

**“EFECTOS DEL EXTRACTO DE *Croton Schiedeana* SOBRE LA
PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN LA PREPARACION DE ANILLOS
AISLADOS DE AORTA”.**



NINFA MARLEN CHAVES TORRES

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, D.C.
2010**

**“EFECTOS DEL EXTRACTO DE *Croton Schiedeanus* SOBRE LA
PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN LA PREPARACIÓN DE ANILLOS
AISLADOS DE AORTA”.**

NINFA MARLEN CHAVES TORRES

Tesis de Maestría en Ciencias – Farmacología

Director

MARIO FRANCISCO GUERRERO PABÓN. Ph D.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
BOGOTÁ, D.C.
2010**

RESUMEN

“EFECTOS DEL EXTRACTO DE *Croton Schiedeanus* SOBRE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN LA PREPARACIÓN DE ANILLOS AISLADOS DE AORTA”.

En este trabajo se determinó la importancia de la ruta metabólica del óxido nítrico y la guanilato ciclasa en el efecto vasodilatador inducido por el extracto de *Croton Schiedeanus* Schlecht utilizando la preparación de anillos aislados de aorta de ratas Wistar.

El extracto de *C. Schiedeanus* relaja anillos precontraídos con fenilefrina, agonista del receptor adrenérgico alfa, en función de la dosis, con una CE_{50} de $1,3 \times 10^{-5}$ g/mL ($9,1 \times 10^{-6}$ – 2×10^{-5}). Este efecto es superior al ejercido sobre anillos precontraídos con KCl (activador de canales de calcio dependientes de voltaje) y se reduce, pero no se suprime, en presencia de anillos sin endotelio. Azul de metileno (10^{-4} M), inhibidor de la guanilato ciclasa y L-NAME (10^{-4} M), inhibidor de la óxido nítrico sintasa, revierten completamente la relajación inducida por el extracto, en tanto que ésta no se afecta en presencia de propranolol (10^{-6} M), antagonista del receptor beta, de atropina (3×10^{-5} M), antagonista muscarínico e indometacina (10^{-6} M), inhibidor de ciclooxigenasa. Esto señala que la relajación inducida por *C. Schiedeanus* no está vinculada a la activación del receptor beta, ni a la activación del receptor muscarínico ni tampoco a la inducción de prostaglandinas. Adicionalmente, *C. Schiedeanus* no afecta las contracciones inducidas por $CaCl_2$ lo que confirma que el antagonismo de calcio no es el mecanismo de relajación vascular de esta especie.

Por otro lado, al ensayar diluciones sucesivas de L-NAME y azul de metileno hasta del orden de 10^{-14} M se observa que este último agente es más eficaz en revertir la relajación inducida por *C. Schiedeanus*, puesto que en tales condiciones persisten efectos inhibitorios importantes (68% de relajación máxima) en tanto que con L-NAME la relajación inducida por el extracto se recupera notoriamente (91%). Estos hallazgos sugieren que *C. Schiedeanus* ejercería efectos aún más selectivos

sobre la ruta guanilato ciclasa/GMPc que sobre la actividad misma del óxido nítrico.

Dado el interés de la actividad relajante de esta especie y la importancia de la ruta metabólica del NO/GMPc, no solo en el campo de la hipertensión sino en el de la aterogénesis y la agregación plaquetaria, los resultados de este estudio dan cuenta de que *C. Schiedeana* podría constituirse en una fuente efectiva para la obtención de un fitoterapéutico con aplicaciones cardiovasculares.

Palabras clave: Croton Schiedeana, oxido nítrico, Endotelio, GMPc, GCs, Aorta de rata.

ABSTRACT

"EFFECTS OF *Croton Schiedeana* EXTRACT ON NITRIC OXIDE PRODUCTION IN THE PREPARATION OF ISOLATED AORTIC RINGS.

In this study we determined the importance of the metabolic pathway of nitric oxide and guanylate cyclase in the vasodilator effect induced by the extract of *Croton schiedeana* Schlecht using the preparation of isolated aortic rings of Wistar rats.

C. Schiedeana relax rings precontracted with phenylephrine, alpha-adrenergic receptor agonist, depending on the dose, with an EC₅₀ of 1.3 x10⁻⁵ g / mL (9.1 x10⁻⁶ - 2x10⁻⁵). This effect is superior to that exercised over rings precontracted with KCl (calcium channel activator of voltage-dependent) and is reduced but not abolished, in the presence of rings without endothelium. Methylene blue (10⁻⁴ M), an inhibitor of guanylate cyclase and L-NAME (10⁻⁴ M), an inhibitor of nitric oxide synthase, completely reversed the relaxation induced by the extract, while it is not affected in presence of propranolol (10⁻⁶ M), beta receptor antagonist, atropine (3x10⁻⁵ M), muscarinic antagonist and indomethacin (10⁻⁶ M), an inhibitor of

cyclooxygenase. This indicates that the relaxation induced by *C. Schiedeanus* is not linked to activation of the beta receptor, or muscarinic receptor activation nor the induction of prostaglandins. Additionally, *C. Schiedeanus* not affect contractions induced by CaCl_2 confirming that the antagonism of calcium is not the mechanism of vascular relaxation of this species.

On the other hand, when testing serial dilutions of L-NAME and methylene blue to the order of 10^{-14}M can be seen that the latter agent is more effective in reversing the relaxation induced by *C. Schiedeanus*, since in such conditions persist significant inhibitory effects (68% of maximal relaxation), whereas with L-NAME-induced relaxation of the extract is recovered well (91%). These findings suggest that *C. Schiedeanus* exert more selective effects on the route guanylate cyclase / cGMP than on the very activity of nitric oxide.

Given the interest of the relaxant activity of this species and the importance of the metabolic pathway of NO / cGMP, not only in the field of hypertension but of atherogenesis and platelet aggregation, the results of this study relates to *C. Schiedeanus* could become an effective source for obtaining a phytotherapy with cardiovascular applications.

Keywords: *Croton schiedeanus*, nitric oxide, endothelium, cGMP, sGC, rat aorta.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia por contribuir en mi formación personal y profesional.

Al Dr. Mario Francisco Guerrero por ser mi tutor, mi amigo y sobre todo por ser un modelo a seguir, por su tiempo, su paciencia, sus consejos y enseñanzas.

Al Dr. Claudio Gómez y Javier Rincón por su valiosa, desinteresada y oportuna colaboración.

A Miguel Ángel...

A mis compañeras Marcela y Paola por su valioso apoyo.

A mi familia que son mi fuerza y la motivación para seguir adelante.

A Dios...

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	2
3.1. Croton Schiedeanus schlecht.....	3
3.1.1. Descripción botánica de <i>Croton Schiedeanus</i> schlecht	3
3.1.2. Antecedentes de <i>Croton schiedeanus</i> schlecht	3
3.1.3. Actividad farmacológica de <i>Croton schiedeanus</i> schlecht	4
3.2. Óxido Nítrico (NO)	4
3.2.1. Síntesis del Oxido Nítrico	5
3.2.2. Antecedentes del Oxido Nítrico	8
3.2.3. Vía del oxido nítrico GMPc	9
3.2.4. El oxido nítrico en el sistema vascular.....	10
3.2.5. Otras funciones fisiológicas del Oxido Nítrico.....	13
4. METODOLOGÍA.....	14
4.1. Materiales.....	14
4.2. Procedimiento Experimental.....	16
4.3. Expresión y análisis de resultados	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Efectos del extracto de <i>c shiedeanus</i> sobre la contracción de FE (10^{-6} M) y KCl (80 mM).	20
5.2. Efectos del extracto de <i>c shiedeanus</i> sobre la contracción de FE (10^{-6} M) en anillos con endotelio (E ⁺) y sin endotelio (E ⁻)	21

5.3. Efectos del extracto de <i>c shiedeanus</i> y ayanina en la inhibición de contracción producida por concentraciones acumulativas de FE (10^{-9} - 10^{-4} M).....	22
5.4. Mecanismos de acción de <i>c shiedeanus</i>	23
5.4.1. Utilización de L-NAME.....	23
5.4.2. Utilización de Azul de Metileno.....	24
5.4.3. Utilización de Atropina, Indometacina, Propranolol.	25
5.4.4. Utilización de Cloruro de Calcio (CaCl^2)	27
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES.....	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades de las tres isoformas de Oxido Nítrico Sintasa (NOS) () (Adaptada de NO, NO y NO•: Oxido Nítrico en la Fisiología Vascular. Louis J. Ignarro)	6
Tabla 2 Fármacos utilizados y su mecanismo de acción	15
Tabla 3 Valores de concentración efectiva 50 (CE50) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de C. Schiedeanus en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10-6 M) o KCl (80 mM).	20
Tabla 4 Valores de concentración efectiva 50 (CE50) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de C. Schiedeanus en anillos de aorta con y sin endotelio previamente contraídos con FE (10-6 M).	21
Tabla 5 Valores de concentración efectiva 50 (CE50) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de C. Schiedeanus en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10-6 M) en presencia de diferentes concentraciones de L- NAME (10-4, 10-7, 10-12, 10-14 M).	23
Tabla 6 Valores de concentración efectiva 50 (CE50) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de C. Schiedeanus en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10-6 M) en presencia de diferentes concentraciones de Azul de Metileno (10-4, 10-7, 10-12, 10-14 M).	25
Tabla 7 Valores de concentración efectiva 50 (CE50) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de C. Schiedeanus en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10-6 M) en presencia de Atropina (3x10-5 M) Indometacina (10-6 M) y Propranolol (10-6 M)	26

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 <i>Croton schiedeanus</i> schlecht	3
Ilustración 2 Generación de oxido nítrico a partir de l-arginina, de donadores de NO y formación de cGMP (). (Adaptada de Katzung B, Farmacología básica y clínica. 9na edición 2004: 314)	7
Ilustración 3 Vía de señalización NO/cGMP	10
Ilustración 4 Esquema sobre la producción de óxido nítrico y blancos terapéuticos de algunos fármacos	12
Ilustración 5 Registro computarizado de contracción de anillos de aorta de rata	16
Ilustración 6 Sistema en serie de baños de órganos con amplificador de señal y de registro computarizado (lab trax, WPI®).....	17

INDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1 Curvas acumulativas de relajación de C Schiedeanus en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10-6 M) o con KC1 (80 mM). Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos, * $p < 0,05$ de C Schiedeanus -FE con respecto a C Schiedeanus -K 21
- Gráfica 2 . Curvas acumulativas de relajación de C. Schiedeanus y Control (DMSO) en anillos de aorta con y sin endotelio contraídos con FE (10-6 M). Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos, $p < 0.05$ con respecto a DMSO..... 22
- Gráfica 3 Curvas acumulativas de contracción de FE en anillos de aorta íntegros en presencia y en ausencia del extracto de C Schiedeanus y el flavonoide ayanina. Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos. 22
- Gráfica 4 Curvas acumulativas de relajación de C Schiedeanus y DMSO (Control) en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10-6 M) y en presencia de L-NAME (10-4, 10-7, 10-12, 10-14 M). Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos, * $p < 0.05$ 24
- Gráfica 5 Curvas acumulativas de relajación de C Schiedeanus y DMSO (Control) en anillos contraídos con FE (10-6 M) y en presencia de Azul de Metileno (10-4, 10-7, 10-12, 10-14 M). Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos, $p < 0.05$ 25
- Gráfica 6 Curvas acumulativas de relajación de C Schiedeanus y DMSO (Control) en anillos contraídos con FE (10-6 M) en presencia de Atropina (3×10^{-5} M), Indometacina (10-6 M), y Propranolol (10-6 M). Cada punto es el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos. 26
- Gráfica 7 Curvas acumulativas de contracción de CaCl_2 en anillos de aorta en presencia y en ausencia del extracto de C Schiedeanus y ayanina. Cada punto representa el promedio \pm e.s.m. de al menos 5 anillos. * $p < 0.05$ con respecto a DMSO..... 27

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

Ach:	Acetilcolina
ADP:	Adenosin Difosfato
AMPC:	Adenocin monofosfato ciclico
H4B2:	Tetrahidrobiopterina
<i>C. Schiedeanus:</i>	<i>Croton Schiedeanus</i> Schlecht
CaCl ²	Cloruro de calcio
EDHF:	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDRF:	Factor relajante derivado de endotelio
FNT:	Factor de necrosis tumoral
FAD:	Favin adenin dinucleotido
FE:	Fenilefrina
FMN:	Flavin mononucleotido
GCs:	Guanilato ciclasa soluble
GMPc:	Guanosin monofosfato cíclico
HNO ₂ :	Ácido nitroso
KCl:	Cloruro de potasio
L-NA:	N ^W – nitro-arginina
L-NAME:	N ^G - nitro-L-arginina metil ester
NADH:	Nicotin adenin dinucleotido, reducido
NADPH:	Fosfato de nicotin adenin dinucleotido, reducido
NMDA:	N-metil D-aspartato
NO:	Óxido nítrico
NO ⁺ :	Ion nitrosonium
NOS:	Óxido nítrico sintasa
PN	Péptidos natriúreticos
SNAP:	S-nitroso acetil penicilamina

1. INTRODUCCIÓN

Croton Schiedeanus Schlecht (familia Euphorbiaceae) es una especie conocida comúnmente en Colombia como “almizclillo”, utilizada en medicina tradicional con fines antihipertensivos (1;2). Sus extractos acuoso y etanólico han mostrado efectos antihipertensivos y vasodilatadores (3;4). De ella se han aislado e identificado 18 compuestos: cuatro flavonoides, diez diterpenoides, dos esteroides y dos fenilbutanoides (5). Entre todos ellos se destacan, como sus principales principios activos, los flavonoides 3,7-di-O-metilquercetina, 3-O-metilquercetina y 3,4',7-tri-O-metilquercetina, los cuales estarían ejerciendo efectos sinérgicos en la respuesta global: antihipertensiva y vasodilatadora de *C. Schiedeanus*(3;4).

El Óxido nítrico (NO): factor de relajación derivado del endotelio, es un mediador clave en los fenómenos vinculados, no solo con relajación vascular, sino también en aquéllos que atenúan los procesos de agregación plaquetaria y aterogénesis, entre otros. Su déficit está íntimamente ligado a la lesión endotelial y ésta, a la progresión de enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial, enfermedad coronaria y falla cardíaca. Si *C. Schiedeanus* ejerce importantes efectos antihipertensivos y vasodilatadores dependientes de la actividad del óxido nítrico, podría constituirse en fuente de origen natural para la obtención eventual de un fitoterapéutico con aplicación cardiovascular.

Este estudio está orientado a determinar el papel de la ruta metabólica del óxido nítrico y la guanilatociclasa en los efectos vasodilatadores de *C. Schiedeanus* aplicando protocolos en anillos aislados de aorta que permitan discriminar su importancia con respecto a otras rutas asociadas con mecanismos vasodilatadores como las ligadas al receptor beta, el receptor muscarínico, el antagonismo de calcio y la inducción de prostaglandinas vasodilatadores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar los efectos del extracto de *Croton Schiedeanus* Schlecht sobre la producción de óxido nítrico en la preparación de anillos aislados de aorta.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Establecer si los efectos vasodilatadores inducidos por el extracto de *C. Schiedeanus* dependen de la producción de NO.

2.2.2. Determinar la potencia relajante del extracto de *C. Schiedeanus* dependiente de la producción de NO.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Croton Schiedeanus* Schlecht

Un arbusto abundante en América del sur, en Colombia crece especialmente en Cundinamarca, de sus hojas se prepara una infusión para el tratamiento de la hipertensión arterial según la medicina tradicional colombiana(1;2)

3.1.1 Descripción botánica de *Croton Schiedeanus* Schlecht(5)

Reino: Plantae

Filo/división: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Nombre científico: *Croton Schiedeanus* Schlecht ó *Crotón perobtusus* lundell.

Nombre común: Almizclillo (*Colombia*)



Ilustración 1 *Croton schiedeanus* schlecht

3.1.2 Antecedentes de *Croton schideanus* schlecht

Una de las primeras descripciones sobre esta planta fue publicada por García en 1975 y en 1992 Correa retoma su estudio, se obtuvieron y estudiaron los extractos acuoso y etanólico de la parte aérea de *C. Schideanus*, estos trabajos se centraron en el fraccionamiento fitoquímico y la evaluación de la actividad antihipertensiva y relajante vascular de estos extractos y algunos compuestos aislados de los mismos (1;2;3;4). Hasta el momento se han aislado e identificado 18 compuestos: cuatro flavonoides, diez diterpenoides, dos esteroides y dos fenilbutanoides entre ellos: Ayanina, 3,7-Di-O-metilquercetina, β -Sitosterol, Cicloartanol, *Cis*-Deshidrocrotonina, *Trans*-deshidrocrotonina, diterpeno 1 y 2. (5)

3.1.3 Actividad farmacológica de *Croton Schideanus* Schlecht

El extracto etanólico de *C. Schideanus* tiene la capacidad de disminuir las cifras de tensión arterial y frecuencia cardiaca en función de la dosis en ratas normotensas e hipertensas administrado por vía intravenosa, además ha probado su actividad vasodilatadora en anillos aislados de aorta de rata precontractados con KCl y fenilefrina(3;4).

De los compuestos aislados se destacan por tener actividad promisorias sobre el sistema cardiovascular: 3,7-O-dimetilquercetina por presentar un perfil de vasodilatación de mayor potencia y ayanina que es el compuesto mayoritario (6), diterpeno 1 y *cis*-deshidrocrotonina también han demostrado efectos cardiovasculares, al parecer todos estos compuestos ejercen efectos sinérgicos entre sí que hacen que el extracto presente mayor actividad vasodilatadora.

Los compuestos flavonoides como quercetina, quercitrina y ayanina han sido especialmente estudiados por poseer actividad hipotensora y/o relajante del músculo liso vascular parcialmente dependiente de endotelio (7;8).

3.2 Óxido Nítrico (NO)

Es un gas simple compuesto por un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno dos de los elementos más comunes en la naturaleza, su gran reactividad hace que pueda actuar de formas diversas según su estado de oxidación (9). Cuando se presenta en su forma reducida NO^- (Óxido Nítrico propiamente dicho) tiene una enorme capacidad lesiva, mientras que su forma Oxidada NO^+ (ion nitrosonium) es protectora. Sería más adecuado denominarlo monóxido de nitrógeno cuando se encuentra en su forma NO^+ y debería reservarse Óxido Nítrico para la forma reducida(9).

3.2.1 Síntesis del Óxido Nítrico

En los sistemas biológicos el NO es sintetizado por distintos mecanismos: Por reducción de nitrato o nitrito que es la vía utilizada por bacterias desnitrificantes y algunas enterobacterias que disponen de los dos sistemas enzimáticos necesarios, la nitrato reductasa y la nitrito reductasa, además se ha demostrado que es la vía principal de síntesis de NO en las plantas (10;11). Pero la mayoría de los organismos entre ellos los mamíferos pueden sintetizar óxido nítrico enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina (12).

Se ha comprobado su síntesis en células endoteliales y en otros tipos de células como: macrófagos, neutrófilos, plaquetas, neuronas, células adrenales, células de la retina, células miocárdicas, células de Von Kupffer del hígado, terminaciones sinápticas, fibroblastos, células cebadas, y condrocitos(13).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por medio de una familia de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) de las cuales se conocen tres isoformas cuyos nombres se deben al lugar donde fueron encontradas por primera vez; NOS neuronal (nNOS o NOS 1), inducible (iNOS o NOS 2), endotelial (eNOS o NOS3) (14) (Tabla 1).

Tabla 1 Propiedades de las tres isoformas de Oxido Nítrico Sintasa (NOS) (Adaptada de NO, NO y NO•: Oxido Nítrico en la Fisiología Vascular. Louis J. Ignarro)

PROPIEDADES	NOS I	NOS II	NOS III
Nombre	bNOS, cNOS, Nnos	iNOS, mNOS	eNOS
Tejido preferencial donde se expresa	Neuronal, epitelial.	Musculatura lisa, Macrofagos, etc.	Endotelio
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva/variable
Requerimientos de Ca ⁺⁺	Si	No	Si

Todos las NOS catalizan un proceso de oxidación-reducción en el que el átomo de nitrógeno del grupo guanidino de la arginina se oxida de -3 a $+2$ (el estado de oxidación formal del carbono no varía). El agente oxidante es el oxígeno molecular, cuyo estado de oxidación pasa de 0 a -2 . El proceso es complejo y requiere la participación de otros agentes como el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADPH), Flavina mononucleótido (FMN), Tetrahidrobiopterina (H4B2) y Flavina adenina dinucleótido (FAD) (15), como se puede ver en la Ilustración 2.

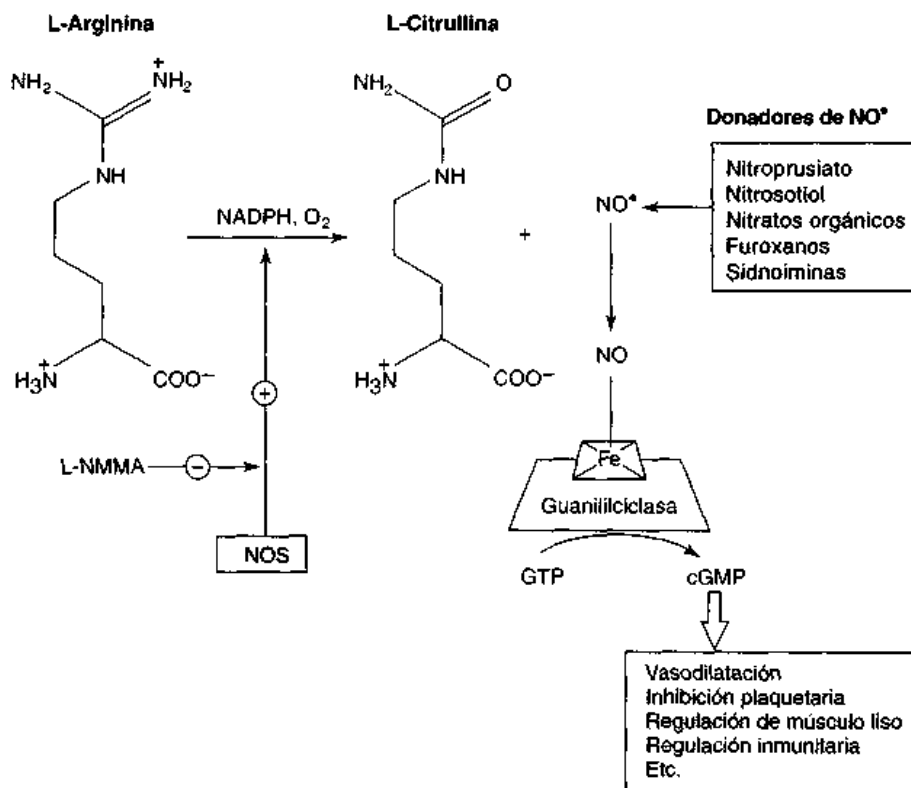


Ilustración 2 Generación de oxido nítrico a partir de l-arginina, de donadores de NO y formación de cGMP. (Adaptada de Katzung B, Farmacología básica y clínica. 9na edición 2004: 314)

La Oxido Nítrico Sintasa constitutiva (cNOS) se produce en condiciones fisiológicas constantemente y en pequeñas cantidades, su regulación es el calcio intracelular, es decir, es calcio calmodulina dependiente (16). Está presente siempre que se necesita una regulación permanente y delicada de un proceso fisiológico, por ejemplo el tono vascular o la neurotransmisión en circuitos especiales. El estímulo que hace expresar la cNOS puede ser de tipo químico como la Acetil colina, o de tipo mecánico como la pulsación de la arteria, o la presión de la sangre sobre el endotelio (17).

La iNOS típicamente no está presente en las células, se sintetiza en respuesta a estímulos intensos como las endotoxina o citoquinas inflamatorias (TNF, IL-1 Interferón gamma)(18). Esta puede producir una gran cantidad de Oxido Nítrico mil veces superiores a las normales, es Ca²⁺ calmodulina independiente. La activación de la iNOS es de mayor duración que la cNOS.

El NO producido difunde rápidamente al exterior pasando a través de las membranas celulares hacia las células musculares lisas vasculares adyacentes (19). También puede pasar por contacto de célula a célula a las plaquetas y ejercer así sus funciones biológicas, Una vez en estas células dianas del tipo de la célula muscular lisa o la plaqueta, activa a la Guanilato ciclasa soluble incrementando la producción GMPc (12;20). Este compuesto produce relajación vascular e inhibición de la actividad plaquetaria (14). El Oxido Nítrico se metaboliza rápidamente a nitrito y nitrato ya que la vida media en el ser humano es muy corta (unos pocos segundos en sangre) (21).

3.2.2. Antecedentes del Oxido Nítrico

La primera síntesis de NO fue reportada por Joseph Priestly (el descubridor del oxígeno) en 1790(15). La primera observación del papel biológico del NO fue en macrófagos y neutrófilos de roedores, se indujo la producción en cantidades significantes de nitrito y nitrato (los dos productos de oxidación del óxido nítrico) que se acumularon en el medio de cultivo(17). La segunda observación fue hecha por el Dr. Furchgott y el Dr. Zawadzki en 1980 usando preparaciones de musculatura lisa vascular. Ellos descubrieron que luego de la estimulación con acetilcolina o carbacol, el endotelio vascular producía un factor vasodilatante con una muy corta vida media el cual, a diferencia de las prostaciclina derivadas del endotelio, no era bloqueado por inhibidores de la ciclooxigenasa, y lo llamaron “Factor Relajante Derivado del Endotelio” (EDRF)(22). En 1987, comparando las propiedades farmacológicas y bioquímicas de este factor, tres grupos independientes reportaron que el óxido nítrico y el EDRF eran la misma molécula (23). Estudios posteriores demostraron que el NO era generado por muchos otros tipos de células y que se podía encontrar en casi todo tipo de tejido.

3.2.3. Vía del óxido nítrico GMPc

Esta vía de señalización ha sido el resultado de varias décadas de investigación y se describió después del descubrimiento del óxido nítrico y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) descubierto por Ashman en 1963, como producto de las Guanilato Ciclasas (GC), que sirven de receptores a ligandos como el óxido nítrico (NO) y los péptidos natriuréticos (PN)(24).

El óxido nítrico en el endotelio vascular en condiciones fisiológicas, se sintetiza enzimáticamente en respuesta a los estímulos de sustancias que circulan en la sangre y por el propio estiramiento de la arteria en cada latido, a partir del aminoácido L- arginina, por acción de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) en presencia oxígeno molecular, este proceso requiere la participación de otros agentes como el NADPH, FMN, H4B2 y FAD para producir L- citrulina y óxido nítrico(25;26;27;28).

Existen dos grandes vías de acción del óxido nítrico. Una de ellas implica la unión a la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) (29;30). La otra implica la actuación directa del óxido nítrico sobre proteínas, nitrosilándolas. La GCs es el receptor más importante del óxido nítrico en los seres vivos. Cuando esta enzima es activada por la unión de óxido nítrico, cataliza la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir de GTP en el interior de la célula (26;31;32;). A su vez, este nucleótido cíclico puede actuar como segundo mensajero por tres rutas de transducción intracelular diferentes: (a) la de las proteínas kinasas dependientes de GMPc (PKGs)(33); (b) la de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs)(34); y (c) la de los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos (CNGs)(35). Activando la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKGs) produce fosforilización proteica, disminución del calcio en el citosol, desfosforilización de la cadena liviana de la miosina y relajación muscular (36). A su vez el GMPc es degradado activamente por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) (Ilustración 3).

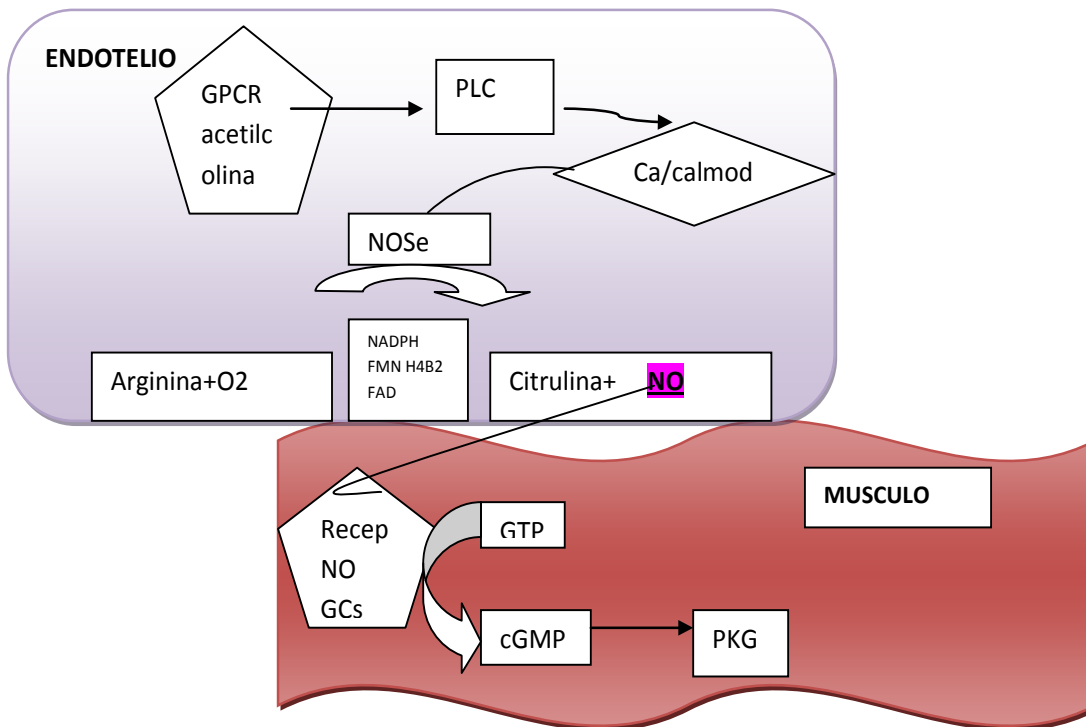


Ilustración 3 Vía de señalización NO/cGMP

En diversas patologías como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, envejecimiento, tabaquismo, disfunción eréctil e insuficiencia cardiaca entre otras se han observado alteraciones de la vía del óxido nítrico/GMP cíclico (30;34;38;37).

3.2.4. El óxido nítrico en el sistema vascular

El Oxido Nítrico es el responsable de que el tono basal del aparato circulatorio(15), los vasos se encuentran en un tono vasodilatador activo que a su vez se comporta como un importante regulador de la presión arterial (38). El NO sintetizado en el endotelio pasa a la capa muscular e induce relajación, con la vasodilatación consecuente. Existe normalmente una liberación basal continuada de Oxido Nítrico si esta liberación disminuye los vasos se cierran, disminuyendo el flujo sanguíneo de la zona afectada (39).

En la hipertensión arterial esencial, la aterosclerosis (16) y la miocardiopatía dilatada parece existir un déficit de Oxido Nítrico, que hace que los vasos presenten disfunción endotelial que no permite la vasodilatación (40;41). A pesar de que sustancias como la angiotensina y la norepinefrina (12) son aceptadas como las mayores responsables de la presión arterial, el Oxido Nítrico aparentemente es su principal regulador.

Las células endoteliales, sintetizan óxido nítrico como relajante muscular y lo hacen en respuesta a los estímulos de sustancias que circulan en la sangre y por el propio estiramiento de la arteria en cada latido, el pulso (42). Una vez producido, este gas se transmite a la parte muscular de la arteria y activa la vía de señalización del NO/GMPc produciendo vasodilatación. El NO tiene una vida media corta, que hace necesario un aporte continuo por parte de las células como respuesta a las fuerzas de cizalla del flujo sanguíneo sobre la pared arterial (43). A su vez este aporte de NO puede ser bloqueado a diferentes niveles de esta vía ya sea por fármacos conocidos y utilizados con fines terapéuticos o de investigación como también por factores fisiopatológicos. (Ilustración 4)

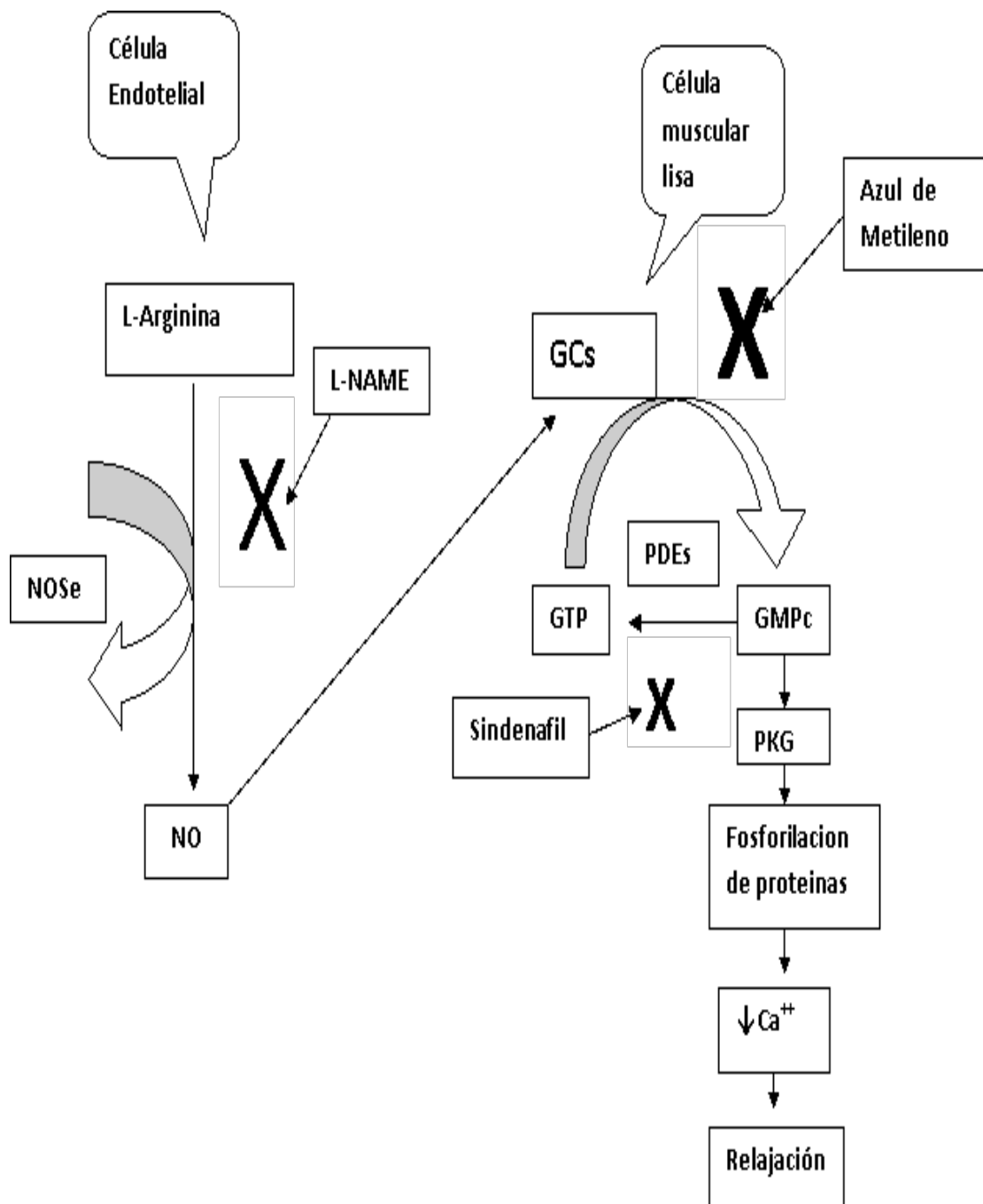


Ilustración 4 Esquema sobre la producción de óxido nítrico y blancos terapéuticos de algunos fármacos

3.2.5. Otras funciones fisiológicas del Oxido Nítrico

El Oxido Nítrico inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria in vivo a través de activación de la guanilato ciclasa soluble, formando GMPc (41;44). También es medidor de los mecanismos de defensa del huésped, los macrófagos activados forman citrulina y Oxido Nítrico a partir de L-arginina, bajo efecto de la iNOS y esto se asocia con un incremento de la citotoxicidad de estas células. Esta toxicidad se ha comprobado contra células tumorales y contra parásitos (45).

En el sistema nervioso actúa como neurotransmisor y como mediador de las acciones del glutamato en los niveles cerebrales de GMPc (46). Parece ser un elemento indispensable para la fijación de la memoria actuando en los procesos de aprendizaje y los mecanismos neurológicos de sueño (47). Una vez adquiridos los conocimientos la inhibición de la NOS no afecta su memorización.

En el aparato respiratorio se ha demostrado la existencia de vías nerviosas con terminaciones que liberan Oxido Nítrico a nivel bronquial que constituyen la única vía nerviosa broncodilatadora (48).

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

El material vegetal: tallos y hojas de *Croton Schiedeanus* (“almizclillo”) se recogió de la región de Tocaima (Cundinamarca). La identificación de la especie fue hecha por el profesor José Luis Fernández, mediante comparación con el ejemplar que reposa en herbario nacional colombiano con código 43216. El extracto etanólico se preparó calentando el material vegetal en horno de aire a 40°C, triturando en molino el material seco obtenido, percolando exhaustivamente con etanol (96%) para extraer y concentrando con rotavapor. El flavonoide ayanina (quercetina 3,4',7-trimetil éter), aislado de *C. Schiedeanus*, fue suministrada por el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. Las alícuotas del extracto etanólico de *Crotón Schiedeanus* Schlecht y ayanina se prepararon en dimetilsulfósido (DMSO).

Todos los fármacos (Tabla 2) utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Se prepararon disoluciones concentradas (0.01; 0,1 o 1 M) de todos los fármacos, se congelaron las alícuotas (-20°C) y se conservaron hasta el momento de su utilización. En el momento del experimento las alícuotas se descongelaron y se diluyeron con solución Krebs o agua destilada hasta obtener la concentración deseada en cada experimento.

Tabla 2 Fármacos utilizados y su mecanismo de acción

FARMACO	MECANISMO DE ACCIÓN
Cloruro de potasio (KCl)	Agonista despolarizante de membrana por activación de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes(12)
Fenilefrina (FE)	Agonista de los receptores α -adrenérgicos(12;13;14)
Acetilcolina (Ach)	Relajante de musculo liso vascular dependiente de endotelio mediado por receptor muscarínico(12;17)
NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)	Inhibidor no selectivo de la NOS(12)
Azul de metileno	Inhibidor de la guanilato-ciclasa soluble(13)
Indometacina	Inhibidor de la ciclooxigenasa(12;13;17)
Atropina	Antagonista competitivo de la acetilcolina a nivel de receptores muscarínicos(13)
Propranolol	Bloquea los receptores adrenérgicos β_1 (17).
Cloruro de Calcio (CaCl)	El aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ sarcoplásmico activa la cinasa de las cadenas ligeras de miosina que permite la contracción del músculo liso (17).

Los animales, previa anestesia profunda con éter, se sacrificaran por decapitación para extraer la arteria aorta desde el diafragma hasta el cayado aórtico. El vaso se colocó en una caja de petri que contenga solución Krebs (NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, Glucosa 11.1 y ácido ascórbico 0.1) gaseada con carbógeno (CO_2 : 95%, O_2 : 5%), se limpió eliminando el tejido

conectivo y graso que la rodea y se cortó posteriormente en anillos de 3 a 4 mm de longitud.

4.2 Procedimiento Experimental

Los anillos se colocaron en un sistema en serie de baños de órganos (ocho unidades) que contenían 10 mL de solución Krebs a 37°C, pH: 7,4 y burbujeo continuo de carbógeno. Cada anillo se fijó mediante finos alambres de acero inoxidable, por su extremo inferior a la base del baño y por su extremo superior a un transductor isométrico acoplado al sistema de amplificación de señal y de registro computarizado (lab trax, WPI®). Los anillos se sometieron a una tensión de base de dos gramos, desplazando el transductor verticalmente con un microposicionador acoplado a él. Se dejó un período de estabilización aproximado de 60 minutos, efectuando cambios de la solución nutritiva cada 15 minutos y ajustando la tensión de base cuando sea necesario. (Ilustración 5 y 6)

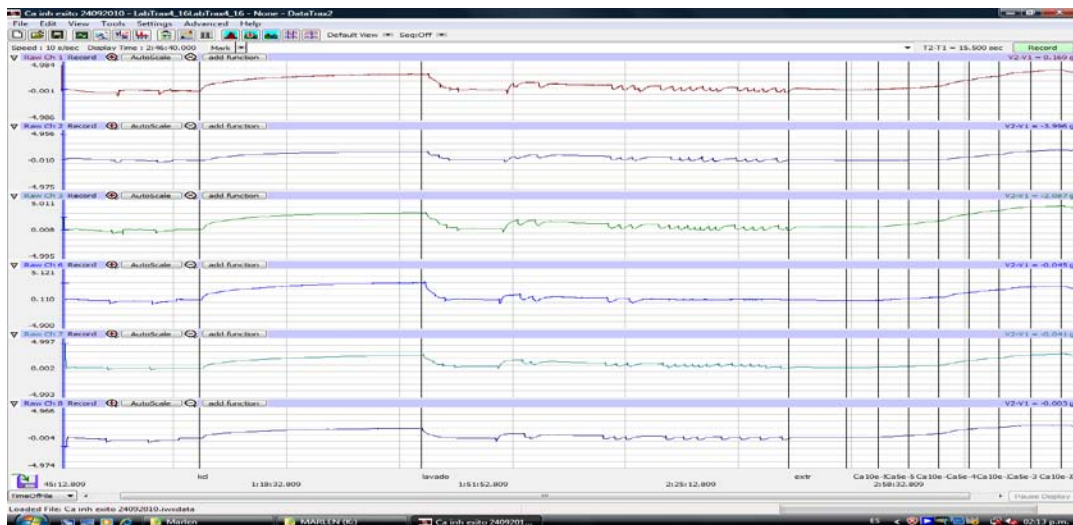


Ilustración 5 Registro computarizado de contracción de anillos de aorta de rata

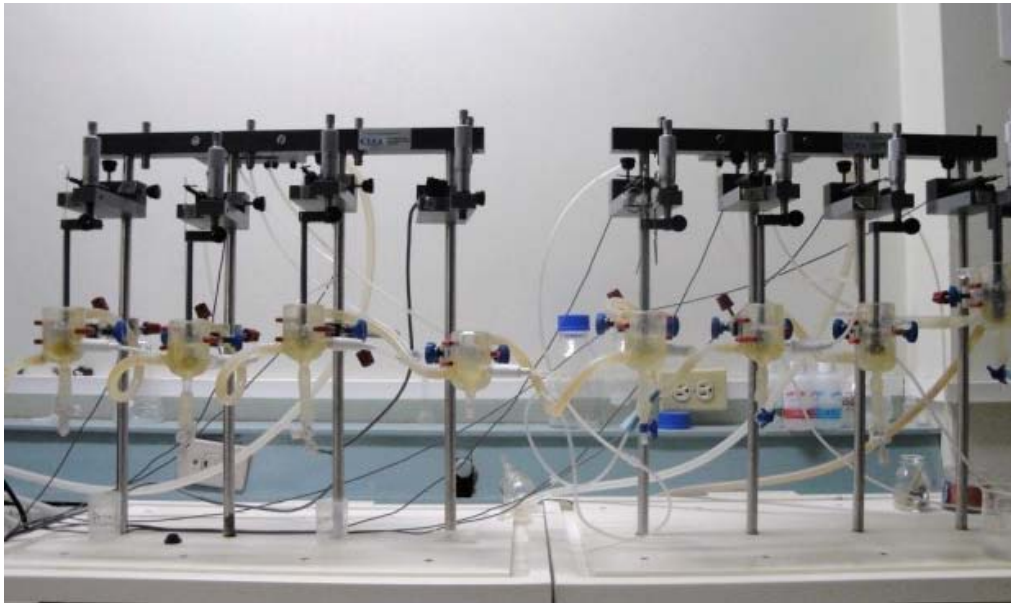


Ilustración 6 Sistema en serie de baños de órganos con amplificador de señal y de registro computarizado (lab trax, WPI®).

Tras el periodo de estabilización y para verificar la integridad de los anillos, se incorporó a cada baño KCl (80 mM) hasta que la respuesta alcance un valor estable de contracción (fase de meseta), momento en que se adicionó acetilcolina (10^{-5} M). Los anillos cuya contracción no sea adecuada con KCl (> 800 mg) o cuya relajación sea insuficiente con acetilcolina ($>30\%$) se descartaron del experimento. Alcanzada la fase de meseta se lavó la preparación con solución nutritiva hasta que la contracción descienda a la tensión de base. Es entonces cuando se procede a examinar el posible papel que desempeña el óxido nítrico en los efectos vasculares inducidos por *C. Schiedeanus* y por ayanina a través de los siguientes protocolos:

1. Para verificar si *C. Schiedeanus* y/o ayanina ejercen mecanismos predominantemente de tipo antiadrenérgico alfa o antagonista de canales de calcio dependientes de voltaje, y su relación con la producción de óxido nítrico, después del periodo de estabilización se incorporó a cada baño KCl 80 mM o fenilefrina 10^{-6} M hasta que la respuesta alcanzó un valor estable de contracción (fase de meseta).

Entonces se adicionaron al baño de manera acumulativa concentraciones crecientes del extracto etanólico *C. Schiedeanus*, (10^{-7} - 3×10^{-4} M) a intervalos de tiempo suficientes (10 minutos) para obtener una relajación estable con cada concentración.

En los anillos controles se aplicó DMSO (<0,01%), vehículo en el que se disolvieron el extracto y el flavonoide. Esto permitió verificar que en estos anillos, la incorporación al baño de órganos de altas concentraciones de KCl (80 mM) o FE (10^{-6} M) produjo una contracción sostenida, que una vez estabilizada se mantuvo sin cambios significativos de tensión a lo largo de todo el experimento (120 minutos).

También se estimularon anillos con concentraciones acumulativas (administradas en intervalos de 10 minutos), de fenilefrina (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} M) en presencia y en ausencia del extracto o de ayanina (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} g/mL) buscando inhibir la contracción producida por fenilefrina administrada en concentraciones crecientes.

2. De modo análogo y para examinar el posible efecto sobre la síntesis de óxido nítrico, se aplicó un protocolo similar con fenilefrina en presencia de L-NAME (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-12} , 10^{-14} M, inhibidor de la NOS) más el extracto.

3. Para examinar el posible efecto sobre la producción del GMPc se aplicó un protocolo similar, esta vez en presencia de azul de metileno (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-12} , 10^{-14} M, inhibidor de la guanilato ciclasa) más el extracto.

4. Para examinar la posible participación de prostaglandinas, se aplicó un protocolo similar en presencia de indometacina (10^{-6} M), inhibidor de ciclooxigenasa, más el extracto.

5. Para examinar la posible participación de mecanismos muscarínicos, se aplicó un protocolo con atropina (3×10^{-5} M), antagonista muscarínico.

6. Para examinar la posible participación de mecanismos beta adrenérgicos, se aplicó un protocolo con propranolol (10^{-6} M), antagonista beta.

7. Por último, para evaluar posibles interacciones con calcio, los anillos se expusieron a una solución de Krebs desprovista de calcio (KCl 60, NaCl 60, NaHCO_3 25.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, Glucosa 11.1 y ácido ascórbico 0.1), a la que se adicionó CaCl_2 en concentraciones crecientes (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 5×10^{-2} M).

4.3 Expresión y análisis de resultados

Los datos se expresan en términos de porcentaje con respecto a la magnitud alcanzada por los anillos en fase de meseta. Las curvas se obtuvieron graficando el logaritmo de la concentración en el eje de las abscisas y el porcentaje de contracción en el eje de las ordenadas. Cada punto representará el promedio y las barras de error, los valores de dispersión (error promedio estándar: ems). Se efectuó un análisis de varianza en cada punto de concentración y posteriormente la prueba de diferencias múltiples de Dunnett de acuerdo la prueba de homogeneidad de varianzas. Se asumió como significativa una $p \leq 0,05$. Se efectuó un análisis de regresión semilogarítmica para obtener la concentración efectiva 50 (CE_{50}) tanto de fenilefrina como de KCl, con sus respectivos intervalos de confianza. Igualmente se examinó cómo se afecta la CE_{50} de fenilefrina en presencia de los fármacos y sustancias mencionados en los protocolos anteriores, que sirvieron de base para la obtención de la constante de potencia del antagonista ($\text{pD}'2$) de L- NAME y Azul de Metileno. Los programas Excel[®] y SPSS[®] se utilizaron para el procesamiento y análisis de datos.

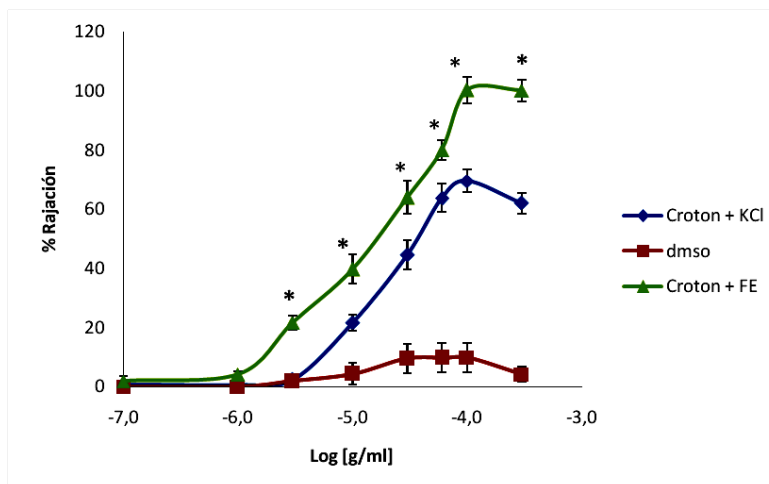
5. RESULTADOS

5.1 Efectos del extracto de *C. Schiedeanus* sobre la contracción de FE (10^{-6} M) y KCl (80 mM).

La acción relajante vascular inducida por *C. Schiedeanus* sobre anillos de aorta de rata íntegros es mayor cuando la contracción es producida por FE que cuando es producida por KCl. Se aprecian diferencias a partir de 3×10^{-6} g, el efecto máximo (E_{\max}) para FE es $100 \pm 3,6\%$ y el E_{\max} para KCl es de $70 \pm 3,4\%$, con una diferencia del 30%. La CE_{50} de *C. Schiedeanus* en anillos precontraídos con FE es de $1,3 \times 10^{-5}$ ($9,1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$) y 3 veces mayor para los contraídos con KCl CE_{50} de $3,7 \times 10^{-5}$ ($1,6 \times 10^{-5} - 8,2 \times 10^{-5}$) (Tabla 3) (Gráfica 1).

Tabla 3 Valores de concentración efectiva 50 (CE_{50}) con su respectivo intervalo de confianza, límite superior (L.S.), límite inferior (L.I.) y porcentaje de efecto máximo (E_{\max}) de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10^{-6} M) o KCl (80 mM).

<i>C. Schiedeanus</i>	CE_{50}	L.I. CE_{50}	L.S. CE_{50}	E_{\max} (%)
KCl	$3,7 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-5}$	$70 \pm 3,4\%$,
FE	$1,3 \times 10^{-5}$	$9,1 \times 10^{-6}$	2×10^{-5}	$100 \pm 3,6\%$



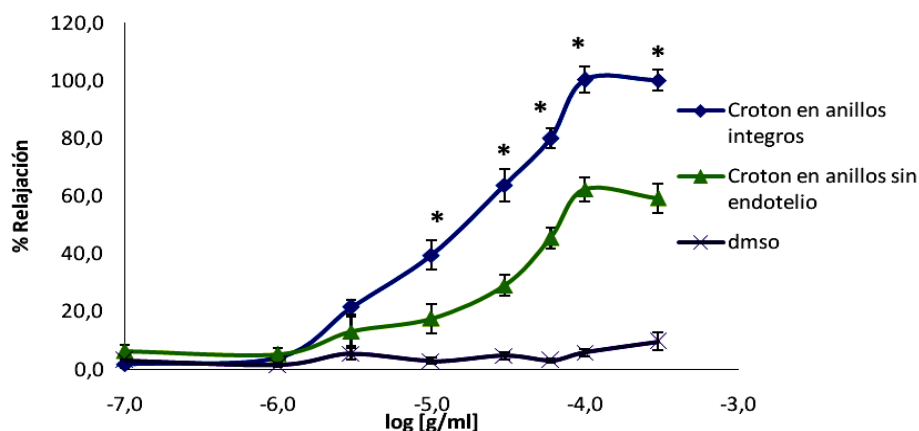
Gráfica 1 Curvas acumulativas de relajación de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10^{-6} M) o con KCl (80 mM). Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de al menos 5 anillos, * $p < 0,05$ de *C. Schiedeanus* -FE con respecto a *C. Schiedeanus* -KCl

5.2 Efectos del extracto de *C. Schiedeanus* sobre la contracción de FE (10^{-6} M) en anillos con endotelio (E^+) y sin endotelio (E^-)

C. Schiedeanus relaja la contracción de FE de una forma concentración-dependiente hasta un máximo de 100% con una concentración 10^{-4} M con una CE_{50} de $1,3 \times 10^{-5}$ ($9,1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$). La eliminación del endotelio disminuye la capacidad de relajación de *C. Schiedeanus*, alcanzándose en este caso un máximo de relajación de 62% con 10^{-4} M y un valor de CE_{50} de $3,3 \times 10^{-5}$ ($1,8 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-5}$) (tabla 4) (Grafica 2).

Tabla 4 Valores de concentración efectiva 50 (CE_{50}) con su respectivo intervalo de confianza, límite superior (L.S.), límite inferior (L.I.) y porcentaje de efecto máximo (E_{max}) de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta con y sin endotelio previamente contraídos con FE (10^{-6} M).

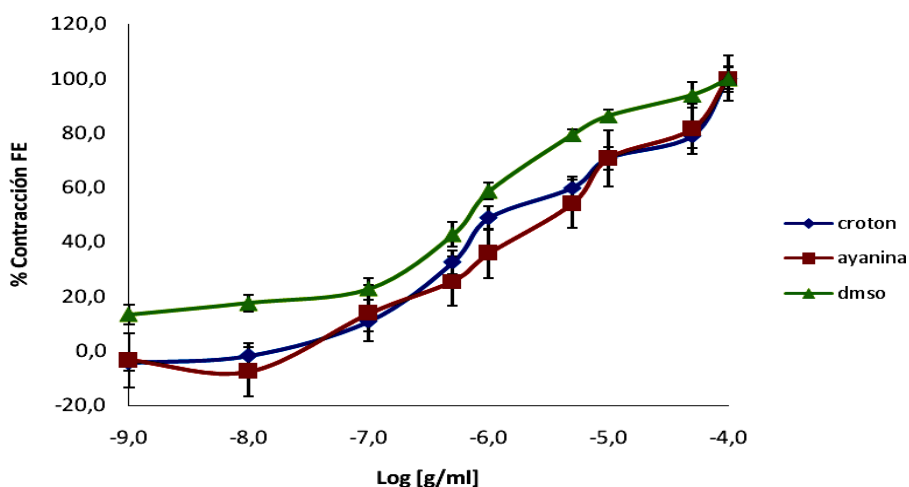
<i>C. Schiedeanus</i>	CE_{50}	L.I. CE_{50}	L.S. CE_{50}	E_{max} (%)
FE (E^+)	$1,3 \times 10^{-5}$	$9,1 \times 10^{-6}$	2×10^{-5}	$100 \pm 3,6\%$
FE (E^-)	$3,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$	6×10^{-5}	$62 \pm 2,2 \%$



Gráfica 2 . Curvas acumulativas de relajación de *C. Schiedeanus* y Control (DMSO) en anillos de aorta con y sin endotelio contraídos con FE (10⁻⁶ M). Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de al menos 5 anillos, $p < 0,05$ con respecto a DMSO.

5.3 Efectos del extracto de *C. Schiedeanus* y ayanina en la inhibición de contracción producida por concentraciones acumulativas de FE (10⁻⁹ - 10⁻⁴ M)

No se observan diferencias significativas en la acción *C. Schiedeanus* y ayanina sobre la inhibición de la contracción vascular producida por FE (Gráfica 3).



Gráfica 3 Curvas acumulativas de contracción de FE en anillos de aorta íntegros en presencia y en ausencia del extracto de *C. Schiedeanus* y el flavonoide ayanina. Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de al menos 5 anillos.

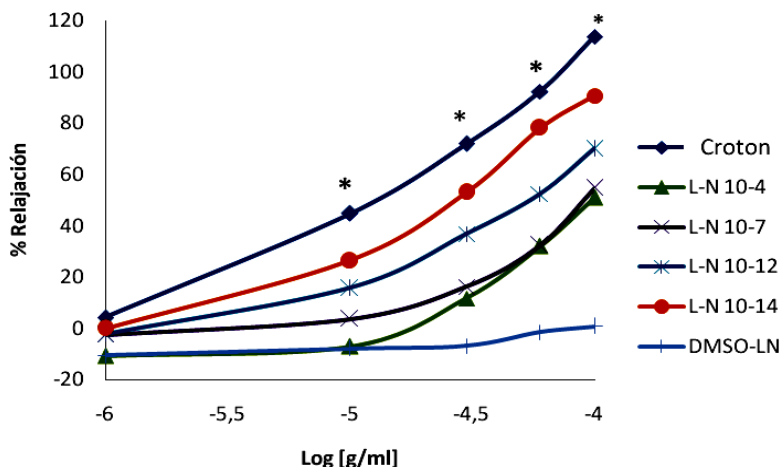
5.4 Mecanismos de acción de *C. Schiedeanus*

5.4.1 Utilización de L-NAME: La acción relajante vascular de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros precontraídos con FE e incubados previamente con L-NAME (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-12} , 10^{-14} M) es significativamente revertido con concentraciones de L-NAME mayores a 10^{-12} M. (Gráfica 4).

C. Schiedeanus relaja la contracción de FE en presencia de L-NAME 10^{-4} hasta un máximo de $51 \pm 4,6$ % con CE_{50} de 1×10^{-4} ($5,2 \times 10^{-5} - 1,9 \times 10^{-4}$), L-NAME 10^{-7} hasta un máximo de $54,6 \pm 5,2$ % con CE_{50} de $4,5 \times 10^{-5}$ ($1,3 \times 10^{-5} - 1,5 \times 10^{-5}$), L-NAME 10^{-12} hasta un máximo de $70,1 \pm 5,1$ % con CE_{50} de $2,9 \times 10^{-5}$ ($7,8 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-4}$), L-NAME 10^{-14} hasta un máximo de $90,8 \pm 2,4$ % con CE_{50} de $2,3 \times 10^{-5}$ ($6 \times 10^{-6} - 8,7 \times 10^{-5}$) cercano al efecto obtenido en ausencia de L-NAME (100%) y se obtuvo $pD'2$ de 6,8 (31-38). (Tabla 5) (Gráfica 4).

Tabla 5 Valores de concentración efectiva 50 (CE50), con su respectivo intervalo de confianza, límite superior (L.S.), límite inferior (L.I.) y porcentaje de efecto máximo (Emax) de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia de diferentes concentraciones de L-NAME (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-12} , 10^{-14} M).

<i>C. Schiedeanus</i>	CE_{50}	L.I. CE_{50}	L.S. CE_{50}	E_{max} (%)
FE + L-NAME 10^{-4}	1×10^{-4}	$5,2 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$54,6 \pm 5,2$ %
FE + L-NAME 10^{-7}	$4,5 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$62 \pm 2,2$ %
FE + L-NAME 10^{-12}	$2,9 \times 10^{-5}$	$7,8 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$70,1 \pm 5,1$ %
FE + L-NAME 10^{-14}	$2,3 \times 10^{-5}$	6×10^{-6}	$8,7 \times 10^{-5}$	$90,8 \pm 2,4$ %



Gráfica 4 Curvas acumulativas de relajación de *C. Schiedeanus* y DMSO (Control) en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10⁻⁶ M) y en presencia de L-NAME (10⁻⁴, 10⁻⁷, 10⁻¹², 10⁻¹⁴ M). Cada punto representa el promedio ± e.m.s. de al menos 5 anillos, *p<0.05

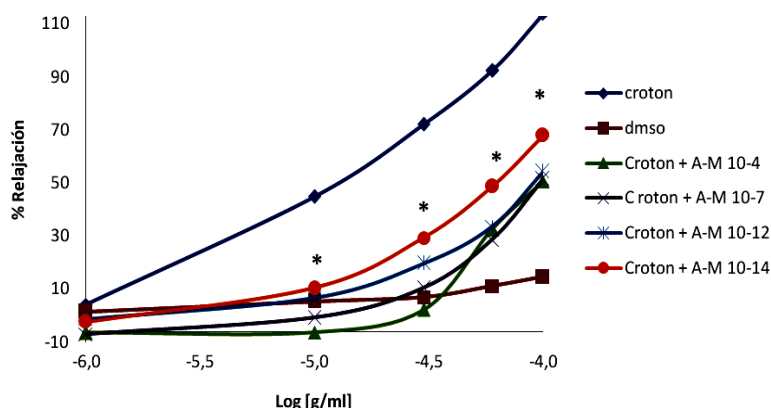
5.4.2 Utilización de Azul de Metileno

La acción relajante vascular de *C. Schiedeanus* en anillos precontraídos con FE e incubados previamente con Azul de Metileno (10⁻⁴, 10⁻⁷, 10⁻¹², 10⁻¹⁴ M) es significativa a partir de concentraciones 10⁻⁵ M. (Gráfica 5).

C. Schiedeanus relaja la contracción de FE en presencia de Azul de Metileno 10⁻⁴ hasta un máximo de 50,5 ± 4,6 % con CE₅₀ de 5,2 x 10⁻⁵ (3,6 x 10⁻⁵ – 7,5x10⁻⁵), Azul de Metileno 10⁻⁷ hasta un máximo de 51 ± 3,9 % con CE₅₀ de 5 x 10⁻⁵ (1,8 x 10⁻⁵ – 1,3x10⁻⁴), Azul de Metileno 10⁻¹² hasta un máximo de 54,3 ± 4,1 % con CE₅₀ de 4,2 x 10⁻⁵ (9,1 x 10⁻⁶ – 1,9x10⁻⁴), Azul de Metileno 10⁻¹⁴ hasta un máximo de 67,8 ± 2,6 % con CE₅₀ de 2,8 x 10⁻⁵ (1,4 x 10⁻⁵ – 5,7x10⁻⁵) menor al efecto obtenido en ausencia de Azul de Metileno (100%) con pD'2 12,4 (11,1-23,5). (Tabla 6)(Gráfica 5).

Tabla 6 Valores de concentración efectiva 50 (CE₅₀) con su respectivo intervalo de confianza, límite superior (L.S.), límite inferior (L.I.) y porcentaje de efecto máximo (E_{max}) de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros contraídos con FE (10⁻⁶ M) en presencia de diferentes concentraciones de Azul de Metileno (10⁻⁴, 10⁻⁷, 10⁻¹², 10⁻¹⁴ M).

<i>C. Schiedeanus</i>	CE ₅₀	L.I. CE ₅₀	L.S. CE ₅₀	E _{max} (%)
FE + A-M 10 ⁻⁴	5,2 x10 ⁻⁵	3,6 x 10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁵	50,5 ± 4,6 %
FE + A-M 10 ⁻⁷	5 x10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁵	51 ± 3,9 %
FE + A-M 10 ⁻¹²	4,2 x10 ⁻⁵	9,1 x 10 ⁻⁶	1,9x10 ⁻⁴	54,3 ± 4,1 %
FE + A-M 10 ⁻¹⁴	2,8 x10 ⁻⁵	1,4 x10 ⁻⁵	5,7x10 ⁻⁵	67,8 ± 2,6



Gráfica 5 Curvas acumulativas de relajación de *C. Schiedeanus* y DMSO (Control) en anillos contraídos con FE (10⁻⁶ M) y en presencia de Azul de Metileno (10⁻⁴, 10⁻⁷, 10⁻¹², 10⁻¹⁴ M). Cada punto representa el promedio ± e.m.s. de al menos 5 anillos, p<0.05

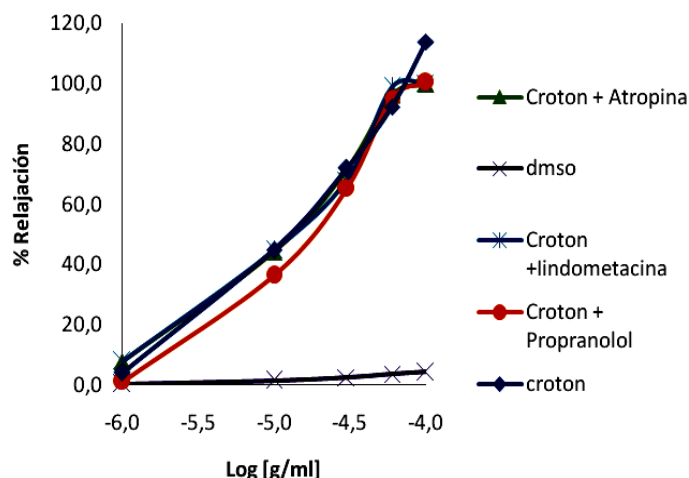
5.4.3 Utilización de Atropina, Indometacina, Propranolol.

La acción relajante vascular de *C. Schiedeanus* en anillos precontraídos con FE e incubados previamente con Atropina (3x10⁻⁵ M), Indometacina (10⁻⁶ M), y Propranolol (10⁻⁶ M) no mostro diferencias significativas con respecto a la relajación inducida por *C. Schiedeanus* en ausencia de estos compuestos.

C. Schiedeanus relaja la contracción de FE en presencia de Atropina (3×10^{-5} M) hasta un máximo de $99,8 \pm 1,1$ %, con CE_{50} de $9,1 \times 10^{-6}$ ($5,6 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-5}$) Indometacina (10^{-6} M), hasta un máximo de $100 \pm 1,8$ %, con CE_{50} de $9,1 \times 10^{-6}$ ($5 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-5}$) y Propranolol (10^{-6} M), un máximo de $100 \pm 0,8$ % con CE_{50} de $1,2 \times 10^{-5}$ ($6,3 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-5}$) similares al efecto obtenido en ausencia de dichos compuestos (100%). (Tabla 7) (Gráfica 6).

Tabla 7 Valores de concentración efectiva 50 (CE_{50}) con su respectivo intervalo de confianza, límite superior (L.S.), límite inferior (L.I.) y porcentaje de efecto máximo (E_{max}) de *C. Schiedeanus* en anillos de aorta íntegros previamente contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia de Atropina (3×10^{-5} M) Indometacina (10^{-6} M) y Propranolol (10^{-6} M)

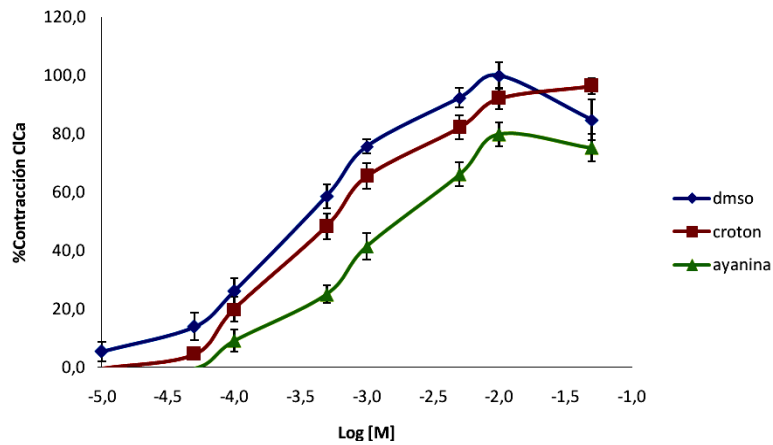
<i>C. Schiedeanus</i>	CE_{50}	L.I. CE_{50}	L.S. CE_{50}	E_{max} (%)
Atropina	$9,1 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$99,8 \pm 1,1$ %
Indometacina	$9,1 \times 10^{-6}$	5×10^{-6}	$1,7 \times 10^{-5}$	$100 \pm 1,8$ %
Propranolol	$1,2 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$100 \pm 0,8$ %



Gráfica 6 Curvas acumulativas de relajación de *C. Schiedeanus* y DMSO (Control) en anillos contraídos con FE (10^{-6} M) en presencia de Atropina (3×10^{-5} M), Indometacina (10^{-6} M), y Propranolol (10^{-6} M). Cada punto es el promedio \pm e.m.s. de al menos 5 anillos.

5.4.4 Utilización de Cloruro de Calcio (CaCl_2)

No se observan diferencias significativas en la acción *C Schiedeana* y ayanina sobre la inhibición de la contracción vascular producida por CaCl_2 (Gráfica 7).



Gráfica 7 Curvas acumulativas de contracción de CaCl_2 en anillos de aorta en presencia y en ausencia del extracto de *C Schiedeana* y ayanina. Cada punto representa el promedio \pm e.m.s. de al menos 5 anillos. * $p < 0.05$ con respecto a DMSO.

6. DISCUSIÓN

La evaluación de los efectos del extracto de *Croton Schiedeanus* Schlecht sobre la producción de óxido nítrico realizada en este trabajo se basó en los resultados de actividad relajante vascular obtenidos con anterioridad (3;4). El extracto etanólico de *C. Schiedeanus* tiene la capacidad de disminuir las cifras de tensión arterial y frecuencia cardíaca en función de la dosis en ratas normotensas e hipertensas administrado por vía intravenosa, además ha probado su actividad vasodilatadora en anillos aislados de aorta de rata precontraídos con KCl y FE(4).

Era por tanto interesante continuar el estudio farmacológico de este extracto y ayanina uno de los flavonoides aislados *C. Schiedeanus* para acercarnos a un posible mecanismo de acción, tarea realizada en este trabajo.

La contracción producida por KCl proporciona un método sencillo para estudiar fármacos con posibles propiedades bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , Altas concentraciones de potasio extracelular producen contracciones tónicas sostenidas en aorta de rata por despolarización de la membrana de las células musculares lisas, incrementando el flujo de calcio a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo L y de tipo T, lo cual, a su vez, activa la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplásmico (49;50).

En cambio, la contracción sostenida que se obtiene con fenilefrina se produce por activación de adrenoreceptores tipo postsinápticos, con dos componentes claramente diferenciados. El primer componente es una contracción fásica que ocurre de forma rápida y transitoria que se produce por la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares mediada por la activación de receptores específicos para inositol trifosfato (IP₃), el segundo componente consiste en una contracción lenta y sostenida (contracción tónica) que se debe a la entrada de Ca^{2+} a través de canales "operados por receptor" y por otros mecanismos (51;52).

La contracción del músculo liso vascular inducida por concentraciones acumulativas de calcio pueden ser resumidos de la siguiente manera: antes de que haya la presencia de calcio libre en el sarcoplasma, la tropomiosina recubre los sitios de unión de la miosina ubicados en la actina. El calcio aparece en el sarcoplasma y se une a los sitios de unión del calcio ubicados en la Troponina C. Se dan cambios conformacionales en la troponina lo cual mueve a la molécula de tropomiosina, y descubre los sitios de unión para la miosina en las subunidades de actina. Los sitios de unión ahora están expuestos y disponibles para interactuar con las cabezas de miosina. El retiro de calcio del sarcoplasma restablece los estados conformacionales iniciales de la troponina y la tropomiosina lo cual previene la interacción entre la actina y la miosina, resultando en un estado de relajación (53;54).

La relajación inducida por *C. Schiedeanus* en anillos precontraídos con FE es concentración-dependiente y la eliminación del endotelio disminuye su capacidad relajante en un 38 %, (Grafica 2), significando esto que la actividad vasorelajante de este extracto es parcialmente dependiente de endotelio. Siendo estos resultados concordantes con los reportados con anterioridad en la literatura (3; 4)

La acción relajante vascular es mayor cuando la contracción es producida por FE que cuando es producida por KCl, sugiriendo que la acción relajante de *C. Schiedeanus* puede estar más vinculada con movilización de calcio intracelularmente estimulada de manera indirecta por diferentes mecanismos, que sobre canales de calcio voltaje dependientes. (Grafica 1)

Después de probar la capacidad relajante del extracto de crotón *Schiedeanus* en anillos pre contraídos con FE, tratamos de probar si este extracto y uno de sus compuestos flavonoides ayanina, inhibían la contracción inducida por concentraciones acumulativas de FE, pre incubando los anillos con el extracto y el flavonoide antes de someterlos a FE, sin observar diferencias significativas con

respecto al control con ninguno de los tratamientos. Esto sugiere que es necesario un estado de vasoconstricción previo para que *C. Schiedeana* induzca relajación de músculo liso vascular. (Gráfica 3)

En cuanto a la síntesis de óxido nítrico nuestros resultados demuestran que la incubación previa de las arterias con L-NAME (10^{-4} M) reduce la capacidad relajante de extracto de *C. Schiedeana* con respecto a la relajación obtenida sin el antagonista (Gráficas 4), pero al disminuir paulatinamente la concentración de L-NAME (10^{-7} 10^{-12} 10^{-14}), el efecto del antagonista disminuye siendo estadísticamente no significativo en esta última concentración (10^{-14}). En trabajos anteriores (3; 4; 5; 6) se observó un efecto significativo de L-NAME (10^{-4} M) en la reversión de la relajación inducida por *C. Schiedeana*. Sugiriendo que el efecto relajante endotelio-dependiente del extracto podría estar relacionado con la síntesis de NO.

En relación con la enzima guanilato ciclasa soluble se sabe que el NO ejerce su efecto vasodilatador después de actuar sobre esta enzima activándola para aumentar la formación de GMPc (55). Para investigar si el extracto de *C. Schiedeana* interviene en la vía de NO/GMPc afectando a la enzima guanilato ciclasa soluble se utilizó azul de metileno, un inhibidor de la enzima.

La incubación previa con azul de metileno (10^{-4}) antagoniza de manera importante la relajación del extracto de *C. Schiedeana*, al disminuir la concentración (10^{-7} 10^{-12} 10^{-14}) el efecto del antagonista disminuye, pero continua siendo estadísticamente significativo en esta última concentración (10^{-14}) (gráfica 5). Lo anterior confirma la participación de la vía NO/GMPc en la relajación vascular inducida por *C. Schiedeana* en anillos de aorta de rata.

En nuestros resultados las curvas muestran que, concentraciones bajas de Azul de Metileno con respecto a L-NAME, son capaces de revertir los efectos relajantes de *C. Schiedeana*, sugiriendo esto que la relajación inducida por este extracto

estaría mayormente vinculada con mecanismos alrededor de la GCs y el GMPc en adición a aquellos que resulten del incremento en la actividad del NO.

En cuando a los efectos sobre el calcio, la preincubación de los anillos con el extracto de *C. Schiedeana* y ayanina no modifico significativamente la contracción inducida por calcio. Esto sugiere que la relajación inducida por el extracto y el flavonoide no está relacionada con antagonismo del calcio. (Grafica 7).

Para examinar la posible participación de mecanismo endotelio-independientes, se utilizo indometacina (10^{-6} M), un inhibidor de ciclooxigenasa, atropina (3×10^{-5} M), antagonista muscarínico, y propranolol (10^{-6} M), antagonista beta. Nuestros resultados mostraron que la incubación previa con estos compuestos no influye significativamente en la relajación inducida por *C. Schiedeana* en anillos contraídos con FE, sugiriendo que el efecto relajante de este extracto no se relaciona con estos mecanismos. (Grafica 6).

7. CONCLUSIONES

Crotón Schiedeanus ejerce efectos relajantes que son predominantemente endotelio-dependientes, no asociados a mecanismos muscarínicos, beta adrenérgicos o asociados a prostaglandinas vasodilatadoras, y tampoco son predominantemente dependientes del antagonismo del calcio.

Se confirma que tales mecanismos están especialmente relacionados con la vía NO/GMPc, aunque el aumento de la actividad del NO no se puede descartar, los estudios realizados en este trabajo sugiere que la principal actividad presente en *C. Schiedeanus* estaría sobre dianas farmacológicas mas allá del NO; concretamente la GCs y el GMPc.

Dada la potencia de la actividad relajante de esta especie y la importancia de la ruta metabólica del GMPc y la GCs relacionados no solamente con la HTA sino también con la aterosclerosis y la agregación plaquetaria, esta especie podría considerarse promisorio para obtener un fitoterapéutico

8. BIBLIOGRAFÍA

¹ Correa J. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andres Bello. Santa Fe de Bogotá, D.C[2], 14-322. 1992.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

² Garcia H. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia[2], 87-91. 1975.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

³ Guerrero MF, Carron R, Martin ML, San RL, Reguero MT. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeianus* Schlecht in rats. *J Ethnopharmacol* 2001 Apr;75(1):33-6.

⁴ Guerrero MF, Puebla P, Carron R, Martin ML, Arteaga L, Roman LS. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2002 Apr;80(1):37-42.

⁵ Correa S. Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Acción Relajante Vasculare de *Croton Schiedeianus* Schlecht Tesis de Grado Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Departamento de Farmacia; 2004.

⁶ Guerrero MF, Puebla P, Carron R, Martin ML, San RL. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeianus* Schlecht. *J Pharm Pharmacol* 2002 Oct;54(10):1373-8.

⁷ Duarte J, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Inhibitory effects of quercetin and staurosporine on phasic contractions in rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1994;262:149-56.

⁸ Novoa B, Céspedes Morales Alix Carmenza. Estudio de los flavonoides responsables de la acción hipotensora del *Croton Glabellus* Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia Bogotá; 1983.

-
- ⁹ Jaramillo P. Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas. Grant de investigación de laboratorios Pfizer., editor. 5ta, 59-69. 2001. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- ¹⁰ Sanchez D, Villanueva G, Sosa C, orjuela D, Ortega J, Ortega A, et al. Oxido nítrico en sistema nervioso central. Neuronas nitrérgicas. Revista de neurología,neurocirugía y psiquiatría 2004 Apr;73-8.
- ¹¹ Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M. NO signals in the haze Nitric oxide signalling in plant defence. Current Opinion in Plant Biology 2009;12:451-8.
- ¹² Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman A, Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill Interamericana, editor. 11va, 789-800. 2007. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- ¹³ Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M, Portoles A. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. Editorial Médica Panamericana, editor. 18a, 73-78. 2008. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- ¹⁴ Tousoulis D, Antoniades C, Koumallos N, Marinou K, Stefanadi E, Latsios G, et al. Novel Therapies Targeting Vascular Endothelium. Endothelium 2006;13:411-21.
- ¹⁵ Kawashima S, Yokohama M. Dysfunction of endotelial nitric oxide synthase and Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, Journal of the American Heart Association 2004;24:998-1005.
- ¹⁶ Champion H, Bivalacqua† T, Hyman A, Ignarro L, Hellstrom† W, Kadowitz P. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. Pharmacology 1999 Sep;96.
- ¹⁷ Champion H, Bivalacqua† T, Hyman A, Ignarro L, Hellstrom† W, Kadowitz P. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. Pharmacology 1999 Sep;96.
- ¹⁸ Kitasato A, Tajima Y, Kuroki T, Tsutsumi R, Adachi T, Mishima T, et al. Inflammatory cytokines promote inducible nitric oxide synthase-mediated DNA damage in hamster gallbladder epithelial cells. World J Gastroenterol 2007 Dec;21:379-84.

-
- ¹⁹ Tavridou A, Megaritis G, Kourounakis A, Charalambous A, Charalambous A, Manolopoulos V. EP2306 and EP2302, Two Novel Squalene Synthase Inhibitors, Stimulate Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Cultured Endothelial Cells. *Endothelium* 2007;14:239-43.
- ²⁰ Bellamy TC, Wood J, Goodwin DA, Garthwaite J. Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Mar 14;97(6):2928-33.
- ²¹ Sanchez D, Villanueva G, Sosa C, orjuela D, Ortega J, Ortega A, et al. Oxido nítrico en sistema nervioso central. *Neuronas nitrgicas. Revista de neurología,neurocirugía y psiquiatría* 2004 Apr;73-8.
- ²² Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endotelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
- ²³ Furchgott R. The Discovery of endothelium-derivd relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *Jama* 1996;276:1186-8.
- ²⁴ Rivero F, De frutos S, Rodriguez M, Rdriguez D, Suara M. Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPc. *Nefrologia* 2001;21:-233.
- ²⁵ Shaul P. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, Location, Location. *Annu Rev Physiol* 2002;64:-749.
- ²⁶ Brunton L.L, Lazo J, Parker K. Goodman and Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mcgraw-Hill, editor. 11, 824-864. 2006. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- ²⁷ Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 2007 Aug 16;81(10):779-93.
- ²⁸ Kawashima S, Mitsuhiro Y. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:998-1005.
- ²⁹ Katzung B.G. Farmacología básica y clínica. Manual moderno, editor. 9, 187-216. 2005.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- ³⁰ Nakane M. Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin Chem Lab Med* 2003 Jul;41(7):865-70.

-
- ³¹ Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006 Nov;45(5):268-76.
- ³² Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 2007 Aug 16;81(10):779-93.
- ³³ Lincoln TM, Wu X, Sellak H, Dey N, Choi CS. Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Front Biosci* 2006 Jan 1;11:356-67.:356-67.
- ³⁴ Guazzi M, Vicenzi M, Samaja M. [Clinical use of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiopulmonary diseases: from experimental evidence to clinical application]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2009 Nov;10(11-12):725-37.
- ³⁵ Fischmeister R, Castro L, bi-Gerges A, Rochais F, Vandecasteele G. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005 Oct;142(2):136-43.
- ³⁶ Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006;9:355-419.
- ³⁷ Francois M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem Int* 2004 Nov;45(6):955-61.
- ³⁸ Robinson J, Lancaster J. Hemoglobin-Mediated, Hypoxia-Induced Vasodilation via Nitric Oxide. *J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:257-61.
- ³⁹ Ignarro L. "El óxido nítrico es clave en la regulación de la presión sanguínea". 1st international meeting on nitric oxide from basic science to clinical evidence. 2003. Ref Type: Video Recording
- ⁴⁰ Wollert K, Fiedler B, Gambaryan S, Smolenski A, Heineke J, Butt E, et al. Gene Transfer of cGMP-Dependent Protein Kinase I Enhances the Antihypertrophic Effects of Nitric Oxide in Cardiomyocytes. *Hypertension* 2002;39:87-92.
- ⁴¹ Kurowska E. Nitric Oxide Therapies in Vascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2002;8:155-66.
- ⁴² Shaul P. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, Location, Location. *Rev Physiol* 2002;64:749-74.

-
- ⁴³ Centelles J, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *Ámbito Farmacéutico Bioquímica* 2004;23:96-102.
- ⁴⁴ Cooke P, Dzau V. Nitric oxide synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Rev Med* 1997;48:489-509.
- ⁴⁵ Ramirez J, Flores L, Segovia J, Arias S. Participación del óxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina (Buenos Aires)* 2007;67:167-76.
- ⁴⁶ Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield D, Giuffrida A. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Publishing Group* 2007;8:766-76.
- ⁴⁷ Sanchez D, Villanueva G, Sosa C, orjuela D, Ortega J, Ortega A, et al. Oxido nítrico en sistema nervioso central. *Neuronas nitrgicas. Revista de neurología, neurocirugía y psiquiatría* 2004 Apr;73-8
- ⁴⁸ Maarsingh H, Leusink J, Bos I, Zaagsma J, Meurs H. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respiratory Research* 2006;7.
- ⁴⁹ Topouzis S, Pelton J.T, Miller R.C. Effects of calcium entry blockers on contractions evoked by endothelin-1, in rat isolated aorta. *Br J. pharmacol* 1989;98, 669-677.
- ⁵⁰ Orallo F. Regulation of cytosolic calcium leveles in vascular smooth muscle. *Pharmacol therapeut* 1996, 69,606-718.
- ⁵¹ Cauvin C, Malik S. Induction of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in isolated rat aorta and mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of alpha-1 receptors. *J. pharmacol. Exp. Ther.* 1984, 230,413-417.
- ⁵² Tran Quang T, Rozec B, Gauthier C. Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta. *Br J. of pharmacology.* 2009, 156, 601-608.

⁵³ Topouzis S, Pelton J.T, Miller R.C. Effects of calcium entry blockers on contractions evoked by endothelin-1, in rat isolated aorta. *Br J pharmacol* 1989;98, 669-677.

⁵⁴ Orallo F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol therapeut* 1996, 69,606-718.

⁵⁵ Krumenacker J, Hnady K, Murad F. Regulation of nitric oxide and guanylyl cyclase. *Brain Research bulletin*. 2004, 62, 505-515.