado en el programa pClamp (versión 10.2), el cual consiste en pasos con pulsos despolarizantes con potenciales de -60 a +50 mV durante 500 ms, a 1 Hz en incrementos de 10 mV con un potencial de fijación de membrana de -60 mV. Este protocolo evoca corrientes entrantes estables y reproducibles. Los cambios en las corrientes bajo las condiciones descritas con anterioridad fueron evaluados en el pico máximo de la corriente para cada voltaje probado.

Para observar las corrientes de Ca^{2+} , los miocitos de la aorta traqueal y torácica se sometieron a una serie de pulsos de hiperpolarización y despolarización de potenciales que van desde -60 a +50 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de reposo de -60 mV durante 100 ms, 1 Hz. Después del protocolo control, se usó extracto metanólico de *C. lawsoniana* (concentración final de 37.5, 75 y 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en solución de perfusión, $n = 5$ cada uno) y se siguió el mismo procedimiento experimental. Los cambios en las corrientes se evaluaron como el pico de corriente máximo para cada voltaje probado.

FÁRMACOS

Para la solución Krebs-Ringer fueron utilizados NaCl, NaHCO_3 , KCl, KH_2PO_4 , MgSO_4 , glucosa, y CaCl_2 (mM). Para los experimentos se utilizó HIS, CCH, EPI, KCl, TEA y Metanol los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Montana, EUA). Para la Disgregación y los cultivos celulares fueron utilizados Colagenasa tipo 1 y papaína fueron comprados de Worthington Biochemical Co. (Lakewood, NJ). Dispasa II fue obtenida de Roche (Indianapolis, IN), solución Hanks, solución de Leibovitz y solución fueron adquiridos en GIBCO. Para la solución externa para la medición de las corrientes entrantes utilizamos Ba^{2+} , HEPES, ácido niflúmico, BaCl_2 , CsCl, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Montana, EUA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La significancia estadística de las diferencias entre los grupos se estimó por análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Las diferencias entre el grupo control y los

grupos tratados se estimaron por la prueba de Dunnett utilizando el programa estadístico Instat 3 (Graph Pad, versión 3.05) Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue menor a <0.05 bimarginal. Los resultados se expresaron con el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

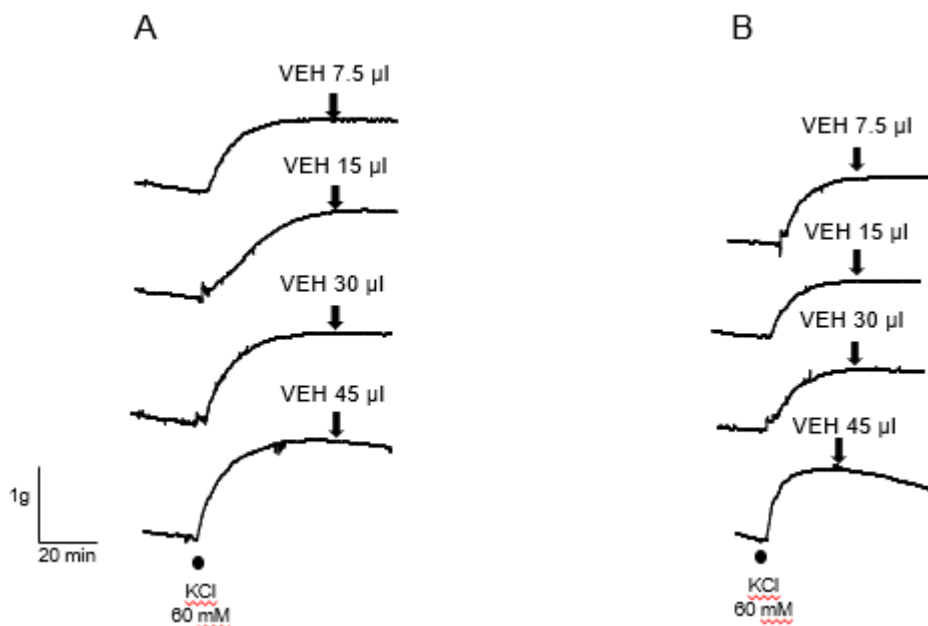


Fig. 7 Registros originales del vehículo (7.5, 15, 30 y 45 µl de metanol) sobre las contracciones de KCL 60 Mm en el músculo liso traqueal de cobayo (A) y músculo liso de aorta de rata (B) del efecto.

1. Efecto del Extracto metanólico de *C. lawsoniana* sobre la contracción inducida por KCl y TEA en el músculo liso traqueal de Cobayo.

Las tráqueas fueron previamente contracturadas con KCl y TEA (bloqueador de los canales de K^+) respectivamente: ambas sustancias producen la

despolarización de la membrana plasmática, permitiendo la apertura del CCDV-L y la subsecuente entrada del Ca^{2+} extracelular al interior de las células e iniciando la contracción muscular. La respuesta contráctil inducida por KCl 60 mM fue disminuida significativamente ($p < 0.01$) por la adición del extracto metanólico de *C. lawsoniana* a diferentes concentraciones (37.5, 75 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig 8A). Cuando los anillos traqueales fueron contracturados con TEA, se obtuvo una relajación significativa cuando se aplicó el extracto a las concentraciones de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$) y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo una relajación altamente significativa ($p < 0.01$), pero no ocurrió con la concentración de 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig 8B). La concentración máxima utilizada en estos experimentos fue de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que una concentración mayor tiene efecto *per-se* sobre el músculo liso, no bajamos la concentración de 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tuvo efecto sobre la contracción.

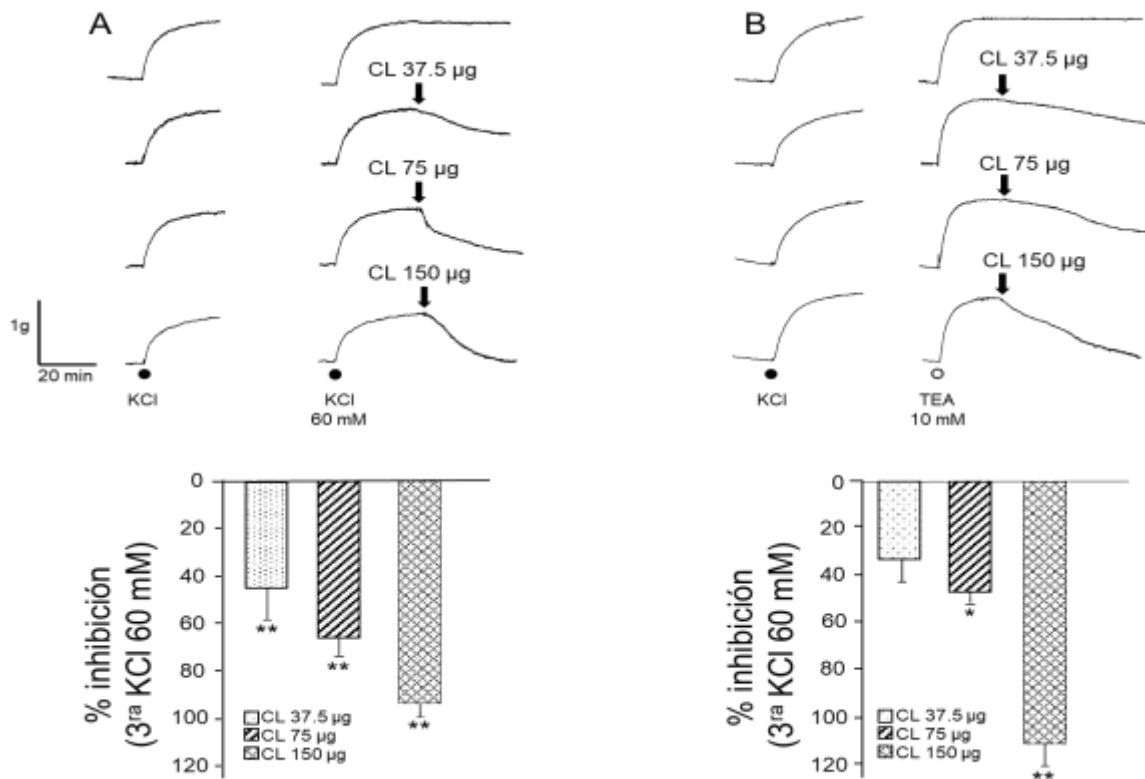


Figura 8. El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* (CL) disminuye la contracción de KCl y tetraetilamonio en el músculo liso traqueal de cobayo de forma dependiente de la concentración. A) El panel muestra los registros originales de los efectos de diferentes concentraciones CL (37.5, 75 y 150 µg/mL; concentración final en baños de órganos de 5 mL) sobre la contracción inducida por el KCl (60mM), donde las barras ilustran la disminución significativa de la contracción de KCl producida por cada concentración de CL analizada (n = 7). En el panel B) Registros originales de los efectos CL en la contracción inducida por tetraetilamonio (TEA, 10 mM, n=5-6); las barras representan las significancias alcanzadas por el efecto de CL a 75 µg/mL y 150 µg/mL. Cada barra representa la media del efecto de contracción ± SEM. Diferencias signitivas a * p <0.05; ** p <0.01.

2. La contracción inducida por la histamina en anillos traqueales de cobayo es disminuida por el extracto metanólico de *C. lawsoniana* dependiente de la concentración.

La administración de HIS (1 mM) al tejido traqueal indujo una respuesta de contracción, al obtener su respuesta máxima, se aplicó el extracto de *C. lawsoniana* a diferentes concentraciones (8.9, 18.75, 37.5, 75 y 150 µg/mL), produciendo en el tejido relajación que fue altamente significativa ($p < 0.01$) en todas las concentraciones. Debido a que 37.5, 75 y 150 µg/mL de CL indujeron una inhibición casi total de la contracción por HIS, decidimos bajar la concentración del extracto metanólico de CL, utilizando 8.9, 18.75 y 37.5 µg/mL, el cual mostró el mismo efecto relajante en la respuesta HIS (Fig. 9).

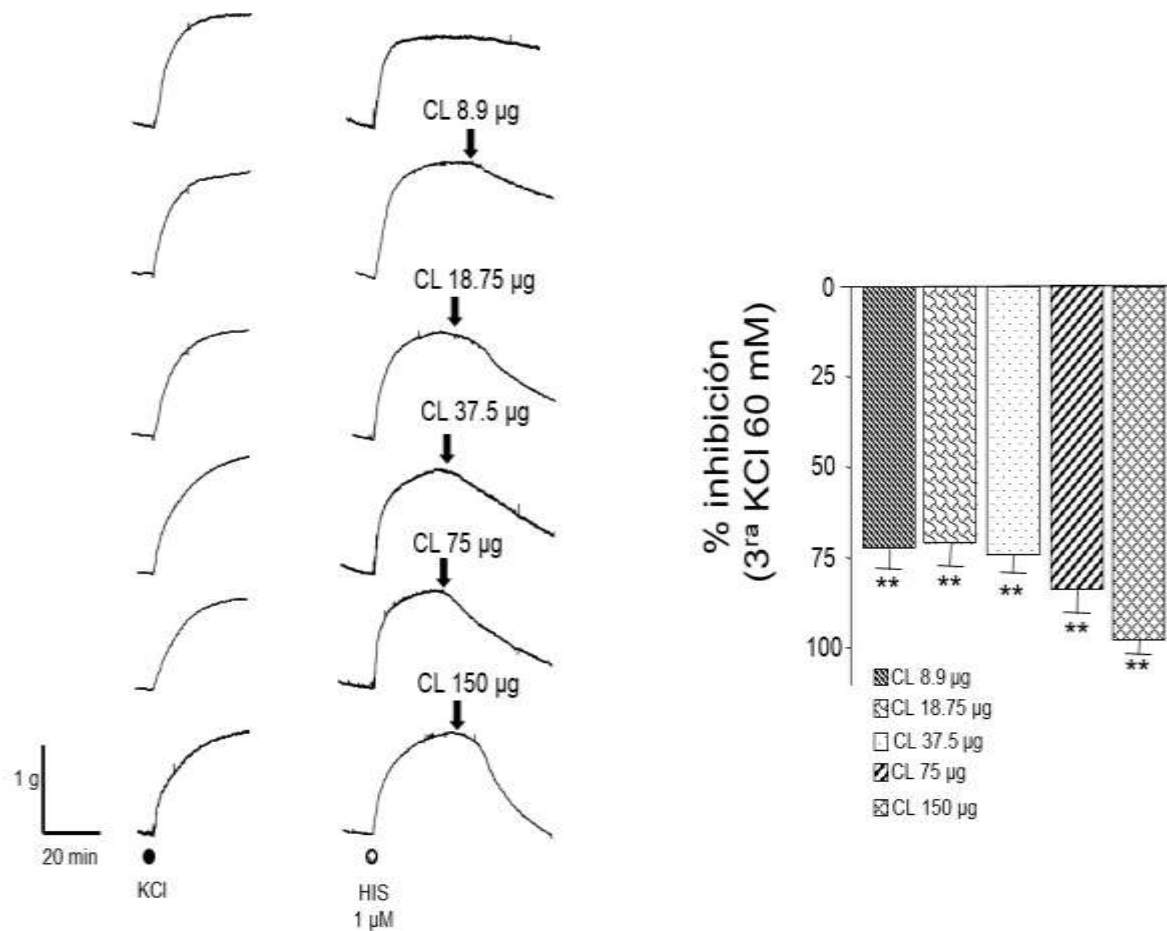


Figura 9. Efecto del extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* por histamina en el músculo liso de las vías respiratorias de cobayo, donde se observa la disminución de las contracciones. El panel izquierdo ilustra el registro original de los efectos a diferentes concentraciones de *Chamaecyparis lawsoniana* (CL) (9,32, 18,75, 37,5, 75 y 150 μg / mL); final concentración en baños de órganos de 5 mL) sobre la contracción inducida por histamina (HIS, 1 μM, n = 6-7). La gráfica de la derecha muestra el efecto alcanzado en todas las concentraciones de CL utilizadas. Cada barra representa la media del efecto de contracción ± SEM. Diferencias significativas a ** p < 0.01.

3. Las contracciones traqueales inducidas por carbacol no se modifican por la adición de *C. lawsoniana* en la respuesta máxima o por la pre-incubación de *C. lawsoniana*.

La administración con CCH (1 μ M) al músculo liso traqueal de cobayo, produce una respuesta de contracción, al alcanzar su respuesta máxima y su meseta, se aplicó el extracto de *C. lawsoniana* a diferentes concentraciones (37.5, 75 y 150 μ g/mL), ninguna de las anteriores concentraciones modificó la contracción del MLVA inducido por CCH. (Fig. 10 A). Se abordó de manera diferente al estimular al tejido dos veces con CCH (1 μ M) con intervalos de 1 hora, observamos que la respuesta de contracción es igual. Cuando incubamos los tejidos con concentración únicas (37.5, 75 y 150 μ g/mL) de *C. lawsoniana* antes de la segunda respuesta de CCH, no se observaron modificaciones a la contracción del CCH (Fig. 10 B). Al lavar los tejidos 30 minutos con Krebs Ringer después de realizar la curva de CL y volver a estimular a los tejidos con CCH observamos que las respuestas de contracción eran similares a las obtenidas al inicio del experimento, esto nos hace pensar que este compuesto no daña al tejido, para confirmar esta teoría sería necesario realizar estudios de concentración tóxica 50 y concentración máxima.

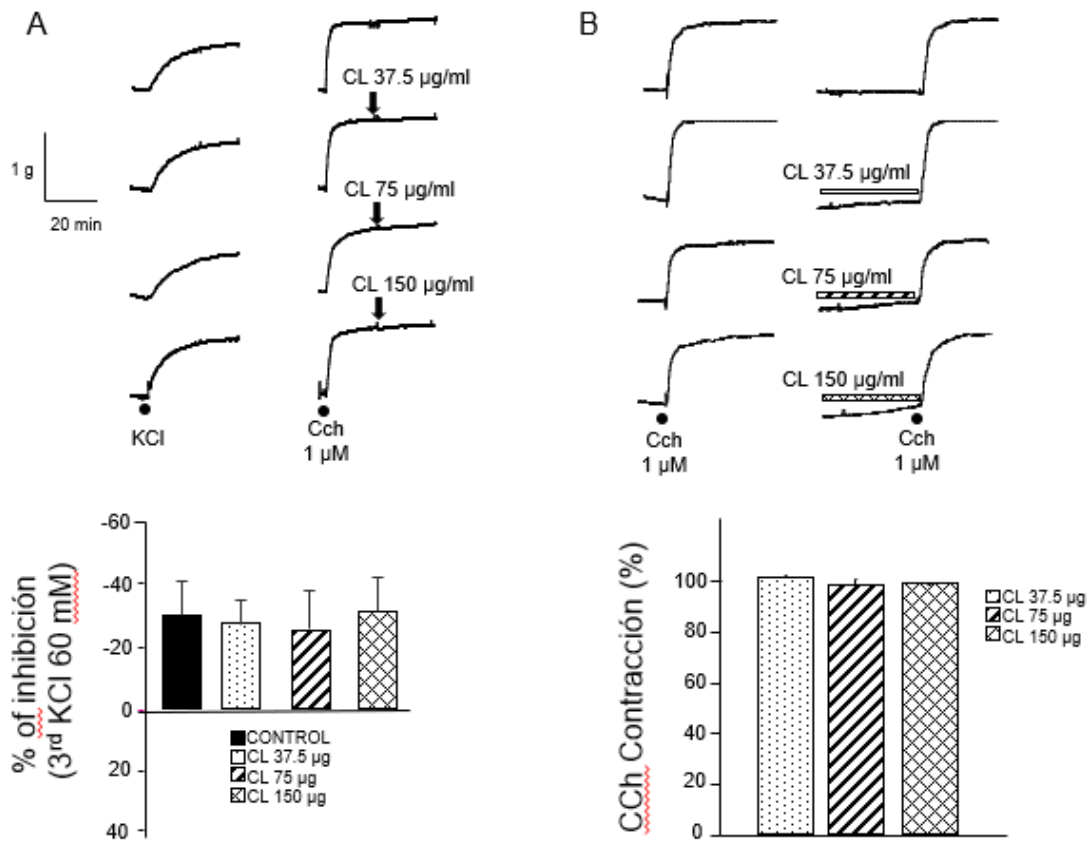


Figura 10. Contracciones traqueales inducidas por CCH, sin modificación por el extracto metanólico de CL. En el panel A se muestra las preparaciones traqueales estimuladas con CCH 1 μ M mostraron una contracción mayor que la respuesta inducida por KCl. Esta contracción no fue alterada por la adición de cualquiera de las concentraciones de CL (37,5, 75 o 150 μ g / mL) durante la meseta de la contracción inducida por CCH. En el panel B) Dos estímulos consecutivos con CCH mostraron la misma respuesta en las preparaciones traqueales de cobayo. Cuando las concentraciones de CL (37,5, 75 o 150 μ g / mL) fueron incubados durante 30 min entre la 1a y la 2a estimulación con CCH, no se observaron efectos en las contracciones. n.s. a $p < 0.05$.

4. En preparaciones aórticas, el extracto de *C. lawsoniana* dependiente de la concentración disminuye las contracciones inducidas por KCl y Epinefrina.

La contracción inducida por la despolarización de la membrana con KCl (60 mM) en músculo de aorta torácica (MLVA) es un proceso mediado únicamente por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (CCDV-L) y la concomitante entrada de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula. Esta contracción se redujo significativamente ($p < 0.01$) por todas las concentraciones utilizadas de *C. lawsoniana* (8.9, 18.75, 37.5, 75 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produciendo relajación del músculo de la aorta torácica (Fig. 11 A). Cuando las preparaciones aórticas se estimularon con Epinefrina (EPI 1 μM), se observó una contracción sostenida. La adición de cualquiera de las concentraciones de *C. lawsoniana* estudiadas (37.5, 75 o 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en esta respuesta sostenida, indujo una relajación significativa ($p < 0.05$ para 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $p < 0.01$ para 75 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 11 B).

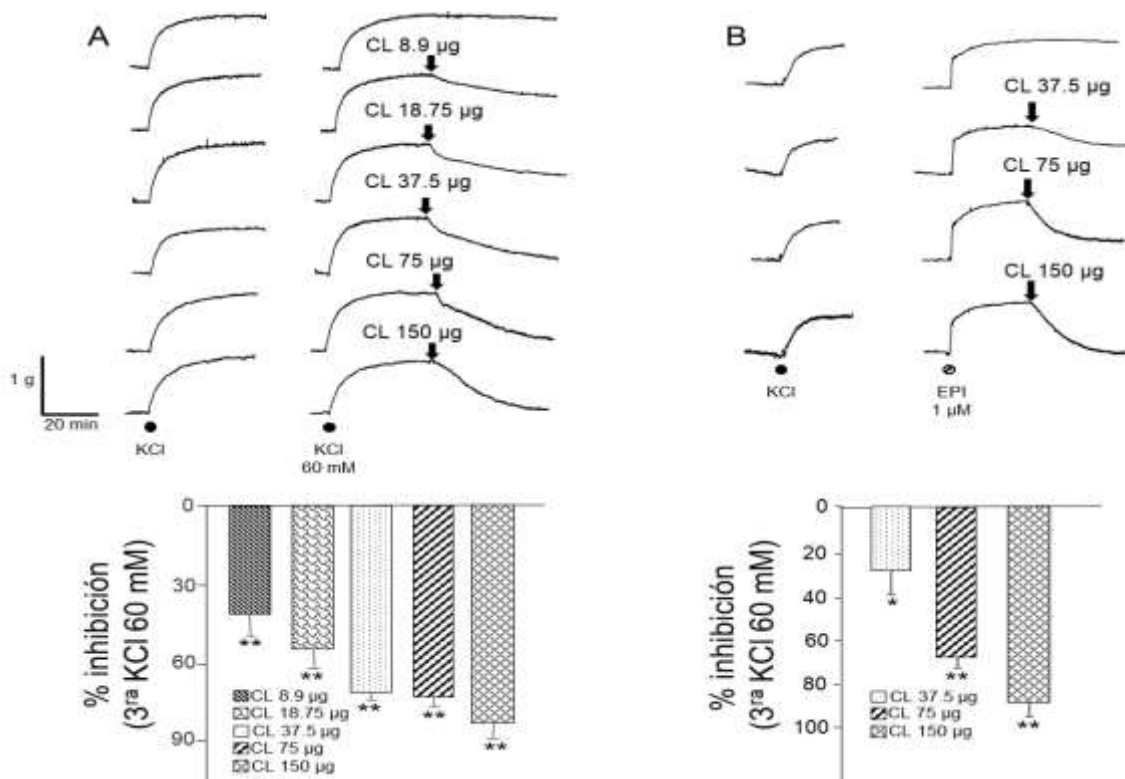


Figura 11. Efecto de la concentración del extracto metanólico de CL por KCl y Epinefrina en aortas torácicas de ratas. En el panel A) se muestra a las aortas contracturadas con KCl (60 mM, n = 6) y el efecto relajante a las concentraciones (9,32, 18,75, 37,5, 75 y 150 µg/mL) de CL la cual es dependiente de la concentración. El gráfico de barras en la parte inferior izquierda muestra que todas las concentraciones estudiadas de CL indujeron una disminución significativa de la contracción de KCl; con respecto al gráfico presente en el panel B) el efecto de CL a 37,5, 75 y 150 µg/mL sobre la contracción de Epinefrina (EPI, 1 µM, n = 6), concentración se observa una disminución de las contracciones significativamente. Las barras representan la media de la contracción \pm SEM. Diferencias significativas a * p <0.05; ** p <0.01.

5. El extracto metanólico de *C. lawsoniana* bloquea las corrientes de Ca^{2+} (CCDV-L) en los miocitos aórticos y traqueales.

En los experimentos de fijación del voltaje en miocitos aórticos de rata, se realizaron pulsos despolarizantes de -60 a $+50\text{mV}$ a partir de un potencial de fijación de -60mV produciendo una corriente entrante de Ba^{2+} dependiente del voltaje (IBa^{2+}). Como en trabajos anteriores (Reyes et al., 2016) se confirmó mediante la adición de nifedipina $1\ \mu\text{M}$ (un bloqueador de CCDV-L) que esta corriente correspondía a la actividad de CCDV-L. La corriente interna máxima alcanzó la amplitud máxima a 0mV . Se observó una corriente similar en los miocitos traqueales de cobayos. Cuando ambos tipos de miocitos se expusieron a diferentes concentraciones de *C. lawsoniana* ($18,75$, $37,5$ y $75\ \mu\text{g} / \text{mL}$) se observó una disminución significativa de cada corriente (Fig. 12 A, B) hasta su abolición con la concentración más alta. Debido a que $37,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de CL disminuyó la corriente a la mitad, decidimos utilizar una concentración inferior en este caso fue $18,75\ \mu\text{g}/\text{mL}$, por otro lado, cabe mencionar que no utilizamos la concentración máxima de $150\ \mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto porque $75\ \mu\text{g}/\text{mL}$ abolió completamente la corriente.

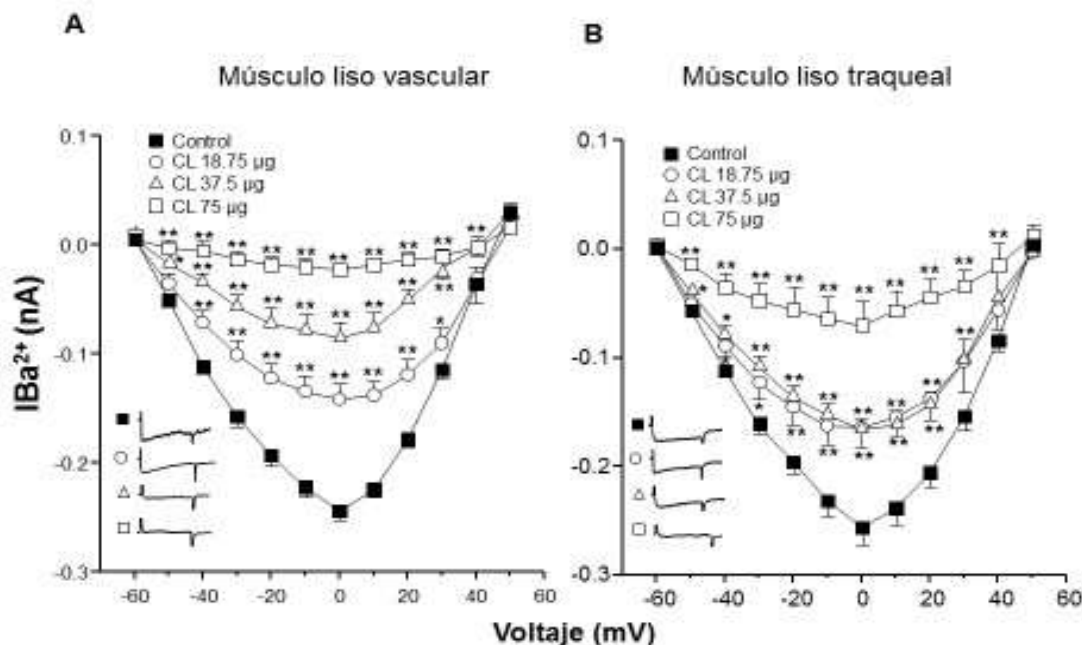


Figura 12. Efecto de la fijación de voltaje con adición del extracto metanólico de *C. lawsoniana*. EL CL disminuyó las corrientes de Ca^{2+} tipo L dependientes del voltaje (CCDV-L) en miocitos vasculares y traqueales. A) Los miocitos vasculares de rata recibieron un pulso de despolarización de -60 a +50 mV desde un potencial en reposo de -60 mV durante 100 ms. Estas estimulaciones produjeron una corriente interna Ba^{2+} dependiente del voltaje (IBa^{2+}), que correspondía a una corriente CCDV-L. La corriente máxima de entrada alcanzó la amplitud máxima a ~0 mV. Estas corrientes disminuyeron significativamente por cada concentración de extracto de CL utilizada y fueron anuladas por el más alto (n = 5-7). B) Se observaron corrientes de Ba^{2+} similares inducidas por incrementos de 10 mV en miocitos traqueales de cobayo. Las corrientes de Ba^{2+} mostraron una disminución cuando las diferentes concentraciones del extracto de CL fueron perfundidas (n = 5-7) y alcanzaron diferencias significativas comparadas con la corriente control. Las inserciones de cada figura representan grabaciones originales. Cada símbolo representa la media \pm S.E.M. Diferencias significativas a * p < 0.05, ** p < 0.01.

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis indican que el extracto metanólico de *C. lawsoniana* induce la relajación aórtica y traqueal a través del bloqueo del CCDV-L. En este sentido, la adición de KCl a cualquiera de los tejidos despolariza el músculo liso, promoviendo la apertura de CCDV-L, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma e induciendo la contracción, por lo que sigue siendo la herramienta preferida para explorar los fenómenos relacionados con CCDV-L.

En los tejidos traqueal y aórtico, se realizó una curva en el que se evaluó el efecto del vehículo (metanol absoluto) sobre la meseta de contracción de KCl utilizando 4 volúmenes de este, fueron 7.5, 15, 30 y 45 μ l, (Ver Figura 7) en las que se observa que la adición de volúmenes mayores a 30 μ l comienza a tener efecto sobre la respuesta a KCl, la adición de volúmenes inferiores a 30 μ l no induce cambios, razón por lo cual no utilizamos concentraciones que superiores a los 30 μ l de metanol. Por otro lado, es conocido que el uso de KCl y el bloqueo de los canales de K^+ con tetraetilamonio (TEA) inducen una contracción debido a la despolarización de la membrana y la apertura de los CCDV-L. La maniobra experimental con TEA nos permitió descartar que la relajación por el extracto metanólico fuera vía la activación de los canales de K^+ , ya que el extracto de *C. lawsoniana* relajó las preparaciones traqueales incluso cuando los canales de K^+ fueron bloqueados por TEA. Para descartar contundentemente un posible efecto extracto metanólico en los canales de K^+ , se realizaron experimentos de Patch Clamp con miocitos traqueales, corroborando que las corrientes de K^+ no fueron alteradas por el extracto metanólico

de *C. lawsoniana* a 150 µg/mL (datos no mostrados). Corroborando que el efecto observado es a través del bloqueo de los CCDV-L induciendo la relajación.

Músculo liso Vascular.

Es ampliamente conocido, que el músculo liso vascular y traqueal se contrae en respuesta al KCl, la entrada de calcio a través de CCDV-L es primordial para una contracción sostenida en los tejidos vasculares. (Ratz *et al.*, 2005; Fernández-Tenorio *et al.*, 2011; Egea-Guerrero *et al.*, 2015). A este respecto, se ha establecido que a concentraciones similares a las empleadas en esta tesis 1 µM de epinefrina, fenilefrina, agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 inducen una contracción del músculo liso de aorta similar a la desarrollada por la estimulación con KCl (Sakamoto *et al.*, 2003; Fernández-Tenorio *et al.*, 2011). Posiblemente, la contracción inducida por los agonistas del receptor adrenérgico α_1 en las preparaciones vasculares a esta concentración depende principalmente de CCDV-L y, por lo tanto, la concentración de extracto metanólico de *C. lawsoniana* más alta probada (150 µg/mL) la bloquea completamente. Esta relajación inducida por *C. lawsoniana* de las aortas precontracturadas con epinefrina a través del bloqueo de CCDV-L resalta su potencial a ser un candidato para desarrollar un fitofármaco que coadyuve en la relajación del músculo liso. Terapéuticamente, la mayoría de los bloqueadores de los CCDV-L se consideran una clase importante y eficaz de agentes antihipertensivos (Messerli, 2003; Brozovich *et al.*, 2016; Touyz *et al.*, 2018; Zamponi *et al.*, 2015; Tamargo and Ruilope, 2016)

Mediante la técnica de Patch Clamp, se corroboró que estos efectos fueron provocados por el bloqueo de CCDV-L (Santos *et al.*, 2011).

Músculo liso Traqueal.

Los estudios realizados en nuestro laboratorio señalan que, en el músculo liso de las vías respiratorias, las contracciones inducidas por histamina tienen un componente importante de CCDV-L con una baja participación de la vía de la PLC β /IP $_3$ (Bazán-Perkins *et al.*, 1998; Carbajal *et al.*, 2005; Montaña *et al.*, 2018) un hecho que explica completamente que las relajaciones inducidas por *C. lawsoniana* de la contracción traqueal inducida por histamina es a través del bloqueo de los CCDV-L.

Por el contrario, los agonistas colinérgicos activan la vía de las PLC β /IP $_3$ induciendo la liberación del Ca $^{2+}$ del RS, promoviendo la contracción (Bazán-Perkins *et al.*, 1998), además, la contracción inducida por CCH no disminuye con el uso exclusivo de bloqueadores de CCDV-L. Además del bloqueo de estos canales, se debe utilizar un antagonista de canales de cationes no selectivos (es decir, 2-APB) para anular completamente las contracciones inducidas por CCH y los aumentos intracelulares de Ca $^{2+}$ (Flores-Soto *et al.*, 2013; Perusquía *et al.*, 2015; Sommer *et al.*, 2016). Por otro lado, se observó que el extracto metanólico de *C. lawsoniana* no tuvo ningún efecto sobre estas contracciones, lo que nos sugiere que es un bloqueador puro de CCDV-L.

Es bien conocido que en enfermedades como el asma, la rinitis alérgica y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las células caliciformes

desempeñan un papel primordial (Henke, Shah and Rubin, 2005; Ordoñez *et al.*, 2001; Larsen, Tos and Mogensen, 1986). Recientemente, se descubrió que estas células expresan todos los subtipos de receptores de histamina (H1-H4) y que su activación estimula la secreción de moco. Este efecto fue abolido mediante la eliminación de Ca^{2+} extracelular, lo que señala la relevancia de la entrada de Ca^{2+} en este fenómeno (Li *et al.*, 2012). Además, debido a que el verapamilo, un antagonista de CCDV-L, ha demostrado ser útil para disminuir la producción de mucosa de las vías respiratorias en ratones sensibilizados (Khakzad *et al.*, 2012), es concebible que estos canales regulen la función de las células caliciformes. Por lo tanto, los bloqueadores farmacológicos de estos canales, como los extractos de *C. lawsoniana*, constituyen un posible candidato para desarrollo de un fitofármaco apropiado para el asma, la rinitis alérgica y la EPOC, aunque se necesitan más investigaciones.

Evidencia de los compuestos químicos caracterizados en CL

Rastogi RP, et al., y Eileen CJ et al., reportaron los compuestos químicos del *C. lawsoniana*, en otras fuentes bibliográficas (Astudillo-Vázquez, Mata and Navarrete, 2009) se expuso que varios de los compuestos activos de *C. lawsoniana* tiene efectos sobre canales iónicos, en el caso de los terpenos pueden mencionarse especulativamente como los candidatos más probables. Una revisión de la literatura más reciente designa terpinen-4-ol (22%), sabineno (21%) y alcanfor (7.8%) como los compuestos con el mayor contenido en las hojas de *C. lawsoniana* (Emami *et al.*, 2009), mientras que en el análisis del aceite obtenido de la corteza y la madera

de *C. lawsoniana*, se descubrió que el α -terpineol (14.33%), el δ -cadineno (8.17%) y el α -pineno (6.53%) son los componentes más abundantes (Tucker and Karchesy, 2000). El componente más abundante del extracto de la hoja, terpinen-4-ol, se puede encontrar en más de 200 derivados de hojas, hierbas y flores y se utiliza como antimicrobiano tópico. Mientras que, en otro estudio, los anillos aórticos de rata precontraturados con alto K^+ o fenilefrina se redujeron con terpinen-4-ol de manera dependiente de la concentración (Maia-Joca et al., 2014). A pesar de la falta de datos confiables, el terpinen-4-ol contenido en el extracto de *C. lawsoniana* podría ser al menos parcialmente responsable del bloqueo del CCDV-L en las aortas de ratas y el músculo liso traqueal de cobayo.

Por último, creemos que es de suma importancia indagar que compuestos químicos están presentes en el extracto metanólico de CL para realizar futuras investigaciones en los diferentes mecanismos que regulan los músculos lisos.

CONCLUSIONES.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* produce efectos relajantes ante una contracción inducida por KCl en músculo liso traqueal de cobayo.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* produce efectos relajantes ante una contracción inducida por TEA (bloqueador de canales de potasio) en músculo liso traqueal de cobayo.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* produce efectos relajantes ante una contracción inducida por HIS (utiliza CCDV-L con una baja participación de la vía de la PLC β /IP $_3$) en músculo liso traqueal de cobayo.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* no produce efectos relajantes ante una contracción inducida por CCH (agonistas colinérgicos activan la vía de las PLC β /IP $_3$) en músculo liso traqueal de cobayo.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* no produce efectos relajantes ante una contracción inducida por KCl (la entrada de calcio a través de CCDV-L) en músculo vascular de rata.

El extracto metanólico de *Chamaecyparis lawsoniana* no produce efectos relajantes ante una contracción inducida por EPI (por receptores adrenérgicos acoplados a proteínas G) en músculo vascular de rata.

Con la técnica de Patch Clamp en miocitos traqueales de cobayo, se corroboró que las corrientes de K $^+$ no fueron alteradas por el extracto metanólico de *C. lawsoniana*

Con la técnica de Patch Clamp en miocitos aórticos de rata, se corroboró que las corrientes de K $^+$ no fueron alteradas por el extracto metanólico de *C. lawsoniana*.

Chamaecyparis lawsoniana ejerce efectos relajantes a través del bloqueo de CCDV-L de los músculos lisos tanto traqueales como vasculares.

BIBLIOGRAFÍA

An, Z. *et al.* (2018) 'Impact of Particulate Air Pollution on Cardiovascular Health', *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(3), pp. 3–9. doi: 10.1007/s11882-018-0768-8.

Astudillo-Vázquez, A., Mata, R. and Navarrete, A. (2009) 'El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos', *Revista Latinoamericana de Química*, 37(1), pp. 7–43.

Baburaj, D. S. *et al.* (2010) 'Homoeopathic raw drug plant sources – II: Non-Angiosperm Groups : Bryophytes, Pteridophytes & Gymnosperms', *Indian Journal of Research in Homoeopathy*, 4(1), pp. 61–64.

Bai, L. *et al.* (2018) 'Exposure to traffic-related air pollution and acute bronchitis in children: Season and age as modifiers', *Journal of Epidemiology and Community Health*, 72(5), pp. 426–433. doi: 10.1136/jech-2017-209948.

Bazán-Perkins, B. *et al.* (1998) 'Involvement of different Ca²⁺ pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium : lack of effect of PKC inhibition', pp. 567–573.

Bazán-Perkins, B. *et al.* (2003) 'Role of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in Ca²⁺ entry of bovine airway smooth muscle cells', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 368(4), pp. 277–283. doi: 10.1007/s00210-003-0806-4.

Berridge, M. J. (2016) 'The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health

and disease', *Physiological Reviews*, 96(4), pp. 1261–1296. doi: 10.1152/physrev.00006.2016.

Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) 'Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp. 517–529. doi: 10.1038/nrm1155.

Bonner, J. R. (1984) 'The epidemiology and natural history of asthma', *Clinics in chest medicine*, 5(4), p. 557—565. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/6394196>.

Brozovich, F. V. *et al.* (2016) 'Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders', *Pharmacological Reviews*, 68(2), pp. 476–532. doi: 10.1124/pr.115.010652.

Campos-Bedolla, P. *et al.* (2005) 'Effect of *Gnaphalium conoideum* HBK on guinea pig airway smooth muscle: Role of L-type Ca²⁺ channels', *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), pp. 267–272. doi: 10.1016/j.jep.2004.11.005.

Carbajal, V. *et al.* (2005) 'LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: Role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(1 32-1), pp. 84–93. doi: 10.1152/ajplung.00446.2003.

Dayawansa, S. *et al.* (2003) 'Autonomic responses during inhalation of natural fragrance of "Cedrol" in humans', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 108(1–2), pp. 79–86. doi: 10.1016/j.autneu.2003.08.002.

Egea-Guerrero, J. J. *et al.* (2015) 'Role of L-type Ca²⁺ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage', *Vascular Pharmacology*, 72, pp. 64–72. doi: 10.1016/j.vph.2015.04.011.

Emami, S. A. *et al.* (2009) 'Identification of Volatile Oil Components from Aerial Parts of *Chamaecyparis lawsoniana* by GC-MS and ¹³C-NMR Methods', *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(6), pp. 661–665. doi: 10.1080/0972060X.2009.10643771.

Federico Renna, N. and Miguel Miatello, R. (2013) 'Capítulo 36 FISIOLOGÍA DEL MÚSCULO LISO VASCULAR', *Cardiología*, pp. 172–175.

Fernández-Tenorio, M. *et al.* (2011) 'Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ Channels: New Mechanism for Depolarization-Evoked Mammalian Arterial Contraction', *Circulation Research*, 108(11), pp. 1348–1357. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240127.

Flores-Soto, E. *et al.* (2013) 'Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling is determined by L-type Ca²⁺ and store operated Ca²⁺ channels in guinea pig airway smooth muscle', *European Journal of Pharmacology*, 721(1–3), pp. 21–28. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.060.

Flores-Soto, E. *et al.* (2017) 'Sex steroids effects on guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular Ca²⁺ basal levels', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, pp. 444–456. doi: 10.1016/j.mce.2016.10.004.

Henke, M. O., Shah, S. A. and Rubin, B. K. (2005) 'The role of airway secretions in COPD - Clinical applications', *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2(3), pp. 377–390. doi: 10.1080/15412550500218148.

Hernández, H. (2006) 'Producción y comercialización de cedrela (*Chamaecyparis thyoides ericoides*) y chimansimpar (*Chamaecyparis lawsoniana ellwoodii*), en el municipio de Xicotepec, Pue.', pp. 1–116.

Honda, T. *et al.* (2018) 'Associations of long-term fine particulate matter exposure with prevalent hypertension and increased blood pressure in older Americans', *Environmental Research*, 164(February), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.envres.2018.02.008.

Horowitz, A. *et al.* (1996) 'Mechanisms of smooth muscle contraction', *Physiological Reviews*, 76(4), pp. 967–1003. doi: 10.1152/physrev.1996.76.4.967.

Janssen, L. J. *et al.* (2001) 'Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles', *Journal of Applied Physiology*, 91(3), pp. 1142–1151. doi: 10.1152/jappl.2001.91.3.1142.

Janssen, L. J. *et al.* (2004) 'KC1 evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(4 31-4), pp. 852–858. doi: 10.1152/ajplung.00130.2004.

Janssen, L. J., Hague, C. and Nana, R. (1998) 'Ionic mechanisms underlying electrical slow waves in canine airway smooth muscle', *American Journal of*

Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 275(3 19-3), pp. 516–523. doi: 10.1152/ajplung.1998.275.3.I516.

Kasjan, J. (2013) *APARATO RESPIRATORIO, Patología*. Available at: <http://smpatologia.blogspot.com/2013/08/aparato-respiratorio-introduccion.html>.

Khakzad, M. R. *et al.* (2012) 'Effect of verapamil on bronchial goblet cells of asthma: An experimental study on sensitized animals', *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 25(2), pp. 163–168. doi: 10.1016/j.pupt.2011.11.001.

Lam, M., Lamanna, E. and Bourke, J. E. (2019) *Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1_16.

Larsen, P. L., Tos, M. and Mogensen, C. (1986) 'Nasal glands and goblet cells in chronic hypertrophic rhinitis', *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 7(1), pp. 28–33. doi: 10.1016/S0196-0709(86)80031-X.

Lee, J. Y. and Lee, D. C. (2014) 'Cardiac and pulmonary benefits of forest walking versus city walking in elderly women: A randomised, controlled, open-label trial', *European Journal of Integrative Medicine*, 6(1), pp. 5–11. doi: 10.1016/j.eujim.2013.10.006.

Li, D. *et al.* (2012) 'Effect of histamine on Ca²⁺-dependent signaling pathways in rat conjunctival goblet cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(11), pp. 6928–6938. doi: 10.1167/iovs.12-10163.

Li, Q. *et al.* (2011) 'Acute effects of walking in forest environments on cardiovascular

and metabolic parameters', *European Journal of Applied Physiology*, 111(11), pp. 2845–2853. doi: 10.1007/s00421-011-1918-z.

Lim, L. *et al.* (2015) 'Phytoncide, nanochemicals from *Chamaecyparis obtusa*, inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells', *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(1), pp. 112–115. doi: 10.1166/jnn.2015.8381.

Maia-Joca, R. P. M. *et al.* (2014) 'Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation', *Life Sciences*, 115(1), pp. 52–58. doi: 10.1016/j.lfs.2014.08.022.

Mascolo, N. *et al.* (1987) 'Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity', *Phytotherapy Research*, 1(1), pp. 28–31. doi: 10.1002/ptr.2650010107.

MENÉNDEZ VALDERREY, J. L. (2017) *Revista asturnatura.com*, *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl. Available at: <https://www.asturnatura.com/especie/chamaecyparis-lawsoniana.html>.

Messerli, F. H. (2003) 'Evolution of calcium antagonists: Past, present, and future', *Clinical Cardiology*, 26(2 SUPPL.), pp. 12–16. doi: 10.1002/clc.4960261405.

Montaño, L. M. *et al.* (2011) 'Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: Involvement of prostaglandins and K⁺ channels', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 462(4), pp. 573–585. doi: 10.1007/s00424-011-0997-3.

Montaño, L. M. *et al.* (2018) 'Testosterone induces hyporesponsiveness by

interfering with IP 3 receptors in guinea pig airway smooth muscle', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 473(2018), pp. 17–30. doi: 10.1016/j.mce.2017.12.010.

Montaño, L. M., Barajas-Lopez, C. and Daniel, E. E. (1996) 'Canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: Role of intracellular Ca²⁺', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74(11), pp. 1236–1248. doi: 10.1139/y96-128.

Montaño, L. M. and Bazán-Perkins, B. (2005) 'Resting calcium influx in airway smooth muscle', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(8–9), pp. 717–723. doi: 10.1139/y05-063.

Ohmann, J. A. (1984) '{Port-Orford-Cedar (*Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murr.) Parl.) An American Wood}', *Fs-228*. doi: citeulike-article-id:13651656.

Ohtsuka, Y., Yabunaka, N. and Takayama, S. (1998) 'Shinrin-yoku (forest-air bathing and walking) effectively decreases blood glucose levels in diabetic patients', *International Journal of Biometeorology*, 41(3), pp. 125–127. doi: 10.1007/s004840050064.

Ordoñez, C. L. *et al.* (2001) 'Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(2), pp. 517–523. doi: 10.1164/ajrccm.163.2.2004039.

Organización Mundial de la salud (2004) *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales*, Centro de prensa.

Available at: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>.

Park, B. J. *et al.* (2010) 'The physiological effects of Shinrin-yoku (taking in the forest atmosphere or forest bathing): Evidence from field experiments in 24 forests across Japan', *Environmental Health and Preventive Medicine*, 15(1), pp. 18–26. doi: 10.1007/s12199-009-0086-9.

Park, Y. *et al.* (2015) 'Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* in mice', *International Immunopharmacology*, 29(2), pp. 320–325. doi: 10.1016/j.intimp.2015.10.034.

Perusquía, M. *et al.* (2015) 'Testosterone-induced relaxation involves L-type and store-operated Ca²⁺ channels blockade, and PGE₂ in guinea pig airway smooth muscle', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4), pp. 767–777. doi: 10.1007/s00424-014-1534-y.

Rastogi, R. P. *et al.* (1979) 'Compendium of Indian medicinal plants', in *Central Drug Research Institute and Publications & Information Directorate*. Available at: <https://www.worldcat.org/title/compendium-of-indian-medicinal-plants/oclc/24464685>.

Ratz, P. H. *et al.* (2005) 'Regulation of smooth muscle calcium sensitivity : KCl as a calcium- sensitizing stimulus', (94). doi: 10.1152/ajpcell.00529.2004.

Reyes-García, J. *et al.* (2016) 'Tumor necrosis factor alpha inhibits L-Type Ca²⁺ channels in sensitized Guinea pig airway smooth muscle through ERK 1/2 pathway', *Mediators of Inflammation*, 2016. doi: 10.1155/2016/5972302.

Sakamoto, K. *et al.* (2003) 'Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: Possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway', *Journal Pharmacological Sciences*, 92(1), pp. 56–69. doi: 10.1254/jphs.92.56.

Santos, B. A. *et al.* (2011) 'Phytomedicine Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca²⁺ current blockade', *European Journal of Integrative Medicine*, 18(7), pp. 539–543. doi: 10.1016/j.phymed.2010.10.015.

Smith, E. C. J. *et al.* (2007) 'Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*', *Phytochemistry*, 68(2), pp. 210–217. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.001.

Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (2003) 'Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase', *Physiological Reviews*, 83(4), pp. 1325–1358. doi: 10.1152/physrev.00023.2003.

Sommer, B. *et al.* (2016) 'Na⁺ permeates through L-type Ca²⁺ channel in bovine airway smooth muscle', *European Journal of Pharmacology*, 782, pp. 77–88. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.040.

Sue-Goo, R. (2001) 'Regulation of Phosphoinositide-Specific', *Annu. Rev. Biochem*, 70, pp. 281–312.

Tamargo, J. and Ruilope, L. M. (2016) *Investigational calcium channel blockers for the treatment of hypertension*, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Taylor &

Francis. doi: 10.1080/13543784.2016.1241764.

Torres, K. (2019) *EXCITACIÓN Y CONTRACCIÓN DEL MUSCULO LISO, EXCITACIÓN Y CONTRACCIÓN DEL MUSCULO LISO*. Available at: <https://anromfisiologiablog.home.blog/2019/02/17/excitacion-y-contraccion-del-musculo-liso/>.

Touyz, R. M. *et al.* (2018) 'Vascular smooth muscle contraction in hypertension', *Cardiovascular Research*, 114(4), pp. 529–539. doi: 10.1093/cvr/cvy023.

Trnjar, K. *et al.* (2017) 'CORRELATION BETWEEN OCCURRENCE AND DETERIORATION OF RESPIRATORY DISEASES AND AIR POLLUTION WITHIN THE LEGALLY PERMISSIBLE LIMITS', *Acta Clin Croat*, 56(2), pp. 210–217. Available at: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/trnjar_2016-210.pdf.

Tucker, A. O. and Karchesy, J. J. (2000) 'Commercial "rose of cedar" oil, the wood oil of port orford cedar, *chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) parl. (Cupressaceae)', *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), pp. 24–26. doi: 10.1080/10412905.2000.9712032.

Umeno, K. *et al.* (2008) 'Effects of direct Cedrol inhalation into the lower airway on autonomic nervous activity in totally laryngectomized subjects', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65(2), pp. 188–196. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.02992.x.

Xiao, D. *et al.* (2001) 'Studies on constituents from *Chamaecyparis pisifera* and antibacterial activity of diterpenes', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(11), pp. 1479–1481. doi: 10.1248/cpb.49.1479.

Zamponi, G. W. *et al.* (2015) 'The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential', *Pharmacological Reviews*, 67(4), pp. 821–870. doi: 10.1124/pr.114.009654.