

“Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA**

PRESENTA:

L.F. EMMANUEL GAONA TOVAR

CO-DIRECTORES DE TESIS

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

DR. ISMAEL LEÓN RIVERA

CUERNAVACA, MORELOS

FECHA: 2020





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO
EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Emmanuel Gaona Tovar

Título de la tesis: "Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo)

20 de mayo de 2020

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2020-05-20 15:56:22 | Firmante
BOLKsNMbsWQqd3+PKsmfXx2tU8R+E25ojs/iWv+bNHYPgJoHs4iHeJOHuoS2H3WNvnbh2Gz2oi4NRUilzT34YBYN+vtkmrJXPXE5e//SUKBPAV5S3rTfj1VtyBAq+e1uzrLj5gQ
I2/RuvBM2+RNJ2z9Fb1pqUUpBJ6LuHZGAznQ3kWEW0uNfyXGumMBzocxgpMwqeYgbDVsl+ddYa9a3qKpGZUIA40Cu3mu0wXOXkDX5Me38mLWj12BdoVw+z1R/DQmusS
dz6sDDZD5CXV1OAAroW70a79/tsrdv0zzZW6RbHcLG16E0dDkuyyvKL1dGzRUTgUQsozr8macw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xdV7rNiiELf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Qing5PKNm87MU91wHIMnfybpKwZDVhB>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Emmanuel Gaona Tovar

Título de la tesis: "Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

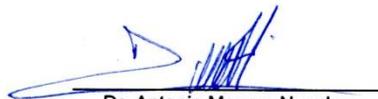
Miembro del jurado: Dr. Antonio Monroy Noyola

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Dr. Antonio Monroy Noyola

17/05/2020

Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Emmanuel Gaona Tovar

Título de la tesis: "Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Angélica Flores Flores

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Angélica Flores Flores

11/03/2020

Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO
EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Emmanuel Gaona Tovar

Título de la tesis: "Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jaime Escalante García

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:
 Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo)

Dr. Jaime Escalante García

20 Mayo 2020

fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Emmanuel Gaona Tovar

Título de la tesis: "Estudio químico y farmacológico de *Bocconia arborea* para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Dr. Sergio Alcalá Alcalá

10/03/2020

Fecha

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos a través de la Facultad de Farmacia y en Centro de Investigaciones Químicas por las instalaciones proporcionadas para poder llevar a cabo el proyecto de investigación.

A la beca otorgada a través del programa “Ayudantes de investigación para investigadores nacionales nivel 3” con número de expediente de ayudante: 14576

A CONACyT por la beca de maestría proporcionada con número CVU:828241

A CONACyT por el financiamiento otorgado a través del proyecto No. A1-S- 13540

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto y al Dr. Ismael León Rivera, por dirigir el presente proyecto de investigación, por sus enseñanzas, aportaciones, orientación, dedicación, paciencia y el apoyo académico y personal brindado, que permitieron la culminación del presente proyecto.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. German Bernal Fernández, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto y Dr. Ismael León Rivera por el apoyo y aportaciones para la realización del presente proyecto.

Al Dr. Hugo Tlahuext Romero, por la ayuda en la elucidación de los compuestos mediante difracción de rayos X.

Al Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, por la ayuda en la realización de las sales en su laboratorio.

A los miembros del jurado, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Antonio Monroy Noyola, Dra. Angélica Flores Flores, Dr. Jaime Escalante Garcia y Dr. Sergio Alcalá Alcalá por las aportaciones, comentarios y sugerencias para terminar el presente documento.

DEDICATORIAS

A mi madre-abuela Gloria, por ser mi guía durante todo el camino que eh recorrido hasta el momento, y sobre todo que sin ti no podría haber realizado nada. Muchas gracias te quiero demasiado y sobre todo que aún me sigues acompañando sin importar cual sea el reto que quiera afrontar.

A mi hermano Adalberto por siempre estar conmigo apoyándome de cualquier manera, ser mi guía y cuidas aún de mi.

A mi abuelo Agustín que, en estos momentos, aunque no se encuentre con nosotros siempre lo recordamos por sus enseñanzas de como afrontar los problemas.

Al resto de mi familia que de alguna manera esta y estará siempre conmigo.

Dr. Samuel gracias por haber sido mi director y mi amigo, este solo es el principio de los trabajos que realizaremos espero contar siempre con su guía y apoyo que aún nos falta el doctorado.

Dr. Ismael gracias por dirigir mi trabajo y apoyarme demasiado en muchos aspectos, tiene mi aprecio y admiración muchas gracias

Al equipo de trabajo del L-12 gracias porque siempre conté con su compañerismo y apoyo, es un orgullo seguir perteneciendo a este equipo de trabajo.

A mis asesorados, yulieth, alma, armando, janneth y angélica por permitirme ser parte de sus proyectos y compañeros que siempre me han apoyado en este trabajo, arlette, armando, angélica, janneth, ruben, mei-li y entre muchos más por su apoyo.

A los sucios (chambitas, dham, flaco, rosario, metal, deyra, angie, Angie flores paty y hugo), hugo Marquina, martin, armando, arlette, janneth y omar por todo el relajo y trabajo que pasamos en el laboratorio me pase muy buen rato con ustedes.

Y gracias a todos aquellos que de alguna manera me ayudaron a ser quien soy es difícil poner a cada uno, sería lo ideal pero jamás terminaría de redactarlo.

Sin antes mencionar que este trabajo es de ustedes, gracias por permitirles brindarles un poco de aquello que ustedes me dieron sin interes alguno mil gracias.

Índice general

Índice	ix
Índice de figuras	xiv
Índice de tablas	xv
Índice de espectros y cromatogramas	xvi
Índice de gráficas	xvi
Abreviaturas	xviii

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	4
4.1. Asma	4
4.2. Hipertensión arterial	4
4.3. Epidemiología	5
4.3.1. Asma	5
4.3.2. hipertensión	7
5. Musculatura lisa	9
5.1. Musculatura lisa vascular	9
5.2. Musculatura lisa de las vías aéreas	9
5.3. mecanismos de acción de la musculatura lisa vascular y de las vías aéreas	10
6. Familia <i>Papaveraceae</i>	11
6.1. <i>Bocconia arborea</i> posición sistemática.	12
6.2. Descripción	12
6.3. Usos en la medicina tradicional.	13
6.4. Composición fitoquímica.	13
6.5. Actividad biológica de los compuestos.	14
7. Efecto traqueo-relajante de los extractos orgánicos de corteza y hoja	16
8. Justificación	17
9. Hipótesis	18
10. Objetivos	19

10.1. Objetivo general	19
10.2. Objetivos particulares	19
11. Metodología	20
11.1. Recolección del material vegetal	20
11.2. Obtención de los extractos	20
11.3. Aislamiento y purificación del alcaloide dihidrosanguinarina.	20
11.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del EMBac.	21
11.5. Formación de los clorhidratos de dihidrosanguinarina y angolina.	21
12. Evaluaciones farmacológicas	21
12.1. Animales	21
12.2. Reactivos	21
12.3. Obtención de la tráquea y aorta aislada de rata.	22
12.4. Sistema de determinación del efecto tráqueo y vasorrelajante, registro de datos.	22
12.5. Evaluación del efecto tráqueo y vasorrelajante	22
12.6. Evaluación del efecto tráqueo y vasorrelajante de las fracciones obtenidas a partir del EMBac	24
12.7. Identificación estructural de los compuestos aislados	24
12.8. Evaluación del efecto relajante de angolina en anillos de tráquea y aorta aislada de rata.	24
12.9. Determinación del mecanismo de acción funcional sobre anillos de tráquea aislada de rata.	24
12.10. Participación de los receptores muscarínicos.	25
12.11. Participación de las enzimas fosfodiesterasas.	26
12.12. Participación de los canales de Ca^{2+} activados por KCl.	27
12.13. Determinación del mecanismo de acción funcional en aorta aislada de rata.	28
12.14. Participación de los receptores α - adrenérgicos	29
12.15. Participación de las fosfodiesterasas.	30
12.16. Participación de canales de calcio en contracciones inducidas por KCl y por $CaCl_2$	31
13. Determinación del efecto antihipertensivo del clorhidrato de dihidrosanguinarina en ratas espontáneamente hipertensas (shr).	32
13.1. Animales	32
13.2. Evaluación del efecto antihipertensivo del clorhidrato de dihidrosanguinarina en un modelo agudo no invasivo.	32

14. Resultados y discusión	33
14.1. Obtención de los extractos, rendimiento de los compuestos y clorhidratos.	33
14.2. Aislamiento y purificación de dihidrosanguinarina.	33
14.3. Caracterización de dihidrosanguinarina	35
14.4. Resonancia magnética nuclear ¹h y ¹³c de dihidrosanguinarina.	35
14.5. Fraccionamiento fitoquímico del EMBac	42
14.6. Aislamiento y caracterización de angolina	44
15. Determinación del efecto vasorrelajante y tráqueorrelajante de las fracciones 1-11 obtenidas a partir del EMBac	51
15.1. Determinación del efecto tráqueorrelajante	51
15.2. Participación de los canales de K⁺	53
15.3. Determinación del efecto vasorrelajante del EMBac y angolina.	56
15.4. Participación de los receptores α-adrenérgicos	60
15.5. Participación de los canales de calcio	62
15.6. Participación de los canales de K⁺	64
15.7. Participación de las fosfodiesterasas.	65
16. Conclusiones	67
17. Perspectivas	68
18. Referencias	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	12
<i>Bocconia arborea</i>	
Figura 2	14
Benzofenantridinas más representativas de la tribu <i>Bocconieae</i> . Tomado de Yu et al., 2014	
Figura 3	23
Esquema general de la evaluación del efecto relajante en tráquea y aorta aislada de rata	
Figura 4	25
Esquema del ensayo para determinar la participación de los receptores muscarínicos	
Figura 5	26
Esquema del ensayo para determinar la participación de las fosfodiesterasas	
Figura 6	27
Esquema del ensayo para determinar la participación de los canales de Ca ²⁺ activados por KCl	
Figura 7	28
Determinación del mecanismo de acción del EMBac con los inhibidores L-NAME, ODQ e indometacina en anillos de aorta aislada de rata.	
Figura 8	29
Esquema del ensayo para determinar la participación de los receptores α -adrenergicos en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio	
Figura 9	30
Esquema del ensayo para determinar la participación de las fosfodiesterasas en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio	
Figura 10	31
Esquema del ensayo para determinar la participación de los canales de calcio en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio	
Figura 11	34
Proceso de purificación de la dihidrosanguinarina, verificado por cromatografía en capa fina revelado con una lámpara UV con onda corta y onda larga	
Figura 12	35
Cromatografía en capa fina del proceso de purificación de dihidrosanguinarina.	
Figura 13	41
Vista estereoscópica de dihidrosanguinarina obtenida por difracción de rayos X	
Figura 14	42
Proceso de fraccionamiento primario en columna abierta, partiendo de 6 g de lavado metanólico del EMBac	

Figura 15	44
Cromatografía en capa fina del proceso de obtención del alcaloide dihidrosanguinarina	
Figura 16	50
Vista estereoscópica de angolina obtenida por difracción de rayos X	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	6
Tratamiento escalonado recomendado por la GINA	
Tabla 2	8
Carga económica de enfermedades no contagiosas, 2011-2025	
Tabla 3	8
Definición y clasificación de nivel de presión arterial	
Tabla 4	33
Rendimiento de los compuestos y clorhidratos	
Tabla 5	36
Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos de RMN ¹ H 500MHz de dihidrosanguinarina	
Tabla 6	38
Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos de RMN ¹³ C DEPTQ 500MHz de dihidrosanguinarina	
Tabla 7	43
Resumen del fraccionamiento primario del EMBac	
Tabla 8	45
Desplazamientos químicos (ppm) de angolina RMN ¹ H 500MHz	
Tabla 9	46
Desplazamientos químicos (ppm) de angolina RMN ¹³ C DEPTQ 500MHz	
Tabla 10	46
Interacciones observadas en el espectro ¹ H COSY	
Tabla 11	47
Interacciones NOESY (¹ H- ¹ H) y HSQC (¹ H- ¹³ C)	
Tabla 12	49
Interacciones HMBC ¹³ C- ¹ H	

ÍNDICE DE ESPECTROS Y CROMATOGRAMAS.

Espectro 1	37
RMN ¹ H 500 MHz de dihidrosanguinarina	
Espectro 2	39
RMN DEPTQ ¹³ C 500 MHz de dihidrosanguinarina	
Espectro 3	40
Espectro de masas obtenido mediante GC-MS de dihidrosanguinarina	
Espectro 4	77
RMN ¹ H 500 MHz de angolina	
Espectro 5	78
RMN ¹ H 500 MHz de angolina ampliación 1	
Espectro 6	79
RMN ¹ H 500 MHz de angolina ampliación 2	
Espectro 7	80
RMN DEPTQ ¹³ C 500 MHz de angolina	
Espectro 8	81
RMN COSY ¹ H 500 MHz de angolina	
Espectro 9	82
RMN HSQC ¹³ C- ¹ H 500 MHz de angolina	
Espectro 10	83
RMN HMBC ¹³ C- ¹ H 500 MHz de angolina	
Espectro 11	84
RMN NOESY ¹ H- ¹ H 500 MHz de angolina	
Cromatograma 1	40
Cromatograma obtenido mediante GC-MS de dihidrosanguinarina.	

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	52
Evaluación del efecto relajante de angolina y clorhidrato de angolina en tráquea aislada de rata.	
Gráfica 2	53
Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a la CE ₅₀ 117 µg/mL sobre anillos de tráquea aislada de rata	
Gráfica 3	54

Efecto relajante del EMBac en presencia de TEA [632µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni ***p<0.001 EMBac vs EMBac + TEA	
Gráfica 4	55
Efecto relajante del EMBac en presencia de glibenclamida [10µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni.	
Gráfica 5	56
Efecto relajante del EMBac en presencia y ausencia de endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni *p<0.05	
Gráfica 6	57
Efecto relajante de angolina en presencia y ausencia de endotelio sobre anillos de aorta aislada de rata. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni *p<0.05 Angolina e+ vs Angolina e-.	
Gráfica 7	58
Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a una concentración de 16 µg/mL en anillos de aorta aislada de rata con endotelio intacto.	
Gráfica 8	59
Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a una concentración de 64 µg/mL en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.	
Gráfica 9	61
Efecto de la CE ₅₀ [64 µg/mL] del EMBac en la contracción inducida por noradrenalina [0.03-10µM] en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni ***p<0.001 control NA vs CE ₅₀ [64 µg/mL] EMBac.	
Gráfica 10	63
Efecto de la CE ₅₀ [64 µg/mL] del EMBac en la contracción inducida por CaCl ₂ [0.081-27.03mM] en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni *p<<0.05, ***p<0.001 control CaCl ₂ vs CaCl ₂ + [64 µg/mL] EMBac.	
Gráfica 11	64
Efecto relajante del EMBac en presencia de TEA [632 µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni *p<0.05 ***p<0.001 EMBac e- vs EMBac + TEA.	
Gráfica 12	66
Efecto relajante del EMBac en presencia de teofilina [124.68 µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba <i>pos hoc</i> Bonferroni *p<0.05 ***p<0.001 EMBac e- vs EMBac + Teofilina.	

Abreviaturas

[Ca ²⁺]	Concentración del ion calcio
°C	Grados centígrados
μM	Micromolar
ACE	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
Am	Aguas madres
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina monofosfato
ARBs	Antagonistas de los receptores de angiotensina II
BPA	Benzofenantridinas
Ca ₂₊	Ion calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCBs	Bloqueadores de canales de calcio de larga duración
CCR	Curva Concentración Respuesta
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CEIB	Centro de investigación en biotecnología
CO ₂	Dióxido de carbono
COX 1	Ciclooxigenasa 1
DAG	Diacilglicerol
DHS	Dihidrosanguinarina
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
EH	Extracto Hexánico
EI	Impacto electrónico
EM	Espectrometría de masas
E _{max}	Efecto máximo
EMBac	Extracto Metanólico de <i>Bocconia arborea</i> de corteza
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FC	Frecuencia cardíaca
GBD	Prevalencia mundial de la enfermedad
GINA	Iniciativa global para el asma
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Glutation transferasa
ICS	Corticoesteroides inhalados
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
LABA	Agonistas β ₂ de acción larga
L-NAME	L-Nitro Arginina Metil Ester

LTRA	Antagonistas de receptores de leucotrienos
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLV	Musculatura Lisa Vasculat
MLVA	Musculatura Lisa de las Vías Aéreas
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Óxígeno molecular
OCS	Corticoesteroides orales
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
OMS	Organización mundial de la salud
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PDE4D	Fosfodiesterasa 4D
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PKC	Proteína cinasa C
PPAR gamma	Peroxisome Proliferators-Activated Receptor
ppm	Partes por millon
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SABA	Agonistas β ₂ de acción corta
SHR	Ratas espontaneamente hipertensas
SOD	Super óxido dismutasa
TEA	Tetraetilamonio
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos

1. Resumen

La musculatura lisa se encuentra en varios tejidos de gran importancia fisiológica, entre ellos se encuentran la musculatura lisa de los vasos sanguíneos y de las vías aéreas. Estos desempeñan un papel crucial en la regulación de la presión arterial y el flujo de aire que ingresa a los pulmones, respectivamente. Cualquier anomalía que altere la función normal de estos, ocasionan distintas enfermedades crónicas, como la hipertensión arterial y el asma. Estas enfermedades son de alta prevalencia a nivel mundial y su tratamiento, en muchos países en vías de desarrollo, no se encuentra accesible o en muchos casos su alto costo no permite que el medicamento sea asequible para la población. En este sentido, la investigación científica en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas se ha enfocado en el estudio de los productos naturales, basándose en la medicina tradicional reconocida como un recurso fundamental para la salud entre la población para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como la hipertensión, el asma, la diabetes, entre otras. Dada la situación actual, se propuso a *Bocconia arborea* para su estudio en la búsqueda de moléculas bioactivas con actividad relajante de la musculatura lisa, dicha planta es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas y diabetes, adicionalmente, en el equipo de trabajo del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, se determinó el efecto relajante en tráquea aislada de rata de los extractos orgánicos de corteza y hoja, resultando el extracto metanólico de corteza el más activo de todos los evaluados. Dado a los antecedentes descritos, en el presente trabajo, se determinó el efecto vasorrelajante del extracto metanólico de corteza en anillos de aorta aislada de rata en presencia y ausencia de endotelio precontraídos con noradrenalina [0.1 μM]. El efecto vasorrelajante del Extracto fue independiente de la presencia de endotelio y dependiente de la concentración (E_{max} 68.7 ± 5.59 % y una CE_{50} 16.23 ± 7.32 μg/mL, en presencia de endotelio; y E_{max} 88.59 ± 8.17 % y una CE_{50} 64 ± 7.41 μg/mL, en ausencia de endotelio). Continuando con el estudio, el extracto referido fue fraccionado por cromatografía en columna abierta, obteniendo un total de 11 grupos de fracciones primarias, de las cuales, las fracciones 4-9 fueron las más activas en la aorta y la tráquea. De la fracción 5, se aisló la angolina que tiene un efecto vasorrelajante interesante en presencia de endotelio (E_{max} 74.15 ± 2.78 % y una CE_{50} 34.56 ± 8.96 μM), y ausencia de endotelio (E_{max} 79.46 ± 3.49 % y una CE_{50} 35.3 ± 9.29 μM). Para finalizar, se determinó que el mecanismo de acción del extracto metanólico en aorta aislada de rata está mediado por un posible bloqueo de los canales de calcio, mientras que en tráquea el mecanismo está mediado por la inhibición de fosfodiesterasas y la apertura de canales de potasio.

2. Abstract

The smooth muscle is found in several tissues with physiological importance such as vascular and airway systems. They play a crucial role in the regulation of blood pressure and air flow into the lungs, respectively. Any abnormality that alters the normal function of those, cause different chronic diseases as high blood pressure and asthma. These diseases are highly prevalent worldwide and their treatment, in development countries, is not accessible, or in many cases their high cost does not make the medicine affordable to the population. In this sense, scientific research in the looking for new bioactive molecules has focused on the study of natural products, based on medicinal plants that are used for the treatment of various diseases, such as hypertension, asthma, diabetes, among others. Thus, *Bocconia arborea* was proposed for the study in the search of bioactive molecules with relaxing activity of the smooth muscle, this plant is used in traditional medicine for the treatment of infectious diseases and diabetes, among other. In addition, in our research group, leads by Dr. Samuel Estrada-Soto, was determined the relaxing effect in isolated rat trachea of organic extracts from bark and leaf, being the most active the methanolic extract from bark. Thus, in current work, it was evaluated the vasorelaxing effect of the methanolic extract of bark on isolated aorta rat rings in presence and absence of endothelium pre-contracted with noradrenaline [0.1 μ M]. the vasorelaxant effect of the extract in presence (E_{max} 68.7 \pm 5.59 % and a CE_{50} 16.23 \pm 7.32 μ g/mL) and absence of endothelium (E_{max} 88.59 \pm 8.17 % and a CE_{50} 64 \pm 7.41 μ g/mL) indicates that the effect is endothelium-independent and concentration-dependent. Continuing with the study, this extract was fractionated by open column chromatography, obtaining a total of 11 group of fractions, being fractions 4 to 9 the most active, in both aorta and trachea. From fraction 5, angolin was isolated, which showed interesting vasorelaxing effect in the presence (E_{max} 74.15 \pm 2.78 % and a EC_{50} 34.56 \pm 8.96 μ M) and absence of endothelium (E_{max} 79.46 \pm 3.49 % and a EC_{50} 35.3 \pm 9.29 μ M). Finally, it was determined that the relaxant mechanism of action in both, isolated rat aorta is mediated by a possible calcium channels blockage, whereas in the trachea the mechanism is mediated by the inhibition of phosphodiesterases and the opening of potassium channels.

3. Introducción

Desde tiempos remotos, la humanidad ha utilizado los recursos naturales para su progreso como sociedad, así mismo, para aliviar y curar las enfermedades que los han aquejado mediante el empleo de plantas que posteriormente se les atribuyó su uso medicinal.

La medicina tradicional o no convencional es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. También suele denominarse medicina complementaria. Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, y prevenir y tratar enfermedades, en particular crónicas degenerativas (**OMS, 2013**) como el asma y la hipertensión. Es por esto que gran parte de la población mundial utiliza la medicina tradicional en el cuidado de su salud, como herramienta terapéutica. Estudios etnofarmacológicos recientes de plantas se han utilizado para la identificación de nuevos compuestos bioactivos (**Buenz et al., 2018**).

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se pretende aislar y caracterizar, de la planta medicinal *Bocconia arborea* a partir de la corteza, el(os) componente(s) responsable(s) que presenten actividad relajante de la musculatura lisa vascular y de las vías aéreas y determinar el mecanismo de acción funcional en un modelo *ex vivo* de tráquea y aorta aislada de rata.

4. Antecedentes

4.1. Asma

Es una enfermedad que se ha padecido a lo largo de la historia de la humanidad, presentándose en la mayoría de las civilizaciones, aunque el término asma aún se desconocía, dicha enfermedad en la mayoría de los casos era referenciada como la dificultad de respirar **(Gurrola & Huerta, 2013)**. No fue hasta que Galeno entre los años 130-200 antes de nuestra era que modificó la definición inicial de Hipócrates y sugiere que el asma es una “enfermedad que se caracteriza por presentar una respiración acelerada, corta y ruidosa, es decir, dificultad respiratoria, en la que carecía de la presencia de fiebre” **(Gurrola & Huerta, 2013)**. Cabe resaltar que es una enfermedad respiratoria compleja cuya incidencia en el mundo se ha incrementado en la última década, la cual no tiene cura. A pesar de que los tratamientos con fármacos broncodilatadores y antiinflamatorios son efectivos en algunos pacientes con este padecimiento, estos no satisfacen terapéuticamente algunos pacientes asmáticos con padecimiento severo **(Camoretti-Mercado, 2009)**. Así mismo, dicha enfermedad es definida por la iniciativa global para el asma por sus siglas en inglés (GINA) como una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías aéreas. Que se define por un historial de síntomas respiratorios como sibilancias, dificultad para respirar y tos, que varían en tiempo e intensidad, acompañado con una limitación variable del flujo aéreo espiratorio. **(GINA, 2018)**

4.2. Hipertensión arterial

Es un factor de riesgo importante para el padecimiento de enfermedades cardiovasculares y ataque fulminante, con el fin de tener un mejor control al paciente que padece esta enfermedad se han propuesto las siguientes definiciones que establecen que el paciente padece de hipertensión arterial **(American Hearth Association, 2016)**. Presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg o en el tratamiento con un medicamento antihipertensivo o después que un médico o un profesional de la salud le haya informado que padece hipertensión arterial **(American Hearth Association, 2016)**.

La hipertensión arterial sistémica, es uno de los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes a nivel mundial y afecta a las sociedades modernas, entre ellas a la sociedad mexicana. Se han realizado diversas encuestas a lo largo de 22 años en el país, en donde se demostró un incremento sostenido de su prevalencia en personas de 20 años y más de esta edad **(PROY-NOM-030-SSA2-2017)**.

4.3. Epidemiología

4.3.1. ASMA

El asma es una enfermedad pulmonar crónica, cuya prevalencia va en aumento, en 2016, un estudio de la prevalencia mundial de la enfermedad (GBD por sus siglas en ingles), estimaron que alrededor de 339.4 millones de personas en el mundo son afectadas por esta enfermedad (**Global Asthma Report, 2018**). El número de personas que padecían enfermedades crónico respiratorias eran 571.4 millones en el mundo en 2017, de los cuales el asma es la enfermedad crónico respiratoria más común, seguida de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (**GBD, 2017**). Por otro lado, en un estudio realizado por **Ebmeier et al., 2017** sobre la tasa de mortalidad del asma en 46 países, se estableció que, en una población con una edad entre 5-34 años, ocurría una tasa de 0.44 muertes por cada cien mil habitantes en el año de 1993 y de 0.19 por cada cien mil habitantes en 2006, cuyos resultados demostraron una disminución en la mortalidad de la enfermedad durante este periodo en un 57%, y no hubo cambio en esta tasa durante el periodo que comprendió del año 2006-2012. Sin embargo, aunque se ha demostrado una reducción en la tasa de mortalidad de individuos que padecen dicha enfermedad; la incidencia de la misma va en aumento (**GBD, 2017**). Con base en esto, el Reino Unido es la nación más afectada por este tipo de padecimiento, teniendo una población de 5.4 millones que reciben tratamiento para el control de su asma, y tan solo en 2011-2012 ingresaron al servicio de urgencias 65000 personas por complicaciones (**Royal College of Physicians ,2014**). Aunque la mortalidad ha disminuido, es necesario conocer las tasas de prevalencia e incidencia de la enfermedad. Ya que estas nos permitirán abordar a la misma, tanto para su control poblacional como individual. Datos recientes indican que el asma tiene un costo anual por persona muy variable dependiendo del país de residencia del paciente, teniendo, por ejemplo, que el costo de la enfermedad para una persona que reside en Abu Dhabi, en los Emiratos Arabes Unidos su costo es menor a 150 dólares por persona, mientras que para un paciente en los Estados Unidos tiene un costo de 3000 dólares (**Ehteshami-Afshar et al., 2016**). En este sentido, es de vital importancia conocer el grado de avance de la enfermedad, por esto mismo, la iniciativa global para el asma clasifica a la misma con base en su severidad que va desde leve, moderada y severa; y esta clasificación está basada de acuerdo al abordaje terapéutico que se les brinda a los pacientes, tomando como leve aquel paciente que presenta pocas exacerbaciones y severa aquel que presenta muchas exacerbaciones porque su asma no está controlada o su tipo de asma es grave. Para el abordaje terapéutico del paciente asmático, según las recomendaciones de la GINA, debe

ser un ciclo en el cual se tenga como objetivo el prevenir las exacerbaciones y controlar los síntomas del paciente, mediante la evaluación, el ajuste del tratamiento y la revisión de la respuesta (GINA, 2019). Los pasos para el tratamiento se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1 Tratamiento escalonado recomendado por la GINA para el tratamiento del asma. Tomado y modificado de GINA, 2019

Paso	Elección del tratamiento controlador preferido	Otras opciones de tratamiento controlador	Tratamiento de rescate preferido	Otras opciones de tratamiento de rescate
1	Corticoesteroides inhalados (ICS)-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	ICS a dosis bajas cada vez que se toma SABA.	ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Agonistas β_2 de acción corta (SABA) según sea necesario.
2	ICS diario o ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Antagonistas de receptores de leucotrienos (LTRA) o ICS a dosis bajas cada vez que se toma SABA.	ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Agonistas β_2 de acción corta (SABA) según sea necesario.
3	Dosis bajas ICS-agonistas β_2 de acción larga (LABA).	Dosis intermedias ICS, o dosis bajas ICS+LTRA.	ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Agonistas β_2 de acción corta (SABA) según sea necesario.
4	Dosis intermedias ICS-LABA.	Dosis altas ICS, agregue tiotropio, o agregue LTRA.	ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Agonistas β_2 de acción corta (SABA) según sea necesario.
5	Dosis altas de ICS-LABA, refiera para investigación fenotípica. Agregue terapia ejemplo: Tiotropio, anti-IgE, anti-IL5/5R, anti-IL4R.	Agregue dosis bajas de corticoesteroides orales (OCS), pero considere efectos secundarios.	ICS-formoterol a dosis bajas según sea necesario.	Agonistas β_2 de acción corta (SABA) según sea necesario.

4.3.2. HIPERTENSIÓN

En 2008 ocurrieron alrededor de 57 millones de muertes, de las cuales 36 millones (63%) fueron debidas a enfermedades no transmisibles; estas comprenden a las enfermedades cardiovasculares (48%), el cáncer (21%), las enfermedades crónico-respiratorias (12%) y la diabetes (3.5%) **(OMS, 2013)**. Actualmente se estima que alrededor de 1130 millones de personas padecen esta enfermedad y dos terceras partes de esta población reside en países de ingresos bajos y medianos **(OMS, 2019)**

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes al año, que representa casi un tercio del total, siendo así, las complicaciones de la hipertensión arterial las causantes de 9.4 millones de muertes anualmente. Las cardiopatías (45%) y el accidente cerebrovascular (51%) representan las principales causas de muerte en el mundo **(OMS, 2013)**.

En México, según el reporte de ENSANUT 2016, la prevalencia de la enfermedad es de un 25.5% y, de esta población, un 40% desconocía que padecía dicha enfermedad. Dicha enfermedad que afecta tanto a hombres (24.9%) como a mujeres (26.1%); de los cuales en el caso de los hombres el 48.6% y el 70.5% de las mujeres conocían que padecían hipertensión arterial **(ENSANUT, 2016)**.

Cerca de un 80 % de las muertes debido a enfermedades cardiovasculares acontecen en países de bajo y mediano ingreso, lo que genera un gran gasto para la economía de dichos países en los que influyen muchos factores, por ejemplo: muerte prematura, discapacidad, interrupción personal y familiar, pérdida de ingresos y gastos debido al cuidado para controlar la hipertensión. Las pérdidas proyectadas debido a enfermedades no contagiosas crónicas asciende a 7.28 trillones de dólares en el periodo de 2011-2025 **(OMS, 2013)**, Como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Carga económica de enfermedades no contagiosas, 2011-2025 (US\$ trillones en 2008). Tomado y modificado de (OMS, 2013).

Grupo (ingresos)	Diabetes	Enfermedades cardiovasculares	Enfermedades respiratorias	Cáncer	Total
Medio alto.	0.31	2.52	1.09	1.2	5.12
Medio bajo.	0.09	1.07	0.44	0.26	1.85
Bajo.	0.02	0.17	0.06	0.05	0.31
Total de bajo y medio.	0.42	3.76	1.59	1.51	7.28

Conociendo el tipo de gasto que genera el padecimiento de la hipertensión arterial, ha sido necesario, en primera instancia, clasificarla de acuerdo a los valores de presión arterial en mmHg, con el fin de atender más eficazmente de acuerdo al grado de la enfermedad que el paciente se encuentra padeciendo y, así mismo, dar un tratamiento farmacológico adecuado, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 Definición y clasificación de nivel de presión arterial. (mmHg). Tomado y modificado de (American Heart Association, 2018)

Categoría	Sistólica		Diastólica
Normal	<120	y	<80
Elevada	120-129	y	<80
Presión arterial alta (hipertensión) nivel 1	130-139	o	85-89
Presión arterial alta (hipertensión) nivel 2	140>	o	90>

Para la mayoría de los pacientes, los diuréticos de tipo tiazídicos, bloqueadores de canales de calcio de larga duración (CCBs), particularmente de la clase de dihidropiridinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARBs), todos son recomendados como medicamentos de primera elección para el tratamiento de la hipertensión (Patel *et al.*, 2016). Esto basado en el grado de hipertensión del paciente empleando solo un medicamento o combinaciones de los mismos para normalizar la presión arterial.

5. Musculatura lisa

Las células de la musculatura lisa se encuentran en las paredes de varios órganos huecos en el cuerpo, estos están conformados en forma de hojas o capas. Este tipo de musculatura se encuentra en los vasos sanguíneos, las vías aéreas, estómago, intestinos, entre otros. Cuando este se contrae, las células de la musculatura lisa se acortan, impulsando así el contenido de los órganos, haciendo que haya variación del diámetro de los tubos o vasos sanguíneos, regulando el flujo de sus contenidos (**Webb, 2003**).

5.1. Musculatura lisa vascular

Es el mayor componente de la túnica media de los vasos sanguíneos y es un regulador importante de la función vascular, esto debido a que regula la resistencia vascular periférica y la presión sanguínea. La disfunción de este tejido, causa una vasoconstricción excesiva y vasoespasmo que conllevaría a desórdenes cardiovasculares como la hipertensión y enfermedad en las arterias coronarias (Liu, 2018). La contractibilidad de dicho tejido está mediada por una serie de eventos bioquímicos, que comienza por la interacción de un agonista con su receptor que conlleva a la activación de la fosfolipasa C, esta misma, cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bis-fosfato en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ es el responsable de la salida de Ca²⁺ de los almacenes celulares, por otro lado, el DAG activa la proteína cinasa C (PKC) y causan la contracción del tejido por la formación del complejo Ca²⁺/calmodulina y activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina, que a su vez fosforila la cadena ligera de miosina y la musculatura lisa se contrae (**Raouf & van Breemen, 1987**). Por otro lado, el proceso de relajación está mediado por distintos factores, en los que se encuentran los endoteliales como el Óxido Nítrico (NO) y la prostaglandina I₂ (PGI₂), principalmente, y los relacionados directamente sobre la musculatura lisa como lo son la producción de segundos mensajeros por la estimulación de la adenilato ciclasa y guanilato ciclasa soluble, el bloqueo de canales de calcio tipo L o la apertura de canales de K⁺ (**Cahill & Redmon, 2016, Brozovich et al., 2016**).

5.2. Musculatura lisa de las vías aéreas

La contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas juega un papel importante funcional y estructural en los pulmones durante la vida, presentándose como bandas musculares en la porción posterior de los cartílagos centrales grandes de las vías aéreas y arreglado de manera circunferencial alrededor de las vías aéreas pequeñas de la periferia, localizados en lo distal de los pulmones (**Lam, Lamanna & Bourke, 2019**). Así mismo, también cumple un rol fisiológico que contribuye a combinar la ventilación con la perfusión. Por otro lado,

confiere estabilidad mecánica a las vías aéreas no cartilaginosas y previene la inhalación de agentes tóxicos de llegar al espacio alveolar (**Pelaia et al., 2008**). Por otro lado, la contracción de la musculatura se encuentra mediada por un aumento en el Ca^{2+} intracelular. Principalmente, mediada por una señalización colinérgica que involucra la activación del receptor M_3 muscarínico acoplado a proteína $G_{\alpha q/11}$ que activa la fosfolipasa C, que a su vez produce inositol trifosfato. Y promueve la salida del Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, el cual se une a la calmodulina y activa la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que fosforila a la miosina y esta se entrelaza con la actina y se genera la contracción (**Noble et al., 2014**).

5.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR Y DE LAS VÍAS AÉREAS

El proceso de contracción de la musculatura lisa vascular esta mediada principalmente por la interacción de un agonista con su receptor, esto se debe a la interacción de la noradrenalina (NA) con el receptor α -adrenérgico, promoviendo una cascada de señalización que finaliza con la interacción de la cadena ligera de miosina con la de actina, tal y como lo describe **Cahill & Redmon, 2016. Brozovich et al., 2016**. En este mismo sentido, la contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas esta mediada principalmente por el agonismo de la acetilcolina con su receptor M_3 y de igual manera finaliza con la interacción de la cadena ligera de miosina con la actina como es descrito por **Noble et al., 2014**. En ambos casos, la contracción de la musculatura lisa esta mediada por dos neurotransmisores noradrenalina y acetilcolina, ejerciendo efectos fisiológicos distintos sobre ambos tejidos, siendo la NA el agente contráctil sobre la Musculatura Lisa Vascular (MLV) y relajante sobre la Musculatura Lisa de las Vías Aéreas (MLVA). En el caso de la acetilcolina, está induce la contracción sobre la MLVA y la relajación en la MLV. En ambos casos, los procesos mediante los cuales la musculatura lisa revierte el proceso de contracción, se encuentran mediados por un incremento de los segundos mensajeros cíclicos como AMPc y GMPc, que son producidos por la activación de la adenilato ciclasa y la guanilatlo ciclasa soluble (**Hamad et al., 2003, Brozovich et al., 2016**). En este sentido, las fosfodiesterasas son las enzimas responsables de la degradación de los segundos mensajeros como AMPc y GMPc en AMP y GMP. Por la actividad descrita para estas enzimas, se han tomado en cuenta como posibles blancos terapéuticos, puesto que al ser inhibidas aumenta el tiempo de vida media de estos mensajeros y permiten la relajación de la musculatura lisa (Klinger & Kadowitz, 2017. Ramírez-Lee et al., 2013), es por esto que varios grupos de trabajo como Kranz et al., 2009, evaluaron diversos compuestos sobre la

fosfodiesterasa 4D (PDE4D), en los que se ocuparon como estructura base n-sustituidos tetrahidroxibenzotiofeno, 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1-benzotiofen-3-carboxamida. En este sentido, Donnell *et al.*, 2010, realizaron análogos del Piridazino[4,5-b]indolizinas como inhibidores de la fosfodiesterasa 4B como potenciales moléculas diseñadas para el tratamiento del asma. Otros grupo de trabajo como Goto *et al.*, 2013, y Ting *et al.*, 2013, se han centrado en la búsqueda de este tipo de compuestos pero para ser inhalados o administrados por vía oral, en el que han demostrado una actividad interesante del compuesto 34 un derivado con núcleo de oxazol, sustituido con grupos de 4-carboxamida y 5-aminometil, como un candidato para el tratamiento de enfermedad pulmonar crónico obstructiva. El incremento del $[Ca^{2+}]$ es responsable del incremento del tono vascular, y la resistencia vascular periférica y la presión sanguínea, pueden ser el resultado del ingreso de Ca^{2+} a través de los canales iónicos del sarcolema activados por hormonas, caída de los almacenes intracelulares o por la despolarización de la membrana o su liberación de los almacenes intracelulares (Tamargo & Ruilope, 2016). Por lo cual, el bloqueo de los canales de calcio favorece la relajación de la musculatura lisa al impedir el ingreso del ion Ca^{2+} a través de dichos canales y por ende favoreciendo la recaptura del Ca^{2+} que se encuentra en el citoplasma hacia el retículo sarcoplásmico.

6. Familia *Papaveraceae*

Es una pequeña familia que engloba alrededor de 43 géneros y 665 especies distribuidas en las regiones templadas del norte del planeta, principalmente (Verma, 2011). Están divididas en 3 subfamilias y 8 tribus. En lo que respecta a toda la familia, las especies de Norteamérica pertenecen al grupo más primitivo en el sistema de evolución, donde forman un antiguo centro de distribución. En el área del mediterráneo se encuentran los géneros más evolucionados y forman otro centro de distribución en conjunto con el Himalaya (Zhuang & Chuang, 1993).

6.1. *Bocconia arborea* posición sistemática.

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Clase: *Equisetopsida*

Orden: *Ranunculales*

Familia: *Papaveraceae*

Género: *Bocconia*

Especie: *arborea*

(Enciclovida, 2019)

6.2. Descripción

Es un árbol de 4.5 a 7.6 metros de altura y hasta 6 metros de diámetro. Las hojas son ovales a oblongo-lanceoladas y profundamente pinnatífidas. Son glabros arriba, pálidos y tomentosos o glabros abajo. La corteza está profundamente agrietada y taponada (Michael, 1972), teniendo distintos nombres comunes siendo mayormente conocido como palo llora sangre o palo de judas en el municipio de Cuernavaca, en el que se tomó la foto de la figura 1.



Figura 1 *Bocconia arborea*. Imagen propia.

6.3. Usos en la medicina tradicional.

Es una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones que se mencionarán a continuación:

El látex se usa localmente para curar enfermedades de la piel. En el caso de padecer granos o jiones en las manos, se unta en la zona afectada el zumo previamente recogido con un algodón y colocado en un frasco con alcohol. Del mismo modo, la savia que brota del peciolo de la hoja o del tallo, se puede aplicar sobre los jiones las veces que sean necesarios. Adicionalmente, se tienen empeines se frota la parte afectada con un tamal hecho a partir de las hojas. Es utilizada para el control de los abscesos y el látex calma el dolor ocasionado por la estomatitis. En este sentido la corteza se bebe diariamente preparada en un té, para curar el dolor de espalda y si se sufre de flojura de cintura, bilis o anemia, se hierven 5 partes (0.5 g cada uno) de su tallo y se bebe como agua de tiempo, de igual manera para padecimientos del riñón. Por último, el piquete de araña se contrarresta untando en el lugar afectado el agua hervida con la hoja y se aplica lo más caliente que se aguante (**Monroy-Ortíz & Castillo-España, 2007**).

6.4. Composición fitoquímica.

Las plantas de la familia *Papaveraceae* son bien conocidas por su extenso uso económico y medicinal, debido a su rica producción de alcaloides. Dentro de esta familia se encuentra la tribu *Bocconieae* que está comprendida por dos géneros estrechamente relacionados, *Macleaya* y *Bocconia*. Actualmente, se han descrito un total de 75 alcaloides para las especies de la tribu *Bocconieae* hasta ahora, en los que se incluyen a las benzofenantridinas (BPAs) siendo los compuestos predominantes (50) como se muestran algunos en la figura 2, protoberberinas (14), protopinas (5) y de otros tipos (6). Los alcaloides del tipo BPAs, son derivados de las protoberberinas vía de la escisión del enlace N-C₆ y la formación del enlace C₆-C₁₃ siendo una de las características y componentes quimiotaxonómicos de las plantas de la familia *Papaveraceae* (**Yu et al., 2014**).

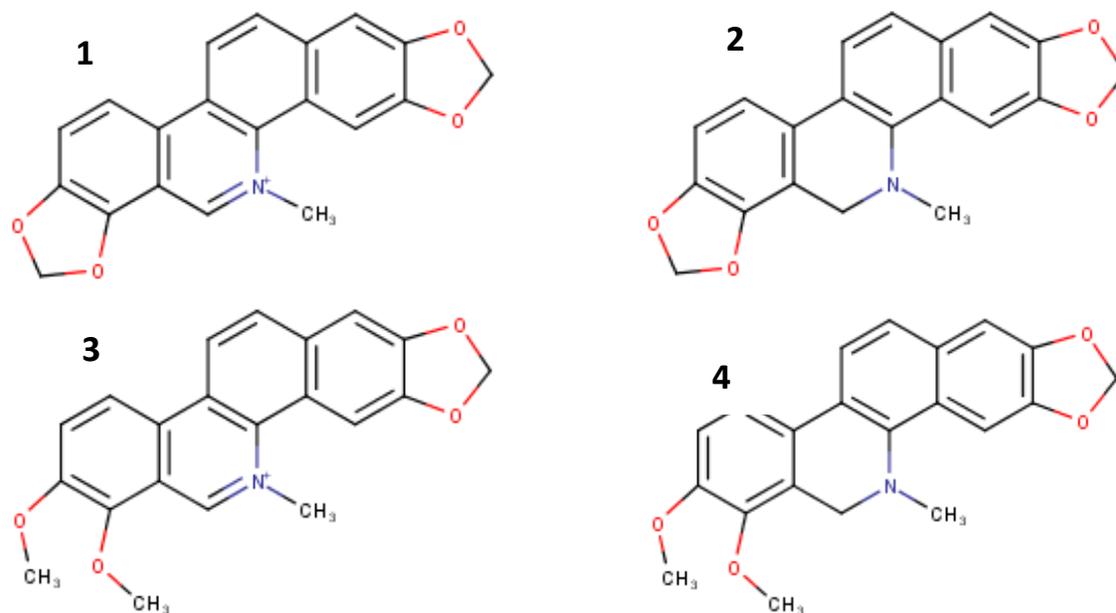


Figura 2 Benzofenantridinas más representativas de la tribu *Bocconieae*. Tomado de **Yu et al., 2014**. 1) sanguinarina, 2) dihydrosanguinarina, 3) queleritrina y 4) dihidroqueleritrina.

6.5. Actividad biológica de los compuestos.

Como se describió anteriormente, los alcaloides del tipo benzofenantridina son el marcador quimiotaxonómico de la tribu *Bocconieae* en la que se encuentra *Bocconia arborea* que tiene una rica producción de este tipo de alcaloides en los que se encuentran los reportados por **Gutiérrez et al., 2002**, como: Sanguinarina, dihydrosanguinarina, oxisanguinarina, 11-Acetonildihidroqueleritrina, angolina, dihidroqueleritrina, queleritrina y queleritridimerina, alguno de estos mismos alcaloides también fueron aislados previamente por **Mclean, 1969**. Adicionalmente, **Julián & Delgado 2001** aislaron y determinaron la estructura de 2 alcaloides, la bocconarborina A y bocconarborina B. En este sentido, los dos alcaloides más estudiados son sanguinarina y queleritrina, los cuales se han descrito diversas actividades tal como antimicrobiana (**Navarro & Delgado, 1998, Miao et al., 2011**), antioxidante (**Pérez et al., 2003**), acaricida (**Miao et al., 2012**) citotóxica (**Galadari et al., 2017, Zhang et al., 2012, Chang et al., 2003**) y se determinó el efecto toxicológico de un aditivo alimenticio llamado sangrovit[®] que contenía como constituyentes principales sanguinarina y queleritrina, siendo administrado por 90 días a ratas macho de la cepa wistar, a quienes se les administraron dosificaciones de 100, 7000 y 14000 ppm, concluyendo que las dosis de

100 o 7000 ppm fueron bien tolerados por las ratas y no mostraron evidencia de toxicidad sistémica. Se mostró un incremento en los niveles de GSH y la actividad de SOD en hígado en la dosis de 14000 ppm, pero dicho efecto no fue ocasionado por los alcaloides cuaternarios del tipo benzofenantridina. Dicho efecto se lo atribuyeron a otros constituyentes como ácidos fenólicos o los alcaloides del tipo isoquinolina (**Zdarilova et al., 2008**). En un estudio en cerdos de 21 días de edad realizado por **Kosina et al., 2004**, se determinó la seguridad de una mezcla de sanguinarina y queleritrina que se administró durante 90 días. Dos dosis, una de 2 mg/kg de alimento (2 ppm, 1.28 mg de sanguinarina y 0.44 mg de queleritrina en 1 kg de alimento) y 100 mg/kg (100 ppm, 64.03 mg/kg de sanguinarina y 21.99 mg/kg de queleritrina) fueron administradas, en donde no se observó alguna anomalía en la salud de los animales con respecto a la ganancia de peso, ningún cambio hematológico ni bioclínico, tampoco se observó inflamación o distrofia en los cortes histológicos y no se observó la formación de aductos. Adicionalmente, se determinó el potencial antihipertensivo de sanguinarina que actúa como un antagonista sobre los receptores AT₁ (**Caballero-George et al., 2003**). Así mismo, Lee *et al.*, 1998 estableció que la angolina y la queleritrina no son inhibidores de la PKC como anteriormente había establecido por **Herbert et al., 1990**. Uno de los alcaloides que deriva de la sanguinarina como la dihidrosanguinarina se ha descrito que posee actividad sobre células 3T3-L1 de ratón en la absorción de glucosa mediante la inhibición de la proteína cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) alfa, regulando la expresión de PPAR γ , sus genes blancos y reduciendo la fosforilación de PPAR γ (**Chow, Iwata & Sato, 2017**). De igual manera **Vrublova et al., 2008** estudió la toxicidad y la farmacocinética de dihidrosanguinarina en ratas macho de la cepa wistar, las que fueron alimentadas con pellets que estaban impregnadas con 100 y 500 ppm de dihidrosanguinarina. Después de que fueron administradas durante 90 días se demostró que el alcaloide fue bien tolerado por las ratas sin toxicidad sistémica aparente, dihidrosanguinarina tiene una eliminación relativamente rápida en las primeras 10 horas, adicionalmente la dihidrosanguinarina no sufre conversión metabólica a sanguinarina o Benz[c]acridina. Finalmente, queleritrina tiene otras actividades descritas como inhibidor de la enzima Ca²⁺-ATPasa del retículo sarco/endoplasmático (**Vieira et al., 2015**) y es un inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2 en un estudio sobre ratón con inflamación aguda inducida (**Niu, Zhou, Li & Xu, 2011**).

7. Efecto traqueo-relajante de los extractos orgánicos de corteza y hoja

En el trabajo de Gaona-Tovar 2018 se determinó el efecto relajante de la musculatura lisa en anillos de tráquea aislada de rata de los extractos orgánicos de corteza y hoja de *Bocconia arborea* pre-contráidos con carbacol [$1\mu\text{M}$], en el que los extractos que presentaron mayor actividad farmacológica fueron los extractos diclorometánicos de corteza ($104.89 \pm 3.37\%$, $\text{CE}_{50} 207.9 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$), hoja ($103.19 \pm 1.21\%$, $\text{CE}_{50} 210.4 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$) y los metanólicos de corteza ($98.52 \pm 2.65\%$, $\text{CE}_{50} 117.9 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$) y hoja ($80.85 \pm 2.22\%$, $\text{CE}_{50} 428.5 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$). El extracto metanólico de corteza (EMBac) se seleccionó para elucidar su posible mecanismo de acción funcional. Se determinó que dicho extracto al preincubar la CE_{50} y posterior a realizar curvas concentración respuesta a contracción inducida con carbacol fue modificada con respecto a la curva control, lo que nos da indicio que los componentes del extracto tienen un antagonismo no competitivo sobre los receptores muscarínicos. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de que el extracto pudiera estar actuando sobre la vía NO/cGMP, en la que se demostró que al preincubar los inhibidores L-NAME (inhibidor inespecífico de la NOS) y ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa soluble) el efecto relajante disminuía significativamente, lo que indicó que esta vía se encuentra involucrada en el proceso de relajación. Finalmente, para corroborar o descartar la participación de las enzimas fosfodiesterasas, se construyeron curvas concentración respuesta de relajación con los inhibidores papaverina y teofilina en presencia de la CE_{50} del EMBac, demostrando un efecto sinérgico en el proceso de relajación, lo que demostró que el EMBac tiene compuestos que actúan a través de la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas.

8. Justificación

Se sabe que las plantas medicinales son unas de las principales alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas en las que se incluye el asma y la hipertensión, y que parte de los tratamientos se basa en el uso de extractos de dichas plantas; es por esto que existe el interés por fundamentar el uso tradicional de las especies vegetales medicinales y de esta manera dar sustento farmacológico al uso etnomédico que se les atribuye. Adicionalmente, realizar el estudio de especies vegetales medicinales fundamentado en la relación quimiotaxonómica que guarda con otras especies del género con el fin de atribuir conocimientos para el posible uso medicinal de las especies vegetales, tal es el caso de *Bocconia arborea*, cuyos extractos orgánicos han demostrado actividad relajante sobre anillos de tráquea aislada de rata, que podría ser debido a la presencia de alcaloides del tipo benzofenantridina que podrían tener un potencial farmacológico de interés en el tratamiento de la hipertensión y/o asma, siendo estas de gran relevancia actualmente por la alta población que las padece. En este sentido, en el presente trabajo se pretende establecer el potencial efecto relajante del extracto metanólico de *Bocconia arborea* de corteza en la musculatura lisa vascular y realizar un estudio farmacológico biodirigido del extracto metanólico para encontrar el (los) compuesto(s) responsables de la actividad farmacológica relacionada con la actividad traqueorelajante y vasorrelajante, respectivamente, éstos compuestos podrían ser los alcaloides del tipo benzofenantridina.



9. Hipótesis

El extracto metanólico de *Bocconia arborea* de corteza tendrá efecto relajante de la musculatura lisa vascular y de las vías aéreas en modelos murinos debido a la presencia de alcaloides del tipo benzofenantridina.

10. Objetivos

10.1. Objetivo general

Determinar el efecto relajante sobre musculatura lisa vascular del extracto metanólico de *Bocconia arborea* de corteza y aislar los componentes responsables de dichas actividades.

10.2. Objetivos particulares

1. Obtener los extractos orgánicos (Hexánico, diclorometánico y metanólico) de *Bocconia arborea* de corteza.
2. Evaluar el efecto relajante del extracto metanólico en un modelo *ex vivo* de aorta aislada de rata.
3. Determinar los mecanismos de acción de los efectos relajantes del extracto metanólico en los modelos *ex vivo* de tráquea y aorta aislada de rata.
4. Realizar un estudio fitoquímico biodirigido a partir del extracto metanólico de corteza utilizando los modelos *ex vivo* adecuados.
5. Evaluar las fracciones obtenidas del fraccionamiento del EMBac sobre anillos de aorta y tráquea aislada de rata.
6. Aislar algunos de los compuestos responsables de la actividad relajante y elucidar su estructura química a través de métodos espectroscópicos, espectrométrico y de difracción de rayos X.

11. Metodología

11.1. Recolección del material vegetal

Se recolectó el material vegetal en septiembre del 2015 y enero del 2018 en el poblado de Santa María Ahuacatitlán, Cuernavaca, Morelos; por el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Posteriormente, la identificación taxonómica se llevó a cabo por la Dra. Irene Perea Arango del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la UAEM, el número de voucher se encuentra en trámite. El material vegetal se separó en corteza y hoja, se sometió a un proceso de limpieza y secado a temperatura ambiente a la sombra. Una vez que la corteza se encontraba seca, se cortó en trozos más pequeños y posteriormente se fragmentó en un molino manual.

11.2. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos, se tomaron 260 g de corteza seca y molida de la colecta de septiembre del 2015 y 1570 g de la colecta de enero del 2018, ambas colectas se sometieron a un proceso de maceración exhaustiva por separado con disolventes orgánicos en orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y metanol), y se les retiraba el disolvente cada 72 horas, este proceso se hizo por triplicado. El macerado obtenido, se filtró y se concentró para ser eliminado del extracto el disolvente con ayuda de un rotavapor Heidolph G-3, a presión reducida con una bomba de alto vacío.

11.3. Aislamiento y purificación del alcaloide dihidrosanguinarina.

Durante el proceso de obtención del extracto hexánico precipitó de manera espontánea un compuesto de color naranja en forma de cristales que fue caracterizado como dihidrosanguinarina (DHS). Sin embargo, éstos presentaban impurezas. Por tanto, se planteó una estrategia para realizar la purificación del compuesto mencionado anteriormente. Para ello, el extracto hexánico de corteza se disolvió con diclorometano destilado para favorecer la precipitación. Se retiró parte del extracto que se encontraba encima del precipitado con una mezcla de diclorometano/acetato de etilo hasta llegar al precipitado, una vez retirada la mayor cantidad del extracto, se lavaron los cristales con una mezcla de acetato de etilo/metanol. Una vez limpios los cristales se retiraron del matraz y se colocaron en un tubo de ensaye para la purificación por el método de recristalización. Se disolvieron los cristales con diclorometano y se les adicionó unas gotas de acetato de etilo para favorecer la cristalización, se realizó el proceso hasta obtener unos cristales transparentes. La revisión del proceso se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina que se eluyó con una fase móvil 70:30 hexano/diclorometano y se reveló en una lámpara

de UV de onda corta y, al final del proceso, se le determinó el punto de fusión de los cristales para verificar su pureza.

11.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de *Bocconnia arborea* (EMbac).

EMbac se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, se utilizó como fase estacionaria gel de sílice con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm de la marca Merck y se utilizó como fase móvil hexano, diclorometano y metanol; comenzando a eluir con hexano y, posteriormente, aumentando la polaridad con mezclas de los disolventes mencionados. Una vez recolectadas las fracciones, se concentraron y se monitorearon por cromatografía en capa fina, para finalmente ser reveladas utilizando la lámpara de UV de onda corta y larga y/o sulfato sérico para reunir las de acuerdo a su similitud cromatográfica. Posteriormente, se llevó a cabo la cromatografía de las fracciones para disminuir su número (por similitud cromatográfica) y realizar la purificación de los precipitados obtenidos.

11.5. Formación de los clorhidratos de dihidrosanguinarina y angolina.

En la formación de las sales de los alcaloides dihidrosanguinarina y angolina, se pesaron 200mg de DHS y 50mg de angolina y se colocaron en frascos, posteriormente, se trituraron hasta obtener un polvo. Se agregó una mezcla metanol/HCl gota a gota y se enfrió la mezcla a 3 °C. Al finalizar la reacción se eliminó el disolvente a presión reducida.

12. Evaluaciones farmacológicas

12.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa wistar y SHR con un peso entre 250 a 350 g, alimentadas con Rodent Labs Chow® y libre acceso a agua en condiciones de bioterio. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones que establece la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

12.2. Reactivos

En la realización del presente proyecto de investigación, se emplearon los siguientes reactivos: Cloruro de carbacol, bitartrato de noradrenalina, N_w-L-Nitro-Arginina-Metil-Ester (L-NAME), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3_a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), glibenclamida y tetraetilamonio (TEA), nifedipina, indometacina y teofilina adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) y clorhidrato de papaverina MP Biomedicals.

12.3. Obtención de la tráquea y aorta de rata.

Para la obtención de los anillos de tráquea y aorta de rata, los animales fueron sacrificados en una cámara saturada con éter etílico, y posteriormente, se procedió a realizar la disección abdominal para extraer la aorta torácica y una disección pectoral para la extracción de la tráquea. Una vez extraído el tejido de interés se colocó en solución fisiológica de Krebs a 37 °C para su limpieza, se les retiró la mayor cantidad de tejido conectivo con mucho cuidado, con el fin de evitar dañar el tejido muscular y endotelial, una vez limpios los tejidos fueron cortados en segmentos de 3-5 mm de longitud y si fuere necesario se retiró el tejido endotelial de la aorta de manera mecánica.

12.4. Sistema de determinación del efecto tráqueo y vasorrelajante, registro de datos.

Se llevó a cabo para determinar el efecto tráqueo y vasorrelajante, se colocaron los anillos previamente cortados y limpiados en 10 mL de solución Ringer-Krebs [mM] NaCl (118), glucosa (11.4), NaHCO₃ (25), KCl (4.7), MgSO₄ (1.2), KH₂PO₄ (1.2), EDTA (0.026), CaCl₂ (2.5)], a pH 7.4 y con un burbujeo constante de gas carbógeno (O₂/CO₂, 95:5%), en una cámara de incubación en el que cada anillo se encuentra sujetado por un lado, con ayuda de un gancho al extremo de la cámara y, por otro lado a un transductor de fuerza grass modelo FT 03 el cual emite los registros que, posteriormente, las envía a un polígrafo BIOPAC systems UIM 100 C. la cámara con la solución se mantendrá a una temperatura constante de 37 °C con un baño recirculador.

12.5. Evaluación del efecto tráqueo y vasorrelajante

Los anillos fueron sometidos a una tensión basal de 2g de fuerza en tráquea y 3 g de fuerza en aorta y se dejó un periodo de estabilización aproximado de 30 min. Posteriormente, el tejido fue sometido a un proceso de sensibilización durante 15 min con carbacol [1 µM] (tráquea) o NA [0.1 µM] (aorta) a intervalos de 30 min (por duplicado en tráquea y triplicado en aorta), respectivamente; en el caso de aorta al final de la última contracción se agrega carbacol [1 µM] para verificar la presencia o ausencia de endotelio. Después de cada estimulación, el tejido fue lavado con solución de Ringer-Krebs, para recuperar el nivel basal de la tensión.

El tejido que fue previamente sensibilizado, fue puesto en contacto con las diferentes concentraciones de extracto de forma acumulativa [3-1000 µg/mL] o compuesto en ¼ de logaritmo. Posteriormente, se construyeron curvas de concentración-respuesta, se utilizó el programa AcqKnowledge (BIOPAC, INC, USA). Los ensayos realizados se muestran en la figura 3.

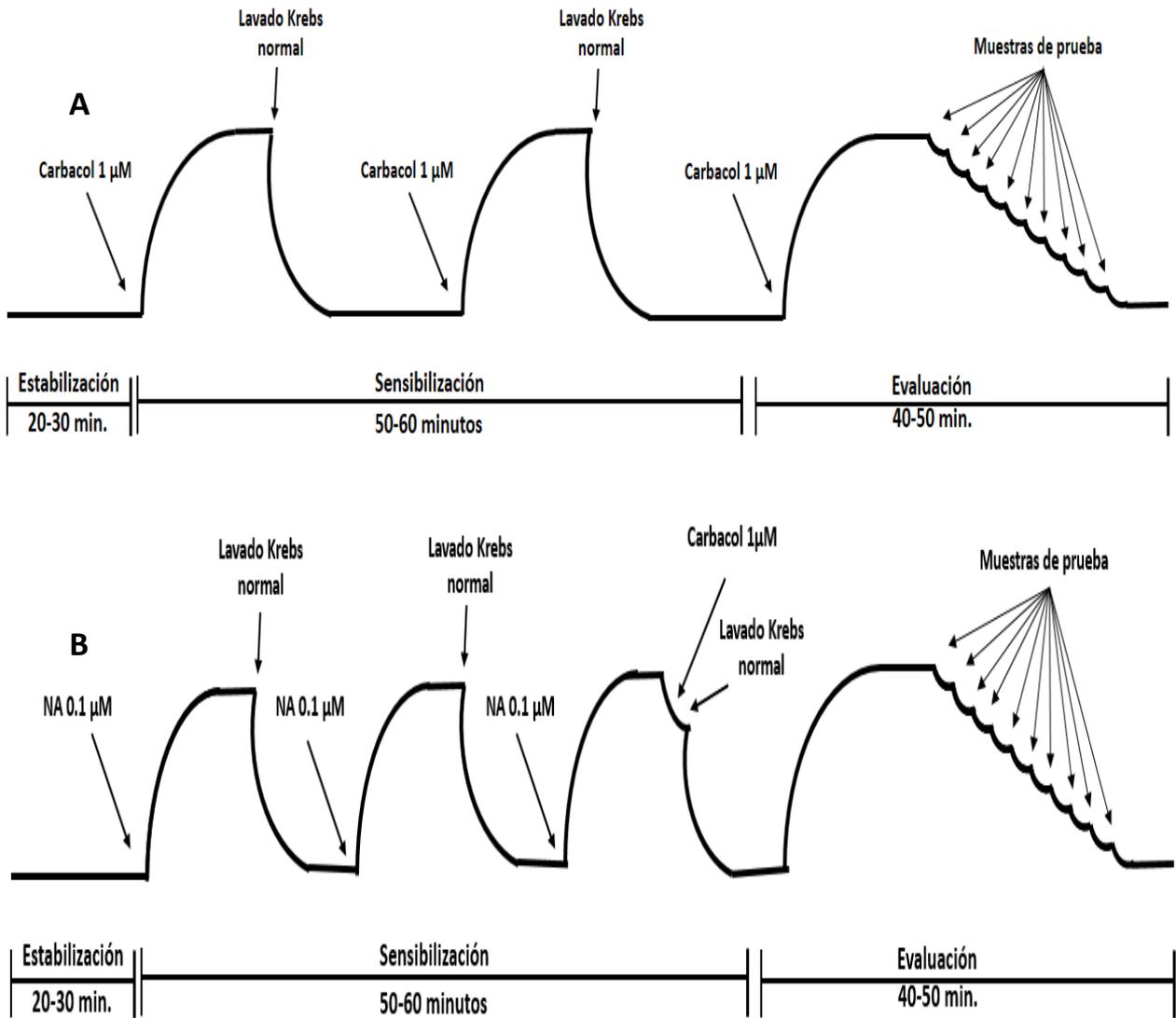


Figura 3 Esquema general de la evaluación del efecto relajante en tráquea (A) y aorta (B) aislada de rata.

12.6. Evaluación del efecto tráqueo y vasorrelajante de las fracciones obtenidas a partir del EMBac

Por otro lado, se siguió la metodología descrita anteriormente, para anillos de tráquea y aorta aislada de rata, las fracciones fueron evaluadas a la CE_{50} del extracto metanólico correspondiente en anillos de tráquea y aorta aislada de rata.

12.7. Identificación estructural de los compuestos aislados

La identificación estructural fue realizada en aquellos compuestos que fueron obtenidos por precipitación espontánea tanto en la realización de los extractos, como aquellos que se obtuvieron de la misma manera en las fracciones recolectadas de la columna del EMBacs. Se aislaron y se purificaron por recristalizaciones seriadas, con la ayuda de técnicas cromatográficas para revisar su pureza, se les determinó el punto de fusión, y posterior a este, se realizaron diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas para la determinación estructural como Resonancia Magnética Nuclear de protón y Carbono¹³ (RMN ¹H y RMN ¹³C), Difracción de rayos X y Espectrometría de Masas (EM).

12.8. Evaluación del efecto relajante de angolina en anillos de tráquea y aorta aislada de rata.

Una vez identificada la angolina, que se encuentra presente en el EMBac, se realizó un estudio de concentración respuesta en el modelo *ex vivo* en anillos de tráquea y aorta (en presencia y ausencia de endotelio vascular) aislada de rata.

12.9. Determinación del mecanismo de acción funcional sobre anillos de tráquea aislada de rata.

La determinación del mecanismo de acción del EMBac se realizó siguiendo la metodología descrita en la página 23 tomando en cuenta la CE_{50} . Estos ensayos se describen a continuación.

12.10. Participación de los receptores muscarínicos.

La realización de este experimento se llevó a cabo con la intención de observar si el efecto relajante está mediado por algún tipo de antagonismo de los receptores colinérgicos, que se encuentran localizados en la musculatura lisa de los anillos de tráquea aislada de rata.

Con lo mencionado anteriormente, posterior a el proceso de estabilización y sensibilización del tejido, se agregó de forma acumulativa el agonista muscarínico carbacol [0.16-54.7 μM] para la construcción de la curva concentración-respuesta control. Una vez terminada la misma, se lavó el tejido, esperando a que regrese a su estado basal y se incubó la CE_{50} de las muestras de prueba durante 15 minutos, continuando con la adición de carbacol [0.16-54.7 μM] de forma acumulativa para la construcción de la CCR, tal como se muestra en la figura 4.

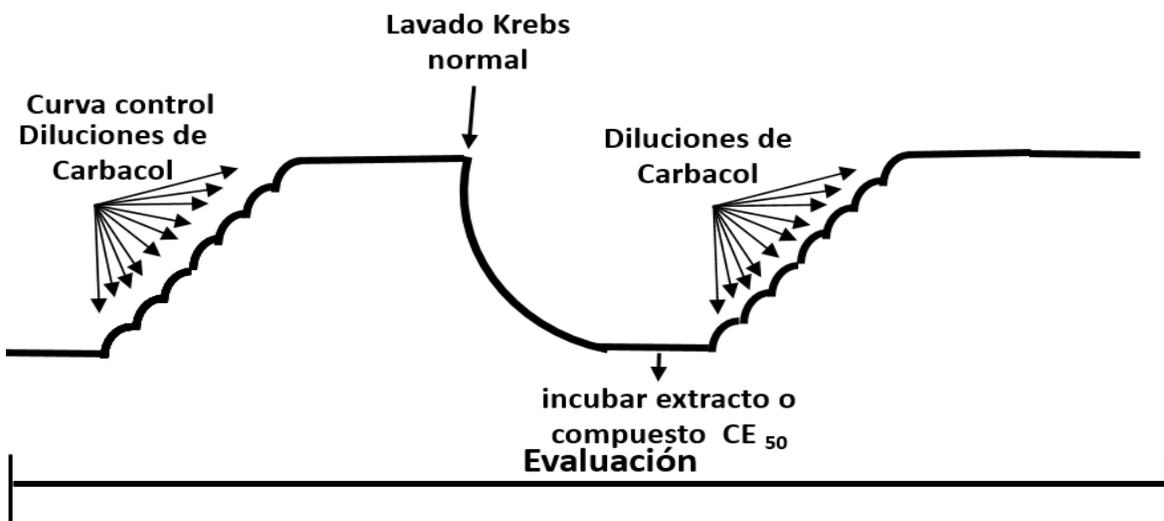


Figura 4

Esquema del ensayo para determinar la participación de los receptores muscarínicos

12.11. Participación de las enzimas fosfodiesterasas.

Para corroborar o descartar que el efecto relajante esté mediado por la acumulación de segundos mensajeros como el AMPc y GMPc, por la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas presentes en la musculatura lisa de la tráquea. Se realizaron curvas concentración respuesta con algunos inhibidores como la teofilina [1.67 – 553.58 μM] o papaverina [0.8 – 266 μM] que fueron agregados de forma acumulativa para la realización de la CCR control. Consecuentemente, se incubó la CE_{50} de la muestra de prueba durante 15 minutos, y de manera acumulativa se agregó teofilina [1.67 – 553.58 μM] o papaverina [0.8 – 266 μM] para la construcción de la CCR, tal como se muestra en la figura 5.

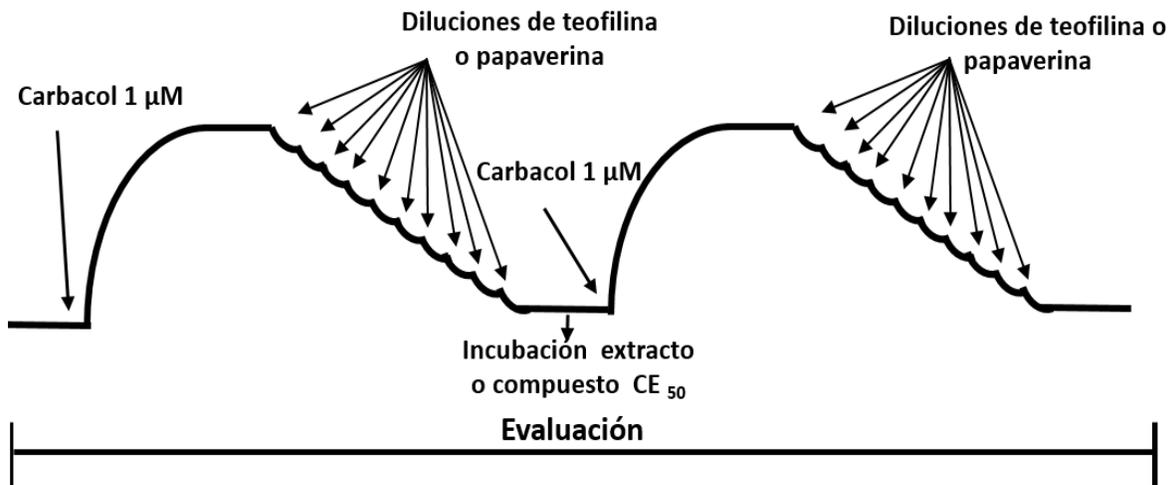


Figura 5 Esquema del ensayo para determinar la participación de las fosfodiesterasas.

12.12. Participación de los canales de Ca^{2+} activados por KCl.

Por último, con el fin de conocer si el efecto relajante está mediado por el bloqueo de canales de calcio, se llevó a cabo la estrategia experimental que se muestra en la figura 6. Cuando el tejido se encuentra en su estado basal, se realiza la contracción con KCl [80 mM], y se espera a que alcance una contracción estable, posteriormente se adiciona de forma acumulativa las muestras de prueba para construcción de CCR del efecto relajante.

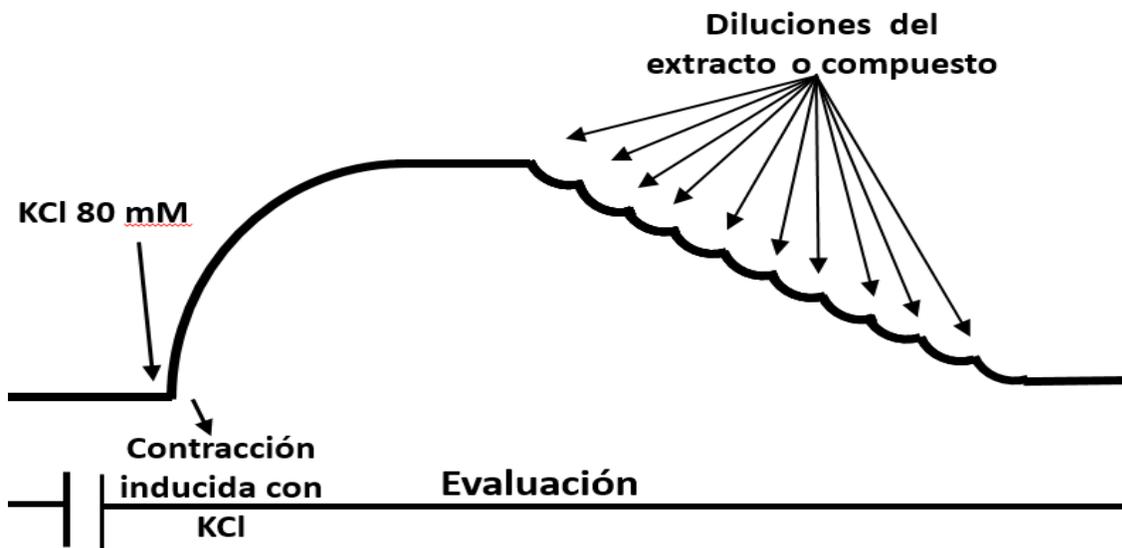


Figura 6

Esquema del ensayo para determinar la participación de los canales de Ca^{2+} activados por KCl.

12.13. Determinación del mecanismo de acción funcional en aorta aislada de rata.

Para la determinación del mecanismo de acción, se siguió la metodología descrita en página 23. Se exploraron diversos mecanismos de acción funcional que podrían verse involucrados en el proceso de relajación-contracción de la musculatura lisa vascular, los cuales están relacionados con la presencia de endotelio vascular (vía NO-GMPc y ciclooxigenasas) y unos que se encuentran en la musculatura lisa (receptores adrenérgicos, inhibición de fosfodiesterasas, canales de potasio y canales de calcio). Para mostrar si el efecto producido por el EMBac está relacionado por factores derivados del endotelio, se realizaron 3 experimentos en el que los anillos de aorta aislada de rata se encontraban con el endotelio intacto, que posteriormente fueron puestos en contacto durante 15 minutos con los inhibidores L-NAME [2.66 μ M] un inhibidor inespecífico de la eNOS, ODQ [1 μ M] un inhibidor irreversible de la guanilato ciclasa e indometacina, inhibidor de la COX. Una vez transcurrido los 15 minutos, se contrajo el tejido con NA [01. μ m] y una vez que la contracción fue estable se añadieron las diluciones de prueba de forma acumulativa del EMBac tal como se muestra en la figura 7.

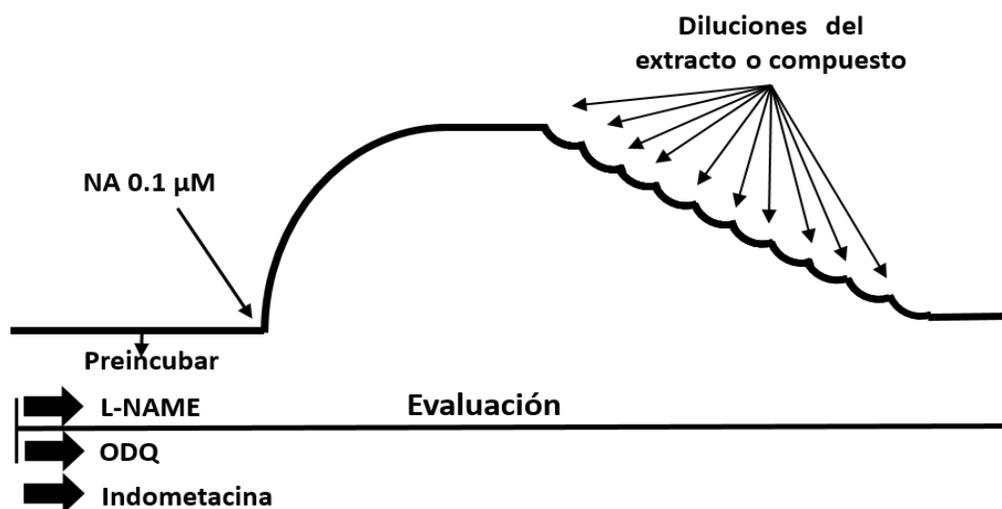


Figura 7 Determinación del mecanismo de acción del EMBac, con los inhibidores L- NAME [2.66 μ M], ODQ [1 μ M] e indometacina en anillos de aorta aislada de rata con endotelio intacto.

12.14. Participación de los receptores α - adrenérgicos

Con la intención de conocer si el mecanismo de acción funcional pudiera verse involucrado mediante un antagonismo en los receptores α - adrenérgicos, para llevar a cabo esto, se realizó una curva control agregando diluciones de NA [0.03-10 μ M] de forma acumulativa, posteriormente se lavó el tejido y una vez llegado a su estado basal, se incubó la CE_{50} del extracto o compuesto durante 15 minutos. Una vez cumplido dicho intervalo, se agrega de forma acumulativa NA [0.03-10 μ M]. Tal como se muestra en la figura 8. Al finalizar el ensayo se construyeron CCR para el análisis de las mismas.

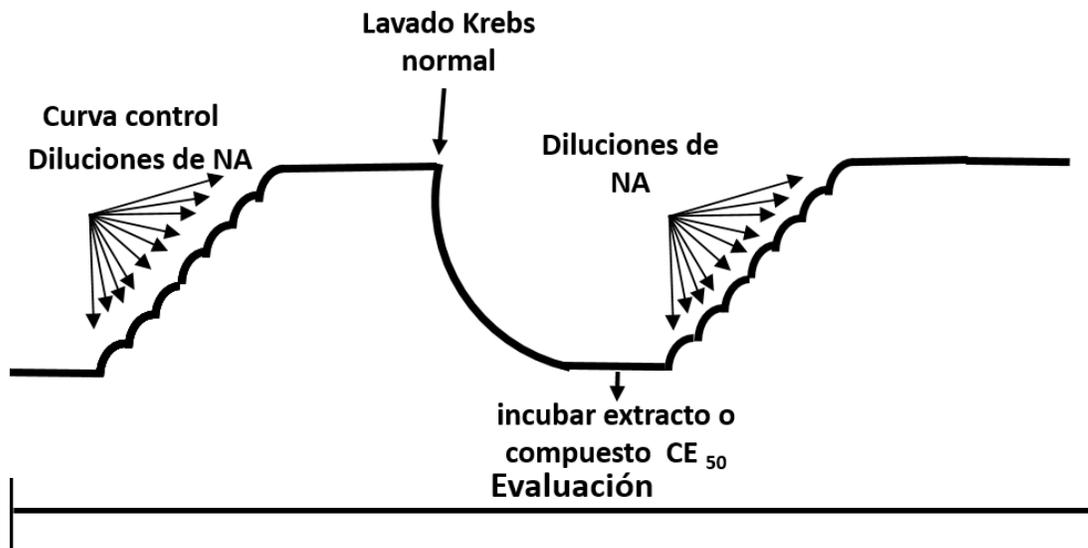


Figura 8 Esquema del ensayo para determinar la participación de los receptores α - adrenérgicos en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

12.15. Participación de las fosfodiesterasas.

Con el fin de mostrar si el efecto relajante se encuentra mediado por la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas y por ende una acumulación de segundos mensajeros como AMPc y GMPc, se realizaron curvas concentración respuesta con algunos inhibidores como teofilina [1.67 – 553.58 μM] o papaverina [0.8 – 266 μM] que fueron agregados de forma acumulativa para la realización de la CCR control. a continuación, se incubó la CE_{50} del extracto o compuesto durante 15 minutos y se agregó de forma acumulativa teofilina [1.67 – 553.58 μM] o papaverina [0.8 – 266 μM] para la construcción de las CCR, tal como se muestra en la figura 9.

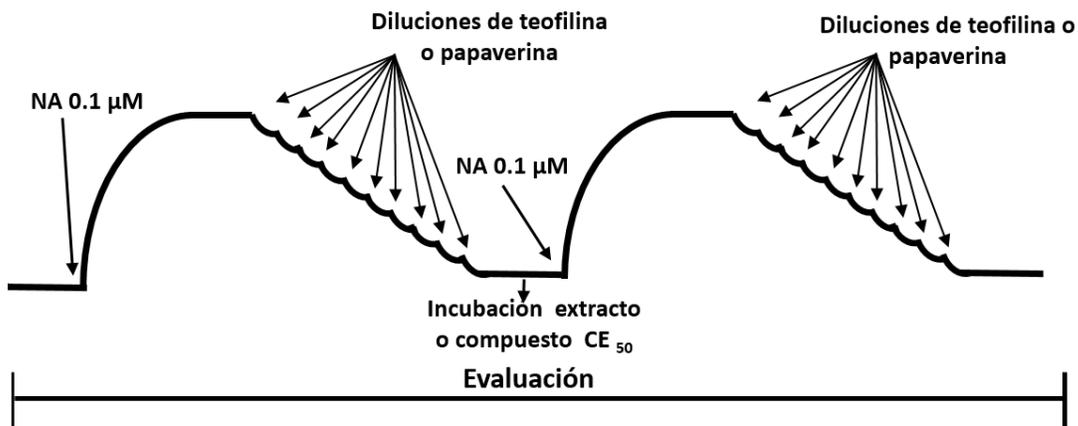


Figura 9 Esquema del ensayo para determinare la participación de las fosfodiesterasas en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

12.16. Participación de canales de calcio en contracciones inducidas por KCl y por CaCl₂

Finalmente, con el propósito de evidenciar si el efecto relajante se encuentra involucrado por un posible bloqueo de canales de calcio, se realizaron CCR de manera acumulativa de las muestras de prueba a la contracción inducida con KCl 80mM. Si las muestras de prueba muestran una actividad significativa en la relajación del tejido que fue contraído con KCl 80mM, se prosigue con la evaluación de las muestras de prueba haciendo curvas concentración respuesta a la contracción con CaCl₂ [0.081-27.03 mM] la estrategia experimental a seguir se describe en la figura 10.

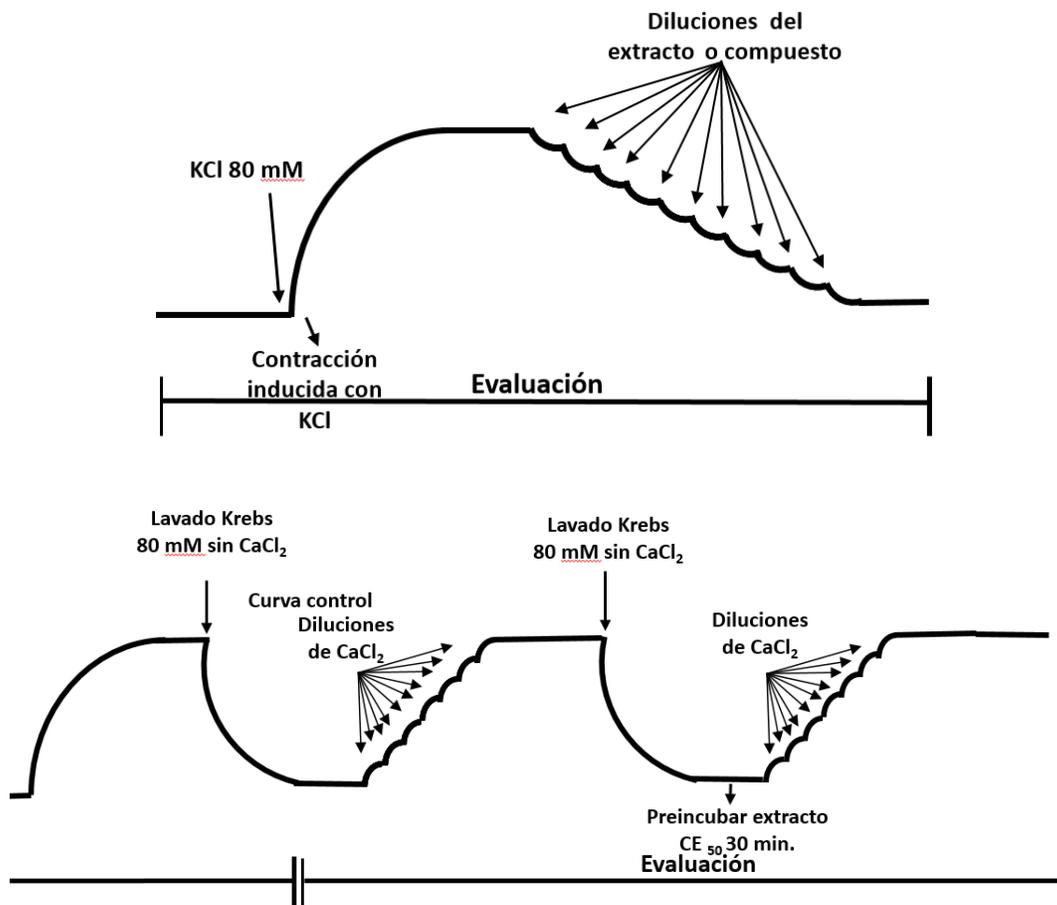


Figura10 Esquema del ensayo para determinar la participación de los canales de calcio en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

13. Determinación del efecto antihipertensivo del clorhidrato de dihidrosanguinarina en ratas espontáneamente hipertensas (shr).

13.1. Animales

En este estudio, se utilizaron ratas macho adultas con un peso de (250-300g) de la cepa SHR, alimentadas *ad libitum* con dieta comercial. El estudio se llevó a cabo bajo los lineamientos que establece la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

13.2. Evaluación del efecto antihipertensivo del clorhidrato de dihidrosanguinarina en un modelo agudo no invasivo.

Para la determinación del efecto antihipertensivo del clorhidrato de dihidrosanguinarina se formaron 2 grupos de 7 animales: al primer grupo se le administró, de manera intragástrica el vehículo (agua/ tween 80 10%), y, por otro lado, al grupo de prueba, se administró el clorhidrato de dihidrosanguinarina disuelta en el vehículo a una dosis de 20 mg/Kg. Se midió PAS, PAD y frecuencia cardiaca (FC), esto se midió con un pletismógrafo LE5007, HARVARD APPARATUS, previsto del programa Chart V 4.2 de powerlab ADInstruments. Se realizaron como un mínimo de 6 mediciones en cada tiempo por animal, en los intervalos de 0,1,3 y 5 horas posterior a la administración.

14. Resultados y discusión

14.1. Obtención de los extractos, rendimiento de los compuestos y clorhidratos.

Posterior a la recolección, secado y molienda de la corteza de *Bocconia arborea*, se maceró el material vegetal partiendo de 1570.3 g y 12 L de disolvente, por triplicado y cada 72 horas para obtener los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico. Cada extracto se filtró para eliminar restos del material vegetal y se eliminó el disolvente a presión reducida con ayuda de un rota-evaporador conectado a una bomba de alto vacío. Los pesos y rendimientos de cada compuesto y su respectivo clorhidrato se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Rendimientos de los compuestos y clorhidratos.

Compuesto	Total compuesto obtenido (g)	Rendimiento contra material vegetal (%)	Peso inicial alcaloide base (mg)	Peso clorhidrato (mg)	Rendimiento (%)
Dihidrosanguinarina	4	0.254	200	240.6	120.3
Angolina	0.251	0.0965	50	70.9	141.8

14.2. Aislamiento y purificación de dihidrosanguinarina.

El aislamiento del alcaloide dihidrosanguinarina se dio a partir del extracto hexánico al precipitar unos cristales de forma espontánea, al evaporarse el disolvente (diclorometano). Una vez seco el extracto, se lavó con una mezcla acetato de etilo/ metanol, como se describe en la página 21 y se purificó por recristalizaciones sucesivas, se verificaba el proceso de purificación mediante cromatografía en capa fina, así como se muestra en la figura 11. Se obtuvieron unos cristales que presentan una tonalidad naranja; de los que se obtuvieron alrededor de 4 g de compuesto teniendo un rendimiento aproximado del 0.254 % con respecto al material vegetal utilizado, el punto de fusión determinado fue de 193.2-195.8 °C teniendo DHS un punto de fusión referido en la literatura de 189-191 °C (Vrublova et al 2008).

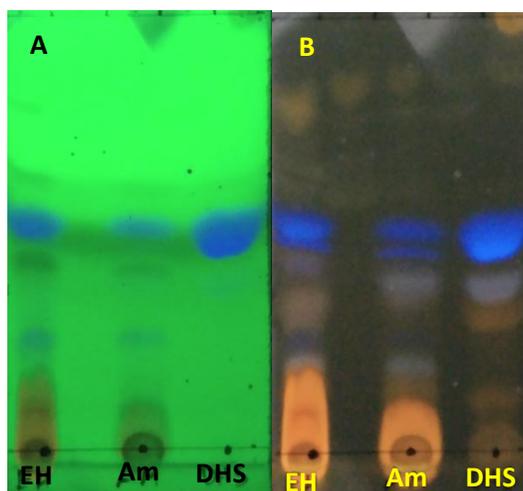


Figura 11 Proceso de purificación de la dihidrosanguinarina verificado por cromatografía en capa fina revelado con una lámpara UV con onda corta y onda larga. En la imagen A, vista en UV de onda corta, se colocó la dihidrosanguinarina (DHS), las aguas madres (Am) y el extracto hexánico (EH). En la imagen B vista en onda larga. Corrida en un sistema 60:40 hexano/diclorometano .

En la figura 11 se observó, con la ayuda de una lámpara UV en onda corta y larga, que la DHS se encuentra relativamente pura (Figura 11A), sin embargo, al ser observada con onda larga, se observa al menos 3 compuestos, que podrían deberse a que la DHS podría ser fotosensible, puesto que tiempo después de exponer la placa a la luz UV, comienza a observarse la banda correspondiente a DHS a simple vista. Como se muestra en la figura 12.

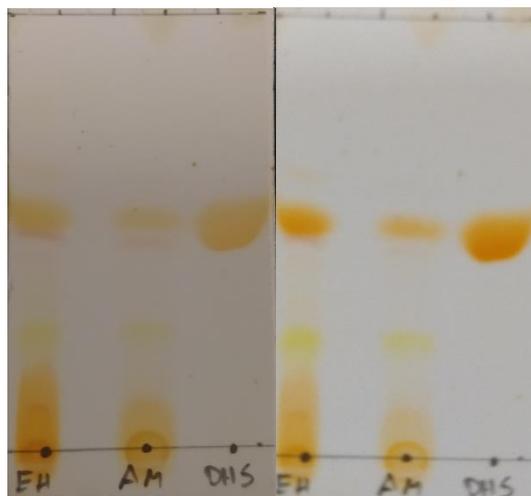


Figura 12 Cromatografía en capa fina del proceso de purificación de dihidrosanguinarina. Extracto hexánico (EH), aguas madres (Am) y dihidrosanguinarina (DHS).

14.3. Caracterización de dihidrosanguinarina

Con el fin de determinar si el compuesto se trataba de dihidrosanguinarina, se realizaron diversos estudios espectroscópicos como RMN ^1H , ^{13}C y difracción de rayos X, y espectrométricos como espectrometría de masas por impacto electrónico (EI).

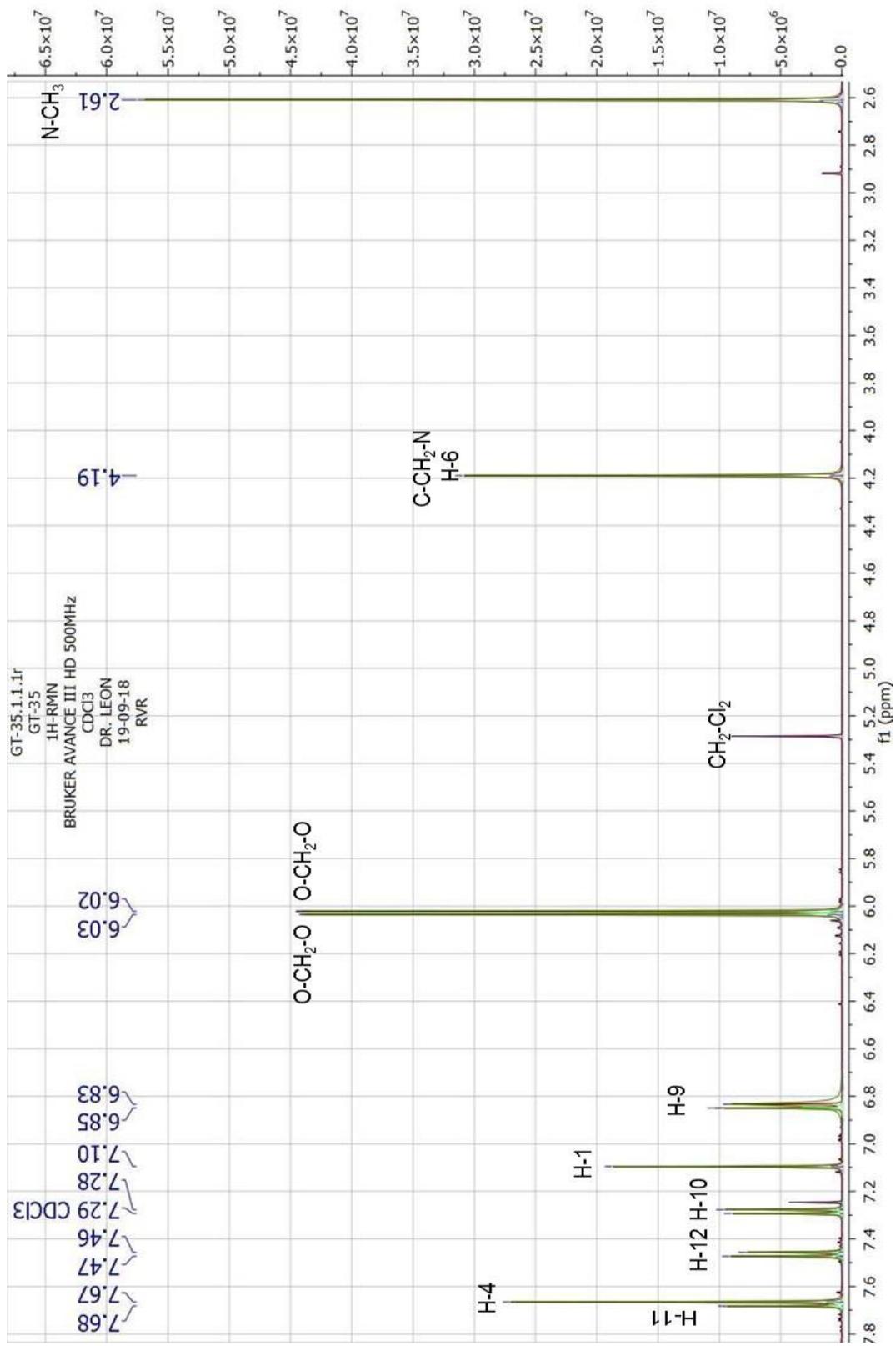
14.4. Resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C de dihidrosanguinarina.

La identificación del compuesto dihidrosanguinarina (DHS), se hizo mediante la comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^1H reportados por **Hernández, 2016** que son los que se muestran en la tabla 5.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el espectro de RMN ^1H de 500 MHz (espectro1), se observan 10 distintos tipos de desplazamiento químico, los cuales se describirán a continuación siendo los primeros valores de los datos experimentales y los segundos de Hernández, 2016. Derivado de la exploración del espectro de protón, se observó que los datos experimentales presentaron desplazamientos químicos casi idénticos a los descritos en la literatura, lo que permitió sugerir que se trataba de la dihidrosanguinarina puesto que en ambos mostraban desplazamientos similares en RMN ^1H δ_{ppm} 2.61(3H,s,N-CH₃), 4.19(2H,s, C-CH₂-N), 6.02(2H,s,O-CH₂-O), 6.04(2H,s, O-CH₂-O), 6.84(1H,d, $J=8.1\text{Hz}$), 7.1(1H,s), 7.29(1H,d, $J=8.15\text{ Hz}$) 7.47(1H,d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.67(1H,s), 7.67(1H,d, $J=8.65\text{Hz}$). Adicionalmente,

Tabla 5 Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos en RMN ^1H 500 MHz de dihidrosanguinarina aislada de *B.arborea*.

^1H 500 MHz Experimental	Desplazamiento químico (δ_{ppm})	^1H 300 MHz (Hernández, 2016)	Desplazamiento químico (δ_{ppm})
H	7.68(8.65 Hz)	H	7.68(8.7 Hz)
H	7.67	H	7.67
H	7.47(8.5 Hz)	H	7.47(8.4 Hz)
H	7.29(8.15 Hz)	H	7.29(8.1 Hz)
H	7.1	H	7.1
H	6.84(8.1 Hz)	H	6.85 (8.1 Hz)
O-CH ₂ -O	6.04	O-CH ₂ -O	6.05
O-CH ₂ -O	6.02	O-CH ₂ -O	6.03
C-CH ₂ -N	4.19	C-CH ₂ -N	4.19
N-CH ₃	2.61	N-CH ₃	2.61

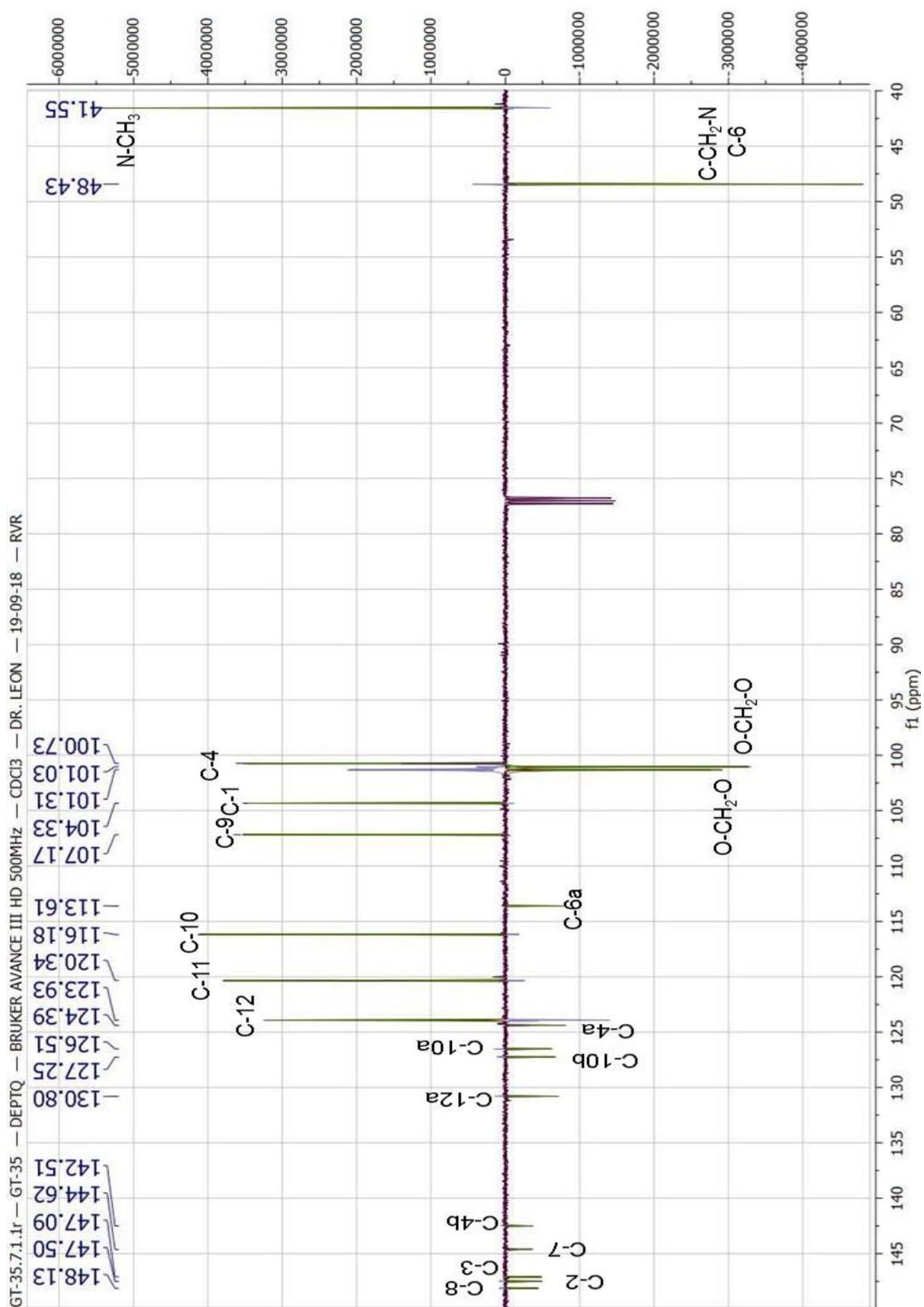


Espectro 1 RMN ¹H 500 MHz de dihydrosanguinarina.

En este sentido, también se hizo el análisis de la RMN DEPTQ 500 MHz experimental como se observan en la tabla 6 y el Espectro 2 con el de **Hernández, 2016**. En donde se observó que los desplazamientos químicos de cada uno de los carbonos en comparación con los referidos en la literatura son muy similares, lo cual nos indica que se trata de la dihidrosanguinarina.

Tabla 6 Desplazamientos químicos (ppm) obtenidos de RMN ¹³C DEPTQ de dihidrosanguinarina.

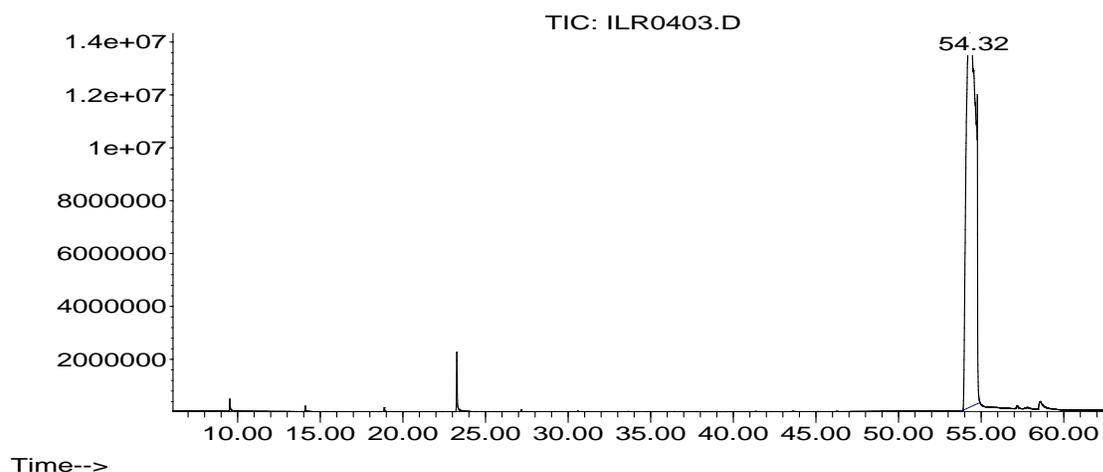
¹³ C Experimental	Desplazamiento químico (δ _{ppm})	¹³ C (Hernández, 2016)	Desplazamiento químico (δ _{ppm})
C-8	148.14	C-8	148.1
C-2	147.50	C-2	147.49
C-3	147.09	C-3	147.07
C-7	144.62	C-7	144.6
C-4b	142.51	C-4b	142.49
C-12a	130.80	C-12a	130.77
C-10b	127.25	C-10b	127.23
C-10a	126.51	C-10a	126.49
C-4a	124.39	C-4a	116.17
C-12	123.93	C-12	123.91
C-11	120.34	C-11	120.32
C-10	116.18	C-10	116.17
C-6a	113.61	C-6a	113.60
C-9	107.17	C-9	107.16
C-1	104.33	C-1	104.31
O-CH ₂ -O	101.31	O-CH ₂ -O	101.29
O-CH ₂ -O	101.03	O-CH ₂ -O	101.01
C-4	100.73	C-4	100.72
C-6	48.43	C-6	48.24
N-CH ₃	41.55	N-CH ₃	41.54



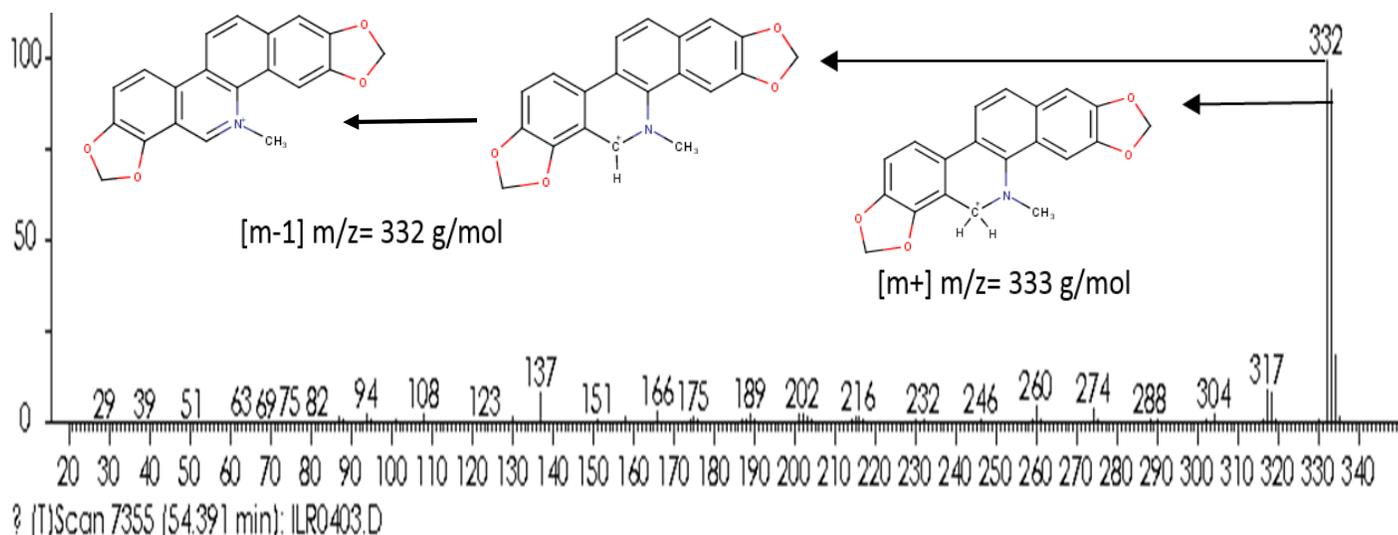
Espectro 2 RMN DEPTQ ¹³C 500 MHz de dihidrosanguinarina

Por otro lado, se realizó la determinación del peso del ion molecular por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. En el cual se puede observar en el cromatograma 1 que la dihidrosanguinarina en primera instancia se encuentra en un alto grado de pureza y presentó un tiempo de retención de 54.32 minutos con un área bajo la curva del 100%. Adicionalmente en el espectro 3, se observó el ion molecular M^+ 333 m/z y el pico base M^-1 332 m/z que se le atribuye a la pérdida de un H y, posiblemente, a un reordenamiento dando una estructura similar a la sanguinarina.

Abundance



Cromatograma 1 Cromatograma obtenido mediante GC-MS de dihidrosanguinarina.



Espectro 3 Espectro de masas correspondiente a dihidrosanguinarina por EI

Y para finalizar, mediante el proceso de purificación de DHS, se obtuvieron cristales, los cuales fueron analizados por difracción de rayos X de monocristal, en colaboración con el Dr. Hugo Tlahuext Romero del CIQ, con este análisis se demostró de forma inequívoca que se trata de dihidrosanguinarina como se observa en la figura 13, que concuerda con los experimentos realizados.

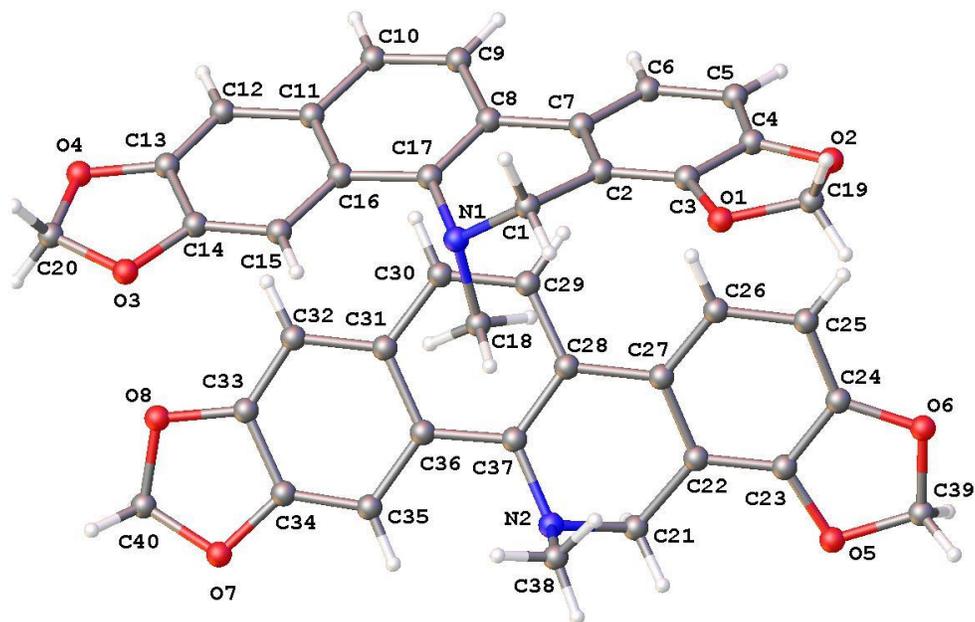


Figura 13 Vista estereoscópica de dihidrosanguinarina obtenida por difracción de rayos X.

14.5. Fraccionamiento fitoquímico del EMBac

Con base en los antecedentes el EMBac se sometió a un proceso de fraccionamiento fitoquímico en columna abierta como se muestra en la figura 14 que se describe en la página 22. Iniciando con una fase móvil con una polaridad 70:30 Hexano/diclorometano y finalizando con una fase móvil con 100% metanol hasta agotamiento. Cada fracción obtenida contenía un volumen de 60 mL, llevando el seguimiento mediante la realización de cromatografía en capa fina empleando distinta polaridad de la fase móvil. Se recolectaron 1367 fracciones y finalizando con un conjunto de 11 fracciones totales dado a su similitud cromatográfica dicho proceso se describe en la tabla 7.



Figura 14 Proceso de fraccionamiento primario en columna abierta, partiendo de 6g de lavado metánolico del EMBac.

Tabla 7 Resumen del fraccionamiento primario del EMBac.

Sistema de elución	Proporción (%)	Fracción	Clave	Peso (mg)
Hexano: diclorometano	70:30	1 -69	F-1	111.3
Hexano: diclorometano	50:50	70-304	F-2	150.2
Diclorometano	100	305-408	F-3	53.4
Diclorometano: metanol	99:1	409-467	F-4	194.5
		468-589	F-5	326.6
		487-589	GT-33	288
Diclorometano: metanol	95:5	590-822	F-6	298.7
		823-880	F-7	42.9
Diclorometano: metanol	80:20	881-1049	F-8	98.4
Diclorometano: metanol	70:30	1050-1136	F-9	185
Diclorometano: metanol	50:50	1137-1254	F-10	640.6
Metanol	100	1255-1367	F-11	1816.6

14.6. Aislamiento y caracterización de angolina

El alcaloide que posteriormente fue identificado como angolina, se obtuvo de forma espontánea, un sólido color morado en forma de cristales a partir de la fracción 468 hasta la fracción 589 que conformaron a la fracción final F-5. Este fue analizado por cromatografía en capa fina, las placas fueron eluidas con una fase móvil constituida de hexano/diclorometano/metanol 45:45:10, así como se muestra en la figura 15.



Figura 15 Cromatografía en capa fina del proceso de obtención del alcaloide angolina. En la imagen se observa en luz UV de onda larga, una banda amarilla desde la fracción 468 que permanece constante hasta la fracción 589. Ambas placas corridas con una fase móvil hexano/diclorometano/metanol 45:45:10.

Los cristales fueron separados de la fracción por múltiples lavados con metanol, posteriormente, fueron sometidos para su purificación a un proceso de recristalización, en el que los cristales eran disueltos en diclorometano alrededor de 30 °C para generar una solución concentrada de los cristales, continuando con la adición de unas gotas de metanol para favorecer la recristalización. Este proceso fue repetido hasta observar en placa fina que el compuesto se encontraba puro. Una vez terminado el proceso de purificación se determinó el punto de fusión de los cristales que fue de 202.1-206.2 °C.

Con el fin de identificar el compuesto aislado se realizó el análisis por técnicas espectroscópicas como RMN ^1H (CDCl_3) 500 MHz δ_{ppm} 2.76(3H,s,N- CH_3), 3.46(3H,s,O- CH_3), 3.92(3H,s,O- CH_3), 3.96(3H,s,O- CH_3), 5.55(1H,s,O-C-H), 6.05(2H,s,O- CH_2 -O), 7.04(1H,d, $J=8.5$ Hz), 7.12(1H,s), 7.47(1H,d, $J=8.5$ Hz), 7.62(1H,d, $J=8.5$ Hz), 7.7(1H,s), 7.77(1H,d, $J=8.5$ Hz). Véase en anexos espectro 4, 5 y 6.

RMN DEPTQ (CDCl_3) 500 MHz δ 40.46(N- CH_3), 53.81(O- CH_3), 55.81(O- CH_3), 61.5(O- CH_3), 85.92(O-C-H), 100.47(C-1), 100.86(O- CH_2 -O), 104.48(C-4), 112.78(C-11), 118.77(C-12), 119.88(C-6), 122.38(C-13), 123.30(C-5), 124.68(C-12a), 125.55(C-8a) 126.58(C-14a), 130.89(C-4a), 138.21(C-14), 146.98(C-9), 147.19(C-3), 147.79(C-2), 151.95(C-10) véase en anexos espectro 7. Así como, difracción por rayos X que permitió establecer la estructura de la angolina de manera inequívoca (figura 15). Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C , así como los experimentos bidimensionales se muestran en las tablas 8-12.

Tabla 8 Desplazamientos químicos de angolina RMN ^1H 500 MHz.

^1H	Desplazamiento (δ_{ppm})	^1H (Lee <i>et al.</i> , 1998)	Desplazamiento (δ_{ppm})
H11	7.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	H11	7.75 (1H, d, $J=8.60$ Hz)
H4	7.7 (1H, s)	H4	7.68 (1H, s)
H10	7.62 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	H10	7.60 (1H, d, $J=8.70$ Hz)
H12	7.47 (1H,d, $J=8.5$ Hz)	H12	7.46 (1H, d, $J=8.60$ Hz)
H1	7.12 (1H)	H1	7.10 (1H, s)
H9	7.04 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	H9	7.03 (1H, dd, $J=8.70$ Hz)
O- CH_2 -O	6.05 (2H)	O- CH_2 -O	6.02 (2H, s)
H6 O-C-H	5.55 (1H)	H6 O-C-H	5.53 (1H, s)
O- CH_3	3.96 (3H)	O- CH_3	3.95 (3H, s)
O- CH_3	3.92 (3H)	O- CH_3	3.90 (3H, s)
O- CH_3	3.46 (3H)	O- CH_3	3.45 (3H, s)
N- CH_3	2.76 (3H)	N- CH_3	2.75 (3H, s)

Tabla 9 Desplazamientos químicos de angolina RMN DEPTQ ¹³C 500 MHz.

¹³ C	Desplazamiento (δ _{ppm})	¹³ C	Desplazamiento (δ _{ppm}) (Lee et al., 1998)
C-8	151.95	C-8	152.02
C-2	147.79	C-2	148.31
C-3	147.19	C-3	147.22
C-7	146.98	C-7	146
C-4b	138.21	C-4b	138.12
C-10b	130.89	C-10b	130.96
C-4a	126.58	C-4a	126.4
C-12a	125.55	C-12a	125.9
C-10a	124.68	C-10a	125
C-12 (C-H)	123.30	C-12 (C-H)	123.39
C-6a	122.38	C-6a	122.46
C- 11 (C-H)	119.88	C- 11(C-H)	120.02
C-10 (C-H)	118.77	C-10 (C-H)	118.93
C-9 (C-H)	112.78	C-9 (C-H)	112.85
C-1 (C-H)	104.48	C-1 (C-H)	104.52
O-CH ₂ -O	100.86	O-CH ₂ -O	100.94
C-4 (C-H)	100.47	C-4 (C-H)	100.53
C-6 (O-C-H)	85.92	C-6 (O-C-H)	86
O-CH ₃	61.5	O-CH ₃	61.59
O-CH ₃	55.81	O-CH ₃	55.84
O-CH ₃	53.81	O-CH ₃	53.87
N-CH ₃	40.46	N-CH ₃	40.59

Tabla 10 Interacciones observadas en el espectro ¹H COSY. Ver anexos espectro 8.

Protón ¹ H (δ _{ppm}) COSY	Protón ¹ H (δ _{ppm}) COSY
7.7735	7.4685
7.621	7.035

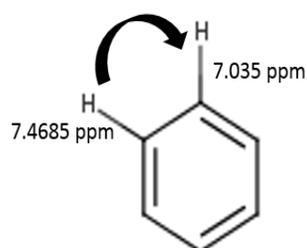
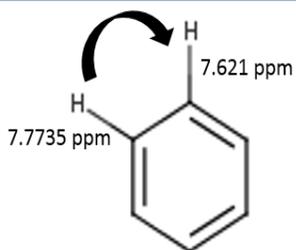
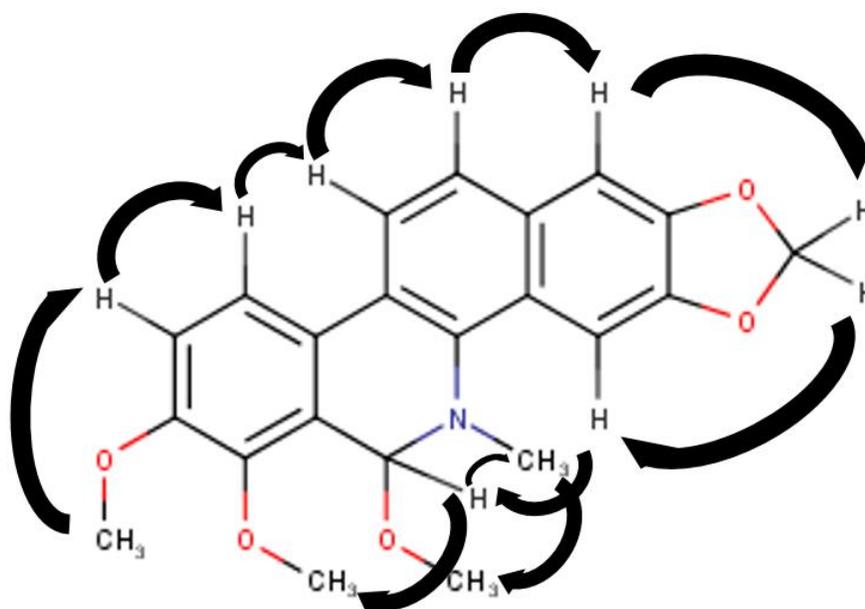


Tabla 11 Interacciones NOESY (^1H - ^1H) y HSQC (^1H - ^{13}C). ver anexos espectros 9 y 11.

^1H (δ_{ppm})	NOESY δ_{ppm} (correlaciones ^1H - ^1H)	HSQC δ_{ppm} (correlaciones ^1H - ^{13}C)
2.762 N-CH ₃	3.46, 3.962, 5.547, 7.698.	40.471
3.46 O-CH ₃	3.962, 5.547, 7.698	53.819
3.922 O-CH ₃	7.0355	55.824
3.962 O-CH ₃	5.547	61.509
5.547 O-C-H	2.762, 3.46, 3.962.	85.93
6.048 O-CH ₂ -O	7.12, 7.698	100.875
7.0355 H	3.922, 7.621	112.795
7.12 H	6.048, 7.0355	104.493
7.4685 H	7.12, 7.7735	123.316
7.621 H	7.0355, 7.7735	118.789
7.698 H	2.762, 3.46, 5.547, 6.048, 7.7735	100.485
7.7735 H	7.4685, 7.698, 7.7735	119.898



HSQC

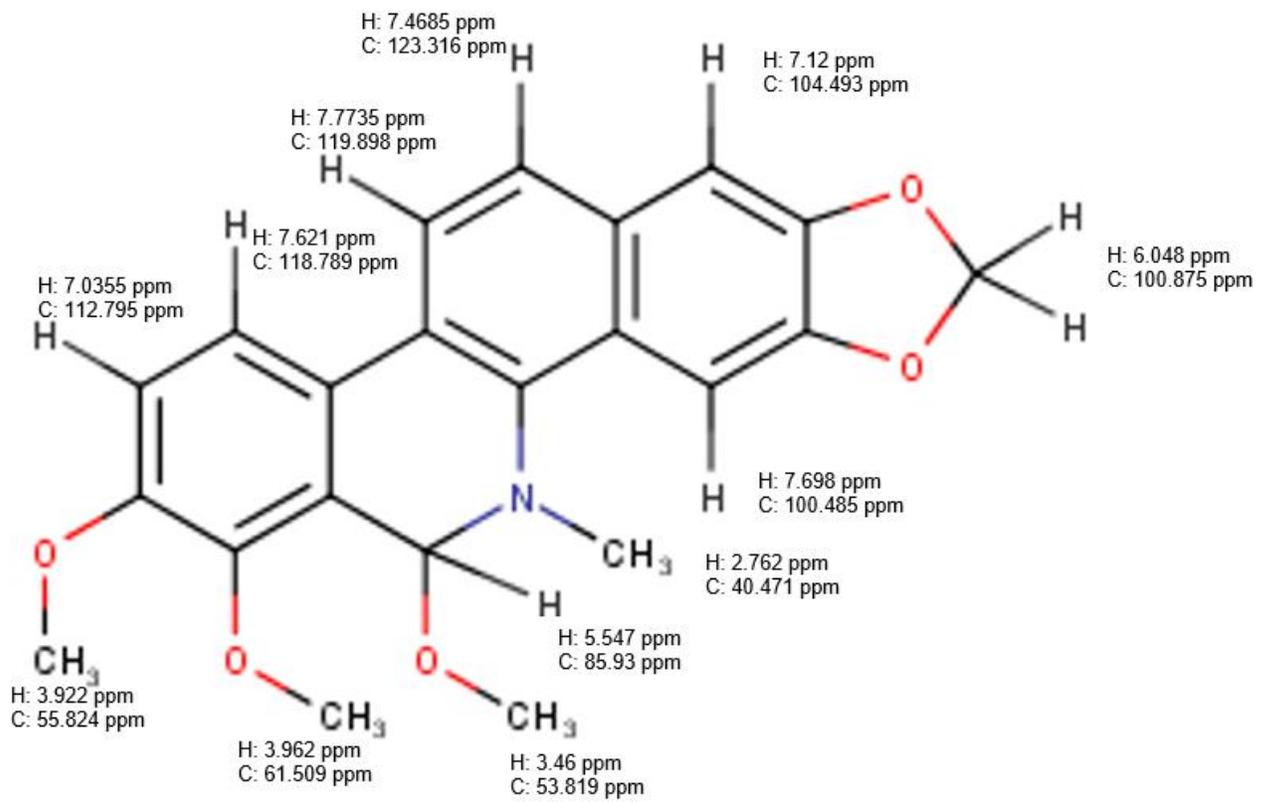
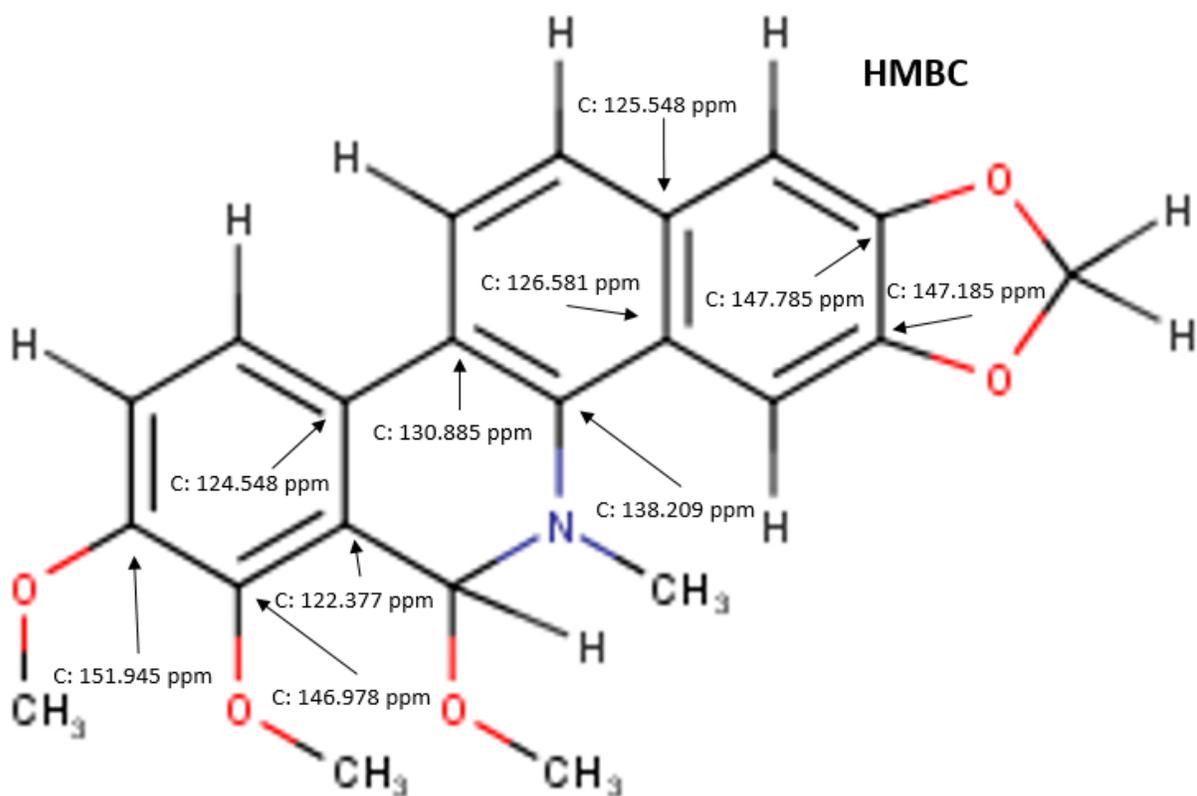


Tabla 12 Interacciones HMBC RMN ^{13}C y ^1H para angolina. Ver anexos espectro 10.

^1H (δ_{ppm})	HMBC δ_{ppm} (correlaciones ^1H - ^{13}C)
2.762 N-CH ₃	85.917, 138.209
3.46 O-CH ₃	85.917
3.922 O-CH ₃	151.945
3.962 O-CH ₃	146.978
5.547 O-C-H	40.462, 53.809, 124.675, 138.209, 146.978
6.048 O-CH ₂ -O	147.185, 147.785
7.0355 H	124.675, 146.978, 151.945
7.12 H	123.301, 126.581, 147.785
7.4685 H	104.480, 122.377, 126.581, 151.945
7.621 H	122.377, 125.548, 147.185, 151.945
7.698 H	104.48, 125.548, 130.885, 138.209, 147.185
7.7735 H	124.675, 130.885, 138.209



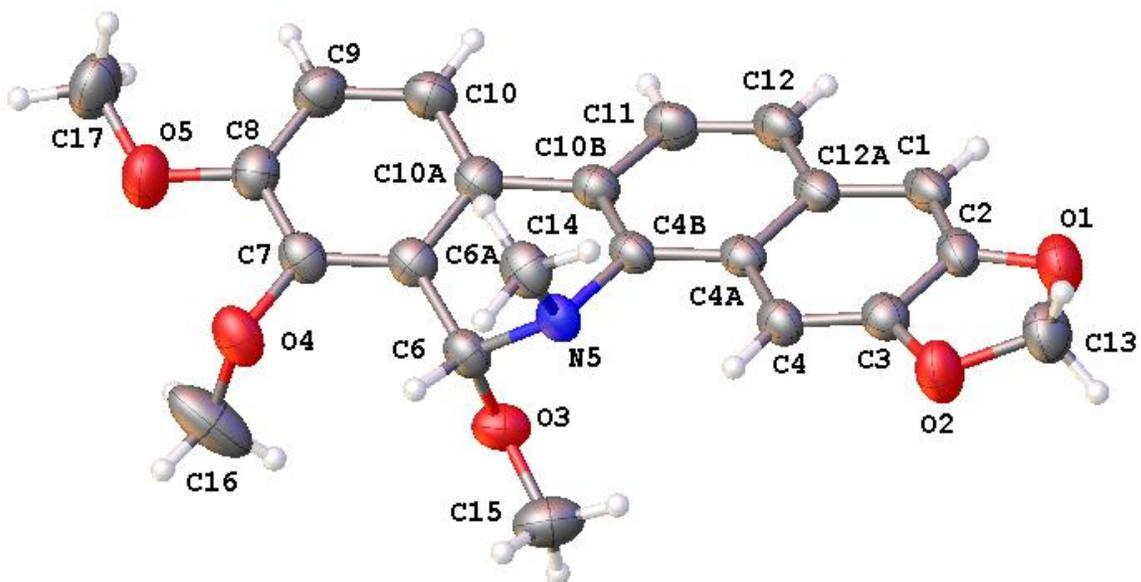


Figura 15 Vista estereoscópica de angolina obtenida por difracción de rayos X.

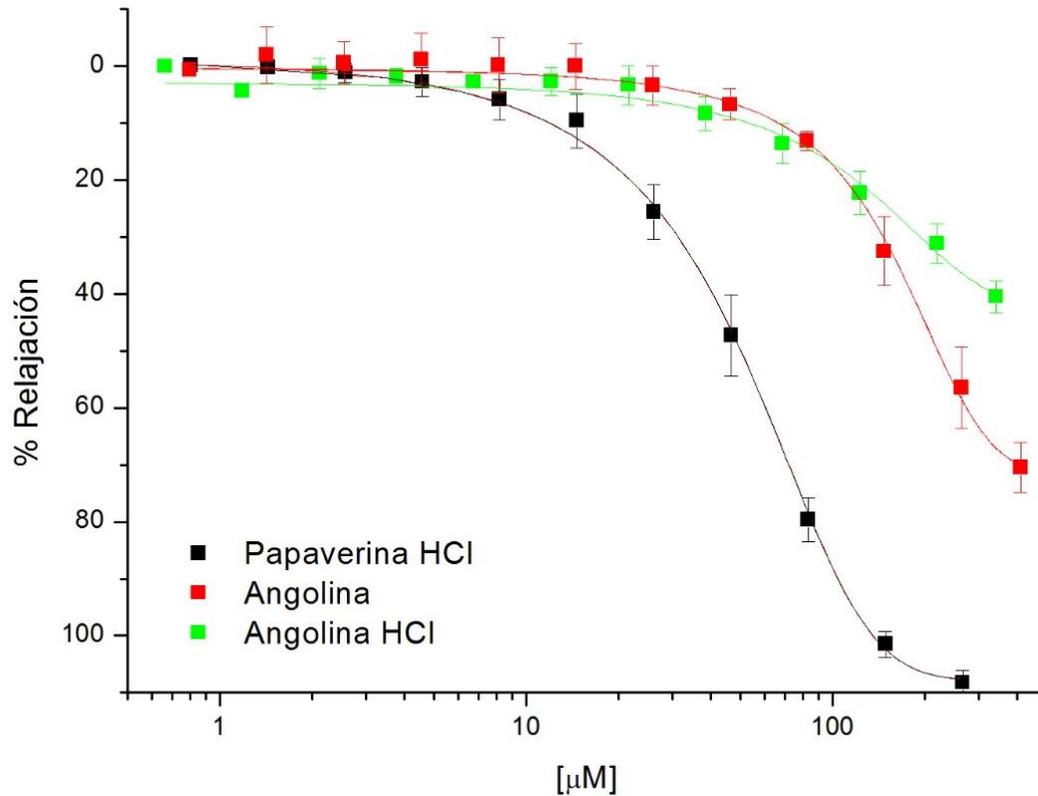
15. Determinación del efecto vasorrelajante y tráqueorrelajante de las fracciones 1- 11 obtenidas a partir del EMBac

15.1. Determinación del efecto tráqueorrelajante

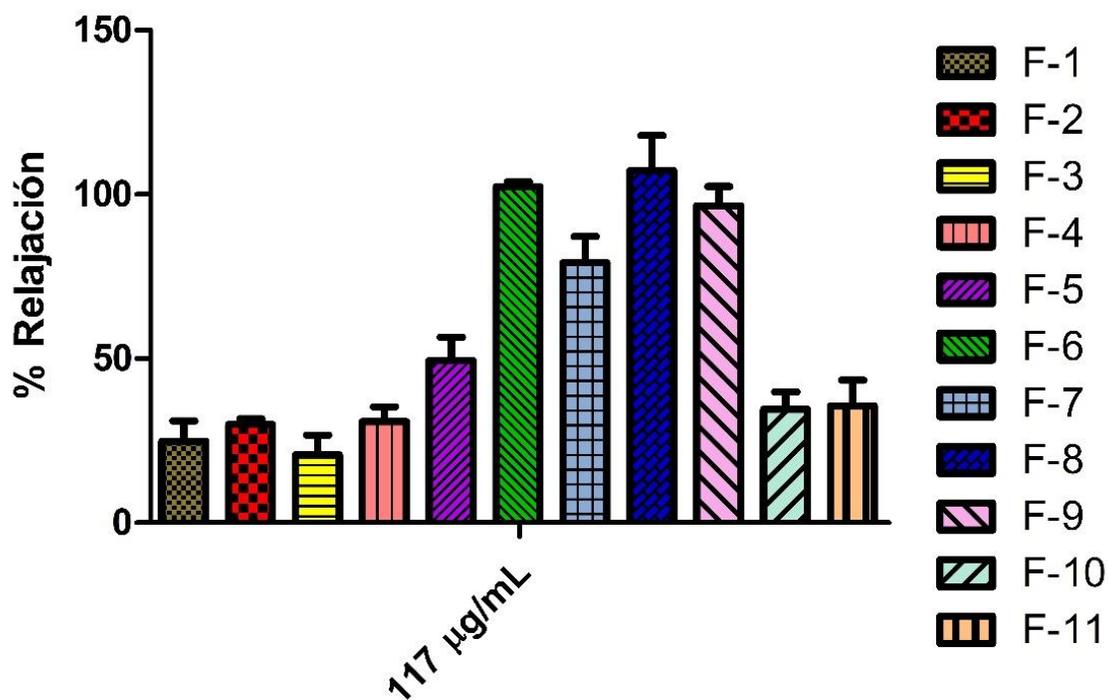
Con base en los antecedentes descritos sobre la actividad farmacológica del EMBac relacionado al efecto traqueorrelajante determinado, se estableció un $E_{max} = 98.52 \pm 2.651$ % y una $CE_{50} = 117.9 \pm 2.9$ $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados sugieren que el EMBac contiene metabolitos de interés farmacológico con actividad relajante de la tráquea y posiblemente relacionado a una actividad inhibitoria de las enzimas fosfodiesterasas debido a la similitud estructural relacionada a la papaverina que es también un alcaloide del tipo de las bencilisoquinolinas aislado de otra especie de la familia Papaveracea conocida como amapola (opio, *Papaver somniferum*) el cual no muestra los mismos efectos de la morfina, pero que actúa induciendo un efecto relajante en el músculo liso, especialmente a nivel de vías respiratorias y sistema cardiovascular, a través de la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas y un bloqueo de los canales de calcio (Ferrari 1974, Iguchi 1992) . En este contexto, las benzofenantridinas podrían servir como prototipos para el desarrollo de fármacos inhibidores de fosfodiesterasas principalmente para el tratamiento del asma (Gaona-Tovar, 2018).

Considerando lo mencionado, en el presente trabajo se realizó un estudio farmacológico biodirigido con el fin de poder aislar o identificar algún compuesto responsable de la actividad farmacológica mostrada utilizando el modelo farmacológico de órgano aislado. La evaluación de las once fracciones obtenidas del fraccionamiento primario a la concentración de 117.9 ± 2.9 $\mu\text{g/mL}$, permitió establecer que las Fracciones 4, 5, 6, 7 y 8, representan las fracciones más activas obtenidas (gráfica 1). De la fracción 5 (49.42 ± 7.15 % de inhibición) precipitó de manera espontánea la angolina (como ya fue descrito) y se decidió establecer su efecto relajante *ex vivo* en la tráquea aislada de rata. Así, se estableció el efecto relajante de angolina sobre la contracción inducida por carbacol a través de la construcción de CCR del alcaloide. En este sentido, se puede observar en la gráfica 2 el efecto traqueorrelajante de angolina mostrando un $E_{max} 70.458 \pm 4.426$ % y una $CE_{50} 160.76 \pm 7.15$ μM , que mostró relación en su efecto con la fracción 5 de donde fue aislado. Estos resultados nos indican que angolina participa como uno de los compuestos responsables de la actividad farmacológica del EMBac. Con base en esto, es bien conocido la capacidad de los alcaloides en la formación de sales tales como clorhidratos, los cuales pueden, en ocasiones, aumentar la solubilidad de los mismos con respecto a su forma base (Di Li, 2016). Por consiguiente, se evaluó la actividad farmacológica del clorhidrato de angolina

con el fin de observar un mejor efecto farmacológico con respecto a su forma base, en la gráfica 1 se muestra un efecto de 40.48 ± 2.76 % y una CE_{50} 119.06 ± 3.79 μ M, lo que permite establecer que no se favoreció el efecto farmacológico del compuesto en su forma de clorhidrato con respecto a su forma de alcaloide base, el alcaloide en forma de clorhidrato favoreció su solubilidad, pero no su eficacia y potencia.



Gráfica 1 Evaluación del efecto relajante de angolina y clorhidrato de angolina en tráquea aislada de rata.

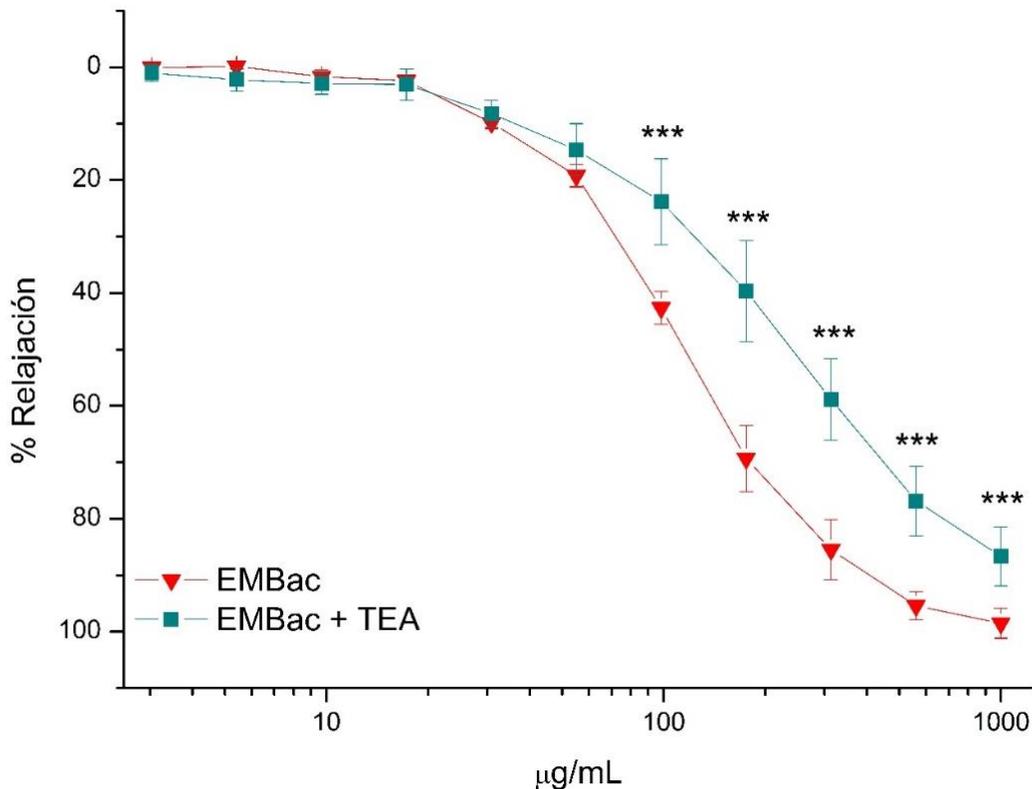


Grafica 2 Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a la CE_{50} 117 μ g/mL sobre anillos de tráquea aislada de rata

Adicionalmente, como se desprende de la gráfica 2, hay otras fracciones que muestran mayor potencia que la fracción 5 como son F-6, F-7, F-8 y F-9, respectivamente, que muestran desde un 80% hasta un 100% de inhibición de la contracción inducida por carbacol. Por lo que es necesario realizar una investigación química exhaustiva para aislar los componentes responsables de la actividad, que podrían ser también fenantridinas o compuestos relacionados y con mayor actividad que la mostrada por angolina.

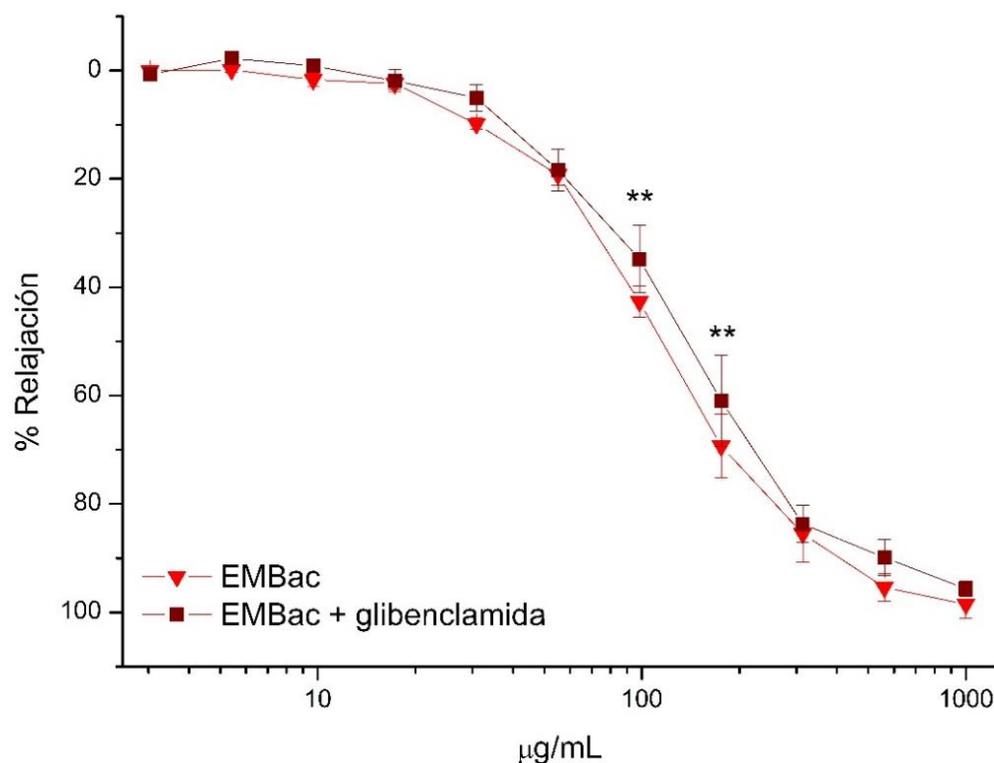
15.2. Participación de los canales de K⁺

Los canales de potasio activados por calcio se encuentran en la membrana plasmática de las células de la musculatura lisa, que se encuentran influenciadas por la concentración de iones, el potencial de membrana, metabolitos o receptores. Dos de estos, de alta conductancia sensible a calcio (BK^{Ca}) y los canales de potasio sensibles a ATP (K^{ATP}) teniendo el rol de modular la contractibilidad de la musculatura lisa de las vías aéreas (Kocmalova *et al.*, 2014). En este sentido, para explorar si los canales de potasio se encuentran involucrados en el proceso de relajación de la musculatura lisa de las vías aéreas, se realizaron curvas concentración respuesta del EMBac (3.03-1000 µg/mL) Se preincubaron los siguientes reactivos durante 15 min y se agregaron las diluciones del extracto en forma acumulativa. Se utilizó glibenclamida [10 µM] que es un bloqueador de los canales K^{ATP} (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1987) como se muestra en la gráfica 3 y Tetra Etil Amonio (TEA) [632µM] bloqueador no selectivo de canales de potasio sensibles a calcio (Luo *et al.*, 2019) que se muestra en la gráfica 4.



Gráfica 3 Efecto relajante del EMBac en presencia de TEA [632 µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni ***p< 0.001 EMBac vs EMBac + TEA.

En la gráfica 3, se observa que al preincubar TEA [632 μ M] durante 15 minutos y, posteriormente, agregar las diluciones del EMBac, se puede observar un desplazamiento hacia la derecha de la curva de relajación, lo que nos sugiere que los canales de potasio se encuentran involucrados en el proceso de relajación de la musculatura lisa vascular, puesto que el TEA es un inhibidor no selectivo de canales de K^+ (Luo *et al.*, 2019), para revisar qué tipo de canales de potasio están relacionados con el proceso de relajación de la musculatura lisa de las vías aéreas, se realizaron curvas concentración respuesta del EMBac en donde se preincubó glibenclamida [10 μ M] tal como se muestra en la gráfica 4.

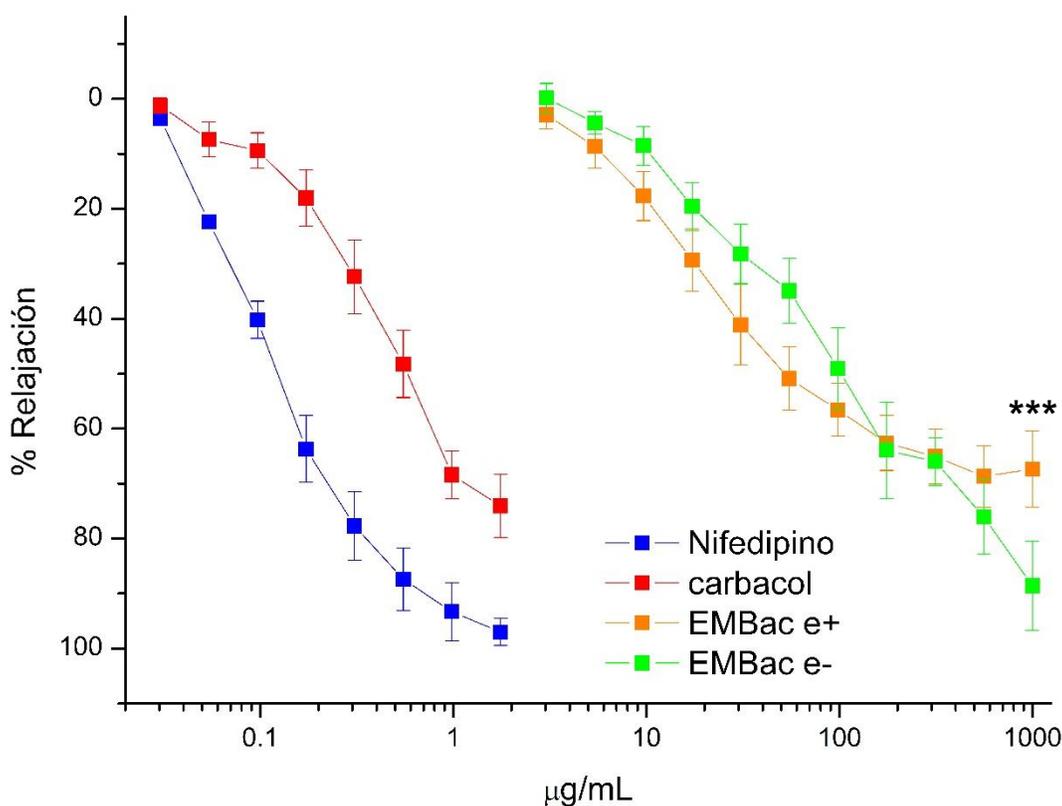


Gráfica 4 Efecto relajante del EMBac en presencia de glibenclamida [10 μ M]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Bonferroni. * $p < 0.05$

Como se puede observar en la gráfica 4, los canales K^+_{ATP} no se encuentran relacionados en el proceso de relajación mediado por el EMBac, al no verse ningún cambio con respecto a la curva control del EMBac, lo que indica que el efecto relajante podría verse mediado por la apertura de los canales BK^+_{Ca} . De acuerdo con los datos experimentales descritos por Gaona-Tovar 2018, el mecanismo de acción funcional del EMBac está mediado por la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas, que a su vez promueven la apertura de los canales de potasio probablemente BK^+_{Ca} impidiendo la entrada del ion Ca^{2+} extracelular y la recaptura del mismo en el retículo sarcoplasmico, esto promueve la relajación de la musculatura lisa vascular y en el mismo sentido evitando la contracción del mismo.

15.3. Determinación del efecto vasorrelajante del EMBac y angolina.

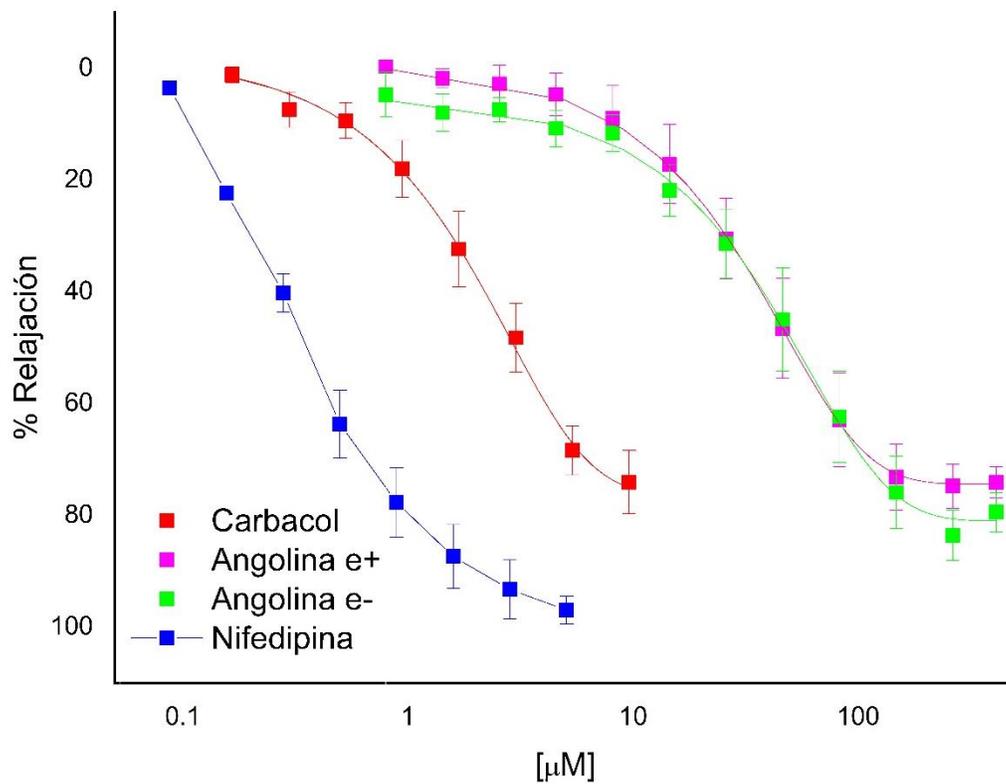
Con el fin de conocer si el EMBac presenta un efecto vasorrelajante sobre los anillos de aorta aislada de rata, esto debido al mecanismo de acción funcional estudiado por **Gaona-Tovar, 2018** que demostró que el mecanismo de acción de dicho extracto esta mediado principalmente por la probable inhibición de las enzimas fosfodiesterasas, se construyó una curva concentración respuesta del EMBac en presencia o ausencia de endotelio sobre anillos de aorta de rata. El cual mostró un efecto independiente de la presencia de endotelio tal como se puede observar en la gráfica 5, teniendo un E_{max} 68.7 ± 5.59 % y una CE_{50} 16.23 ± 7.32 $\mu\text{g/mL}$ en anillos con endotelio intacto (e+) y en ausencia de endotelio (e-) un E_{max} 88.59 ± 8.17 % y una CE_{50} 64 ± 7.41 $\mu\text{g/mL}$



Gráfica 5 Efecto relajante del EMBac en presencia y ausencia de endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Bonferroni *** $p < 0.001$

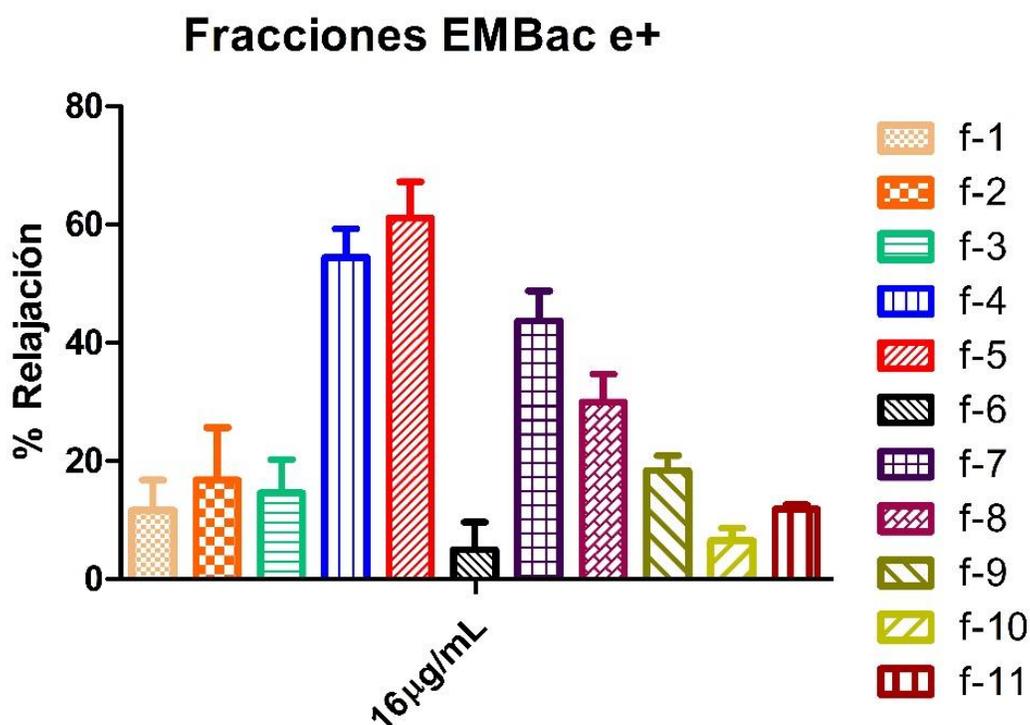
Teniendo en cuenta que se tenía caracterizado a la angolina, se decidió evaluar sobre anillos de aorta aislada para determinar su efecto farmacológico.

De la gráfica 6 se desprende que el efecto relajante de angolina es independiente de la presencia de endotelio. El efecto relajante en presencia de endotelio mostró un E_{max} 74.15 ± 2.78 % y una CE_{50} 34.56 ± 8.96 μ M, sin embargo, cuando se realizaron CCR sin endotelio se observó una E_{max} 79.46 ± 3.49 % y una CE_{50} 35.3 ± 9.29 μ M; confirmándose que el efecto vasorrelajante de angolina es independiente de la presencia de endotelio y que el mecanismo de acción funcional podría ser debido a la inhibición de enzimas fosfodiesterasas, bloqueo de canales calcio o antagonismo de receptores adrenérgicos que se encuentran solamente en la musculatura lisa vascular.

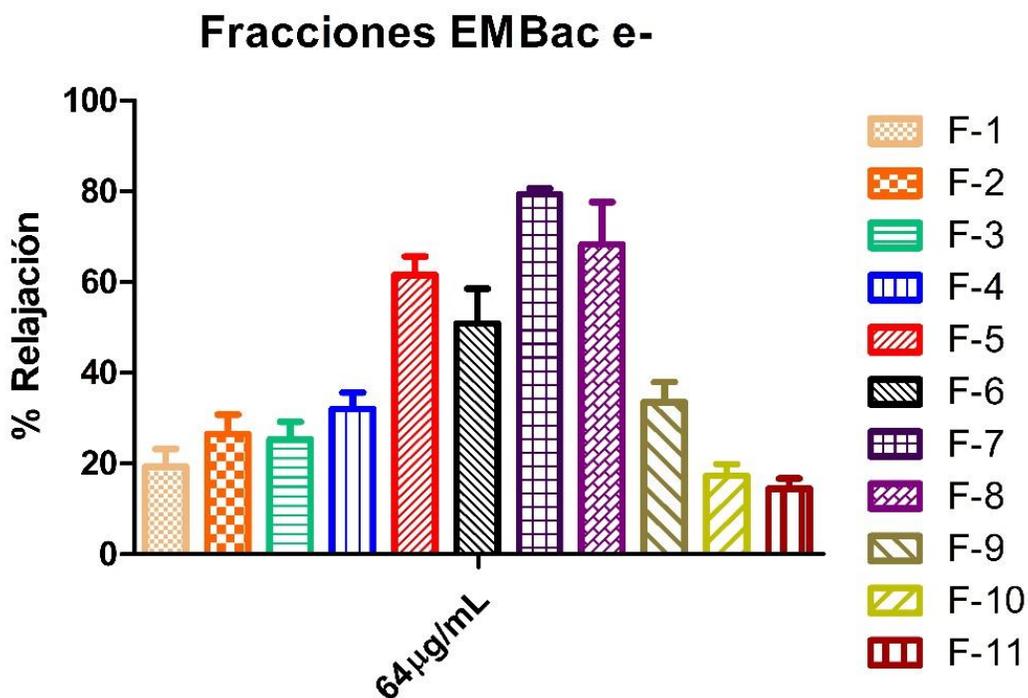


Gráfica 6 Efecto relajante de angolina en presencia y ausencia de endotelio sobre anillos de aorta aislada de rata. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni. * $p < 0.05$ Angolina e+ vs Angolina e-.

En contraste con lo anterior, puede decirse que la angolina es uno de los compuestos responsables de la actividad vasorrelajante del EMBac, puesto que al observar la gráfica 7, la fracción F-5 fue una de las fracciones con mayor actividad relajante evaluada en presencia de endotelio a una concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$ mostró un $62\pm 18.2\%$ de relajación y ausencia del mismo evaluada a una concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$ mostró un efecto relajante de $61.54\pm 4.08\%$ como se observa en la gráfica 8, lo que nos confirma que la angolina si es uno de los compuestos con actividad vasorrelajante del EMBac. Sin embargo, es importante destacar, como se hizo en el estudio fitoquímico biodirigido de la sección anterior, que existe fracciones que resultaron mas activas o similares en actividad que la F-5, por lo que es necesario estudiar esas fracciones para obtener los componentes responsables del efecto vasorrelajante, esas fracciones son: F-4, F-6, F-7 y F-8.



Gráfica 7 Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a una concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$ en anillos de aorta aislada de rata con endotelio intacto.



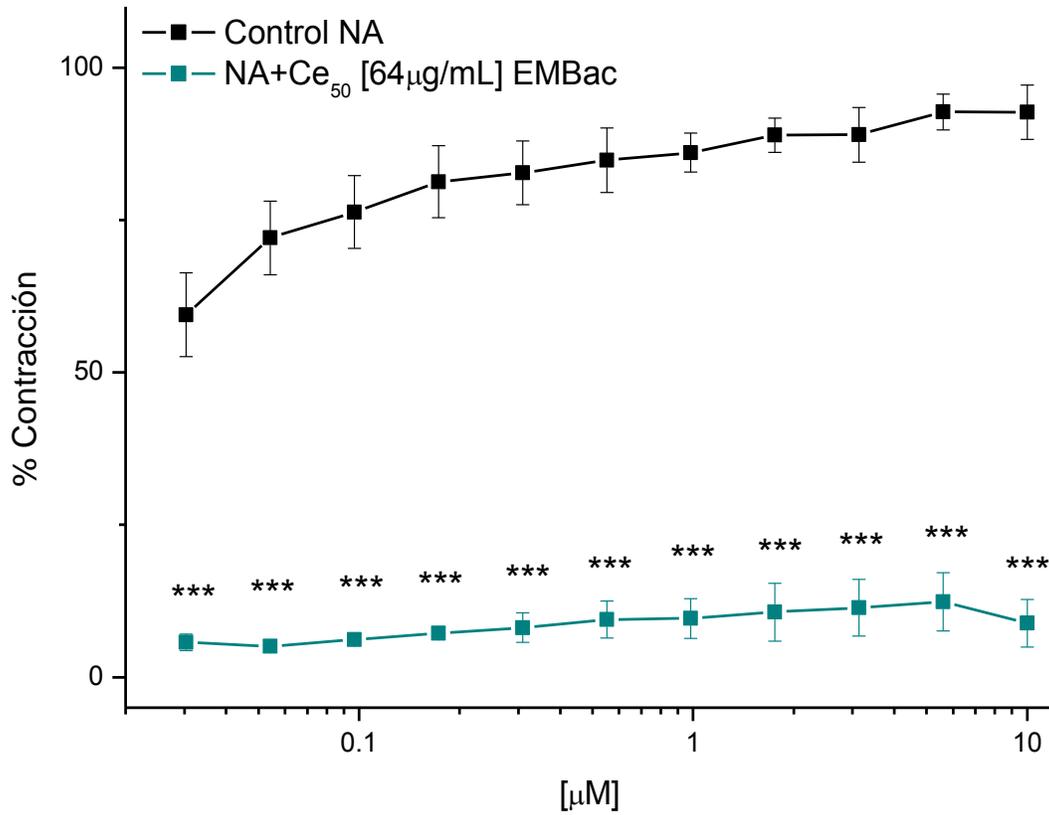
Gráfica 8 Evaluación del efecto relajante de las fracciones del EMBac a una concentración de 64 µg/mL en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio.

Una vez determinado el efecto relajante tanto del EMBac como de las fracciones, se decidió determinar el mecanismo de acción funcional del extracto. Con la finalidad de conocer el (los) mecanismo(s) involucrados en el efecto vasorrelajante independiente de la presencia de endotelio, se estudiaron los mecanismos de contracción y relajación de la musculatura lisa vascular que incluyen a los receptores adrenérgicos, fosfodiesterasas, canales de potasio y canales de calcio.

15.4. Participación de los receptores α -adrenérgicos

Las catecolaminas, como la hormona endógena adrenalina, el neurotransmisor noradrenalina y una amplia variedad de análogos ejercen sus efectos farmacológicos y fisiológicos por la interacción con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células especializadas. Existen 2 clases de receptores adrenérgicos α y β , que a su vez se subdividen en α_1 (vasoconstricción), α_2 (inhibe la retroalimentación del lanzamiento de noradrenalina), β_1 (corazón en mamíferos y tejido adiposo) y β_2 (musculatura lisa vascular, uterina y bronquial) (Lefkowitz, Stadel & Caron 1983).

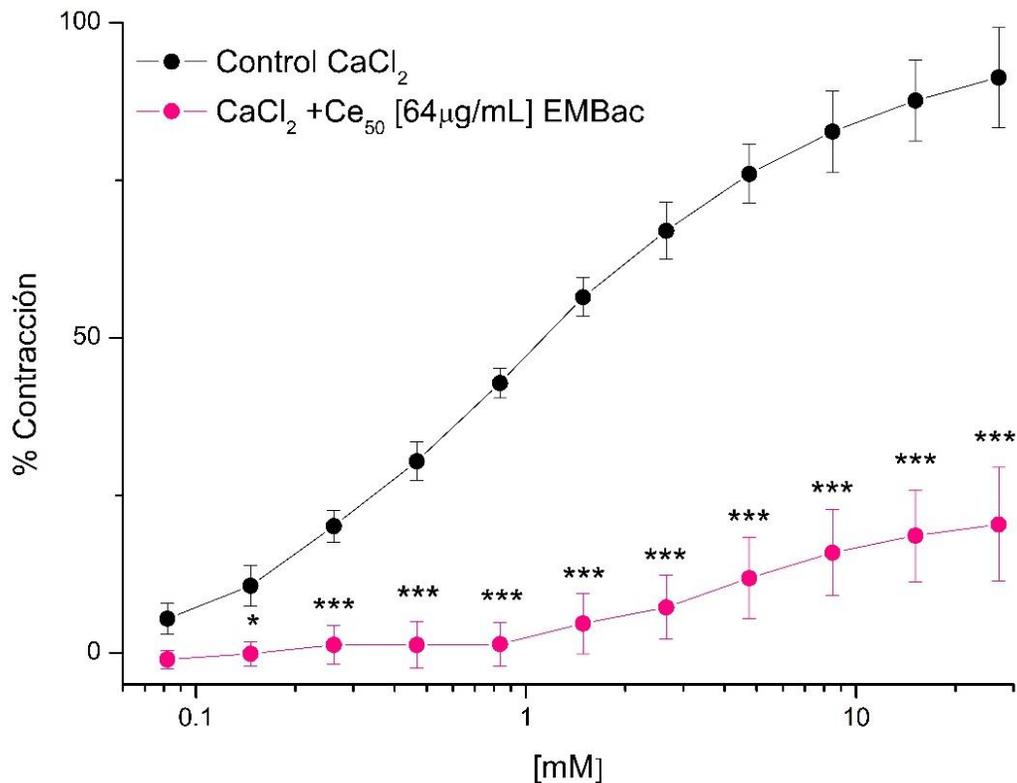
La liberación de noradrenalina de los nervios simpáticos periféricos ocasiona vasoconstricción por la activación de los receptores adrenérgicos α_1 en las células de la musculatura lisa vascular. Esta respuesta es modulada recíprocamente por los receptores adrenérgicos β y α_2 activados por proteínas-G estimuladora (G_s) e inhibitoria (G_i), respectivamente, oponiéndose y mejorando la vasoconstricción mediada por los receptores adrenérgicos α_1 (Berg 2017). Por tal motivo se construyeron curvas concentración respuesta a contracción con NA [0.03-10 μ M] como control, posteriormente se preincubo la CE_{50} del EMBac (64 μ g/mL) durante 15 minutos y se agregaron las diluciones de NA y se construyó la gráfica 9. al preincubar la CE_{50} del EMBac hay una oposición total a la contracción inducida por la NA, lo cual nos demuestra que posiblemente el EMBac está actuando por un antagonismo no competitivo por unirse a un sitio alostérico, o de igual manera dicho extracto podría estar oponiéndose a la contracción puesto que podrían estar involucradas otras vías de señalización que impiden que la contracción se lleve a cabo, en la que se podría deberse a un bloqueo de los canales de calcio, la activación de los canales de potasio o la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas, entre otras (Hamad *et al.*, 2003, Brozovich *et al.*, 2016, Klinger & Kadowitz, 2017, Ramírez-Lee *et al.*, 2013, Tamargo & Ruilope, 2016). Por lo que es importante explorar estas vías para conocer el posible mecanismo de acción funcional del EMBac.



Gráfica 9 Efecto de la CE₅₀ [64 µg/mL] del EMBac en la contracción inducida por noradrenalina [0.03-10 µM] en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Bonferroni ***p < 0.001 Control NA vs NA+ CE₅₀ [64 µg/mL] EMBac.

15.5. Participación de los canales de calcio

La fosfolipasa C induce la producción de trifosfato de inositol, este mismo estimula la liberación de calcio del retículo sarcoplasmico y el diacilglicerol ocasionando la activación de la proteína cinasa C. Adicionalmente, numerosos canales de calcio, como los canales operados por voltaje (VOC), canales operados por receptores (ROC), los almacenes operados por canales (SOC), canal de receptor de potencial catiónico transitorio (TRP) y los canales catiónicos no selectivos permeables a Ca^{2+} , promueven el influjo de calcio e incrementan $[\text{Ca}^{2+}]$, y la importancia de los canales de calcio se centra especialmente por su manejo anormal del calcio en la hipertensión, dando hincapié a la efectividad de los bloqueadores de canales de calcio tipo L para el tratamiento de la misma (Touyz *et al.*, 2018). La familia de los canales $\text{Ca}_v 1 \text{ Ca}^{2+}$ también son conocidos como canales Ca^{2+} tipo “L”, estos fueron designados debido a las corrientes de entrada de larga duración durante la despolarización, lo que permitió distinguirlos de los canales tipo T (Zamponi *et al.*, 2015). Los canales de calcio operados por voltaje son complejos hetero-oligoméricos transmembrana, teniendo como componente la subunidad α_1 que forma parte del poro en donde se unen los bloqueadores de canales de calcio. Este tipo de canales se encuentran en el corazón y los vasos sanguíneos, las isoformas se encuentran distribuidas de forma variable en el tejido cardiaco y la musculatura lisa (Godfraind 2017). Debido a la importancia y al papel que estos receptores desempeñan en el proceso de contracción de la musculatura lisa vascular, se realizó una curva concentración respuesta a la contracción inducida por CaCl_2 [0.081-27.03 mM] en la curva control, y para ver la participación se preincubó la CE_{50} del EMBac y se agregaron las diluciones de CaCl_2 [0.081-27.03 mM] como se muestra en la gráfica 10.



Gráfica 10 Efecto de la CE₅₀ [64 µg/mL] del EMBac en la contracción inducida por CaCl₂ [0.081-27.03 mM] en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio ANOVA de dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Bonferroni *p<0.05, ***p<0.001 control CaCl₂ vs CaCl₂ + CE₅₀ [64 µg/mL] EMBac .

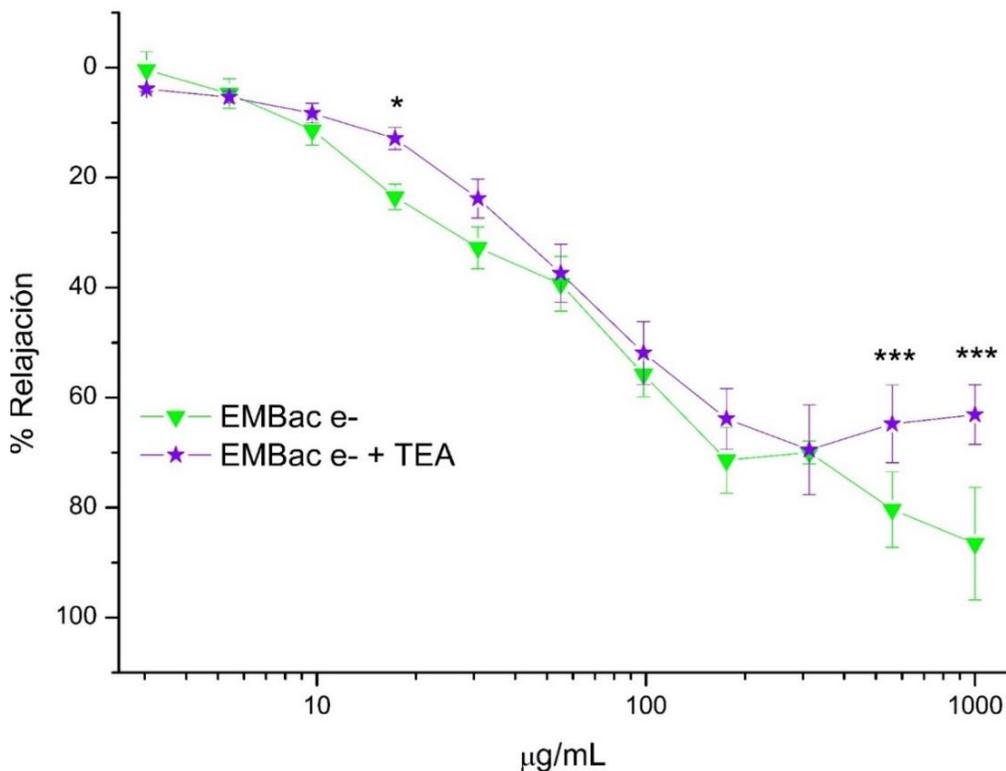
En la gráfica 10 se se aprecia una oposición a la contracción inducida por cloruro de calcio con respecto a la curva control del EMBac, lo que sugiere fuertemente que el efecto relajante de la musculatura lisa vascular esta mediada por el bloqueo de los canales de calcio tipo L, el cual es crucial para llevar a cabo el proceso de contracción (Ghosh *et al.*, 2017). Este efecto podría estar mediado por la presencia de los diversos alcaloides del tipo benzofenantridina en el bloqueo de estos canales, para corroborar dicha situación es necesario evaluar algún alcaloide y determinar si estos actúan por el bloqueo de estos canales.

15.6. Participación de los canales de K⁺

Los canales de potasio son claves en la regulación del potencial de membrana con un incremento o decremento de la actividad, resultando en la hiperpolarización o despolarización de la membrana respectivamente (Stott, Jepps & Greenwood 2014).

El potencial de membrana de las células de la musculatura lisa de las arterias se encuentra regulado por los canales de K⁺ siendo un regulador importante del tono arterial y por lo tanto del diámetro. La apertura de estos canales en la membrana celular de las células de la musculatura lisa en las arterias, incrementa el eflujo del K⁺ teniendo como consecuencia la hiperpolarización por el potencial de membrana, cerrando los canales de Ca²⁺ e impidiendo la entrada de Ca²⁺ (Nelson & Quayle 1995).

Se realizaron curvas concentración respuesta del EMBac en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio, en el que se preincubó TEA [632 μM] durante 15 minutos y se agregaron las diluciones del EMBac. Posteriormente, se construyó la gráfica comparándolo con respecto a la curva del EMBac sin TEA tal como se muestra en la gráfica 11.



Gráfica 11 Efecto relajante del EMBac en presencia de TEA [632 μM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ EMBac e- vs EMBac + TEA.

En la gráfica 11, se observa que la curva del EMBac más TEA solo presenta diferencia significativa en las 2 últimas concentraciones, lo que sugiere que el efecto relajante no está mediado por la participación de los canales de potasio ante el proceso de relajación inducido por el EMBac, por lo que es necesario explorar otras vías de señalización que podrían verse involucradas como la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas.

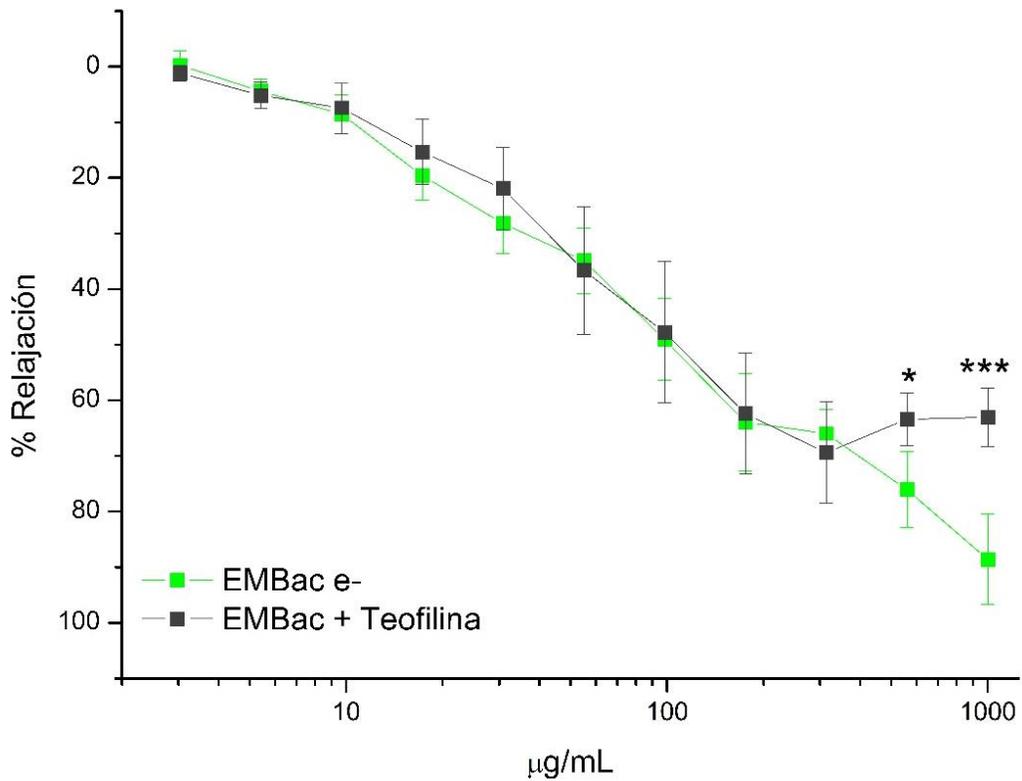
15.7. Participación de las fosfodiesterasas.

La activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial y la liberación del radical libre NO, que se difunde con facilidad a través de las membranas biológicas, que da por resultado la estimulación de la guanilato ciclasa soluble conduciendo a un incremento del GMPc intracelular alrededor de las células de la musculatura lisa, dando por resultado la relajación y la vasodilatación. En este sentido hay otro vasodilatador derivado del endotelio que es estimulado por estrés, y en respuesta a la acetilcolina es la prostaciclina PGI₂, que estimula al receptor PGI₂, los que ocasiona la activación de la adenilato ciclasa, sintetizando AMPc causando la relajación de la musculatura lisa. Ambas vías se encuentran relacionadas por la producción de segundos mensajeros siendo el GMPc un inhibidor de la fosfodiesterasa 3 aumentando el tiempo de vida media del AMPc (Cahill & Redmon 2016).

Las enzimas fosfodiesterasas (PDE) son las únicas enzimas encargadas de la degradación del AMPc y GMPc y terminar la señalización de estos. Las fosfodiesterasas 1,2,3, 10 y 11 hidrolizan al AMPc y GMPc, las fosfodiesterasas 4,7 y 8 son específicas para AMPc y las fosfodiesterasas 5,6 y 9 son específicas para GMPc (Johnson *et al.*, 2012).

La teofilina es una xantina que ha sido utilizada desde 1937 en el tratamiento de enfermedades respiratorias como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), los mecanismos de acción molecular no se conocen totalmente, pero existen diferentes blancos potenciales en los que se incluyen una inhibición no selectiva de las fosfodiesterasas, inhibición de la fosfoinositida 3-cinasa, antagonismo al receptor de adenosina y un incremento de la actividad de ciertas histonas deacetilasas (Spina, 2017)

Se realizaron curvas concentración respuesta en la que se preincubó la CE₅₀ de teofilina [124.68 µM] y se adicionaron las diluciones del EMBac, dicho experimento se muestra en la gráfica 12.



Gráfica 12 Efecto relajante del EMBac en presencia de teofilina [124.68 µM]. ANOVA de dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Bonferroni * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ EMBac e- vs EMBac + Teofilina.

Como se muestra en la gráfica 12, en la curva concentración respuesta del extracto en el que se preincubó la CE_{50} de teofilina, solo presentó diferencia estadística en las 2 últimas diluciones agregadas, lo que permite descartar la potencial inhibición de fosfodiesterasas que el proceso de relajación inducido por EMBac.

16. Conclusiones

1. El extracto metanólico de *Bocconia arborea* de corteza presenta un efecto relajante de la musculatura lisa vascular independiente de la presencia de endotelio. Ejerciendo su efecto relajante a través de diferentes mecanismos en el que se incluye un efecto antagonista no competitivo sobre los receptores adrenérgicos y un bloqueo de los canales de calcio. Por otro lado, EMBac promueve la apertura de canales de potasio sobre la musculatura lisa de las vías aéreas, segundo mecanismo de acción que se suma a la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas que promueve la apertura de canales de potasio, y que fue establecido en un estudio previo.
2. El estudio fitoquímico del EMBac permitió la obtención de 11 fracciones cromatográficas, siendo las más activas las fracciones F4-F9 en tráquea y aorta aisladas de rata. Derivado de la fracción 5, se aisló el alcaloide angolina que presenta efecto relajante de la musculatura lisa, siendo más activo y potente en la aorta presentando un efecto independiente de la presencia de endotelio.
3. Se aisló y caracterizó el alcaloide dihidrosanguinarina con rendimientos buenos, pero demostró baja solubilidad y debido a esto no se llevó a cabo su evaluación.



17. Perspectivas

1. Determinar el mecanismo de acción de la angolina en aorta aislada de rata y realizar el ensayo antihipertensivo agudo en ratas SHR.
2. Realizar el estudio toxicológico agudo y subagudo de angolina.
3. Realizar estudio fitoquímico exhaustivo de los distintos extractos de corteza para aislar otros alcaloides con posible actividad farmacológica.
4. Realizar el estudio antiasmático *in vivo* en cuyos con asma inducida de algunos alcaloides aislados.

18. Referencias

1. Ahmed M. Hamad, Andrew Clayton, Baharul Islam, and Alan J. Knox. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Vol.285. L973-L983 pp. 2003. <http://10.1152/ajplung.00033.2003>.
2. American College of Cardiology, American College of Cardiology, & American Heart Association. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical practice guidelines. *Hypertension*, 71(6), E13-E115.
3. American Heart Association, 2016. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update. DOI:10.1161/CIR.0000000000000350
4. Berg, T. (2017). β - and α 2-Adrenoceptor Control of Vascular Tension and Catecholamine Release in Female Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in neurology*, 8, 130. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00130>
5. Buenz Eric J., Verpoorte Rob and Bauer Brent A. The Ethnopharmacologic Contribution to Biosprospecting Natural Products. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* (58). 19.1-19.22 p. 2018.
6. Caballero-George, C., Vanderheyden, P. M., Solis, P. N., Gupta, M. P., Pieters, L., Vauquelin, G., & Vlietinck, A. (2003). In vitro effect of sanguinarine alkaloid on binding of [3H] candesartan to the human angiotensin AT1 receptor. *European journal of pharmacology*, 458(3), 257-262.
7. Cahill, P. A., & Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium—gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, 97-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
8. Chang, Y. C., Chang, F. R., Khalil, A. T., Hsieh, P. W., & Wu, Y. C. (2003). Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 521-526.
9. Chow, Y. L., Iwata, Y., & Sato, F. (2017). Dihydrosanguinarine Enhances Glucose Uptake in Mouse 3T3-L1 Cells. *ACS omega*, 2(10), 6916-6925.
10. Di Li, E. K. (2016). *Drug-like properties concepts, structure, design, and methods from ADME to toxicity optimization*. Elsevier inc.

11. Donnell, A. F., Dollings, P. J., Butera, J. A., Dietrich, A. J., Lipinski, K. K., Ghavami, A., & Hirst, W. D. (2010). Identification of pyridazino [4, 5-b] indolizines as selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(7), 2163-2167. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.044>
12. Dra. Alma Gurrola Silva y Dr. José Guadalupe Huerta López. Historia del asma. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas vol, 22 (2). pp 77-86. 2013.
13. Enciclovida: Chicalote de árbol *Bocconia arborea*. <http://enciclovida.mx/especies/166236-bocconia-arborea> (2019).
14. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Informe final de resultados. México, 2016. 151 p.
15. Ferrari M. Effects of papaverine on smooth muscle and their mechanisms. *Pharmacol Res Commun*. 1974;6(2):97-115. doi:10.1016/s0031-6989(74)80018-4
16. F.V. Brozovich, C.J. Nicholson, C.V. Degen, Yuan Z. Gao, M. Aggarwal, and K.G. Morgan. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacological Reviews* Vol. 68 (2016). Pp. 476-532 <http://dx.doi.org/10.1124/pr.115.010652>
17. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Molecular targets and anticancer potential of sanguinarine—A benzophenanthridine alkaloid. *Phytomedicine*, 34, 143-153.
18. Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., Santana, L. F., Nieves-Cintrón, M., & Navedo, M. F. (2017). Calcium channels in vascular smooth muscle. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 78, pp. 49-87). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.002>
19. Girolamo Pelaia, Teresa Renda, Luca Gallelli, Alessandro Vatrella, Maria Teresa Busceti, Sergio Agati, Mario Caputi, Mario Cazzola. Rosario Maselli, Serafino A. Marsico. Molecular mechanism underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory Medicine* Vol. 102 (2008), 1173-1181. <http://doi:10.1016/j.rmed.2008.02.020>
20. Global Asthma Network. The Global Asthma Report 2018. Pp 1-92
21. Global Initiative For Asthma. Manejo y prevención del asma para adultos y niños mayores de 5 años, guía de bolsillo para profesionales de la salud, actualización 2019.
22. Godfraind, T. (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in pharmacology*, 8, 286. doi: 10.3389/fphar.2017.00286

23. Goto, T., Shiina, A., Murata, T., Tomii, M., Yamazaki, T., Yoshida, K. I., ... & Takagi, N. (2014). Identification of the 5, 5-dioxo-7, 8-dihydro-6H-thiopyrano [3, 2-d] pyrimidine derivatives as highly selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(3), 893-899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.076>
24. Goto, T., Shiina, A., Yoshino, T., Mizukami, K., Hirahara, K., Suzuki, O., ... & Takahashi, M. (2013). Identification of the fused bicyclic 4-amino-2-phenylpyrimidine derivatives as novel and potent PDE4 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(11), 3325-3328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.104>
25. Gutierrez, R. P., Vargas Solis, R., Gutierrez, G. D., & Martinez-Martinez, F. J. (2002). Identification of benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea* by gas chromatography–mass spectrometry. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(3), 177-180.
26. Herbert, J. M., Augereau, J. M., Gleye, J., & Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*, 172(3), 993-999.
27. Iguchi M, Nakajima T, Hisada T, Sugimoto T, Kurachi Y. On the mechanism of papaverine inhibition of the voltage-dependent Ca⁺⁺ current in isolated smooth muscle cells from the guinea pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263(1):194-200.
28. James R. Klinger and Philip J. Kadowitz. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *The American Journal of Cardiology*. Pp. S71-S79. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.06.012>
29. Johnson, W. B., Katugampola, S., Able, S., Napier, C., & Harding, S. E. (2012). Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: comparison with rat and guinea pig. *Life sciences*, 90(9-10), 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.11.016>
30. Julián, A., & Delgado, G. (2001). (±)-Bocconarborines A and B, Novel 1, 3-Bis-Benzo [c] phenanthridinyl Acetone Alkaloids from *Bocconia arborea*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(4), 189-194.
31. Kocmalova, M., Oravec, M., Adamkov, M., Sadlonova, V., Kazimierova, I., Medvedova, I., ... & Sutovska, M. (2014). Potassium ion channels and allergic asthma. In *Allergens and Airway Hyperreactivity* (pp. 35-45). Springer, Cham. DOI 10.1007/5584_2014_76
32. Kosina, P., Walterova, D., Ulrichová, J., Lichnovský, V., Stiborová, M., Rýdlová, H., ... & Šimánek, V. (2004). Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on

- pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 85-91.
33. Lefkowitz, R. J., Stadel, J. M., & Caron, M. G. (1983). Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 159-186.
 34. Liu, Z. Evolving mechanism of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology* (2018). <https://doi.org/10.1016/J.bcp.2018.02.012>
 35. Luo, D., Chen, X., Zhu, X., Liu, S., Li, J., Xu, J., ... & Ji, X. (2019). Pu-erh tea relaxes the thoracic aorta of rats by reducing intracellular calcium. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
 36. MacLean, D. B., Gracey, D. E. F., Saunders, J. K., Rodrigo, R., & Manske, R. H. F. (1969). Some benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea*. *Canadian Journal of Chemistry*, 47(11), 1951-1956.
 37. Maggie Lam, Emma Lamanna and Jane E. Bourke. Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease. *Smooth Muscle Spontaneous Activity*, Advances in Experimental Medicine and Biology 1124, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2019. Pp- 381- 422. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_16
 38. Manuel A. Ramírez-Lee, Héctor Rosas-Hernández, Samuel Salazar-García, José Manuel Gutiérrez-Hernández, Ricardo Espinosa-Tanguma, Francisco J. González, Syed F. Alli and Carmen González. Silver nanoparticles induce anti-proliferative effects on airway smooth muscle cells. Role of nitric oxide and muscarinic receptor signaling pathway. *Toxicology Letters* 22. pp. 246-256 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.027>
 39. Miao, F., Yang, X. J., ZHENG, F., SONG, X. P., & ZHOU, L. (2012). Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their in vitro acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c12-00618.
 40. Miao, F., Yang, X. J., Zhou, L., Hu, H. J., Zheng, F., Ding, X. D., ... & Sun, W. (2011). Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity. *Natural product research*, 25(9), 863-875.
 41. Michael Kranz , Michael Wall, Brian Evans, Afjal Miah, Stuart Ballantine, Chris Delves, Brian Dombroski, Jeffrey Gross, Jessica Schneck, James P. Villa, Margarete Neu, Don O. Somers. Identification of PDE4B over 4D subtype-selective inhibitors

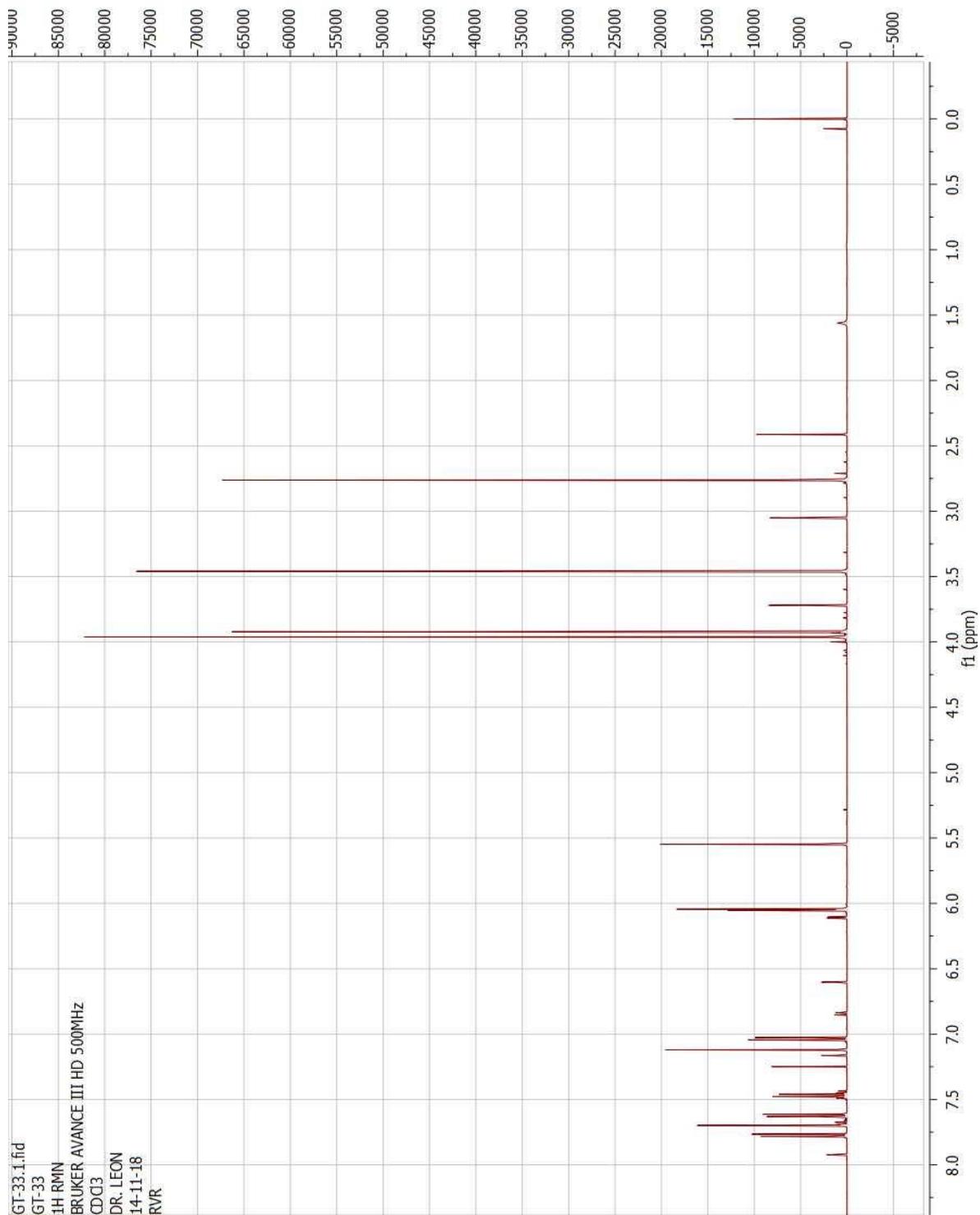
- revealing an unprecedented binding mode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Vol. 17 (2009) pp. 5336-5341. <http://doi:10.1016/j.bmc.2009.03.061>
42. Michael, R. Phytochemical investigation of *Bocconia arborea* family (*Papaveraceae*) in the graduate college. University of Arizona (1972).
 43. Monroy-Ortíz, C., & España, P. C. (2007). M7 Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos.
 44. Navarro, V., & Delgado, G. (1999). Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(2), 223-226.
 45. Nelson, M. T., & Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(4), C799-C822.
 46. Niu, X. F., Zhou, P., Li, W. F., & Xu, H. B. (2011). Effects of chelerythrine, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, on acute inflammation in mice. *Fitoterapia*, 82(4), 620-625.
 47. Organización Mundial de la Salud, 2019. Datos y cifras de la hipertensión. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
 48. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra, Suiza. 2013. 75 p.
 49. Organización Mundial de la Salud. GLOBAL ACTION PLAN for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Ginebra, Suiza. 91p.
 50. Organización Mundial de la Salud. Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo, una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Ginebra, Suiza. 2013. 40p.
 51. Paul A. Cahill, Eileen M. Redmond. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* vol. 248 (2016), 97-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
 52. Pérez, R. M., Vargas, R., Martínez, F. J., García, E. V., & Hernández, B. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 44(1), 5-21.
 53. Peter B. Noble, Chris D. Pascoe, Bo Lan, Satoru Ito, Loes E.M. Kistemaker, Amanda L. Tatler, Tonio Pera, Bindi S. Brook, Reinoud Gosens, Adrian R. West. Airway smooth muscle in asthma: Linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 29. 2014. pp 96-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2014.07.005>

54. PhD. Blanca Camoretti-Mercado. Targeting the airway smooth muscle for asthma treatment. Mosby, Inc. All right reserved. doi: 10.1016/j.trsl.2009.06.008
55. Pragna Patel, MD, MPH, Pedro Ordunez, MD, PhD, Donald DiPette, MD, Maria Cristina Escobar, MD, Trevor Hassell, MD, Fernando Wyss, MD, PhD, Anselm Hennis, MD, MSc, PhD, Samira Asma, DDS, MPH, and Sonia Angell, MD, MPH. Improved Blood Pressure Control to Reduce Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality: The standardized Hypertension Treatment and Prevention Project. DEPARTAMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. USA. December 2016; 18(12): 1284-1294. doi:10.1111/jch.12861.
56. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-030-SSA2-2017, Para la prevención, detección, Diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. Diario Oficial de la Federación 19/04/2017. Consultado el 03/04/2019
57. R. Clinton Webb. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*, 27(4), 201-206.
58. Royal College of Physicians. Why asthma still Kills, The National Review of Asthma Deaths, Confidential Enquiry report. London: RCP, 2014. Pp. 1-115
59. S. Ehteshami-Afshar, J.M. FitzGerald, M.M. Doyle-Waters, M. Satsafavi. The global economic burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 20 (1) pp. 11-23. 2016
60. Sang Kook Lee, Wei Guo Qing, Woongchon Mar, Lumonadio Luyengi, Rajendra G. Mehta, Kazuko Kawanishi, Harry H. S. fong, Christopher W. W. Beecher, A. Douglas Kinghorn and Jhon M. Pezzuto. Angoline and Chelerythrine, Benzophenanthridine Alkaloids That Do Not Inhibit Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*. Japan Vol. 273, No. 31. pp. 19829-19833. Printed in USA.
61. Schmid-Antomarchi, H., De Weille, J., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1987). The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 262(33), 15840-15844.
62. Spina D., Page C.P. (2016) Xanthines and Phosphodiesterase Inhibitors. In: Page C., Barnes P. (eds) *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 237. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/164_2016_71
63. Stefan Ebmeier, Darmiga Thayabaran, Irene Braithwaite, Clément Bénamara, Mark Weatherall and Richard Beasley. Trends in international asthma mortality: analysis

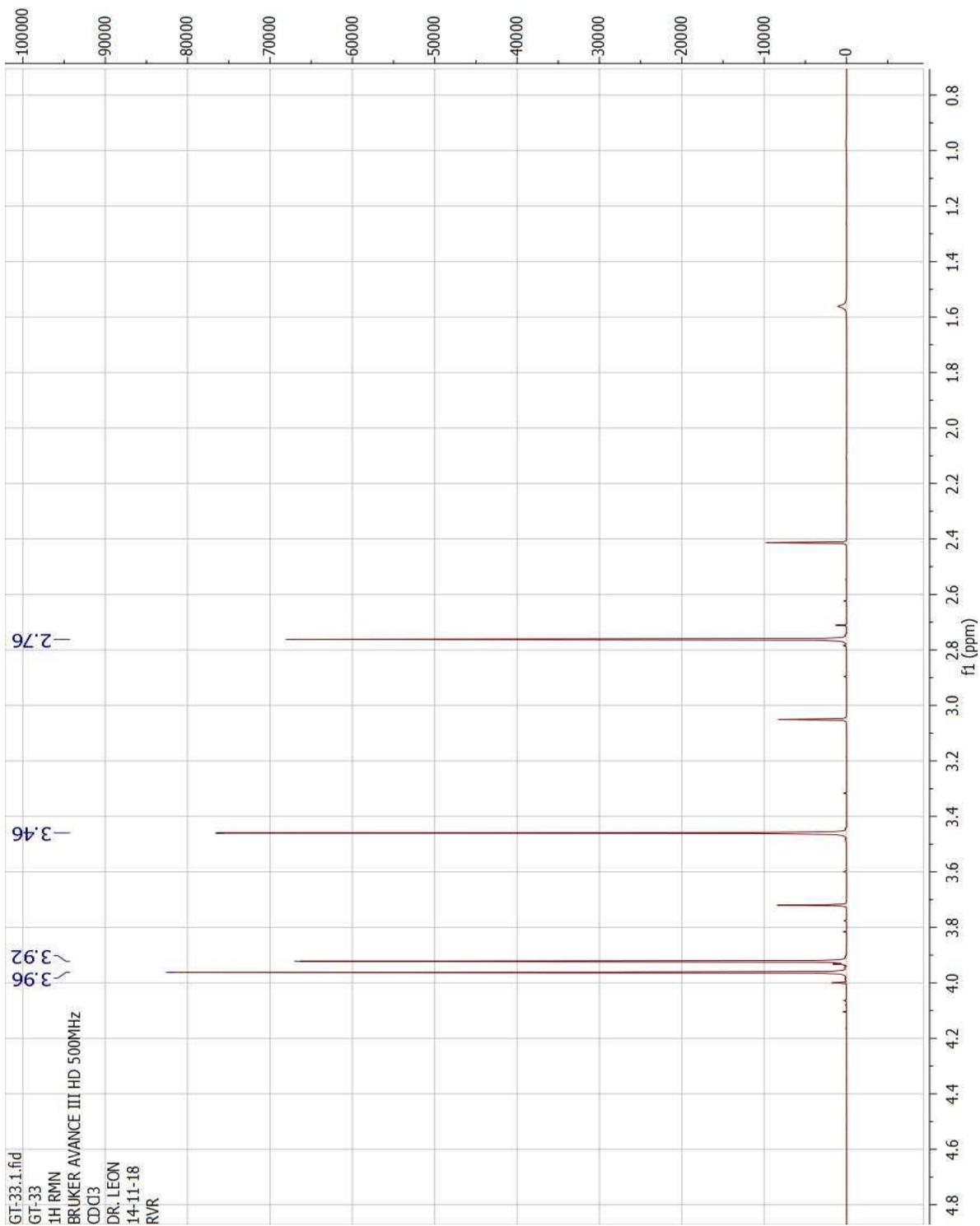
- of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012). *The lancet* Vol. 390 pp.935-945. 2017
64. Stott, J. B., Jepps, T. A., & Greenwood, I. A. (2014). KV7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. *Drug discovery today*, 19(4), 413-424. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.003>
65. Tamargo, J., & Ruilope, L. M. (2016). Investigational calcium channel blockers for the treatment of hypertension. *Expert opinion on investigational drugs*, 25(11), 1295-1309. <http://dx.doi.org/10.1080/13543784.2016.1241764>
66. The Global Burden of Diseases, injuries and risk factors (GBD). Global, regional, and national incidence, prevalence and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The lancet*, vol. 390 pp. 1-49. 16 de septiembre del 2017.
67. Ting, P. C., Lee, J. F., Kuang, R., Cao, J., Gu, D., Huang, Y., ... & Lamca, J. (2013). Discovery of oral and inhaled PDE4 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(20), 5528-5532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.056>
68. Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular research*, 114(4), 529-539. doi:10.1093/cvr/cvy023
69. Verma, B. K. (2011). *Introduction to taxonomy of angiosperms*. PHI Learning Pvt. Ltd.
70. Vieira, S. M., de Oliveira, V. H., do Carmo Valente, R., da Cruz Moreira, O., Fontes, C. F. L., & Mignaco, J. A. (2015). Chelerythrine inhibits the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and results in cell Ca²⁺ imbalance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 570, 58-65.
71. Vrublova, E., Vostalova, J., Vecera, R., Klejdus, B., Stejskal, D., Kosina, P., ... & Dvorak, Z. (2008). The toxicity and pharmacokinetics of dihydrosanguinarine in rat: a pilot study. *Food and chemical toxicology*, 46(7), 2546-2553.
72. Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P., & Chai, X. (2014). Alkaloids from the tribe Bocconieae (Papaveraceae): A chemical and biological review. *Molecules*, 19(9), 13042-13060.
73. Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological reviews*, 67(4), 821-870. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>

- 
74. Zdarilova, A., Vrublova, E., Vostalova, J., Klejdus, B., Stejskal, D., Proskova, J., ... & Cernochova, D. (2008). Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3721-3726.
75. Zhang, Z., Guo, Y., Zhang, L., Zhang, J., & Wei, X. (2012). Chelerythrine chloride from *Macleaya cordata* induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 464-471.
76. Zhang, Z., Guo, Y., Zhang, L., Zhang, J., & Wei, X. (2012). Chelerythrine chloride from *Macleaya cordata* induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 464-471.
77. Zhuang, X., & Chuang, H. (1993). The taxonomic and evolution and distribution of Papaveraceae. *Acta Botanica Yunnanica*, 15(2), 137-148.

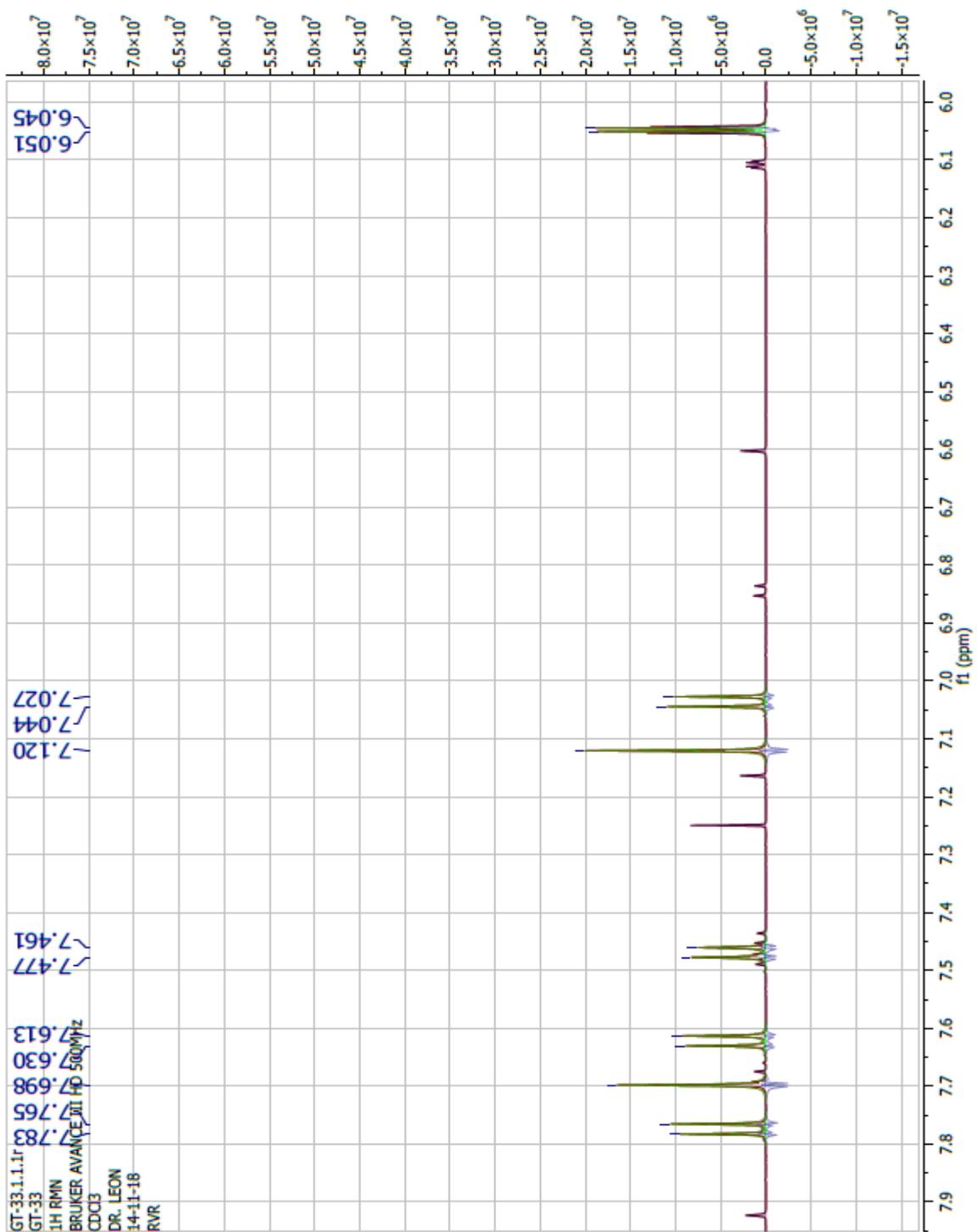
19. Anexos



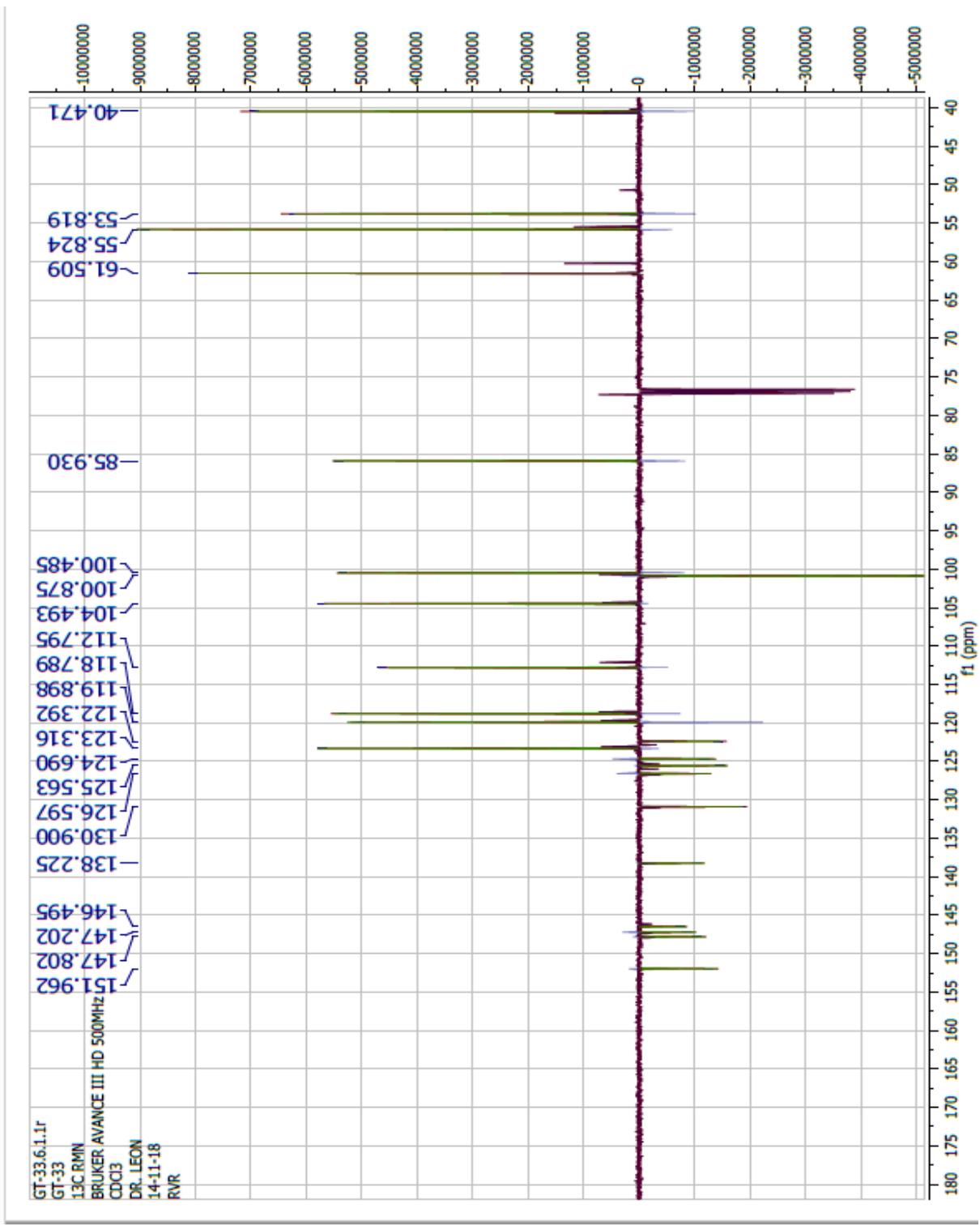
Espectro 4 RMN ¹H 500 MHz de angolina



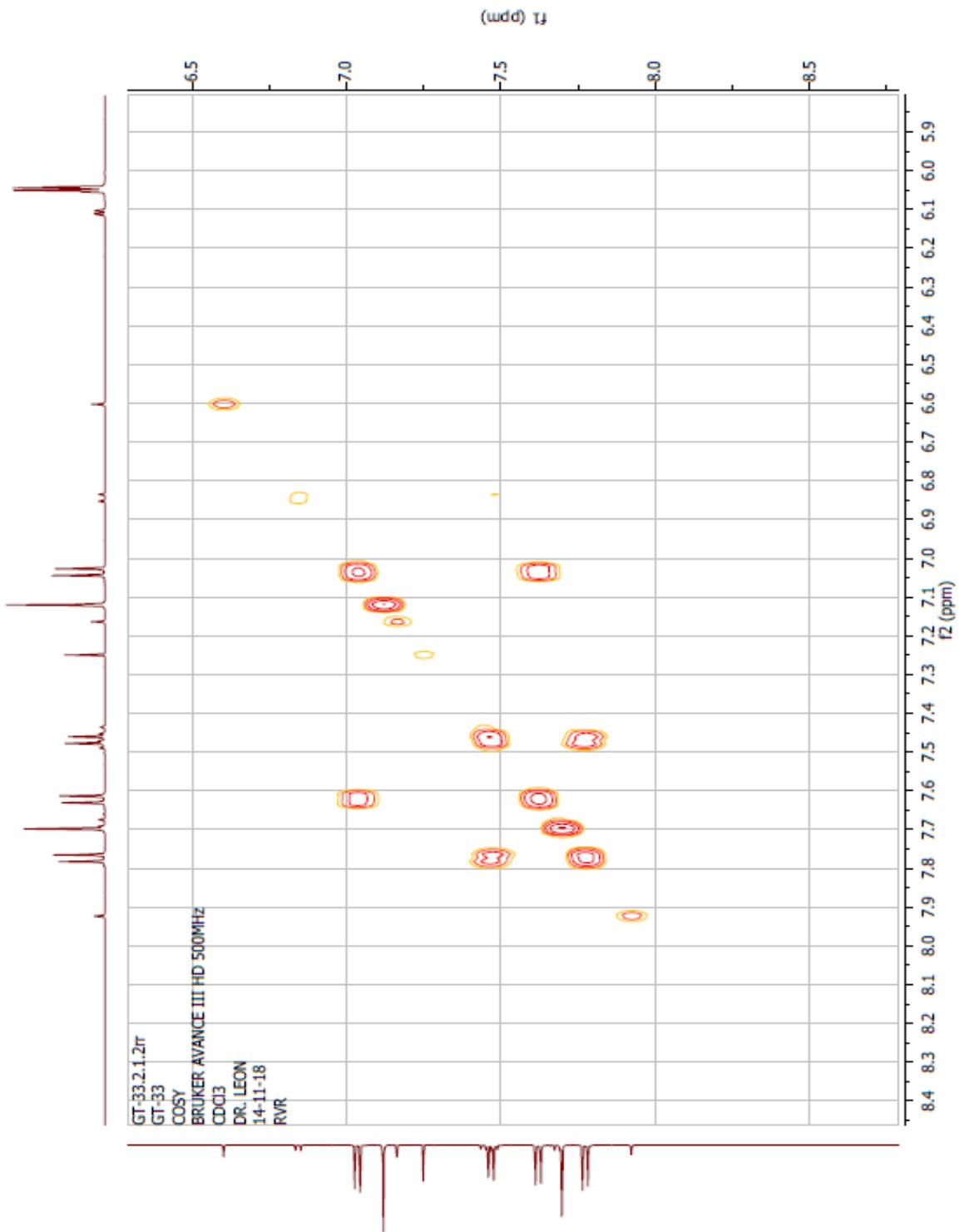
Espectro 5 RMN ¹H 500 MHz de angonina ampliación 1



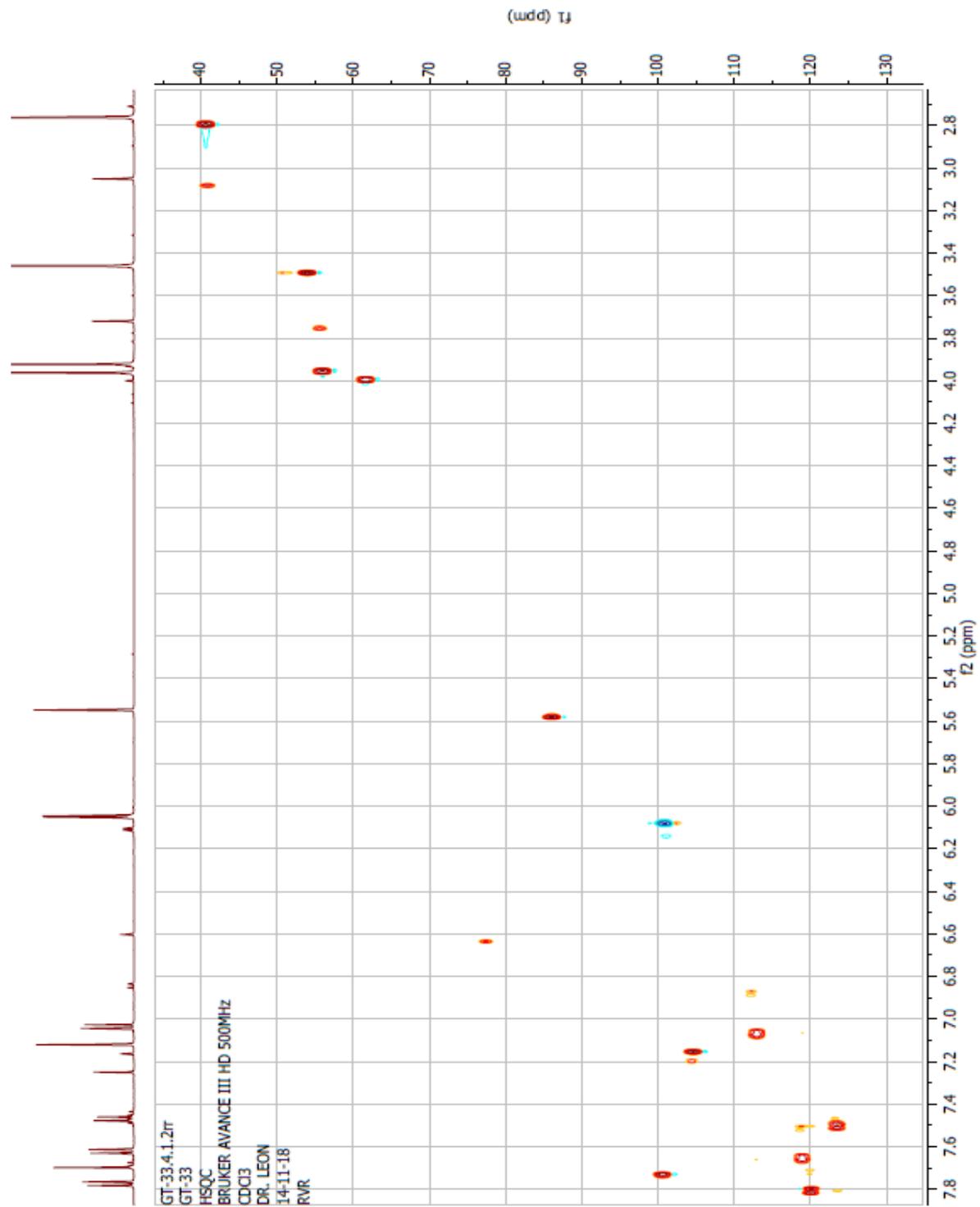
Espectro 6 RMN ¹H 500 MHz de angolina ampliación 2.



Espectro 7 RMN DEPTQ ¹³C 500 MHz de angolina

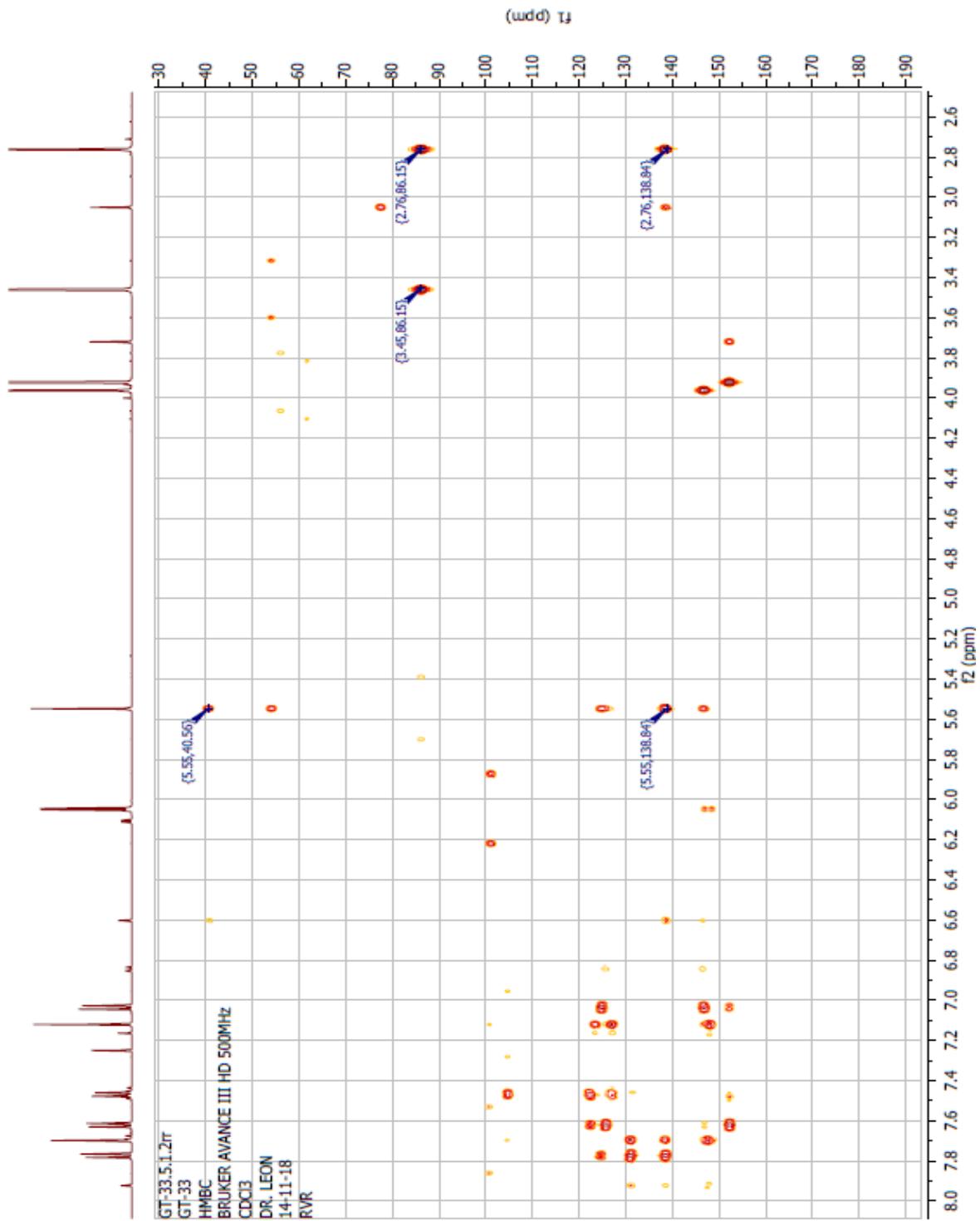


Espectro 8 RMN COSY ¹H 500 MHz de angolina

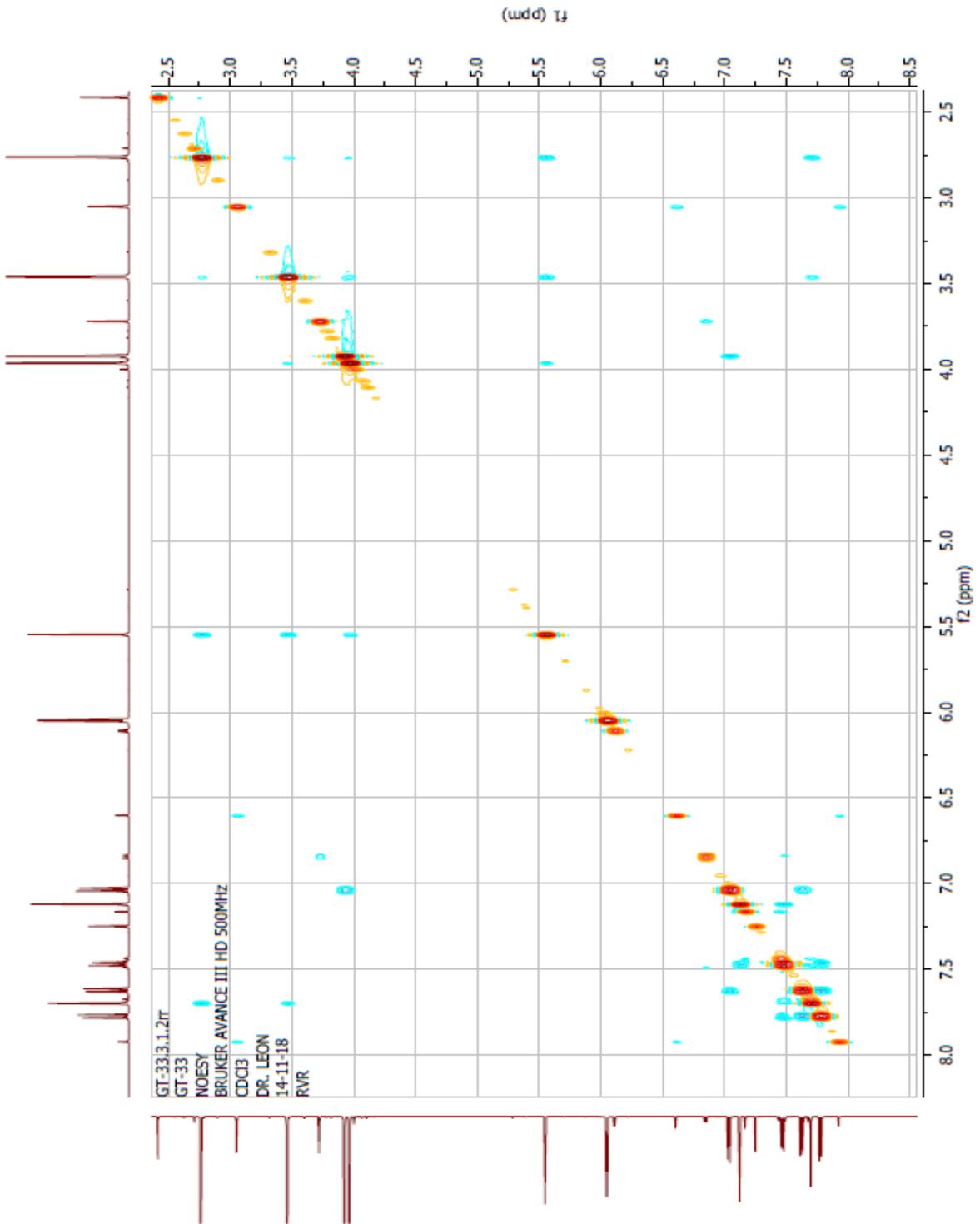


Espectro 9

RMN HSQC ^{13}C - ^1H 500 MHz de angonina



Espectro 10 RMN HMBC ^{13}C - ^1H 500 MHz de angolina



Espectro 11 RMN NOESY ^1H - ^1H 500 MHz de angolina