



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**Exploración del efecto biológico de la santamarina purificada de los extractos diclorometánicos de *Tanacetum parthenium*, en el modelo aislado de aorta de rata.**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMÍCO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**  
Israel González Soto

Director: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

Asesor: M en F. MARÍA MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto E, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Departamento de Farmacia, Laboratorio 126.

México, D.F., a 23 de Marzo de 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS:**

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto PAPIIT 203614 y del Programa de Apoyo a la investigación y posgrado a través del proyecto PAIP 5000-9143.

Agradezco sinceramente al Dr. Andrés Navarrete Castro por su paciencia, tiempo, enseñanzas y especialmente por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

Usted ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico, sin los cuales no podría tener una formación completa.

A su manera ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, me siento en deuda por lo recibido durante mi estancia en el laboratorio 126.

Agradezco en gran manera a mi mamá, por todo el esfuerzo que ha puesto en mí, para sacarme adelante y ayudarme a lograr este sueño. Tengo de ella el más grande ejemplo que es su fortaleza para tomar las piedras que pone la vida y convertirlas en castillos, siempre con una sonrisa en el alma ante los vientos de tribulación.

A mi familia por todos los grandes momentos, esos que se llevan en el alma como un aliento eterno.

A Yanis por el amor y cariño con el que me ha nutrido, de igual manera tengo de ella un gran ejemplo de fortaleza y valor humano.

Por último y no menos importantes agradezco a mis amigos Daniel y David con quienes eh compartido las mejores etapas de mi vida desde la niñez, así como mis amigos del 126, Los warriors y todos los que están en estos momentos en mi vida.

## ÍNDICE TEMÁTICO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. <i>Tanacetum parthenium</i> .....	3
3.2. Descripción de la planta ( <i>Tanacetum. parthenium</i> ).....	3
3.3. Composición química de <i>Tanacetum parthenium</i> . .....	4
3.4. santamarina.....	5
3.5. Fisiopatología de la Migraña .....	7
3.6. Músculo liso vascular .....	8
3.7. Contracción del músculo liso vascular .....	9
3.8. Relajación del músculo liso vascular .....	11
3.9. Receptores acoplados a Proteínas G .....	12
3.10. Proteína G.....	12
3.11. Receptores serotoninérgicos (5-Hidroxitriptamina (5-HT)) presentes en músculo liso vascular .....	15
3.11.1. Receptores 5-HT involucrados en la Vasoconstricción.....	15
3.11.2. Receptores 5-HT involucrados en la Vasorelajación.....	15
3.12. Receptores adrenérgicos presentes en músculo liso vascular .....	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
5. OBJETIVO .....	18
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
7. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
8.1. Material vegetal .....	20
8.2. Equipos.....	20
8.3. Purificación del compuesto santamarina.....	20
8.4. Fármacos .....	21
8.5. Animales de experimentación .....	22
8.6. Solución fisiológica Krebs-Henseleit (solución de lavado).....	22
8.7. Ensayo biológico; Modelo de Órgano Aislado .....	23
8.8. Curva dosis respuesta de santamarina .....	24
8.9. Curva dosis respuesta de fenilefrina.....	24
8.10. Curva de inhibición de la contracción.....	24
8.11. Cálculo de potencia antagonista $pA'2$ .....	25
9. RESULTADOS .....	26
9.1. Aislamiento e identificación de la santamarina.....	26

9.2. Curva concentración-respuesta con santamarina.....	27
9.3. Comprobación del efecto de taquifilaxia ocasionada por santamarina usando un agonista de los receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos.....	28
9.4. Inhibición de la contracción de fenilefrina inducida por santamarina.....	30
9.5. Calculo del potencial antagonista $pA'_2$ .....	31
10. Discusión de resultados .....	32
11. CONCLUSIONES .....	34
12. PERSPECTIVAS .....	34
13. BIBLIOGRAFÍA .....	35
ANEXOS .....	41

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cudro1.</b> Relajación mediada por receptores acoplados a Proteína G en músculo liso.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Contracción mediada por Receptores acoplados a Proteína G en músculo liso.....	14
<b>Cuadro 3.</b> Formulación para preparar 4 L de solución fisiológica Krebs (solución de lavado).....	22
<b>Cuadro 4.</b> Máximo Porcentaje de contracción inducido por fenilefrina en presencia de santamarina.....	31
<b>Cuadro 5.</b> Comparación del $pA'_2$ y $CE_{50}$ de la santamarina, reynosina y el extracto diclorometánico.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagen de la planta Santa María.....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura de la santamarina.....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de contracción del músculo liso vascular.....	10
<b>Figura 4.</b> Adrenoreceptores y sus efectos fisiológicos.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema del montaje del tejido en el Polígrafo Biopack System MP100-AC.....	23
<b>Figura 6.</b> Estructura de la santamarina.....	26
<b>Figura 7.</b> Curva del efecto contráctil de la santamarina.....	27
<b>Figura 8.</b> Trazo del experimento para comprobar el efecto de la fenilefrina.....	28
<b>Figura 9.</b> Efecto de la contracción inducida por la fenilefrina.....	29
<b>Figura 10.</b> Efecto inhibitorio de la santamarina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina.....	30
<b>Figura 11.</b> Gráfica de Schild para la obtención del $pA'_2$ de la santamarina.....	31

## 1.RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la extracción, purificación e identificación del compuesto santamarina, una lactona sesquiterpénica presente en los extractos diclorometánicos de la planta *Tanacetum parthenium*, con el fin de explorar su efecto biológico en el modelo de órgano aislado de aorta de rata, así como sentar las bases para determinar el mecanismo por el cual éste metabolito actúa y poder relacionar éste efecto con el efecto antimigrañoso de *Tanacetum parthenium*. La santamarina presentó un efecto contráctil del 70% relativo al efecto contráctil inducido por fenilefrina en la aorta aislada de rata. También inhibió de forma no competitiva las contracciones inducidas con fenilefrina, con un potencial antagonista  $pA'_{2} = -1.46 \pm 0.105$ , sugiriendo un efecto agonista parcial con capacidad de inhibir las contracciones de un agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. El aporte de éste trabajo establece bases útiles para comenzar a elucidar el posible mecanismo por el cual la santamarina pueda estar actuando en el tejido vascular y su relación con la patología de la migraña atribuida al *Tanacetum parthenium*.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se han utilizado durante miles de años y han demostrado ser de vital importancia en el tratamiento de diversas enfermedades (1). El uso de terapias con plantas medicinales está en aumento en todo el mundo. La evidencia recolectada, que sustenta la eficacia de varias alternativas médicas en los desórdenes como dolor de cabeza, cada vez son mayores, dando una amplia variedad de alternativas en el tratamiento de migraña mediante el uso de productos naturales. Los constituyentes de *Tanacetum parthenium* son de particular importancia ya que se les atribuye actividad antimigraña (2). Esta planta se puede encontrar a la venta como hojas secas o frescas, las cuales son usadas como un remedio herbolario para el tratamiento de la migraña, artritis (3), mareo y fiebre (1). Los estudios fitoquímicos de la planta han sido parciales y los principales mecanismos por los cuales ejerce sus efectos farmacológicos, aún no se conocen del todo (1). Dentro de esta planta se han encontrado una amplia variedad de compuestos, los cuales son considerados como responsables de la actividad farmacológica. Uno de éstos compuestos, la santamarina (4), es una lactona sesquiterpénica, a la cual se le atribuyen propiedades farmacológicas de interés como lo es la inhibición de la liberación de serotonina, que es vaso activa en la migraña (5) (6), por lo que el estudio de éste compuesto es de suma importancia para aumentar el conocimiento fitoquímico y farmacológico de la planta así como tener evidencias científicas que respalden sus propiedades medicinales. Por lo cual en este trabajo se exploró la actividad biológica de la santamarina en el tejido vascular usando el modelo de órgano aislado de aorta de rata y de esta manera poder relacionar su efecto con la actividad antimigraña, atribuida a *Tanacetum parthenium*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. *Tanacetum parthenium*

Las plantas medicinales se han utilizado durante miles de años y han demostrado ser de vital importancia en el tratamiento de diversas enfermedades (1).

En la última década, las investigaciones se han centrado en buscar estrategias para aislar y purificar los principios activos de origen vegetal, ya que se considera que poseen menos efectos secundarios y adversos (1). En México el uso de las plantas medicinales es extenso. Una de las plantas medicinales mexicanas de amplio uso para diversos padecimientos es la Santa María (*Tanacetum parthenium*) (7).

#### 3.2. Descripción de la planta (*Tanacetum. parthenium*)

*Tanacetum parthenium* también conocida en México como altamiza, hierba de Santa María, hierba santa, manzanilla grande, manzanilla romana, mastranzo, matlalí (7) es una hierba perenne común, mide entre 14-15 cm de altura, tiene un fuerte olor, es de color amarillo verdoso (**Figura 1**). Se encuentra ampliamente distribuida en setos y lugares de residuos. Es muy común en Europa y ha sido cultivada como planta ornamental y medicinal (8). Es miembro de la familia de las *Asteráceas* (9).



**Figura 1.** Imagen de la planta Santa María.



En el mercado se pueden encontrar a la venta tanto las hojas secas como frescas de la planta, las cuales son usadas como un remedio herbolario para el tratamiento de la migraña, artritis (3), mareo, fiebre, desordenes menstruales, dolor de estómago, dolor de muelas, picadura de insectos y tinitus o acúfenos (1).

### 3.3. Composición química de *Tanacetum parthenium*.

El uso de terapias herbales esta en aumento a lo largo de todo el mundo. La evidencia recolectada, que sustenta la eficacia de varias alternativas médicas en los desórdenes como dolor de cabeza, cada vez son mayores, dando una amplia variedad de alternativas en el tratamiento de migraña usando productos herbales (2).

La fitoquímica de la planta no ha sido completamente estudiada y los principales mecanismos por los cuales ejerce sus efectos farmacológicos, aún no se conocen del todo (1), sin embargo dentro de esta planta se han encontrado una amplia variedad de compuestos, que en estudios clínicos se les ha considerado como responsables de su actividad antimigraña entre otras ya mencionadas (8). Las sustancias más importantes aisladas de *Tanacetum. parthenium* a las cuales se les ha atribuido actividad biológica se enuncian a continuación:

- **Lactonas sesquiterpénicas:** Son el componente activo de muchas plantas medicinales de la familia *Asteraceae* de entre ellas se destaca a la partenólida la cual en la especie *Tanacetum parthenium* se ha utilizado como compuesto marcador en la identificación química (8), otras de éstas lactonas son:
  - ✓ **santamarina (4)**
  - ✓ **3β-hidroxipartenólida (8)(4)**
  - ✓ **canina (8)(4)**
  - ✓ **artecanina (8)(4)**
  - ✓ **α-metilen butirolactona (8)(4)**
  - ✓ **reynosina (4)**

- **Flavonoides**

- ✓ apigenina

- ✓ luteolina

- **Flavonoides Lipofílicos**

- ✓ 3,6-dimetoxiquercetagenina

- ✓ 3,6-dimetoxi-6-hidroxicamferol

- ✓ 3,6,4'-trimetoxi-6-hidroxicamferol (santina) (10)

Como se mencionó anteriormente, la partenolida es un constituyente predominante de *Tanacetum parthenium*, es una lactona sesquiterpénica encontrada en abundancia en flores, hojas, y en mínima cantidad en las raíces, el contenido de ésta lactona en la planta depende de múltiples factores ambientales como; época del año, tipo de clima y suelo. La partenolida presenta una variada actividad biológica la cual ha sido ampliamente estudiada en modelos *in vivo* e *in vitro* (11). Tiene como estructura base un germacranólido y la principal actividad biológica que se le ha atribuido es el de profiláctico en el tratamiento de migraña (12).

La partenolida puede interactuar con los sitios nucleofílicos de las proteínas gracias a la presencia de un anillo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona y un grupo peróxido presentes en su estructura (13).

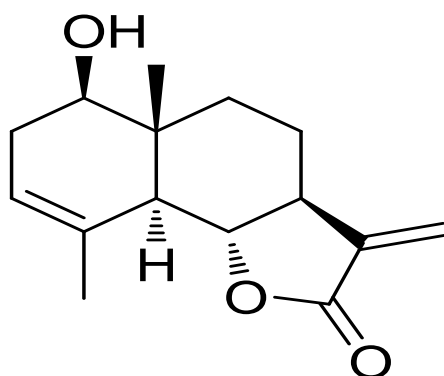
### 3.4. santamarina

Las asteráceas son una familia que contiene varios tipos de lactonas sesquiterpénicas provenientes de los grupos; germacranólido, eudesmanólido y guaianólido. La actividad biológica de estos compuestos se ha atribuido a la presencia en su estructura de  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona, este metileno nucleofílico, puede reaccionar con tioles dentro del organismo tales como residuos de cisteína en las proteínas (14). Este anillo es agonista del receptor de potencial transitorio de canal catiónico (TRPA1 por sus siglas en inglés) que por una modificación covalente de los residuos de cisteína causa su activación. La

activación del canal TRPA1 genera la liberación de neuropéptidos como sustancia P, neuroquinina y calcitonina los cuales están involucrados en el mecanismo de generación de la migraña (13).

Todos los estudios clínicos realizados hasta la fecha, han usado preparaciones de hojas de *Tanacetum parthenium* con algún tipo de lactona sesquiterpénica como, partenolida y otras como 3 $\beta$ -hidroxipartenólida, canina ( $\alpha$ ), artecanina ( $\beta$ ) en bajas concentraciones. Cabe resaltar que en la subespecie mexicana, las lactonas santamarina y reynosina son las más frecuentes y se encuentran en abundancia (15).

La santamarina tiene una estructura base de un eudesmanólido, presenta citotoxicidad y actividad antibacteriana (16). Su estructura química se presenta en la **figura 2** (17);



**Figura 2. Estructura de la santamarina (17).**

Cabe resaltar que, las lactonas sesquiterpénicas, junto con otros compuestos como flavonoides y aceites volátiles, son los componentes más importantes de *Tanacetum parthenium*, ya que es a ellos a quienes se les atribuye la actividad antimigraña, la cual es desencadenada a través de una amplia variedad de rutas fisiológicas (2).

Se sabe que otras lactonas sesquiterpénicas, incluyendo a la santamarina, actúan inhibiendo la liberación de serotonina (5) (6) e inhibiendo la nocicepción y la vasodilatación neurogénica, en el sistema trigémino vascular por la vía del canal TRPA1, vías involucradas en el trastorno de la migraña (2).

### 3.5. Fisiopatología de la Migraña

La migraña es uno de los desórdenes neurológicos más frecuentes, afecta a más del 15% de la población. La IHS (International Headache Society, por sus siglas en inglés) define a la migraña como un desorden caracterizado por ataques intermitentes de dolor de cabeza, combinado con náuseas, fotofobia y/o fonofobia. Las formas más comunes de migraña son; con o sin aura, las cuales no han sido vinculadas a genes específicos (18).

La mayoría de los ataques comienzan en el cerebro, como sugieren los síntomas premonitorios (dificultad para hablar o leer, aumento de la sensibilidad emocional e hipersensibilidad sensorial) (19), fatiga, irritabilidad, falta de concentración, cambio de humor, bostezos, torticollis y náusea. Otros síntomas que han sido reportados incluyen cambios de apetito, ansiedad por comer, hinchazón, piloerección y cambios en la expresión facial (20).

En muchos pacientes los ataques de migraña son altamente predecibles, debido a que los síntomas aparecen 12 horas antes. Algunos de los detonantes de la migraña típica son; estrés, privación de sueño, dormir en exceso, hambre y prolongada estimulación sensorial.

Se tiene evidencia indirecta a través del cuerpo, que el desarrollo del dolor de cabeza por migraña depende de la activación y sensibilización de sensores aferentes del trigémino que inervan tejidos craneales, particularmente meninges y grandes vasos sanguíneos (19).

El cerebro es insensible al dolor, por el contrario, la duramadre, los segmentos proximales de los grandes vasos intracraneales (carótida y sus ramas, vertebral y basilar), la rama oftálmica del nervio trigémino, glossofaríngeo, vago y las raíces cervicales superiores, son las únicas estructuras intracraneanas sensibles al dolor. La cefalea resulta de la activación de los nociceptores meníngeos, de los vasos sanguíneos, y de un cambio en la modulación central del dolor. Durante un ataque de migraña ocurre un proceso

inflamatorio (inflamación neurogénica). La activación del trigémino produce la liberación de sustancia P, un péptido relacionado con el gen de la calcitonina, neurocinina A y glutamato, lo cual inflama las terminaciones nerviosas meníngeas. La liberación de estas sustancias, activa los mastocitos, sensibiliza las terminaciones nerviosas, aumenta la permeabilidad capilar con extravasación de plasma alrededor de los vasos sanguíneos duros y hay activación plaquetaria. Se considera que la inflamación neurogénica es un paso importante en la generación de la migraña (21).

Actualmente se han reconocido varios receptores serotoninérgicos (5-HT), de los cuales los receptores de las clases 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>, interactúan con los medicamentos para el tratamiento de migraña. Especialmente el subtipo 5-HT<sub>2A</sub> que se encuentra distribuido en varios tejidos, incluyendo sistema vascular, corteza cerebral, sistema límbico y ganglio basal (22).

### **3.6. Músculo liso vascular**

El músculo liso se puede localizar en los sistemas; vascular, respiratorio, urinario, reproductivo, gastrointestinal, y ocular (23).

La contracción en el músculo liso vascular es regulada principalmente por la activación de receptores, la despolarización de la membrana también puede desencadenar una contracción, la cual ocurre una vez que la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) fosforila la cadena ligera de miosina (MLC), permitiendo el entrecruzamiento de la miosina y los filamentos de actina (24).

La miosina es la principal proteína presente en los filamentos gruesos del músculo liso y está compuesta de dos subunidades de cadena pesada (aproximadamente 200 kDa) y dos tipos de subunidades de cadena ligera (20 y 17 kDa respectivamente) (25). La fosforilación de ésta cadena regula la contracción del músculo liso, la cual se da en respuesta a un estímulo eléctrico de despolarización o en respuesta a un agonista (26).

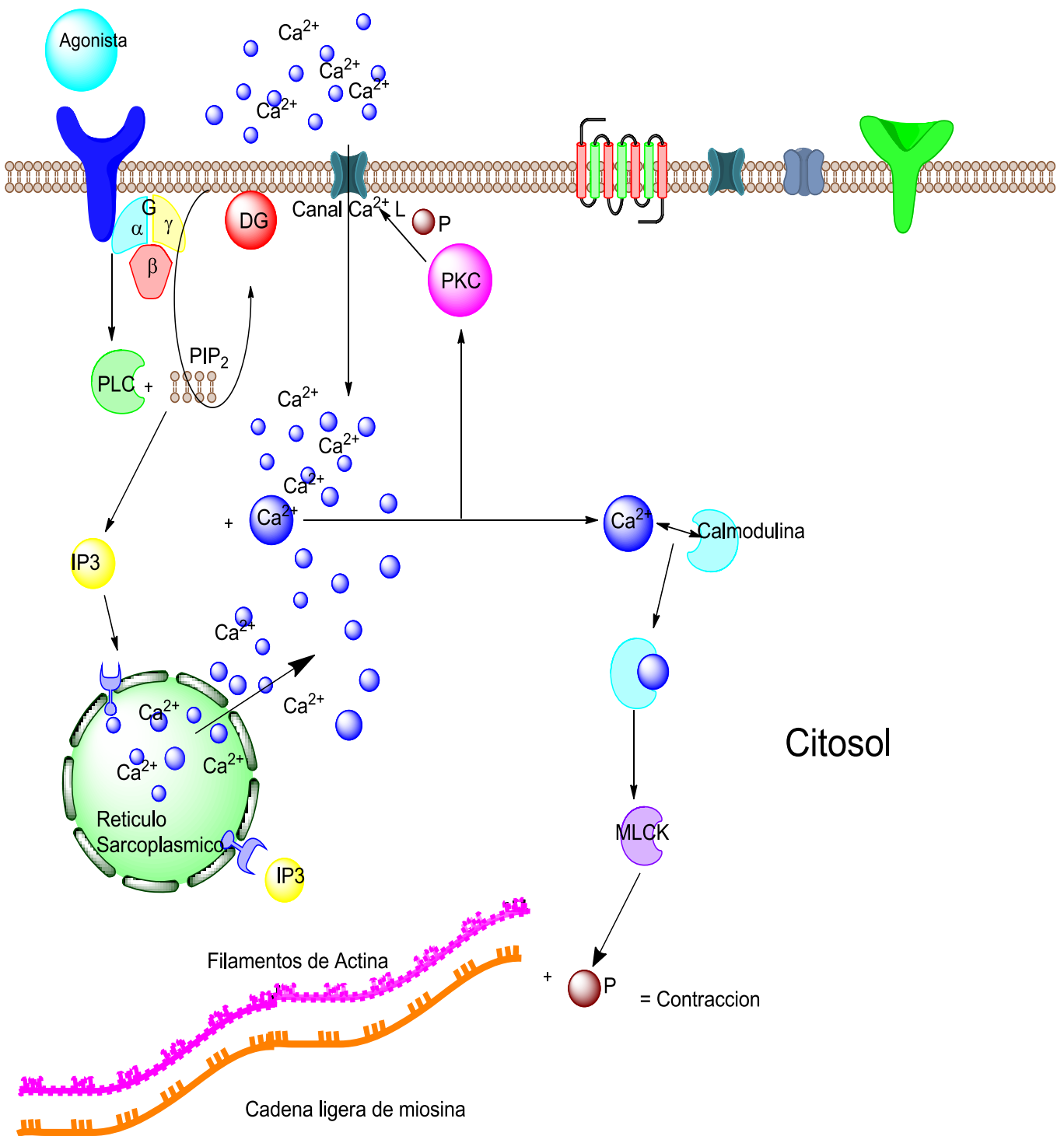
### 3.7. Contracción del músculo liso vascular

La contracción del músculo liso vascular inicia por un cambio de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los filamentos gruesos. En respuesta a este estímulo específico se incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, este  $\text{Ca}^{2+}$  se combina con calmodulina, formando un complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina el cual activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina que fosforila a la cadena ligera de miosina permitiendo la interacción de miosina y los filamentos de actina (24).

El calcio ingresa al citosol por 2 vías principales: Primero el calcio es liberado de los depósitos del retículo sarcoplásmico y segundo el calcio entra desde el espacio extracelular a través de canales de calcio. Los agonistas (norepinefrina, angiotensina II, endotelina, etc.) se unen a receptores específicos y se acoplan a la proteína G heterotrimétrica estimulando la actividad de la fosfolipasa C. Esta enzima cataliza la formación de 2 segundos mensajeros, inositoltrifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DG) desde la membrana lipídica a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. La unión de  $\text{IP}_3$  a los receptores en el retículo sarcoplásmico provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. El diacilglicerol junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  activa la proteincinasa C (PKC). La Proteincinasa C fosforila canales de calcio tipo L y esto promueve la contracción (24). En la **figura 3** se representa el proceso de contracción del músculo liso vascular.

Existen 3 subunidades de fosfatasa de cadena ligera de miosina, cuando la subunidad de unión de la miosina está fosforilada, inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, permitiendo a la cadena ligera de miosina permanecer fosforilada, promoviendo así la contracción (24).

# Espacio Extracelular



**Figura 3. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular.** IP<sub>3</sub>= inositoltrifosfato, PLC= Fosfolipasa C, MKLC= cinasa de la cadena ligera de miosina, PIP<sub>2</sub>= fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, DG= diacilglicerol, G<sub>βγ</sub>= subunidades de la proteína G, Ca<sup>2+</sup>= iones de Calcio, PKC= cinasa C de proteínas, P= fósforo.

### 3.8. Relajación del músculo liso vascular

La cinasa de la cadena ligera de miosina es dependiente de calcio, la enzima fosfatasa de la cadena ligera de miosina, desfosforila a la cadena ligera de miosina promoviendo la relajación del músculo liso (24).

Dicha relajación esta mediada por un incremento en la concentración de nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc. Múltiples mecanismos han sido descritos para AMPc que induce la relajación en el músculo liso (27).

Otros mediadores de este proceso son la proteincinasa A (PKA) y la proteincinasa G (PKG), las cuales son activadas por el AMPc, estas inhiben la contracción que es mediada por los receptores acoplados a proteína G por varios mecanismos como la vía  $G_q/G_{11}$  mediada por calcio, vías independientes de calcio, y Rho/Rho-cinasa. También pueden inhibir los receptores acoplados a proteína G mediados por la formación de  $IP_3$  (27).

PKA reduce el flujo de calcio al activar los canales de potasio, resultando una hiperpolarización de las células de músculo liso (27).

PKG puede fosforilar ciertas isoformas de receptores de  $IP_3$ , provocando una inhibición de los receptores de  $IP_3$  mediados por el calcio liberado de reservas intracelulares (27).

PKA y PKG interfieren con la vía Rho/Rho-cinasa y con la subsecuente inhibición de la actividad de la miosin-fosfatasa incrementando la desfosforilación de la cadena ligera de miosina y con ello la relajación de las células de músculo liso (27). Estas proteínas son capaces de fosforilar e inactivar Rho-A evitando la activación de Rho-cinasa (27). Cabe destacar que ésta enzima, es miembro de la familia RAS de GTP-asas monoméricas que son responsables de la sensibilización de calcio inducida por la estimulación de agonistas



y se cree que actúan sobre la fosfatasa de cadena ligera de miosina, inhibiendo su actividad y promoviendo el estado fosforilado de la cadena ligera de miosina (28).

### 3.9. Receptores acoplados a Proteínas G

Los receptores acoplados a proteína G, llevan a cabo la transducción de señales causadas por hormonas, neurotransmisores, fotones y otros estímulos, los cuales son el medio por el cual la célula lleva a cabo la comunicación entre su medio externo y su medio interno. El papel principal de estos receptores es acoplarse a un agonista, para llevar a cabo la activación de un sitio específico de la proteína G heterotrimétrica, que continuará con la respuesta del estímulo causado por el agonista. Los receptores acoplados a proteína G son una gran familia de proteínas de membrana y son mediadores de diversas respuestas celulares, así también forman parte de procesos como la visión, olfato y el tacto (29). Todos los receptores acoplados a proteína G tienen como base la misma estructura que consta de 7 dominios transmembranales, tres asas extracelulares, tres asas intracelulares, un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal intracelular (30).

### 3.10. Proteína G

La interacción entre los receptores acoplados a proteínas G, juega un papel importante en la transducción de señales. Las proteínas G están compuestas de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , las cuales se dividen en 4 subtipos ( $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  y  $G_{12/13}$ ) basado en la estructura y función de la subunidad  $\alpha$ . La proteína  $G_s$  activa la adenilato-ciclasa,  $G_{i/o}$  inhibe la adenilato-ciclasa y regula los canales iónicos,  $G_{q/11}$  activa la fosfolipasa C y  $G_{12/13}$  activa el intercambio  $Na^+/H^+$ . La asociación entre las proteínas G y los receptores acoplados a proteínas G, desencadenan el intercambio de guanosina difosfato (GDP) en la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G, por guanosina trifosfato (GTP) lo que genera la disociación de las proteínas G en  $\alpha$ -GTP y los complejos  $\beta$ - $\gamma$ . La disociación de la subunidad  $\alpha$  puede

activar o inhibir muchas proteínas efectoras como son; adenilato-ciclasa, tirosincinasas, fosfodiesterasas, canales iónicos entre otras, lo cual genera una amplia variedad de funciones celulares y respuestas fisiológicas que dependen de la especificidad biológica de las subunidades disociadas (31).

En los cuadros 1 y 2 podemos observar una lista de tejidos donde se localiza el músculo liso, así como la localización de los diferentes tipos de receptores acoplados a proteína G, los ligandos a los que son específicos y que tipo de proteína G está involucrada en ese receptor, siendo más importantes para este trabajo los receptores y ligandos localizados en el sistema vascular (27).

**Cudro1. Relajación mediada por receptores acoplados a Proteína G en músculo liso.** Receptores y ligandos localizados en el sistema vascular involucrados en la relajación (27).

Ligando	Receptores	Acoplamiento a proteína G	Localización					
			Vasos sanguíneos	Sistema respiratorio	Útero	Tracto gastrointestinal	Urogenital	Ciliar
Adenosina	A <sub>1</sub> ,A <sub>2B</sub>	G <sub>S</sub>	X	X		X		
Dopamina	D <sub>1/5</sub>	G <sub>S</sub>	X				X	
Epinefrina, Norepinefrina	.β <sub>1</sub>	G <sub>S</sub>				X		
	.β <sub>2</sub>	G <sub>S</sub>	X	X	X	X		
Prostaglandina D <sub>2</sub>	DP <sub>1</sub>	G <sub>S</sub>	X	X	X			
Prostaglandina E <sub>2</sub>	EP <sub>2</sub>	G <sub>S</sub>	X	X	X			
	EP <sub>4</sub>	G <sub>S</sub>	X					
Prostaciclina	IP	G <sub>S</sub>	X	X	X			
Relaxina	RXFP	G <sub>S</sub>	X		X			
Vasopresina	V <sub>2</sub>	G <sub>S</sub>	X					
VIP, PACAP	VPAC <sub>2</sub>	G <sub>S</sub>		X	X	X		

**Cuadro 2. Contracción mediada por receptores acoplados a proteína G en músculo liso.**  
 Receptores y ligandos localizados en el sistema vascular involucrados en la contracción (27).

Ligando	Receptores	Acoplamiento a proteína G	Vasos sanguíneos					Sistema respiratorio		Útero		Tracto gastrointestinal		Urogenital		Ciliar	
Acetilcolina	M <sub>2</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X				X		X			X	
	M <sub>3</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>						X			X		X			X	
Adenosina	A <sub>1</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X										
Angiotensina	AT <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X														
Apelina	APJ	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X								X						
ATP/UTP	P2Y <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X														
	P2Y <sub>2</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X				X				X						
	P2Y <sub>6</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X				X										
Bradiquinina	B <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X														
	B <sub>2</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X										
Colecistocina	CCK <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>									X						
Endotelina	ET <sub>A</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X				X		X		X						
	ET <sub>B</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>					X				X						
Epinefrina, norepinefrina	.α <sub>1A</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X											X			
	.α <sub>1B</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X														
	.α <sub>1D</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X											X			
	.α <sub>2A</sub> y α <sub>2C</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X						X		X						
	.α <sub>2B</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X						X								
Histamina	H <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X				X				X			X			
Leucotrieno B4	BLT <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X														
Leucotrieno C4/D4	CysLT <sub>2</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>						X									
LPA	LPA <sub>1</sub> , LPA <sub>2</sub> , LPA <sub>3</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X				X		X		X						
Melatonina	MT <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X														
Motilina	MTLR	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>									X						
Neuroquinina A	NK <sub>2</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X				X						
Neuroquinina B	NK <sub>3</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>									X						
Neuromedina U	NMU <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X								X			X			
Neuropeptido S	NPS	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	.?				X										
Neuropeptido Y	Y <sub>1</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X								X			X			
Neurotensina	NTS <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>									X						
Oxitocina	OT	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>							X								
Prostaglandina E2	EP <sub>1</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X								X					X	
	EP <sub>3</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X		X		X						
Prostaglandina F2α	FP	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X						X							X	
S1P	S1P <sub>2</sub> , S1P <sub>3</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X				X		X		X						
Serotonina	5-HT <sub>1A/1B</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X										
	5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>							X								
	5-HT <sub>2A/2B</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X				X				X						
Somatostatina	SST <sub>2</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	X				X				X		X		X		
Tromboxano A2	TP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X				X		X								
Trombina	PAR1,2,3	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>12</sub> /G <sub>13</sub>	X				X		X		X		X				
Urotensina II	UT	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X														
Vasopresina	V <sub>1a</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	X						X								

### **3.11. Receptores serotoninérgicos (5-Hidroxitriptamina (5-HT)) presentes en músculo liso vascular**

Existen 14 diferentes receptores de 5-HT los cuales están divididos en 7 grupos (5-HT<sub>1</sub> hasta 5-HT<sub>7</sub>) basado en su estructura molecular, propiedades de transducción de señales, y sus propiedades farmacológicas (32). Todas las familias de receptores son receptores heptahélicos acoplados a proteínas G (G<sub>s</sub>, G<sub>o</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q/11</sub>), a excepción de la familia de receptores 5-HT<sub>3</sub> (familia de canales iónicos) (33).

#### **3.11.1. Receptores 5-HT involucrados en la Vasoconstricción**

Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> han sido localizados en células de músculo liso de aorta y arteria pulmonar, arteria temporal y occipital (32), la familia de receptores 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> también se encuentran activos en los tejidos vasculares (15) (33). La vasoconstricción es predominantemente mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (34), usando las vías de regulación de protein-quinasa C, Rho-quinasa y cinasas extracelulares (35). El receptor 5-HT<sub>1B/1D</sub> puede mediar también la vasoconstricción como es el caso de los triptanes, los cuales son agonistas de este receptor usados en el tratamiento de migraña (34).

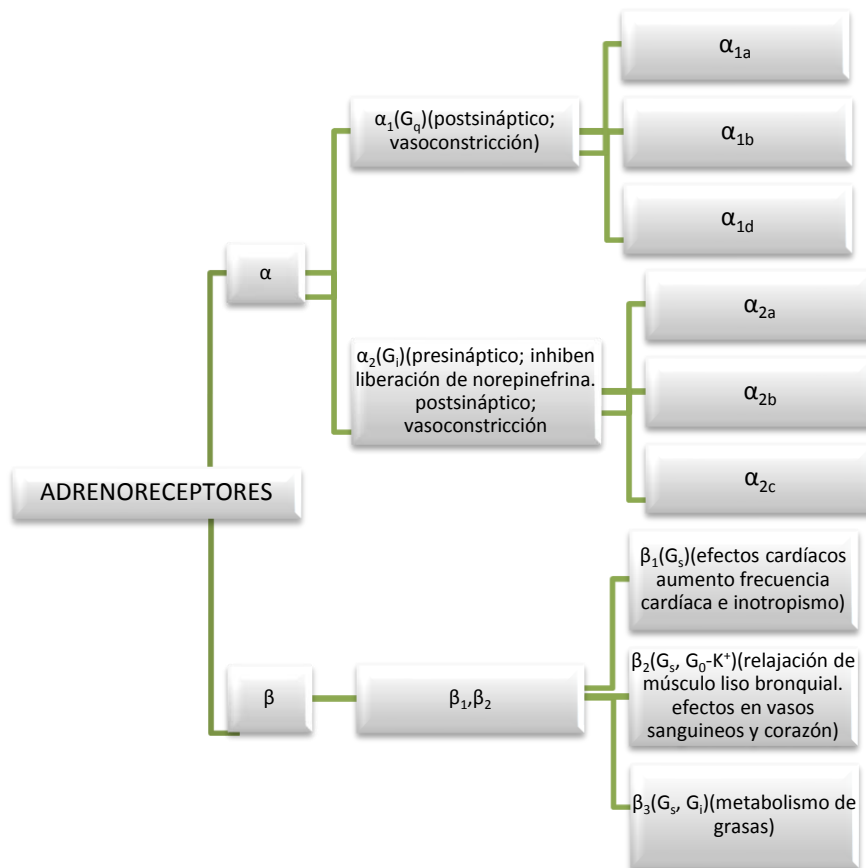
#### **3.11.2. Receptores 5-HT involucrados en la Vasorelajación.**

Basado en la localización celular de mRNA para los receptores 5-HT, se sugiere que los receptores endoteliales, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y los receptores del músculo liso 5-HT<sub>7</sub>, pueden estar involucrados en la relajación vascular (32) (33).

### **3.12. Receptores adrenérgicos presentes en músculo liso vascular**

Los receptores adrenérgicos, pertenecen al grupo de amino-receptores de la familia de la rodopsina y están acoplados a proteína G. Estos receptores, están presentes en casi todos los tejidos periféricos y en muchas poblaciones neuronales, forman parte de funciones fisiológicas como son, regulación cardíaca, pulmonar, presión sanguínea y una

amplia variedad de funciones del sistema nervioso central incluyendo el metabolismo (36). Hasta el día de hoy se han encontrado 9 subtipos de adrenoreceptores, que han sido agrupados según sus características estructurales y farmacológicas. Estos están agrupados en la **figura 4** donde también se muestra en general, los efectos fisiológicos de los receptores adrenérgicos y el tipo de proteína G a la que se ha reportado que están acoplados (37).



**Figura 4. Adrenoreceptores y sus efectos fisiológicos, tipo de proteína G a la que están acoplados (37).**

En las arterias mesentéricas y pulmonarias de rata los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  son mediadores de las contracciones al usar norepinefrina o fenilefrina (38), cabe destacar la importancia de este receptor ya que está involucrado en el trabajo que se realizará.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La atención primaria de salud de un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por herencia cultural o por que no existen otras opciones. En los países desarrollados, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que “natural” es sinónimo de inocuo.

Muchos productos medicinales, tradicionales o alternativos son de venta libre. En una encuesta realizada en 142 países por la OMS, 99 de ellos respondieron que la mayoría de estos productos podían adquirirse sin prescripción. En 39 países muchos remedios tradicionales se utilizan para la automedicación y son comprados o preparados por amigos o conocidos, o por el propio paciente. Esas tendencias plantean dudas acerca de la calidad de los productos utilizados, su idoneidad terapéutica en cada caso, y la falta de seguimiento médico.

La OMS considera el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo, pero a medida que aumenta el número de personas que utiliza esas medicinas, los gobiernos deben contar con instrumentos para garantizar que todos los interesados dispongan de la mejor información sobre sus beneficios y riesgos (39).

Por ésta razón las investigaciones en medicina herbolaria están encaminadas a brindar información científica sólida, así como la búsqueda de nuevos métodos y fármacos capaces de brindar un mejor desempeño ante diversas patologías.

Por ello, realizar estudios sobre la planta conocida comúnmente como Santa María (*Tanacetum parthenium*), específicamente en uno de sus componentes, conocido como santamarina, a la cual se le atribuyen propiedades farmacológicas de interés científico, es de suma importancia para aumentar el conocimiento fitoquímico y terapéutico que se le atribuye a la planta y para tener evidencia científica que respalde sus propiedades medicinales.

## 5. OBJETIVO

Explorar el mecanismo de acción relajante de la santamarina aislada de *Tanacetum parthenium*, en el modelo de órgano aislado de aorta torácica de rata.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar a la santamarina de la planta Santa María (*Tanacetum. Parthenium*).
- Identificar a la santamarina a partir de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas utilizando RMN  $^{13}\text{C}$  y RMN  $^1\text{H}$ .
- Determinar el efecto inhibitorio de santamarina sobre las contracciones inducidas por fenilefrina.

## 7. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se conoce que los extractos de diclorometano de *Tanacetum parthenium* tienen actividad relajante sobre el músculo liso vascular, por lo que se espera que la santamarina, que es uno de los componentes en este extracto, presente inhibición de las contracciones inducidas por fenilefrina como un mecanismo de relajación vascular en el modelo de órgano aislado de aorta de rata.



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Material vegetal**

El material vegetal fue adquirido en el mercado de Sonora, con el nombre de Santa María, en enero del 2012.

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

### **8.2. Equipos**

Para la realización del presente trabajo se utilizaron los siguientes equipos y programas.

- Evaporador rotatorio marca Buchi, R-100
- Polígrafo Biopack System MP100
- Programa Acknowledge 3.5.3.
- Software Graphpad Prism<sup>®</sup> version 5.00
- Software Sigma Plot 11.0

### **8.3. Purificación del compuesto santamarina**

El proceso inició con la separación de las hojas y flores de 35 kg de la planta, obteniendo un peso de 5 Kg, estas se maceraron con 32 L de diclorometano, la maceración se llevó a cabo 3 veces por periodos de 72 horas cada uno, el macerado total se concentró en un evaporador rotatorio obteniendo un extracto de 734 g. El extracto se dividió a la mitad, una de las mitades se fraccionó en una columna cromatográfica de fase normal, usando gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm), con un gradiente de polaridad Hexano/Acetato de etilo, 3:1, 1:1 y 1:3, de la cual se obtuvieron 90 fracciones, siendo las fracciones 40-90 ricas en lactonas, éstas se identificaron usando una referencia de santamarina aislada en trabajos anteriores y monitoreadas con la técnica de cromatografía en placa delgada. La identificación se hizo cualitativamente, usando como revelador sulfato cérico amoniacal donde las lactonas toman un característico color violeta. Las fracciones ricas en

santamarina, obtenidas de las dos mitades del extracto inicial se colectaron para, continuar la purificación por medio de columnas sucesivas, con las mismas características a la anteriormente descrita. La purificación continuó hasta obtener lactonas en forma de agujas de color blanco opaco.

Las fracciones purificadas de lactonas, fueron identificadas como una mezcla isomérica de santamarina y reynosina. Para separar ésta mezcla isomérica, se usó una columna cromatográfica en la cual se utilizó gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) adsorbido con una solución acuosa al 1% p/v de nitrato de plata y posteriormente activado a 120 °C por una hora. La mezcla de lactonas se eluyó con un gradiente de polaridad Hexano/Acetato de etilo, 3:1, 1:1 y 1:3, para separar a la santamarina de la otra lactona. La primer lactona en eluir de la columna es la santamarina, ésta aparece en las primeras fracciones, su localización se demostró al hacer el análisis espectroscópico de los cristales obtenidos, la segunda lactona en eluir es la reynosina, la cual aparece en las fracciones finales. La santamarina obtenida de la columna de nitrato de plata se purifica disolviéndola en diclorometano caliente y posteriormente induciendo la cristalización con un baño de hielo, los cristales se filtraron con vacío obteniendo 5.5403 g de santamarina.

#### **8.4. Fármacos**

Los fármacos utilizados para llevar a cabo los experimentos de este trabajo fueron; clorhidrato de fenilefrina, bitartrato de norepinefrina monohidratada y cloruro de carbacol estos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich®. La santamarina usada fue aislada, purificada e identificada con los espectros de RMN <sup>13</sup>C, RMN <sup>1</sup>H.

### 8.5. Animales de experimentación

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho de entre 175-200 g de peso, los cuales fueron adquiridos en Harlan, S.A. de C.V., estas se mantienen con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, a una temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C, con libre acceso a comida y agua potable antes de los experimentos. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y uso de los animales de laboratorio.

### 8.6. Solución fisiológica Krebs-Henseleit (solución de lavado)

La solución se preparó antes de cada experimento y se puso en un baño a temperatura constante de 37 °C. La formulación para preparar 4 litros de solución de lavado, consta de las sales descritas en el **cuadro 3**.

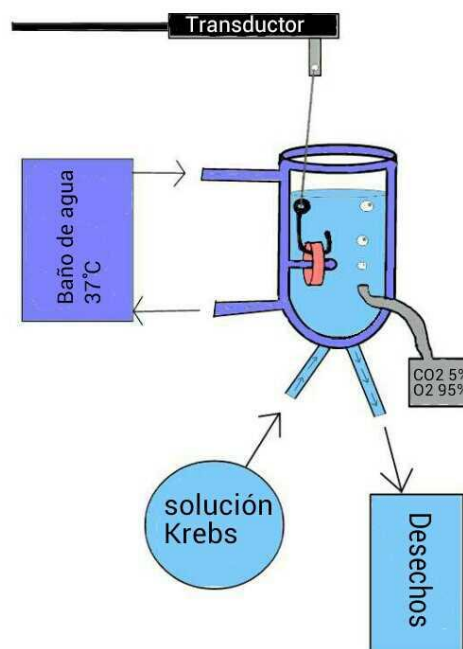
**Cuadro 3. Formulación para preparar 4 L de solución fisiológica Krebs (solución de lavado).**

Sal	Distribuidor	Peso en gramos
NaCl	J.T. Baker	27.612
KCl	J.T. Baker	1.404
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	J.T. Baker	1.4708
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	Química Meyer	1.182
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	Química Meyer	0.662
NaHCO <sub>3</sub>	J.T. Baker	8.4
D-Glucosa monohidratada	Química Meyer	7.992
EDTA	Sigma-Aldrich®	0.068

## 8.7. Ensayo biológico; Modelo de Órgano Aislado

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

Los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se disecó la primera mitad de la aorta comprendida en el área del tórax y se cortaron aproximadamente 8 anillos de 2 a 3 mm de grosor. Los anillos se colocaron con ayuda de ganchos de nicromel dentro de una cámara llena con 10 mL de solución fisiológica Krebs-Henseleit a 37 °C y aireación constante con una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> (**Figura 5**). Cada uno de los anillos de aorta se tensó a 4 g de fuerza al inicio de cada experimento.



**Figura 5. Esquema del montaje del tejido en el Polígrafo Biopack System MP100-AC.**

Antes de los experimentos, los anillos aislados en las cámaras se mantuvieron en estabilización durante 1 hora, con lavados cada 15 min. Posteriormente se estimularon en dos ocasiones con una solución de 100 µM de norepinefrina para asegurar su viabilidad, después de la primera estimulación con norepinefrina al llegar a una meseta se estimula con una solución de 100 µM de carbacol para comprobar la viabilidad del endotelio, después de cada estimulación se realizó un lavado.

El tejido se dejó reposar durante una hora con lavados cada 15 minutos, al finalizar el tiempo de estabilización se comenzó con los experimentos pertinentes.

#### **8.8. Curva dosis respuesta de santamarina**

Se realizó una curva con concentraciones acumulativas usando santamarina a las concentraciones de 0.1 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, 3.75 µg/mL, 7.5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL y 60 µg/mL, comenzando con la concentración más baja del fármaco y aplicando la concentración sucesiva al observar en el registro una contracción estable del tejido. Se utilizó un control, el cual consta de agua destilada y trazas de Tween 80.

#### **8.9. Curva dosis respuesta de fenilefrina**

Se realizó una curva de contracción utilizando concentraciones acumulativas de fenilefrina a las concentraciones de  $1 \times 10^{-10}$  M,  $3 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $3 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M y  $3 \times 10^{-5}$  M, en cada uno de los canales, comenzando con la concentración más baja del fármaco y aplicando la concentración sucesiva al observar en el registro una contracción estable del tejido, ésta curva se usó como control del 100 % de contracción para la curva de inhibición de contracción inducida con santamarina.

#### **8.10. Curva de inhibición de la contracción**

Después de realizar la curva de contracción con fenilefrina se lavan perfectamente los tejidos y se dejan reposar 1 hora, con lavados cada 15 minutos, hasta alcanzar una línea basal constante.

En cada uno de los canales se aplicó una concentración diferente de santamarina a las concentraciones de 300 µg/mL, 177 µg/mL, 100 µg/mL, 57 µg/mL, 30 µg/mL, 17 µg/mL y un control (agua destilada con trazas de Tween 80), se dejó en reposo por 15 minutos para permitir que el compuesto interactúe con el tejido. Pasado el tiempo de incubación,

se procedió a realizar nuevamente la curva acumulativa de fenilefrina, en cada uno de los tejidos con el compuesto incubado, obteniendo así el efecto de inhibición de la contracción inducido por una concentración dada de santamarina, lo cual se comparó con el 100% de efecto obtenido en la curva acumulativa de fenilefrina inicial.

### 8.11. Cálculo de potencia antagonista pA'2

El cálculo del potencial antagonista se realizó para un antagonismo tipo no competitivo por una modificación a la ecuación de Schild, con la siguiente relación:

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

$$x' = \frac{A}{\bar{A}}$$

$$= \frac{\text{Efecto maximo del Agonista en ausencia del Antagonista}}{\text{Efecto maximo del Agonista en presencia de una Concentracion del Antagonista}}$$

$$B = \text{Concentración de Antagonista}$$

$$b = \text{Ordenada al origen}$$

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

$$-\frac{b}{m} = (-\text{Log } B) = pA'2$$

(40)

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Aislamiento e identificación de la santamarina

Se utilizaron 35 kg de Santa María (*Tanacetum parthenium*), de la cual se obtuvieron 5.5403 g de cristales del compuesto santamarina con un rendimiento del 0.0159 % con respecto a la planta seca.

Los cristales obtenidos se analizaron con espectrometría de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C, la cual permitió confirmar que las señales de desplazamiento químico como las constantes de acoplamiento coinciden con las reportadas para el producto natural santamarina (41) (42) ver anexo 1 y 2.

A continuación se describen en detalle las principales señales de los espectros de la santamarina: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ): 3.66 (1H, dd, J= 6.59, 9.98 Hz, H-1α); 5.35 (1H, m, H-3); 3.95 (1H, m, H-6β); 6.08 (1H, d, J= 3.24 Hz, H-13); 5.42 (1H, d, J= 3.09 Hz, H-13); 0.87 (3H, t, J= 2.78 Hz, H-14); 1.83 (3H, m, H-15), <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 74.9 (C-1), 32.5 (C-2), 121.3 (C-3), 133.3 (C-4), 51.1 (C-5), 81.6 (C-6), 50.9 (C-7), 21.1 (C-8), 34.2 (C-9), 40.8 (C-10), 138.9 (C-11), 171 (C-12), 119.9 (C-13), 14.1 (C-14), 23.2 (C-15).

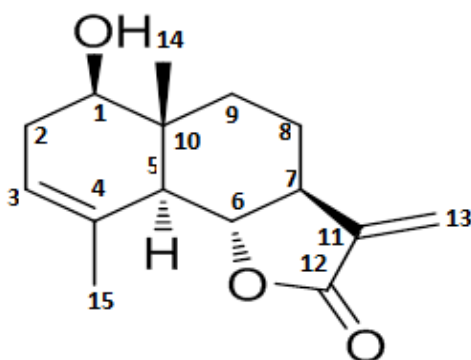
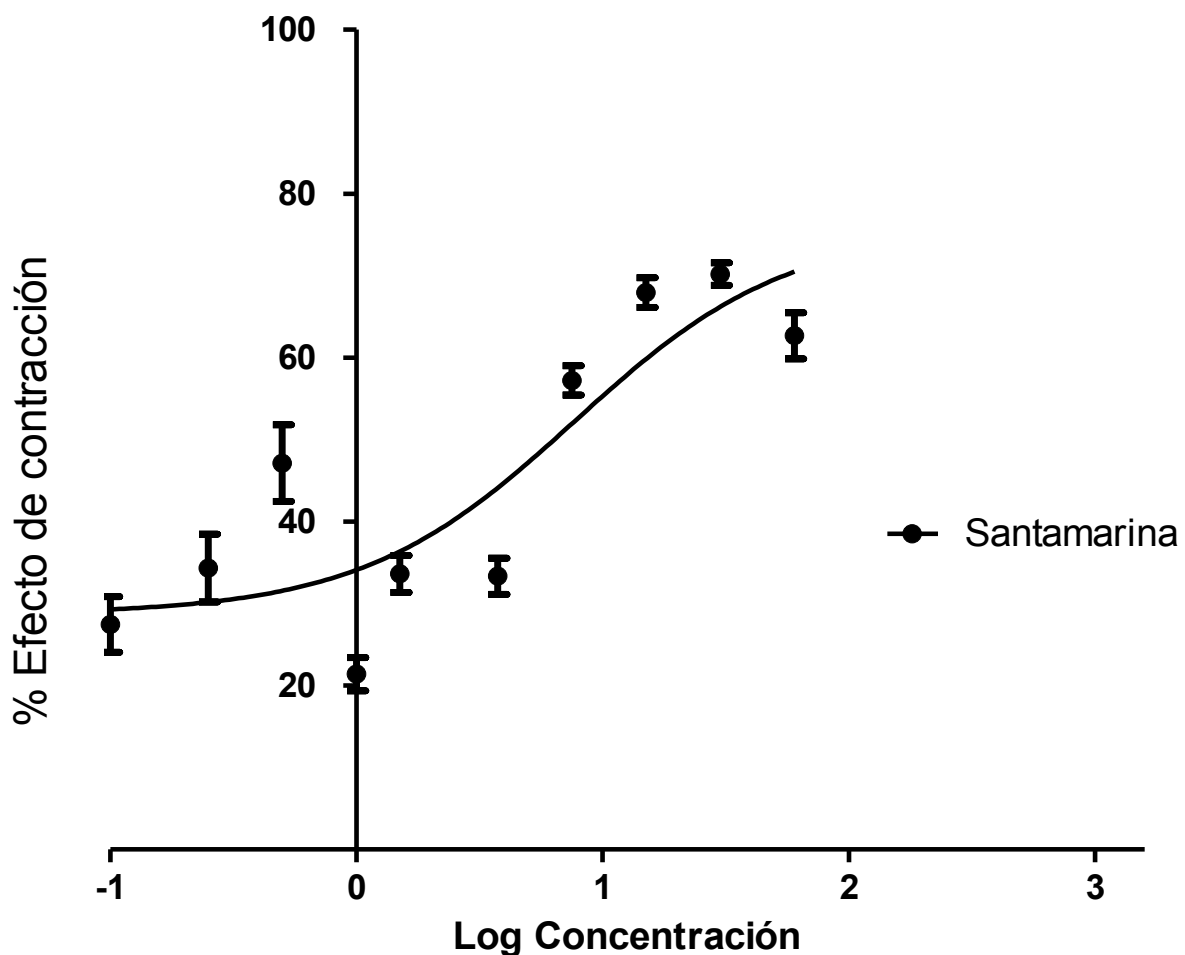


Figura 6. Estructura de la santamarina.

## 9.2. Curva concentración-respuesta con santamarina

La santamarina aislada presentó un efecto contráctil inicial con una  $CE_{50} = 7.716 \pm 0.1321$   $\mu\text{g/mL}$  así como un efecto máximo de 70.1964 % a la concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  y para la concentración más baja utilizada 0.1  $\mu\text{g/mL}$  se obtiene un efecto de 27.46 % de contracción **figura 7**.

Por último, al observar la curva se hace evidente una disminución del efecto contráctil a la concentración más elevada de 60  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 7**), ésta disminución se discute en el siguiente punto.

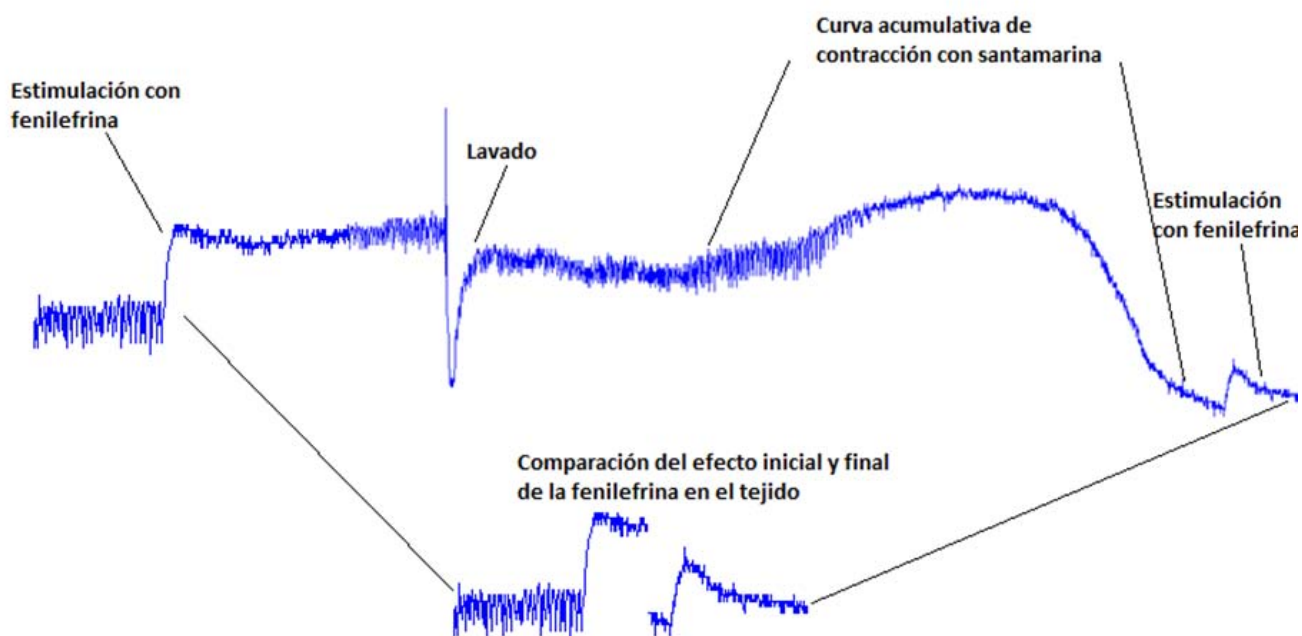


**Figura 7. Curva del efecto contráctil de la santamarina** la cual presenta una  $CE_{50} = 7.716 \pm 0.1321$   $\mu\text{g/mL}$ . Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de al menos 6 experimentos.



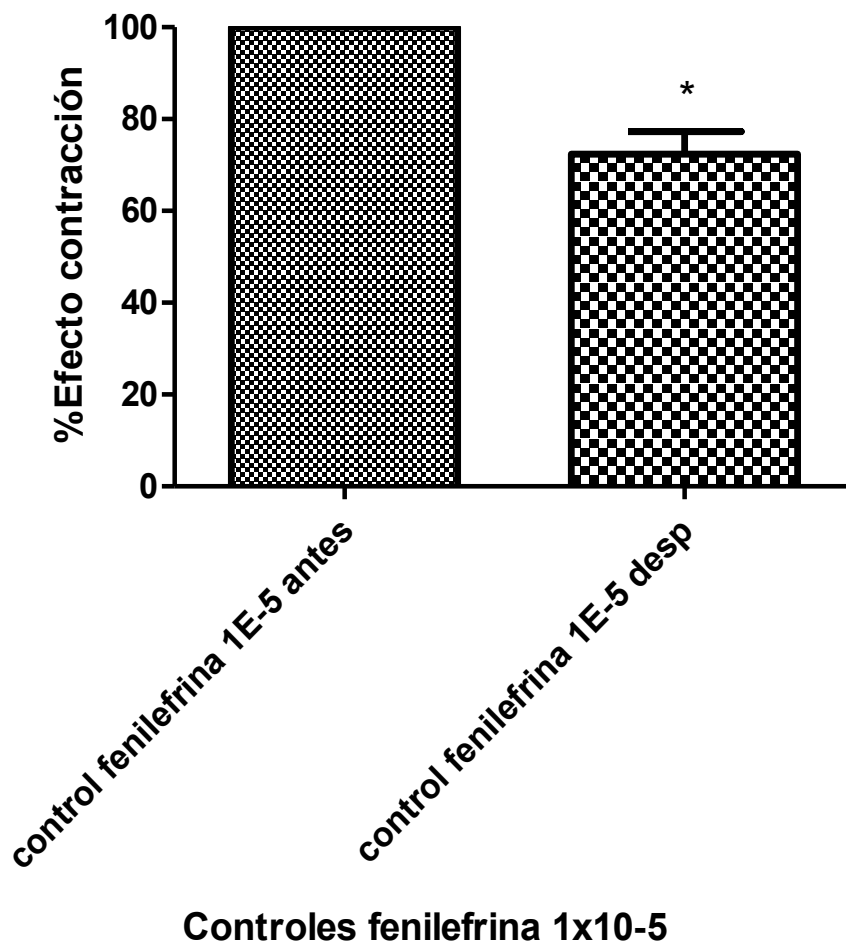
### 9.3. Comprobación del efecto de taquifilaxia ocasionada por santamarina usando un agonista de los receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Como se puede observar en la **figura 7** la curva de la santamarina presentó un efecto de taquifilaxia, éste se da por una disminución de la respuesta contráctil a concentraciones elevadas de compuesto. Este efecto se observó mejor en los trazos realizados en el polígrafo (**Figura 8**) en donde al llegar a la concentración más alta de la curva de la santamarina, se observó una disminución de la contracción del tejido. Por lo tanto, para demostrar que dicha respuesta no es por un deterioro del tejido, se llevó a cabo la adición de fenilefrina a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M antes y después de haber realizado la curva de santamarina.



**Figura 8. Trazo del experimento para comprobar el efecto de fenilefrina.** En este trazo se observó una primera estimulación con una concentración de fenilefrina de  $1 \times 10^{-5}$  M, la cual sirve como control positivo, posteriormente se realiza un lavado para proseguir con la adición de las diferentes concentraciones de la santamarina y concluyendo con una adición de fenilefrina a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M para comprobar la viabilidad del tejido. Por último se compararon los efectos de contracción inicial y final de las estimulaciones de fenilefrina.

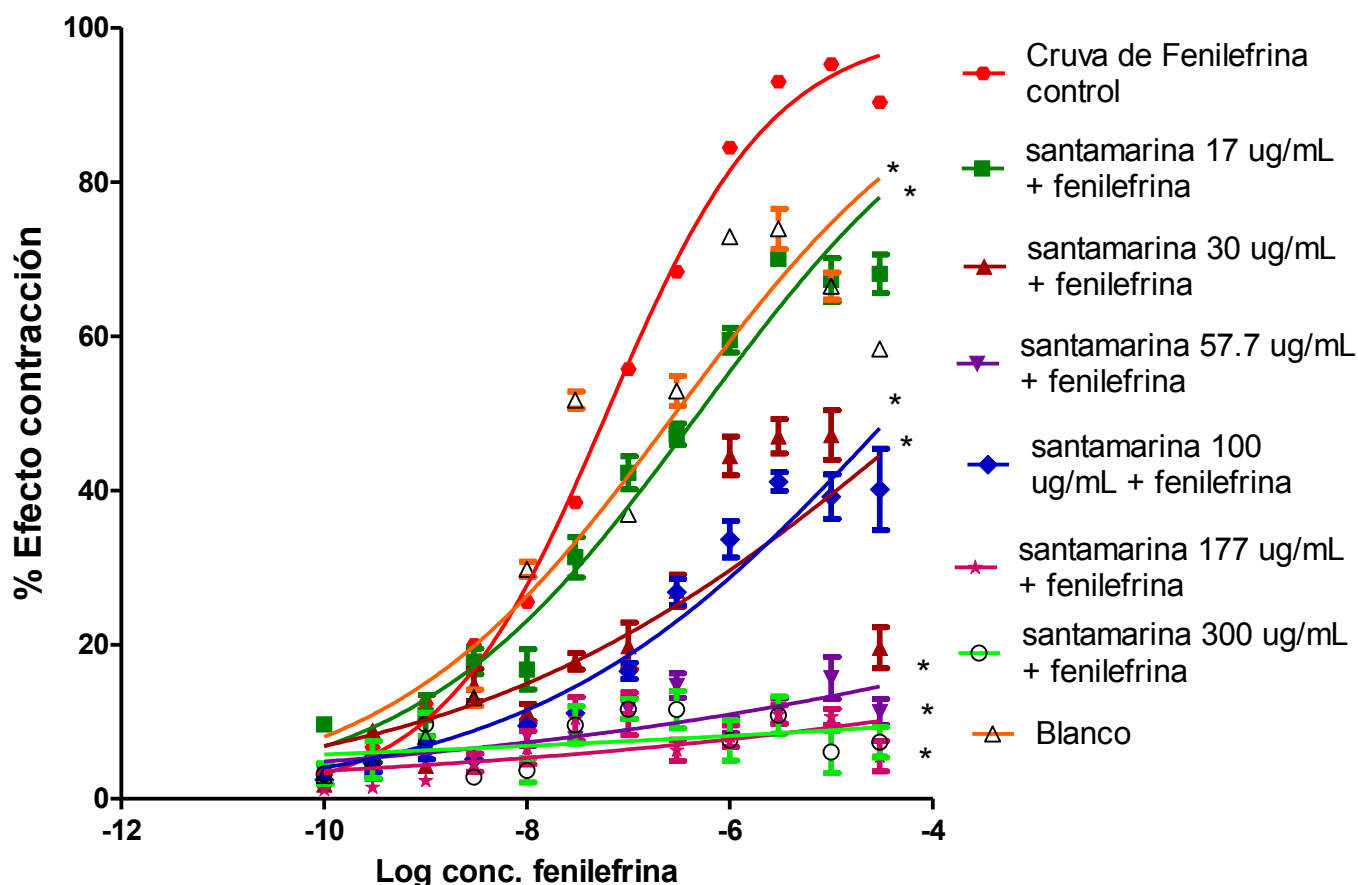
Por lo tanto, al comparar las respuestas dadas por las dos estimulaciones de fenilefrina (**Figura 9**) se observó que el tejido continúa viable, ya que existe una respuesta contráctil al adicionar la fenilefrina al final de la curva de la santamarina, así mismo el efecto contráctil de la fenilefrina se ve abatido al 72.34% de efecto al ser comparado con el efecto de la fenilefrina en ausencia de la santamarina, con una diferencia significativa (\* $P < 0.001$ ).



**Figura 9. Efecto de la contracción inducida por fenilefrina** antes y después de la curva de santamarina, usado para comprobar la viabilidad en el tejido. Existe diferencia significativa \* $P < 0.001$  (Los datos fueron analizados con una prueba T- Student pareada). Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de al menos 6 observaciones.

#### 9.4. Inhibición de la contracción de fenilefrina inducida por santamarina

En la **figura 10** se muestra el efecto de inhibición de la contracción inducida por la adición de fenilefrina, usando a la santamarina como inhibidor, donde se puede observar el abatimiento del efecto máximo directamente proporcional al aumento de la concentración de santamarina, mostrando un antagonismo de tipo no competitivo.



**Figura 10. Efecto inhibitorio de la santamarina a diferentes concentraciones sobre las contracciones inducidas por fenilefrina en aorta de rata.** Existe diferencia significativa  $*P < 0.05$  comparados contra el control de fenilefrina (Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de una vía seguida de una prueba post hoc de Dunn's). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos 6 observaciones.

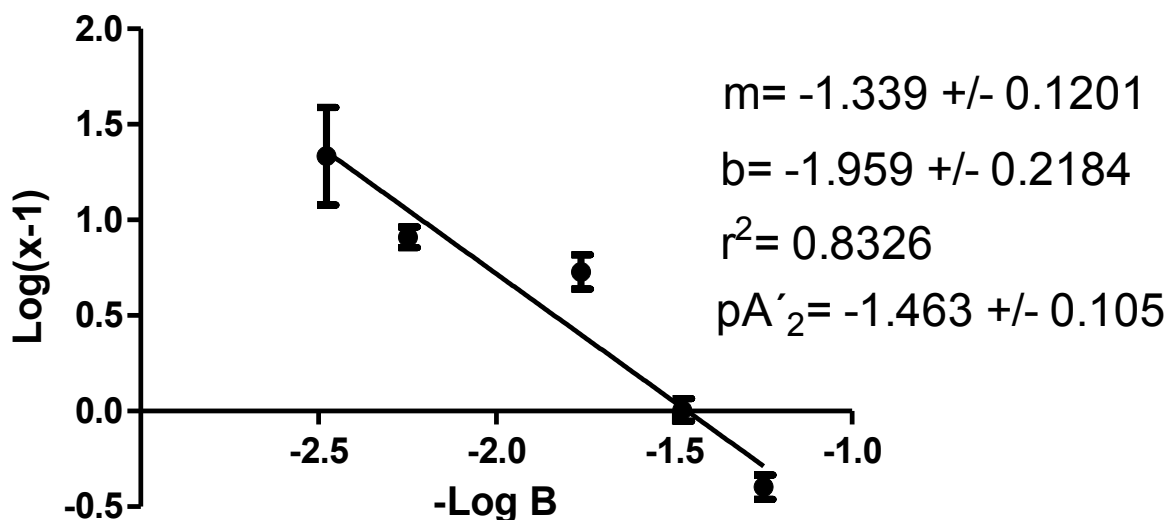
En el **cuadro 4** se presentan los porcentajes de contracción máximos alcanzados en cada concentración de santamarina. Se puede observar que existe una diferencia significativa \*P<0.05 al ser comparados contra la curva control de fenilefrina.

**Cuadro 4. Máximo porcentaje de contracción inducido por fenilefrina en presencia de santamarina a diferentes concentraciones.**

Concentración de santamarina (µg/mL)	% Máximo de Contracción +/- EEM
0	73.93+/- 0.263
17	70.03+/-0.7656
30	47.19+/-3.21
57.7	15.67+/-2.72
100	41.14+/-1.21
177	11.03+/-1.17
300	11.64+/-2.41

### 9.5. Calculo del potencial antagonista $pA'_2$

La concentración de santamarina calculada para inhibir al 50 % la contracción producida por fenilefrina es de  $29.04 \pm 0.105$  µg/mL, ésta se calculó usando una modificación a la ecuación de Schild, obteniéndose el valor de  $pA'_2 = -1.463 \pm 0.105$  el cual se obtiene gráficamente de la intersección de la recta en el eje de abscisas cuando  $Y=0$ .



**Figura 11. Gráfica de Schild para la obtención del  $pA'_2$  de santamarina con respecto a la fenilefrina. Las concentraciones utilizadas de santamarina fueron 17.7, 30, 57.7, 177 y 300 µg/mL respectivamente.**

## 10. Discusión de resultados

La santamarina presentó una actividad contráctil sobre el músculo liso vascular en el modelo de órgano aislado de aorta de rata (**Figura 7**). Estos resultados difieren con otros estudios realizados sobre distintas lactonas sesquiterpénicas entre las cuales destaca la partenolida, la cual presenta efectos relajantes en el músculo liso vascular de aorta de conejo (14) (43). Se hace mención de que la actividad de la partenolida se debe a la presencia en su estructura del grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona (14), éste compuesto es agonista del receptor de potencial transitorio de canal catiónico (TRPA1), el cual está involucrado en el mecanismo de generación de la migraña (13), El anillo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona es el mismo grupo presente en la santamarina.

Por otro lado, se observó que a una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  existe una disminución del efecto contráctil, dicho efecto está asociado a un efecto de taquifilaxia la cual está definida como una pérdida del efecto farmacológico de un fármaco durante un tratamiento, sin embargo, existe también una tolerancia de tipo celular, la cual se da cuando existe una estimulación repetida a los receptores acoplados a proteína G esto causa una fosforilación de determinados residuos del receptor, lo que provoca un desacoplamiento de las proteínas transductoras y una inactivación; los receptores son reconocidos de forma específica por proteínas que promueven su internalización y su posterior destrucción con lo que disminuye su densidad en la membrana y por lo tanto los efectos de los agonistas (44). Considerando el efecto taquifiláctico observado de la santamarina se adiciono fenilefrina, a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M antes y después de cada curva de santamarina, para lo cual se encontró que el tejido continua viable, ya que alcanza un efecto de contracción de 72.34 %, sin embargo se observó que el efecto de fenilefrina no llega nuevamente al 100 % como era de esperar, dado que presenta una diferencia significativa con respecto al control, como se muestra en la **figura 9**.

Como se pudo observar la santamarina inhibe el efecto de contracción inducido por la fenilefrina, este efecto es dado por la afinidad a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , como se ha descrito en trabajos anteriores de ésta planta, donde utilizan a la reynosina que es un isómero estructural de la santamarina y el extracto diclorometánico del cual se aisló la lactona usada en este trabajo. Por otro lado, el extracto diclorometánico así como la reynosina usados en trabajos anteriores, presentaron actividad sobre los receptores serotoninérgicos (5-HT) y adrenérgicos de tipo  $\alpha_1$ , siendo más afines a este último receptor (40). Debido a lo anterior se decidió realizar una curva de inhibición de la contracción inducida por fenilefrina (Figura 10) en donde la santamarina presentó un antagonismo de tipo no competitivo, así como un comportamiento de inhibición de la contracción inducida con fenilefrina directamente proporcional a la concentración de la santamarina.

Por otro lado y apoyados en la modificación de la ecuación de Schild para el cálculo de potencial de antagonismo, se calculó el  $pA'2$  de la santamarina usando como agonista a la fenilefrina (Figura 11), el cual al ser comparado con los valores de  $pA'2$  de la reynosina y el extracto diclorometánico usando el mismo agonista reportado en trabajos anteriores(40), se observa que la santamarina es más potente que la reynosina y el extracto diclorometánico ya que presenta un  $pA'2$  mayor, así también al observar la concentración que inhibe el 50 % del efecto máximo se puede notar claramente que la santamarina presenta una mayor potencia antagonista que reynosina y que el extracto de donde se obtuvo (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Comparación del  $pA'2$  y  $CE_{50}$  de la santamarina, reynosina y extracto diclorometánico.**

Compuesto	$pA'2 \pm EEM$	Concentración que inhibe el 50% del efecto máximo
Santamarina	$-1.46 \pm 0.105$	$29.04 \pm 0.105$
Reynosina	$-1.54 \pm 0.090$	$34.83 \pm 1.23$
Extracto diclorometánico	$-1.65 \pm 0.092$	$45.26 \pm 1.23$

Por último en el análisis espectroscópico de RMN  $^1\text{H}$  y  $\text{C}^{13}$ , se confirmó que el compuesto evaluado en este trabajo es la santamarina, ya que al observar las señales obtenidas, éstas corresponden a las señales reportadas en la bibliografía (42) (43).

## 11. CONCLUSIONES

La santamarina fue aislada e identificada ésta presentó efecto contráctil sobre el músculo vascular de aorta de rata con capacidad para inhibir las contracciones inducidas por fenilefrina de forma no competitiva con un valor de  $\text{pA}'2 = -1.46 \pm 0.105$ . El doble efecto contráctil e inhibitorio de la santamarina sugiere un efecto agonista parcial con capacidad de inhibir las contracciones de un agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico.

## 12. PERSPECTIVAS

Tomando como base los resultados de este trabajo se propone como perspectivas los siguientes puntos.

Realizar una curva de Inhibición de la contracción de serotonina inducida por santamarina a diferentes concentraciones.

Calcular el  $\text{pA}'2$  de la santamarina utilizando a la serotonina como agonista.

Comparar los resultados de los puntos anteriores con los de la reynosina y el extracto presentados en trabajos anteriores en el laboratorio.

Lo anterior podría atribuir o no un posible efecto de la santamarina sobre los receptores serotoninérgicos, así como su posible relación con la actividad antimigraña atribuida a la planta *Tanacetum parthenium* y en general a la santamarina.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Cijo G, Kumar N, Suresh P y Ashok K. A Review on the therapeutic potentials of parthenolide: sesquiterpene lactone. *International Research Journal of Pharmacy*. 2012; 3 (2): 69 - 73.
2. Andrea G, Cevoli S y Cologno D. Herbal therapy in migraine. *Journal of the Neurological Sciences*. 2014; 35(1): S135 - S140.
3. Williams C, Hoult J, Harborne J, Greenham J y Eagles J. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*. 1995; 38 (1):267 - 270.
4. Awang D. The quest for the anti-migraine principle(s) of feverfew, *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2009; 15: 98 - 105.
5. Wagner S, Arce R, Murillo R, Terfloth L, Gasteiger J y Merfort I. Neural networks as valuable tools to differentiate between sesquiterpene lactones Inhibitory activity on serotonin release and on NF- $\kappa$ B. *Journal Medicinal Chemistry*. 2008; 51: 1324 - 1332.
6. Luo Q, Darsey J, Compadre C y Mitra S. Prediction of potential antimigraine activity using artificial neural networks. *Journal of the Arkansas Medical Society*. 1997; 51: 131 - 134.
7. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea]; 2009 [citado 2013 03 20]. Disponible en:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7488>.
8. Jain N, Kulkarni S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68: 251 - 259.



9. Walsh E, Ashe S, Walsh J. Nature's migraine treatment: isolation and structure elucidation of Parthenolide from *Tanacetum parthenium*. Journal of Chemical education. 2011; 89: 134 - 137.
10. Wu C, Chen F, Wang X, Kim H, He G, Haley-zitlin V y Huang G. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic Quantification. Food Chemistry. 2005; 96: 220 - 227.
11. Majdi M, Charnikhova T, Bouwmeester H. Genetical, developmental and spatial factors influencing parthenolide and its precursor costunolide in feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). Industrial Crops and Products. 2013; 47: 270 - 276.
12. Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, Ali Malboobi M, Beekwilder J, Cankar K, de Vos R, Todorovic S, Simonovic A, Bouwmeester H. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). Phytochemistry. 2011; 72: 1739 - 1750.
13. Materazzi S, Benemei S, Fusi C, Galdani R, Siena G, Vastani N, Andersson D, Trevisan G, Moncelli M, Wei X, Dussor G, Pollastro F, Patacchini R, Appendino G, Geppetti P, Nassini R. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. PAIN. 2013; 154: 2750 - 2758.
14. Fishedick J, Standifor M, Johnson D y de Vos R. Activation of Antioxidant Response Element in Mouse Primary Cortical Cultures with Sesquiterpene Lactones Isolated from *Tanacetum parthenium*. Planta Med. 2012; 78:1725 - 1730.
15. Awang D. The quest for the anti-migraine principle(s) of feverfew, *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 2009; 15: 98 - 105.

16. Sun C, Syu W, Don M y Lu J. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from the Root of *Saussurea lappa*. *Journal of Natural Products*. 2003; 66: 1175 - 1180.
17. Marino S, Borbone N, Zollo F, Lanaro A, Meglio P y Lorizzi M. New Sesquiterpene Lactones from *Laurus nobilis* Leaves as Inhibitors of Nitric Oxide Production. *Planta Med*. 2005; 71: 706 - 710.
18. Limmroth V y Michel M. The prevention of migraine: a critical review with special emphasis on  $\beta$ -adrenoceptor blockers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 52: 237 - 243.
19. Pietrobon D, Moskowitz M. Pathophysiology of Migraine. *The Annual Review of Physiology*. 2013; 75: 365 - 391.
20. Charles A. The Evolution of a Migraine Attack – A Review of Recent Evidence. *American Headache Society*. 2012; 413 - 419.
21. Montero L, Pretelt F, Millan S y Gil L. Sistema trigémino vascular y cefalea. *Univ. Méd.* ISSN 0041-9095. 2012; 54(1): 92 - 103.
22. Weber T, O'Connor M, HayatakaK, Colson N, Medora R, Russo E y Parker K. Activity of Parthenolide at 5-HT<sub>2A</sub> Receptors. *Journal of Natural Products*. 1997; 60: 651 - 653.
23. Horowitz A, Menice C, Laporte R y Morgan K. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. *Physiological Reviews*. 1996; 76: No.4.
24. Lee D, Webb R y Jin L. Hypertension and RhoA/Rho-Kinase Signaling in the Vasculature, Highlights From the Recent Literature. *Journal of the American Heart Association*. 2004; 44: 796 - 799.

25. Stull J, Gallagher P, Herring B, Kamm K. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Journal of the American Heart Association*. 2014; 17: 723 - 732.
26. Yamin R, Morgan K. Deciphering actin cytoskeletal function in the contractile vascular smooth muscle cell. *The Journal of Physiology*. 2012; 17: 4145 - 4154.
27. Wirth A, Offermanns S. G-Protein-Coupled Receptors in Smooth Muscle. *Muscle Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. 2012; 2: 1145 - 1153.
28. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2001; 22: 32 - 39.
29. Rosenbaum D, Rasmussen S, Kobilka B. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *NATURE*. 2009; 459: 356 - 363.
30. Harmar A. Protein family review, Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*. 2001; 2(12): 3013.1 - 3013.10.
31. Li Z, Zhou X, Dai Z y Zou X. Classification of G proteins and prediction of GPCRs-G proteins coupling specificity using continuous wavelet transform and information theory. *Amino Acids*. 20012; 43: 793 - 804.
32. Kaumann A y Levy F. 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111: 674 - 706.
33. Watts S, Davis R. 5-Hydroxytryptamine Receptors in Systemic Hypertension: An Arterial Focus. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010; 29: 54 - 67.
34. Watts S, Morrison S, Davis R, Barman S. Serotonin and Blood Pressure Regulation. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*. 2012; 64: 359 - 388.

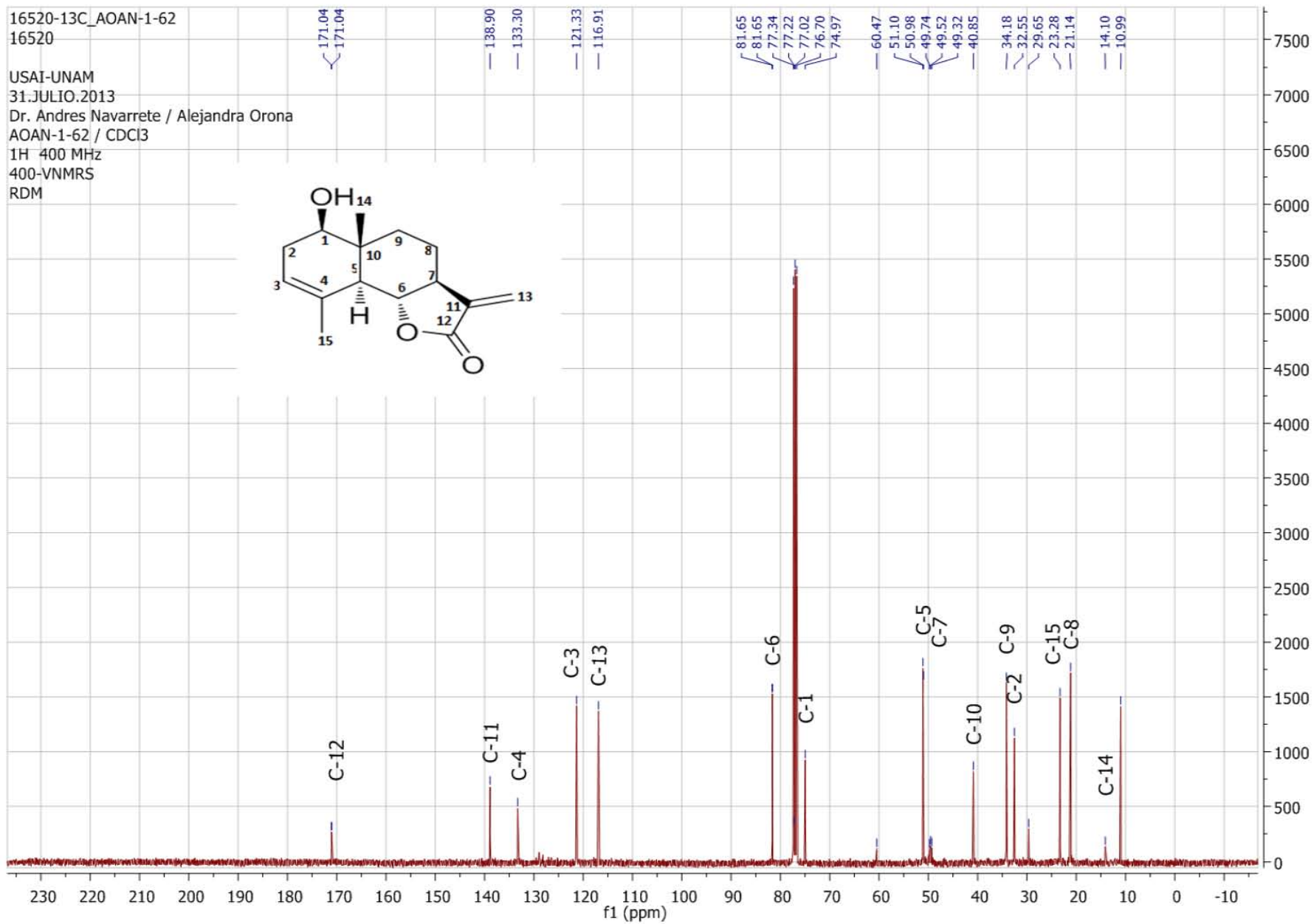
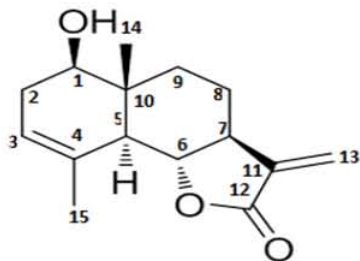
35. Lu R, Alioua A, Kumar Y, Kundu P, Eghbali M, Weisstaub N, Gringrich J, Stefani E, Toro L. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated contraction in rat aorta. *The Journal of Physiology*. 2008; 16: 3855 - 3869.
36. Brueckner F, Piscitelli C, Tsai C, Standfuss J, Deupi X, Schertler G. Structure of  $\beta$ -Adrenergic Receptors. *Methods in Enzymology*. 2013; 520: 117 - 151.
37. Michelotti G, Price D, Schwinn D.  $\alpha$ 1-Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 88: 281 - 309.
38. Hussain M, Marshall I. Characterization of  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenoreceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*. 1997; 122: 849 - 858.
39. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
40. Orona Ortiz A, Efecto de la santina y reynosina aislada de *Tanacetum parthenium* sobre la respuesta contráctil del tejido vascular de aorta de rata, Tesis de maestría. UNAM, Ciencias Químicas. 2013; pp. 51.
41. Elin J, Jang K, Lee S, Lee D, Mar W, Oh K, Shin J. Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. *Phytochemistry*. 2012; 80: 70 - 76.
42. Zhao F, Xu H, He E, Jiang Y, Liu K. Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the overproduction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  release in LPS-activated macrophages. *Journal of Natural Products Research*. 2008; 10 (11): 1045 - 1053.
43. Hay A, Hamburger M, Hostettmann K, Hoult J. Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive  $\alpha$ -methylene-butyrolactone functions. *Journal of Pharmacology*. 1994; 112: 9 - 12.

44. Ruiz-Gayo M, Fernández-Alfonso M. Fundamentos de Farmacología Básica y Clínica.  
2° edición. Editorial panamericana. pp; 231 - 233. 2013.

# **ANEXOS**

16520-13C\_AOAN-1-62  
16520

USAI-UNAM  
31.JULIO.2013  
Dr. Andres Navarrete / Alejandra Orona  
AOAN-1-62 / CDCl<sub>3</sub>  
1H 400 MHz  
400-VNMRS  
RDM



16520-1H\_AOAN-1-62  
16520

16520

USAI-UNAM

01.AGOSTO.2013

Dr. Andres Navarrete / Alejandra Orona

AOAN-1-62 / CDCl<sub>3</sub>

1H 400 MHz

400-MR

RDM

