

Vasodilatación inducida por *Croton schiedeanus* Schlecht vinculada con la ruta metabólica de guanilato ciclasa

Marlén Chaves-Torres^{1,2}, Pilar Puebla-Ibáñez³, Mario Guerrero-Pabón⁴

^{1,2} Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana. Correo electrónico: nmchavest@unal.edu.co.

³ Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Correo electrónico: puebla@usal.es.

⁴ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. A. A. 14490. Correo electrónico: mfguerrerop@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 2 de noviembre de 2012.

Aceptado para publicación: 19 de mayo de 2012.

RESUMEN

El extracto etanólico de *Croton schiedeanus* Schlecht, especie medicinal utilizada por la tradición popular en Colombia con fines antihipertensivos, relaja los anillos vasculares de la aorta de ratas Wistar contraídos con fenilefrina (10^{-6} M, agonista del receptor adrenérgico alfa), en función de la dosis, con una CE_{50} de $1,3 \times 10^{-5}$ g/mL. Este efecto es superior al ejercido sobre anillos contraídos con KCl (6×10^{-2} M, activador de canales de calcio dependientes de voltaje) y se reduce, pero no se suprime en anillos vasculares sin endotelio. La vasodilatación se revierte en presencia de azul de metileno (10^{-4} M, inhibidor de guanilato ciclasa) y L-NAME (10^{-4} M, inhibidor de óxido nítrico sintasa), en tanto que no se afecta en presencia de propranolol (10^{-6} M, antagonista del receptor beta), atropina (3×10^{-5} M, antagonista muscarínico) e indometacina (10^{-6} M, inhibidor de ciclooxigenasa). Además, las contracciones inducidas por $CaCl_2$ (10^{-5} – 10^{-2} M, activador de las corrientes de calcio) no se afectan significativamente en presencia del extracto etanólico de *C. schiedeanus* (5×10^{-5} g/mL). Por otro lado, al efectuar diluciones sucesivas de L-NAME y azul de metileno (hasta 10^{-14} M) se observa que *C. schiedeanus* recupera casi totalmente sus efectos vasodilatadores en presencia de L-NAME, pero no en presencia de azul de metileno (91% y 68% de E_{max} , respectivamente). Además, la potencia y eficacia vasodilatadora inducida por el extracto de *C. schiedeanus* fue superior a la ejercida por su metabolito activo mayoritario, ayanina (CI_{50} : 1,3 vs. $4,9 \times 10^{-5}$ g/mL, E_{max} : 100 vs. 67%). Estos hallazgos sugieren que *C. schiedeanus* ejerce efectos vasodilatadores

vinculados especialmente con la ruta metabólica de guanilato ciclasa y da soporte al uso tradicional de esta especie.

Palabras clave: Croton, óxido nítrico, vasodilatación, guanilato ciclasa, hipertensión.

SUMMARY

Vasodilatation induced by *Croton schiedeanus* Schlecht associated with metabolic way of guanylate cyclase

The EtOH extract of *Croton schiedeanus* Schlecht, medicinal species used by the popular tradition in Colombia for hypertension, relaxes vascular rings of Wistar rat aorta stimulated with phenylephrine (10^{-6} M, alpha adrenergic receptor agonist), in a dose-depending manner, with an EC_{50} of 1.3×10^{-5} g/mL. This effect is superior to that exercised over rings stimulated with KCl ($6,0 \times 10^{-2}$ M, voltage-dependent calcium channel activator) and is reduced in vascular rings without endothelium. The vascular relaxation is reversed in the presence of methylene blue (1.0×10^{-4} M, guanylate cyclase inhibitor) and L-NAME (10^{-4} M, nitric oxide synthase inhibitor), and is not affected in presence of propranolol (10^{-6} M, beta receptor antagonist), atropine (30×10^{-5} M, muscarinic antagonist) and indomethacin (10^{-6} M, cyclooxygenase inhibitor). Additionally, the contractions induced by $CaCl_2$ ($10^{-5} - 10^{-2}$ M, calcium currents activator) are not affected in the presence of EtOH *C. schiedeanus* extract (5.0×10^{-5} g/mL). Serial dilutions of L-NAME and methylene blue (until 10^{-14} M) show that *C. schiedeanus* recovers almost entirely the vasodilator effect in presence of L-NAME but not in presence of methylene blue (91 versus 68% of E_{max} , respectively). In addition, the relaxant potency and efficacy of *C. schiedeanus* is greater than its predominant active metabolite, ayanin (IC_{50} : 1,3 vs. $4,9 \times 10^{-5}$ g/mL, E_{max} : 100 vs. 67%). These findings suggest that *C. schiedeanus* exerts vasodilating effects, particularly related to the metabolic pathway of guanylate cyclase and gives support the traditional use of this species.

Key words: Croton, nitric oxide, vasodilation, guanilate ciclasa, hypertension.

INTRODUCCIÓN

Croton schiedeanus Schlecht (N. V. “almizclillo”) es una especie medicinal cuyas hojas en infusión se utilizan popularmente en Colombia para la hipertensión arterial (1). Estudios previos señalan que el extracto acuoso y en mayor medida el extracto etanólico, ejercen efectos hipotensores y vasodilatadores en ratas de laboratorio (2, 3). El análisis fitoquímico ha llevado al aislamiento e identificación de metabolitos de tipo flavonoide, diterpenoide, esterol y fenilbutanoide (4). La ayanina, su metabolito mayoritario, conjuntamente con la quercitrina, 3,7-di-O-metilquercetina y 3-O-metilquercetina, serían los principales responsables de la actividad biológica (5, 6, 7). Si bien los mecanismos vasodilatadores de estos metabolitos están ligados a la activación de óxido nítrico, hasta la fecha no se ha precisado el o los principales mecanismos vasodilatadores del extracto total de *C. schiedeanus*.

La hipertensión arterial, dadas las complicaciones con las que está íntimamente vinculada (enfermedad coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, falla renal, retinopatía hipertensiva y aneurismas vasculares, entre otras), sigue constituyendo un problema de hondo impacto en la salud pública, pese a los avances logrados tanto en el conocimiento de su fisiopatogenia como en su manejo terapéutico (8). Alternativas terapéuticas de origen natural podrían ayudar a mitigar su progresión y es interesante examinar si *C. schiedeanus*, dado su uso tradicional y los estudios realizados hasta la fecha, pueda constituirse en una de ellas (9).

Este estudio está enfocado a aportar en el conocimiento de *C. schiedeanus* como fuente natural con posibles efectos antihipertensivos, y establece si su efecto vasodilatador se debe a interacciones de tipo muscarínico, beta-adrenérgico, prostanoide, o vinculadas con óxido nítrico, guanilato ciclasa o canales de calcio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron aproximadamente 12 kg de tallos y hojas de *Croton schiedeanus* (“almizclillo”) en la región de Tocaima (Cundinamarca) en febrero de 2010, material que se identificó por comparación con el ejemplar que reposa en el Herbario Nacional Colombiano (código 43216, Prof. José Luis Fernández). El extracto etanólico se preparó por secado del material vegetal en un horno de aire a 40 °C durante 48 h, trituration del material seco obtenido en un molino, percolación subsecuente con etanol (96%) durante 72 h, concentración del material obtenido con un evaporador rotatorio y, finalmente, secado completo en un desecador al vacío.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar macho, suministradas por el Bioterio del Departamento de Farmacia (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional) de 9-11 semanas de edad, con pesos entre 280-320 g, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (22 °C, 70%).

Montaje de la preparación

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, previa anestesia con éter en una campana de vidrio. Se les efectuó una disección por la línea media abdominal y torácica, se cortó la reja costal y se apartó a un lado el contenido visceral para dejar al descubierto la arteria aorta que se cortó desde la región próxima a la bifurcación ilíaca hasta el cayado. La arteria se colocó en una caja de Petri que contenía solución fisiológica de Krebs, gaseada con carbógeno (CO_2 : 95%, O_2 : 5%), en donde se le retiraron los restos de grasa, sangre y tejido circundante. Luego se seccionó en anillos de aproximadamente 3-4 mm de longitud, cada uno de los cuales se montó en un baño de órgano aislado que contenía igualmente solución de Krebs y carbógeno. Cada anillo se fijó, por el extremo inferior, a un fino alambre de aluminio anclado a la cámara del baño y por su extremo superior a un transductor isométrico (*Fort 10/WPI*). Cada transductor estaba sujeto a un microposicionador para ajustarle tensión y todo el conjunto se conectaba a un amplificador de potencial eléctrico (*Bridge 8/IsoDam/WPI*) que transmitía la señal a un convertidor análogo-digital acoplado al computador (*lab-trax/WPI*).

La solución de Krebs tenía la siguiente composición (mM): 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 11,0 y ácido ascórbico 0,1, y su pH se ajustó entre 7,38 y 7,42. A cada anillo se le fijó una tensión basal de 2 g y se efectuaron cambios de la solución fisiológica cada 15 minutos, hasta que la línea basal de tensión generada se estabilizó, aproximadamente 60-75 minutos después del montaje.

Protocolo experimental

Transcurrida la fase de estabilización, se adicionó a cada baño fenilefrina (10^{-6} M) o KCl (60 mM), agentes con los que se alcanzó una señal estable de contracción (fase de meseta) aproximadamente hacia los 40 min, momento en que se adicionó acetilcolina (10^{-5} M) para examinar la integridad del endotelio, hecho que se verificó con la obtención de una señal transitoria de relajación del orden del $\geq 30\%$. Entonces se adicionó el extracto etanólico de *C. schiedeanus*, previamente preparado en dimetilsulfóxido (DMSO, 0,1%), en concentraciones acumulativas de 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} y 10^{-4} g/mL, en intervalos de 15 min. En algunos baños se adicionó únicamente el vehículo: DMSO (0,1%), como tratamiento de control.

Un protocolo similar se realizó en anillos sin endotelio, el cual se retiró raspando suavemente con una pequeña pinza roma la superficie interna del anillo antes de su montaje en el baño. La viabilidad de la preparación se evidenció por su capacidad de contraerse y la denudación endotelial se comprobó por la ausencia de respuesta relajante ante acetilcolina.

Para estudiar los mecanismos de relajación vascular planteados se efectuó un protocolo similar en anillos íntegros estimulados con fenilefrina (10^{-6} M, agonista alfa) previamente incubados durante 15 min con uno de los siguientes agentes: atropina (3×10^{-5} M, antagonista muscarínico), indometacina (10^{-6} M, inhibidor de ciclooxigenasa), propranolol (10^{-6} M, antagonista beta), L-NAME (10^{-4} M, inhibidor de óxido nítrico sintasa) y azul de metileno (10^{-4} M, inhibidor de guanilato ciclasa).

Para examinar el efecto diferencial de L-NAME y azul de metileno sobre *C. schiedeana*, estos agentes se incubaron durante 15 min, en concentraciones de 10^{-7} , 10^{-10} o 10^{-14} M, a anillos que se estimularon con fenilefrina (10^{-6} M) y se expusieron luego a concentraciones acumulativas del extracto de *C. Schiedeana* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL).

También se examinó el efecto de *C. schiedeana* y su metabolito mayoritario, ayanina (3,4,7-tri-O-metilquercetina) sobre las corrientes de calcio, para lo cual se adicionó CaCl_2 acumulativamente (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 5×10^{-2} M), en intervalos de 10 min, en anillos previamente incubados con el extracto de *Croton* (5×10^{-5} g/mL), ayanina (5×10^{-5} g/mL) o el control (DMSO, 0,1%). Esto se efectuó en solución de Krebs despolarizante sin calcio, con la siguiente composición (mM): KCl 60, NaCl 60, NaHCO_3 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2, glucosa 11,1 y ácido ascórbico 0,1.

Por último, se contrastó el efecto de *C. schiedeana* frente a la ayanina, en dos tipos de protocolos: anillos estimulados con concentraciones acumulativas 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 ausencia de *C. schiedeana* o ayanina (5×10^{-5} g/mL) y en anillos previamente contraídos con fenilefrina (10^{-6} M) expuestos a concentraciones acumulativas de *C. schiedeana* y ayanina (10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} y 10^{-4} g/mL).

Fármacos y soluciones

Se utilizaron las siguientes sales: NaCl, CaCl_2 , NaHPO_4 , NaHCO_3 , glucosa; KCl, MgCl_2 , KH_2PO_4 y MgSO_4 , ácido ascórbico, clorhidrato de fenilefrina, cloruro de acetilcolina, indometacina, LNAME, dimetilsulfóxido, clorhidrato de propranolol y sulfato de atropina (Merck). El extracto y la ayanina se disolvieron en DMSO (0,1%), las demás sustancias se prepararon en solución salina normal.

La ayanina se aisló del extracto etanólico de *C. schiedeanus*, tratado sucesivamente con cloroformo y NaOH (4%), que permitió obtener una fracción neutra que se sometió a cromatografía de *flash* en gel de sílice (Hex/AcOEt, 1:1) y que se identificó por sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C (5, 6).

Análisis de datos

Los datos se expresan como porcentaje de contracción alcanzado con respecto a la fase de meseta (E_{max} : efecto máximo). Se generaron curvas concentración-respuesta, graficando el logaritmo de la concentración en el eje de las abscisas y el porcentaje de contracción en el eje de las ordenadas. En las abscisas se representan los promedios de contracción obtenidos \pm el error medio estándar (e.m.s.), de 5-7 anillos (n). Se efectuó un análisis de regresión semilogarítmica para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI_{50} : concentración con la que se alcanza el 50% de la contracción máxima), con sus respectivos intervalos de confianza (10). Se efectuó un análisis de varianza en cada punto de concentración seguido de la prueba de diferencias múltiples de Dunnett. Se asumió como significativa una $p \leq 0,05$. Se utilizaron los programas Excel[®] y SPSS[®] para el procesamiento y análisis de datos.

Aspectos éticos

La prueba biológica utilizada (baños de anillos de aorta aislados) tiene la ventaja de reducir el número de animales para utilizar, dado que de cada espécimen se obtienen entre seis y ocho unidades experimentales (anillos). Además, gracias a la anestesia aplicada, se redujo el dolor al máximo durante el procedimiento previo a la resección de la aorta. La investigación se hizo acorde con la Ley 84 de 1989, de conformidad con las “Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, establecida en la Resolución 8430 de 1993, del Ministerio de Salud de Colombia, y siguiendo los lineamientos trazados en la “Guía para el uso de animales de laboratorio” de la Universidad Nacional de Colombia (11).

RESULTADOS

Las contracciones máximas alcanzadas por los anillos estimulados con fenilefrina (10^{-6} M) y KCl (60 mM) fueron de 1.514 ± 212 y 1.680 ± 109 mg, respectivamente. La adición acumulativa del extracto de *C. schiedeanus* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) produjo un efecto vasodilatador mayor en los anillos contraídos con fenilefrina, con una relajación completa (E_{max} : 100%) y una CI_{50} de $1,3[0,9-2,0] \times 10^{-5}$ g/mL; mientras que en los anillos contraídos con KCl se obtuvo una E_{max} de 70% y una CI_{50} de $3,7[1,6-8,2] \times 10^{-5}$ g/mL (figura 1). El efecto relajante de *C. schiedeanus* se redujo, sin suprimirse totalmente en anillos sin endotelio (E_{max} : 62%, CI_{50} : $3,3[0,1-6,0] \times 10^{-5}$ g/mL) (figura 2).

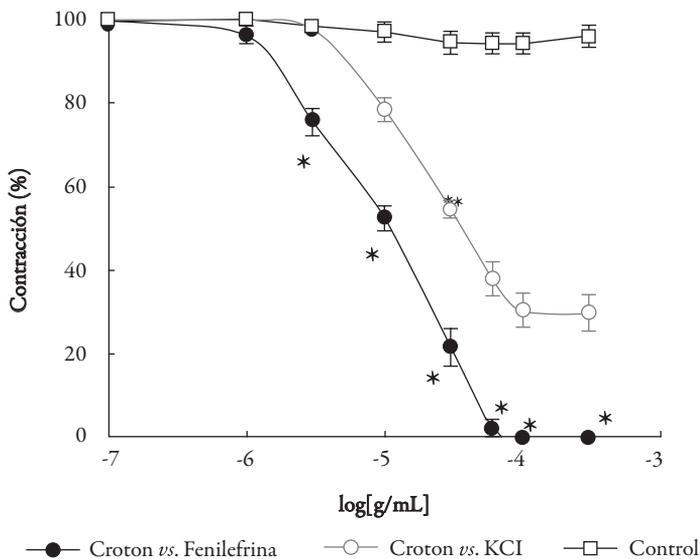


Figura 1. Efecto del extracto etanólico de *C. schiedeanus* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar estimulados con fenilefrina (10^{-6} M) o KCl (60 mM). Control: DMSO (0,1%), * $p < 0,05$ con respecto a KCl.

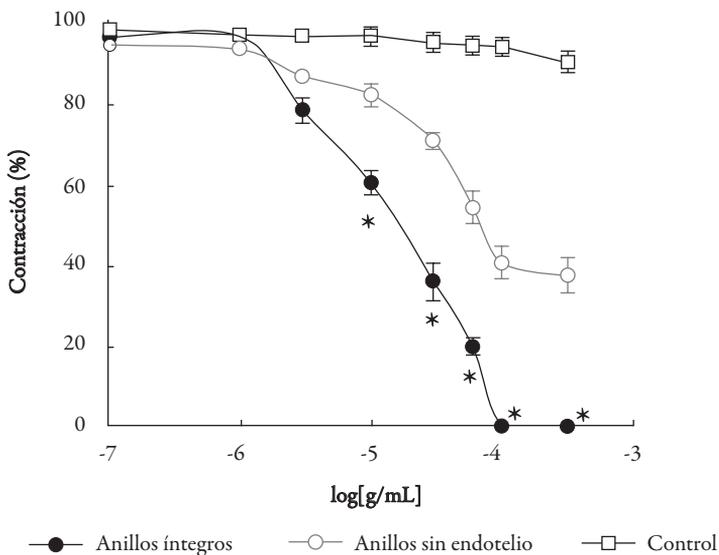


Figura 2. Efecto del extracto etanólico de *C. schiedeanus* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar estimulados con fenilefrina (10^{-6} M) íntegros o sin endotelio. Control: DMSO (0,1%), * $p < 0,05$ con respecto a los anillos denudados.

La atropina (3×10^{-5} M), la indometacina (10^{-6} M) y el propranolol (10^{-6} M) no modificaron significativamente la curva de relajación de *C. schiedeanus* frente a la fenilefrina, en tanto que L-NAME (10^{-4} M) y el azul de metileno (10^{-4} M) sí revirtieron ese efecto (figura 3). Al efectuar diluciones sucesivas de L-NAME y azul de metileno (10^{-7} , 10^{-12} , 10^{-14} M) la relajación de *C. schiedeanus* se recuperó frente a L-NAME mas no frente al azul de metileno (tabla 1, figura 4), (E_{\max} : $90,8 \pm 2,4\%$ versus $67,8 \pm 2,6\%$ con 10^{-14} M, respectivamente).

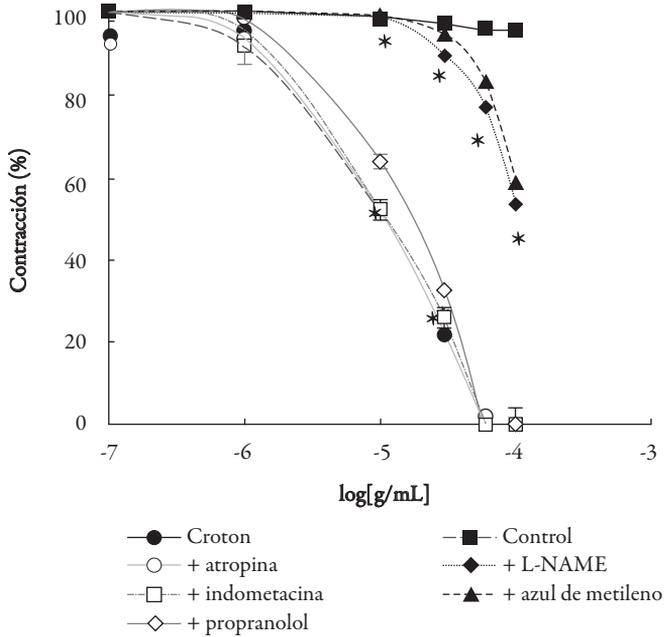


Figura 3. Efecto del extracto etanólico de *C. schiedeanus* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar estimulados con fenilefrina (10^{-6} M) en presencia o ausencia de atropina (3×10^{-5} M), indometacina (10^{-6} M), propranolol (10^{-6} M), L-NAME (10^{-4} M) o azul de metileno (10^{-4} M). Control: DMSO (0,1%), * $p < 0,05$ con respecto a *C. schiedeanus*.

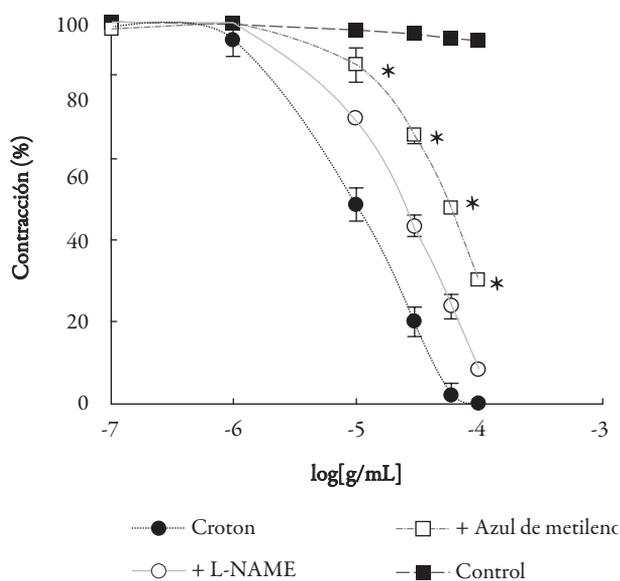


Figura 4. Efecto del extracto etanólico de *C. schiedeanaus* (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar estimulados con fenilefrina (10^{-6} M) en presencia o ausencia de L-NAME (10^{-14} M) o azul de metileno (10^{-14} M). Control: DMSO (0,1%), * $p < 0,05$ con respecto a *C. schiedeanaus*.

Tabla 1. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y efecto máximo de relajación (E_{max}) de *C. schiedeanaus* en anillos de aorta de ratas Wistar contraídos con fenilefrina (10^{-6} M) en presencia de L-NAME y azul de metileno (10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-10} y 10^{-14} M).

Concentración	CI_{50} vs. L-NAME (g/mL)	E_{max} vs. L-NAME (%)	CI_{50} vs. azul de metileno (g/mL)	E_{max} vs. azul de metileno (%)
1,0E-04	$1,0 \times 10^{-4}$	$54,6 \pm 5,2$	$5,2 \times 10^{-5}$	$50,5 \pm 4,6$
1,0E-07	$4,5 \times 10^{-5}$	$62,0 \pm 2,2$	$5,0 \times 10^{-5}$	$51,0 \pm 3,9$
1,0E-10	$2,9 \times 10^{-5}$	$70,1 \pm 5,1$	$4,2 \times 10^{-5}$	$54,3 \pm 4,1$
1,0E-14	$2,3 \times 10^{-5}$	$90,8 \pm 2,4$	$2,8 \times 10^{-5}$	$67,8 \pm 2,6$

A diferencia de la ayanina, *C. schiedeanaus* no desplazó significativamente la curva de contracción inducida por $CaCl_2$ en solución despolarizante sin calcio (figura 5). En cambio, la curva de contracción inducida por fenilefrina se desplazó levemente en presencia de ayanina y *C. schiedeanaus* con las concentraciones iniciales (figura 6). Finalmente, al comparar las curvas de relajación de *C. schiedeanaus* y ayanina se observó una potencia y eficacia relajante superior del extracto (CI_{50} : $1,3$ vs. $4,9 \times 10^{-5}$ g/mL, E_{max} : 100 vs. 67%) (figura 7).

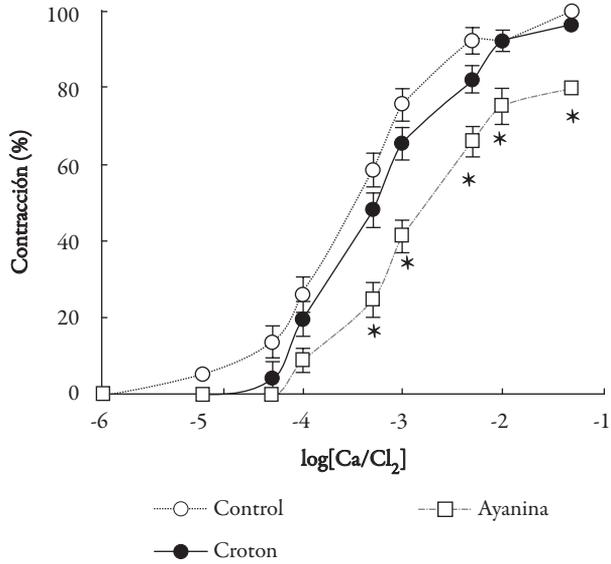


Figura 5. Efecto de CaCl₂ (10⁻⁵ – 10⁻² M) en ausencia o en presencia del extracto etanólico de *C. schiedeanus* o ayanina (5 × 10⁻⁵ g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar. Control: DMSO (0,1%), **p* < 0,05 con respecto al control.

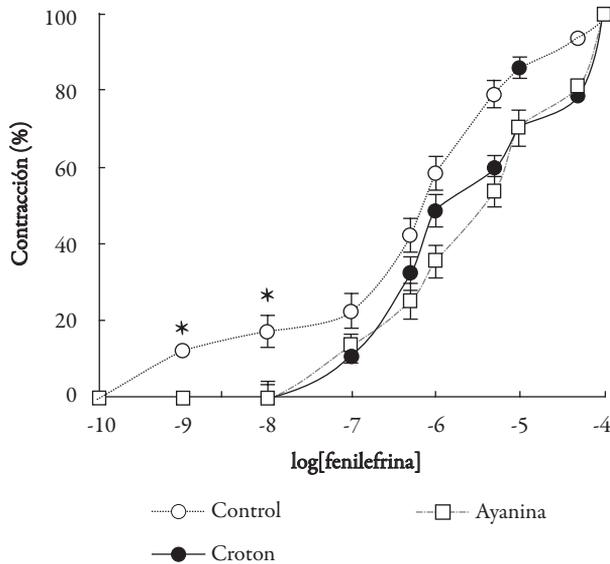


Figura 6. Efecto de fenilefrina (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M) en ausencia o en presencia del extracto etanólico de *C. schiedeanus* o ayanina (5 × 10⁻⁵ g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar. Control: DMSO (0,1%), **p* < 0,05 con respecto al control.

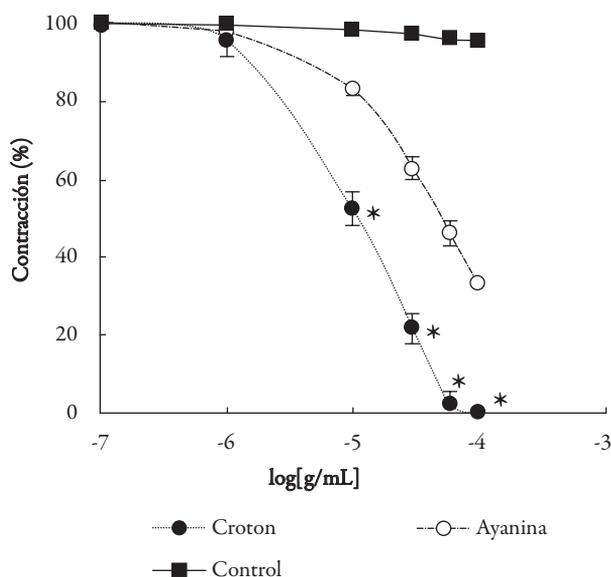


Figura 7. Efecto del extracto etanólico de *C. schiedeanus* y ayanina (10^{-6} – 10^{-4} g/mL) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar estimulados con fenilefrina (10^{-6} M). Control: DMSO (0,1%), * $p < 0,05$ con respecto a la ayanina.

DISCUSIÓN

Estos resultados muestran que *C. schiedeanus* ejerce efectos vasodilatadores especialmente relacionados con la ruta metabólico del óxido nítrico y la guanilato ciclasa y que carece de efectos notables de tipo muscarínico, beta-adrenérgico, prostanoide o antagonismo de canales de calcio. Igualmente sugieren que si bien la ayanina, su metabolito mayoritario, desempeña un papel clave en la respuesta global inducida por *C. schiedeanus*, difícilmente podría adscribirse a ella únicamente el efecto vasodilatador observado. Precisamente, el hecho de observar que con concentraciones similares, la respuesta relajante del extracto sea superior (Figura 6), permite plantear que el efecto de *C. schiedeanus* no se debe única ni principalmente a la ayanina, sino que otros principios activos cooperan en el efecto global de la especie.

Es interesante observar que *C. schiedeanus* es más sensible al efecto del azul de metileno, un inhibidor de la liberación de óxido nítrico, que al de L-NAME, un inhibidor de su síntesis (12, 13). Estos resultados están en consonancia con la eventual capacidad de *C. schiedeanus* para captar radicales libres, en particular el anión superóxido, generando así un efecto más sostenido del óxido nítrico (14). El incremento en la disponibilidad de este mediador en el endotelio vascular se traduciría, tras la nitrosilación de guani-

lato ciclasa y el consecuente incremento en el GMPc intracelular, no sólo en efectos vasodilatadores, sino también antiagregantes (15). De ser así, *C. schiedeanus* podría ejercer efectos favorables no sólo en la hipertensión arterial, sino también en el campo de la aterosclerosis, dado que contribuiría a mitigar la lesión sobre el endotelio, factor a partir del cual se desencadena la serie de fenómenos que conducen a la formación de la placa ateromatosa (16).

Sin duda, la ayanina, que además parece ejercer interacciones sobre el calcio, tendría un papel clave en el efecto de *C. schiedeanus*; sin embargo, teniendo en cuenta que la potencia relajante de *C. schiedeanus* es superior a la observada con la ayanina, habría que considerar la participación de otros metabolitos, entre ellos: 3,7-di-O-metilquercetina y 3-O-metilquercetina, también descritos en esta especie (4,7). La naturaleza flavonoide de los principales metabolitos activos de *C. schiedeanus* acentúa el interés de esta especie como fuente fitoterapéutica frente a la hipertensión arterial y los trastornos asociados (17).

Es interesante observar que *C. schiedeanus* y la ayanina ejercen efectos relajantes en anillos previamente contraídos con fenilefrina, en tanto que difícilmente modifican la curva de contracción inducida por este mismo agente; es decir, ejercen efectos vasodilatadores mas no anticontracturantes. Estos resultados no sorprenden si se tiene en cuenta que las rutas metabólicas que tienen lugar durante la contracción fásica y la contracción tónica (fase de meseta) difieren entre sí. En efecto, tras la estimulación alfa-1 adrenérgica, durante la contracción fásica ocurre un incremento de calcio mediado por inositoltrifosfato que precede a la contracción tónica, la cual está mediada por incrementos de calcio a través de canales dependientes de voltaje (18). Cabe plantear que la fase de contracción tónica sería especialmente sensible a los mecanismos que inducen la liberación de óxido nítrico, razón por la cual *C. schiedeanus* y la ayanina ejercen efectos ostensibles durante esta fase.

Otro punto interesante es el hecho de que *C. schiedeanus* sea tan sensible al efecto del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico: L-NAME, pero aún más, al inhibidor de su liberación, azul de metileno. Esto es consistente con las concentraciones notablemente bajas de óxido nítrico que se generan en condiciones fisiológicas, del orden picomolar, tras la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa constitutiva del endotelio (tipo III) (19). La estrategia planteada en este estudio, de acudir a diluciones sucesivas de los agentes inhibidores del efecto relajante, habría ayudado a avanzar en la discriminación del mecanismo de relajación involucrado en *C. schiedeanus*, que estaría inhibiendo la degradación de óxido nítrico antes que favorecer su síntesis. Además, la ausencia de efectos significativos frente a la atropina, el propranolol, la indometacina y el cloruro de calcio, permite descartar mecanismos de tipo muscarínico, beta-adrenérgico, prostanoide y antagonismo de canales de calcio, como mecanismos fundamentales de vasodilatación inducidos por *C. schiedeanus*.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que *C. schiedeanus* ejerce efectos vasodilatadores relacionados con la vía de óxido nítrico y guanilato ciclasa, posiblemente vinculados con su capacidad para captar radicales libres, atribuibles en buena medida a la presencia de metabolitos flavonoides, entre ellos, la ayanina. Estos resultados dan soporte al uso tradicional de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (VRI/DIB) que apoyó la financiación de este estudio con el proyecto 12785. Igualmente agradecemos al Bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, UNCSB.

REFERENCIAS

1. H. García, "Flora medicinal de Colombia", Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, 1975, vol. 2, p. 87.
2. M.F. Guerrero, R. Carrón, M.L. Martín, L.S. Román, M.T. Reguero, Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **75**, 33 (2001).
3. M.F. Guerrero, P. Puebla, R. Carrón, M.L. Martín, L. Arteaga, L.S. Román, Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **80**, 37 (2002).
4. S.X. Correa, "Estudio fitoquímico y evaluación de la acción relajante vascular de *Croton schiedeanus* Schlecht", trabajo de grado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (2004).
5. M.F. Guerrero, P. Puebla, M.L. Martín, R. Carrón, L.S. Román, M.T. Reguero, Inhibitory effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on the anti-adrenergic response elicited by ayanin in the pithed rat, *Planta Med.*, **68**, 322 (2002).
6. R. Carrón, E. Sanz, P. Puebla, M.L. Martín, L.S. Román, M.F. Guerrero, Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rat, *Colombia Med.*, **41**, 10 (2010).
7. M.F. Guerrero, P. Puebla, R. Carrón, M.L. Martín, L.S. Román, Quercetin 3,7-dimethyl ether a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1373 (2002).

8. A.V. Chobanian, G.L. Bakris, H.R. Black, W.C. Cushman, L.A. Green, J.L. Izzo, D.W. Jones, B.J. Materson, S. Oparil, J.T. Wright, E.J. Roccella, Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, *Hypertension*, **42**, 1206 (2003).
9. M.F. Guerrero, Elementos para la evaluación eficaz de productos naturales con posibles efectos antihipertensivos, *Biomédica*, **29**, 547 (2009).
10. R. Tallarida, L. Jacob, "The dose-response relation in pharmacology", Springer-Verlag Ed., New York, 1979, p. 111.
11. A.M. Osorio, A. Rosenkrans, "Guía para el uso de animales de laboratorio", Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 1990.
12. B. Mayer, F. Brunner, K. Schmidt, Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 367 (1993).
13. D. Rees, R.M.J. Palmer, R. Schuls, Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*, *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 746 (1990).
14. S. Moncada, E.A. Higgs, Endogenous nitric oxide physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, **21**, 361 (1991).
15. B.T. Mellion, L.J. Ignarro, E.H. Ohlstein, E.G. Pontecorvo, A.L. Hyman, P.J. Kadowitz, Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation, *Blood*, **57**, 946 (1981).
16. G. Yetik-Anacak, J.D. Catravas, Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease, *Vasc. Pharmacol.*, **45**, 268 (2006).
17. V. Bayard, F. Chamorro, J. Motta, N.K. Hollenberg, Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panamá, *Int. J. Med. Sci.*, **4**, 53 (2007).
18. G. Loirand, P. Pacaud, C. Mironneau, J. Mironneau, Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture, *Pflügers. Arch.*, **407**, 566 (1986).
19. M.A. Marletta, Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12231 (1993).