



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

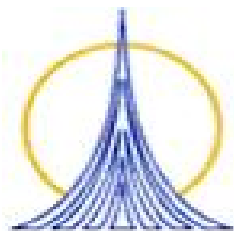
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Participación de los canales de calcio, de las enzimas: guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa en el mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico en anillos de tráquea aislada de cobayo”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
GARCÍA SÁNCHEZ JULIO CÉSAR

Director: Dra. María Elena Sánchez
Mendoza

Asesor: Dr. Benito Reyes Trejo





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio de “Farmacología Cardiovascular” del Departamento de Graduados.

Se agradece a la Secretaría de investigación y Posgrado del I. P. N, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo, bajo el número de proyecto **SIP: 2009-0966**

A la Dra. **María Elena Sánchez Mendoza** por sus acertados comentarios y consejos que fueron de suma importancia para concluir el presenta trabajo, además e brindar su amistad.

Al Dr. **Jesús Arrieta Valencia** por compartir su conocimiento y experiencia durante el desarrollo de este trabajo, por su apoyo y su amistad.

Al Dr. **Benito Reyes Trejo** por su amistad y enseñanzas que adquirí en su laboratorio

Al Dr. **Adelfo N. Reyes Ramírez** por su apoyo al desarrollo de este proyecto

A MIS PADRES:

Pascual y Ma. De la Paz por su apoyo incondicional durante toda mi formación académica y personal.

A MIS HERMANAS:

Blanca, Claudia y Natalia quienes me han acompañado a lo largo de toda mi vida.

A MI TIO:

Felipe Sánchez Rosas. Por su apoyo que me brindo en los momentos difíciles.

Diana María Guadalupe Siles Barrios.

Por haberme abierto su corazón, brindarme su cariño en todos los momentos que la he necesitado y la gran felicidad de haberme hecho padre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	III
LISTA DE GRÁFICAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
I. FUNDAMENTO TEÓRICO	2
1.1. Aparato respiratorio	2
1.2. El músculo liso de las vías aéreas	2
1.2.1. Inervación colinérgica.....	2
1.2.2. Inervación adrenérgica.....	3
1.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica (NANC).....	3
1.3. Broncoconstricción	4
1.3.1. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gq.....	4
1.3.2. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gi.....	5
1.4. Broncorrelajación.....	7
1.4.1. Broncorrelajación a través de los receptores acoplados a proteína Gs.....	7
1.4.2. Broncorrelajación a través de la guanilil ciclasa (GC).....	8
1.4.2.1. Guanilil ciclasa soluble (GC _S)	8
1.4.2.2. Guanilil ciclasa particulada (GC _P)	8
1.4.3. Inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos.....	9
1.4.4. Broncorrelajación relacionada con influencia sobre canales iónicos.....	9
1.4.4.1. Canales de calcio.....	9
1.4.4.2. Canales de potasio.....	10
1.4.4.2.1. Canales de K ⁺ activados por calcio.....	10
1.4.4.2.2. Canales de K ⁺ rectificador tardío	10
1.4.4.2.3. Canales de K ⁺ sensibles a ATP (K ⁺ _{ATP})	10
1.5. Fármacos broncodilatadores	10
1.5.1. Fármacos que bloquean el efecto de mediadores contráctiles.....	11
1.5.1.1. Anticolinérgicos.....	11
1.5.1.2. Antihistamínicos	11

1.5.1.3. Fármacos anti-leucotrienos	12
1.5.1.4. Glucocorticoides	12
1.5.2. Fármacos relajantes.....	12
1.5.2.1. β_2 -Adrenérgicos	12
1.5.2.2. Inhibidores de fosfodiesterasas	13
1.5.2.3. Canales de K^+	13
1.5.2.4. Canales de K^+ sensibles a ATP	14
1.6. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias	14
1.6.1. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias en México.....	18
1.7. El género <i>Croton</i>	18
1.7.1. Estudios químicos del género <i>Croton</i>	18
1.7.2. Estudios de actividad biológica del género <i>Croton</i> y de <i>Croton reflexifolius</i>	20
1.7.3. Mecanismos de acción relajante del ácido poliáltico en músculo liso de tráquea aislada de cobayo.....	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
III. HIPÓTESIS.....	22
IV. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1. Objetivos específicos	23
V. METODOLOGÍA	24
5.1. Animales	24
5.2. Fármacos	24
5.3. Aislamiento e identificación del ácido poliáltico.....	24
5.4. Ensayos biológicos.....	25
5.4.1. Disección de la tráquea y montaje de la preparación.....	25
5.4.2. Evaluación del efecto relajante del ácido poliáltico.....	25
5.4.3. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta contráctil inducida con calcio.....	26
5.4.4. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta relajante de nitroprusiato de sodio y forskolina.....	26

5.4.5. Evaluación de la participación de la guanilil ciclasa soluble en el efecto relajante del ácido poliáltico.....	26
5.4.6. Evaluación de la participación de la adenilil ciclasa en el efecto relajante del ácido poliáltico.....	27
VI. ESTADÍSTICA.....	27
VII. RESULTADOS.....	28
7.1. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta contráctil inducida con calcio.....	28
7.2. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta relajante de nitroprusiato de sodio y forskolina.....	32
7.3. Evaluación de la participación de la guanilil ciclasa soluble en el efecto relajante del ácido poliáltico.....	32
7.4. Evaluación de la participación de adenilil ciclasa en el efecto relajante del ácido poliáltico.....	35
VIII. DISCUSIÓN.....	38
8.1. Participación de los canales de calcio.....	38
8.2. Participación de la enzima guanilil ciclasa soluble.....	39
8.3. Participación de la enzima adenilil ciclasa.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	42
X. PERSPECTIVAS.....	43
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Principales agentes contráctiles del MLA.	6
Cuadro 2. Principales relajantes del MLA.	7
Cuadro 3. Plantas utilizadas en la medicina tradicional China.	15
Cuadro 4. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de la India.	16
Cuadro 5. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de diferentes países.	17
Cuadro 6. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades respiratorias.	19
Figura 1. Estructura del ácido poliáltico.	24

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto inhibitorio del ácido poliáltico sobre la respuesta contráctil de Ca^{++}	29
Gráfica 2. Efecto inhibitorio del diltiazem sobre las contracciones provocadas por Ca^{++} ...	30
Gráfica 3. Efecto relajante de nitroprusiato en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ácido poliáltico.	33
Gráfica 4. Efecto relajante de forskolina en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ácido poliáltico.	34
Gráfica 5. (A y B) Efecto relajante del ácido poliáltico (A) y nitroprusiato (B) en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ODQ.	36
Gráfica 6. (A y B) Efecto relajante del ácido poliáltico (A) y forskolina (B) en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de 2', 5'-dideoxiadenosina.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores CE_{50} y de $E_{m\acute{a}x}$ de calcio en ausencia y presencia de ácido poliáltico....	31
Tabla 2. Valores CE_{50} y de $E_{m\acute{a}x}$ de calcio en ausencia y presencia de diltiazem.....	31
Tabla 3. Valores de CE_{50} de nitroprusiato y forskolina en ausencia y presencia de ácido poliáltico.....	35

INTRODUCCIÓN

El género *Croton* está constituido por 700 especies pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae* (Catalán *et al.*, 2003), y para varias de esas especies se han reportado diferentes actividades biológicas, entre las que se encuentran: anti-hipertensiva (Bacelli *et al.*, 2005), insecticida (Nihei *et al.*, 2005), antiplasmódica (Adelekan *et al.*, 2008), antibacteriana y antimicótica (Shahid *et al.*, 2008), etc.

En el caso particular de *Croton reflexifolius*, se ha descrito actividad gastroprotectora (Reyes-Trejo *et al.*, 2008) y actividad relajante del músculo liso de tráquea aislada de cobayo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008). En ambos trabajos se identificó al ácido poliáltico como uno de los principales metabolitos responsables de estas actividades.

Adicionalmente, en el estudio de la actividad relajante se encontró que su efecto no fue modificado por glibenclamida (bloqueador de canales de K^+_{ATP}), L-NAME (inhibidor de la sintasa de monóxido de nitrógeno) o propanolol (bloqueador de receptores β -adrenérgicos) sugiriendo que los canales de K^+_{ATP} , el NO y los receptores β -adrenérgicos no participan en su mecanismo de acción. Además se demostró que no actúa inhibiendo la respuesta contráctil inducida con histamina, pero sí produjo un efecto anti-muscarínico de tipo no competitivo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008)

Considerando lo anterior, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de acción del ácido poliáltico, enfocándose en determinar la participación de los canales de Ca^{++} y de las enzimas guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa, utilizando el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. Aparato respiratorio

El aparato respiratorio comprende las vías respiratorias (fosas nasales, la parte superior de la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios) y a los pulmones. Las primeras conducen el aire a los segundos, en los cuales se producen los intercambios gaseosos (Rouviere y Delmas, 1999).

Las estructuras anatómicas más importantes de la vía aérea, desde el punto de vista farmacológico, son el músculo liso, el epitelio ciliado y las glándulas bronquiales. El músculo liso involuntario frecuentemente sufre de modo inapropiado constricción grave en respuesta a diversos tipos de irritación; con el consiguiente broncoespasmo, el cual es un problema de primera importancia en la mayor parte de las enfermedades respiratorias obstructivas crónicas del pulmón (Latarget y Ruiz, 1995).

La submucosa es la capa de tejido conectivo vascular que se encuentra debajo del epitelio, y contiene glándulas bronquiales especializadas, compuestas por dos tipos de células secretoras: serosas y mucosas. La función principal de las glándulas traqueobronqueales es la producción de mucina que ayuda a formar una barrera protectora entre el epitelio de las vías aéreas y el medio ambiente (Finkbeiner, 1999).

1.2. El músculo liso de las vías aéreas

El músculo liso de las vías aéreas (MLA), es un importante tejido involucrado en la regulación del tono broncomotor que existe desde la tráquea hasta los bronquiolos (Amrani y Panettieri, 2003). La inervación del MLA es compleja, además de participar nervios simpáticos (adrenérgicos) y parasimpáticos (colinérgicos), existe una inervación no adrenérgica no colinérgica (NANC). Sin embargo, el calibre de las vías aéreas no solamente está determinado por el tono del músculo liso, sino también depende de la profundidad de la submucosa así como de las secreciones luminales (Finkbeiner, 1999).

1.2.1. Inervación colinérgica

Las vías aéreas del ser humano, reciben una importante inervación colinérgica. La liberación de acetilcolina regula el tono de las vías aéreas, ocasionando contracción del músculo liso y secreción de moco, a través de la interacción con receptores muscarínicos de

acetilcolina localizados en músculo liso bronquial, glándulas y vasculatura pulmonar (Belmonte, 2005). El MLA contiene dos tipos de receptores muscarínicos el M₂ y el M₃. La proporción de receptores M₂ y M₃ es aproximadamente 4:1, variando ligeramente la proporción de acuerdo a la especie (Belmonte, 2005; Gosens *et al.*, 2006). Se ha establecido que la estimulación de los receptores muscarínicos M₃ media la contracción del músculo liso (ML), sin embargo la función de los del tipo M₂, no es totalmente clara. Algunos estudios plantean que la estimulación de los receptores M₂ en MLA, lleva a una inhibición de la activación de la adenilil ciclasa (AC), lo que resulta en una disminución de los niveles de AMP_C (3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina) otros estudios proporcionan evidencia del papel contráctil de los receptores M₂ cuando los receptores M₃ están bloqueados (Ehlert, 2003; Walker *et al.*, 2004) y otros reportes han sugerido que desempeñan dos papeles: a corto plazo efectúan una inhibición de la enzima AC y a largo plazo, regulan a la alta la expresión de esta enzima contrarrestando con ello, la acción de los agonistas de los receptores M₃ acoplados a la fosfolipasa C (Hall, 2000; Michal *et al.*, 2001; Mistry *et al.*, 2005). En tanto que en los nervios parasimpáticos los receptores M₂ actúan como autoreceptores, inhibiendo la liberación de acetilcolina (Barnes, 1998; Thirstrup, 2000).

1.2.2. Inervación adrenérgica

La inervación adrenérgica de las vías aéreas de los seres humanos tiene una importancia funcional limitada con respecto a la broncodilatación, sin embargo las, fibras adrenérgicas pueden modular la neurotransmisión colinérgica, además la adrenalina liberada por la médula suprarrenal puede ejercer notable efecto broncodilatador en ciertas circunstancias (Thirstrup, 2000; McGraw *et al.*, 2007).

1.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica (NANC)

En las vías aéreas del cobayo se ha identificado que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el monóxido de nitrógeno (NO) son los transmisores que median la relajación NANC, en tanto que los probables candidatos del componente excitatorio del NANC son la capsaicina, taquicininas, sustancia P y neurocinina A. Con respecto al humano, ya se ha establecido que el NO forma parte de los componentes inhibitorios; sin embargo, todavía no se define el papel del VIP (Thirstrup, 2000; Fischer *et al.*, 2002).

1.3. Broncoconstricción

La contracción del ML puede ser iniciada por una despolarización (acoplamiento electro-mecánico) o por una estimulación con agonistas contráctiles (acoplamiento fármaco-mecánico) que está íntimamente relacionado con un incremento en las concentraciones de calcio intracelular. El incremento en las concentraciones de calcio intracelular origina la formación de un complejo calcio-calmodulina que activa a la enzima cinasas de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), la cuál es responsable de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina en la serina 19, esta fosforilación activa a la miosina ATPasa, la cuál genera la subsecuente formación de puentes cruzados entre actina y miosina desencadenando el proceso contráctil (Thirstrup, 2000; Jassen y Killian, 2006).

El MLA puede ser contraído por agentes que estimulen directamente a receptores acoplados a proteínas G, o a través de vías indirectas, que involucran la liberación y/o síntesis de otros mediadores que actúan directamente (Thirstrup, 2000; Janssen y Killian, 2006; McGraw *et al.*, 2007). Los principales mediadores contráctiles del MLA, se presentan en el cuadro 1.

1.3.1. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gq

En el MLA existen receptores acoplados a proteínas Gq capaces de inducir contracción, entre los que se encuentran los receptores de acetilcolina (M_3), histamina (H_1), leucotrienos ($CysLT_1$), endotelina (ET-A) y bradicinina (B_2). Adicionalmente existen otros receptores tales como los de adenosina (A_3), y neurocinina 1 y 2 (NK-1, NK-2 respectivamente) (Nicosia *et al.*, 2001; Billington y Penn, 2003; Anderson y Kippelen, 2008). Sin embargo, la importancia de estos últimos en la mediación de la contracción bajo condiciones fisiológicas o patológicas aún permanece incierta (Billington y Penn, 2003).

La señalización de estos receptores involucra la activación secuencial del receptor y del efector. Al unirse el agonista al receptor, este experimenta un cambio conformacional, con la subsiguiente activación de la subunidad α , y la disociación de las subunidades $\beta\gamma$, la subunidad $G\alpha$, activa a la fosfolipasa C (PLC), que promueve la hidrólisis de fosfoinositol, 4,5-difosfato (PIP_2) dando lugar a los segundos mensajeros intracelulares 1,2-diacilglicerol (DAG) y 1, 4, 5-trifosfato de inositol (IP_3).

El DAG activa a la protein cinasa C (PKC), que es capaz de fosforilar a numerosos sustratos, algunos de ellos intermediarios de la vía de señalización de la MAPK (protein cinasa activada por mitógeno) lo cual activa varios factores de transcripción involucrados

en promover el crecimiento de las vías aéreas. Los receptores acoplados a Gq también son capaces de activar al receptor de tirosin cinasa induciendo el crecimiento del MLA. Por otro lado, tanto la PKC como intermediarios de la MAPK p42/p44 fosforilan y estimulan la actividad catalítica de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), que libera ácido araquidónico (AA) y derivados de prostaglandinas y tromboxanos A₂ (Franová *et al.*, 2004). El otro producto de la hidrólisis de PIP₂, el IP₃ se une a un receptor del retículo sarcoplásmico, lo que resulta en la apertura de canales de calcio y el flujo del ión hacia el citosol. El incremento de calcio libre intracelular, promueve la unión de calcio a calmodulina formando un complejo que activa a las MLCK, la fosforilación de las cadenas de miosina, permite la unión con actina y la activación de miosina ATPasa requerida para la contracción (Hall, 2000; Thirstrup, 2000; Billington y Penn, 2003; Batra *et al.*, 2007).

1.3.2. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gi

El MLA de los humanos expresa receptores muscarínicos (M₂), de serotonina (5-HT_{2c}) y de adenosina (A₁) los cuales están acoplados a proteínas G inhibitorias (G_i) (Barnes, 1998; Hall, 2000; Jacoby y Fryer, 2001; Billington y Penn, 2003). Estos receptores tienen la capacidad de iniciar o modular la señalización a través de acciones derivadas de las subunidades α y $\beta\gamma$. Al disociarse G_{ai} del complejo heterotrimérico se une a la AC V y VI actuando como un modulador negativo de la señalización inducida por G_{os}. Las subunidades G _{$\beta\gamma$} modulan la actividad de AC, inhibiendo la AC tipo I, pero incrementa la activación inducida de AC II, IV y VII. Las subunidades G _{$\beta\gamma$} también pueden activar la fosfolipasa C _{β} (PLC _{β}) resultando la generación de fosfoinosítidos, activación de PKC vía DAG y movilización de calcio. La activación del receptor acoplado a G_i también puede promover el crecimiento del músculo liso de las vías aéreas (Hall, 2000; Billington y Penn, 2003).

Cuadro 1. Principales agentes contráctiles del MLA (Barnes, 1998; Thirstrup, 2000).

Mediador contráctil	Mecanismo contráctil	
	Directo	Indirecto
Acetilcolina	M ₃	
Adenosina		Liberación de histamina, acetilcolina, y prostaglandinas, neuropéptidos y leucotrienos
Bradicinina	BK	Liberación de neuropéptidos y acetilcolina
Endotelina (ET-1,-2, -3)	ET _B	Liberación de prostaglandinas, acetilcolina y neuropéptidos
Histamina	H ₁	No descrito
Leucotrienos LTB ₄ LTC ₄ LTD ₄ LTE ₄	CysLT ₁ CysLT ₁ CysLT ₁	Síntesis de tromboxano A ₂
Neuropéptidos Sustancia P Neurocinina A	NK ₁ NK ₂	No descrito
Factor de activación plaquetaria	PAF	Leucotrienos, eosinófilos, tromboxano A ₂ y acetilcolina
Prostaglandinas PGD ₂ PGF _{2α}	DP FP	No descrito
Serotonina	5-HT ₂	No descrito
Tromboxano	TP	Acetilcolina

1.4. Broncorrelajación

Varias sustancias endógenas son relajantes del MLA y actúan ya sea activando receptores o liberando broncodilatadores endógenos (Barnes, 1998). En el cuadro 2 se presentan los principales mediadores relajantes del MLA. El proceso de relajación a través de las diferentes vías de señalización finalmente tiende a reducir las concentraciones de calcio libre intracelular y/o afectan la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles. Para ello existen cuatro mecanismos celulares principales mediante los cuales actúan los relajantes del músculo liso de las vías aéreas; estos son a través del: a) incremento del AMPc; b) aumento del 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); c) inhibición del rompimiento de los nucleótidos cíclicos; d) modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana celular (Thirstrup, 2000).

Cuadro 2. Principales relajantes del MLA (Barnes, 1998).

Broncodilatador	Receptor
Epinefrina	β_2 -adrenérgico
Péptido intestinal vasoactivo	PVR1
Prostaglandina E ₂	EP
Prostaciclina	IP
Péptido natriurético auricular	Guanilil ciclase (particulada)
NO	Guanilil ciclase (soluble)

1.4.1. Broncorrelajación a través de los receptores acoplados a proteína Gs

Los receptores acoplados a G_s en el MLA son activados por agentes endógenos como las catecolaminas (β_2 -adrenérgicos), prostaglandinas (PGE₂), adenosina (A_{2b}) y el VIP (Hall, 2000; Billington y Penn, 2003). La activación de G α activa a la AC (Billington y Penn, 2003). La activación de la AC cataliza la formación de AMPc a partir del trifosfato de adenosina (ATP) citoplasmático y la función principal del AMPc es activar a la protein cinasa A (PKA). La PKA puede fosforilar varias proteínas intracelulares en residuos específicos de serina y treonina (Barnes 1998), lo que lleva a la inactivación de las MLCK (Batra *et al.*, 2007).

Asimismo, PKA fosforila ciertos canales de K^+ los cuales se abren permitiendo un flujo de potasio con la consiguiente hiperpolarización de la membrana (Barnes, 1998). También fosforila el factor de transcripción CREB, el cual está implicado en la regulación de numerosos genes (Billington y Penn, 2003).

1.4.2. Broncorrelajación a través de la guanilil ciclasa (GC)

Existen dos formas de la enzima guanilil ciclasa, (soluble y particulada) que al activarse catalizan la conversión de GTP (trifosfato de guanosina) a GMPc, con la subsecuente activación de la proteína cinasa G, (PKG) la cual fosforila diversos sustratos que contribuyen a la relajación del MLA (Hamad *et al.*, 2003).

1.4.2.1. Guanilil ciclasa soluble (GC_S)

La GC_S es una enzima heterodimérica que contiene una subunidad larga α y una pequeña β . Es activada por el NO endógeno y por los nitrovasodilatadores.

El NO ejerce su efecto relajante por el incremento de GMPc (Mullershausen *et al.*, 2006) y, además se ha sugerido que en el MLA activa directamente canales BK_{Ca}^{++} (alta conductancia a potasio), oxida proteínas contráctiles intracelulares (tales como las cabezas de miosina o proteínas reguladoras involucradas en la contracción) y disminuye la sensibilidad al calcio intracelular (Hamad *et al.*, 2003). Dependiendo del sitio de generación y de la cantidad, el NO presenta muchos efectos sobre las funciones de las vías aéreas en condiciones fisiológicas o patológicas (Fischer *et al.*, 2002; Hamad *et al.*, 2003) entre las que se encuentran el ejercer un efecto vasodilatador bronquial, presentar un efecto inmunoprotector, estimular la secreción de moco, la formación de radicales libres e inhibición plaquetaria (Mullershausen *et al.*, 2006). Asimismo, el NO desempeña un papel importante como vía parácrina, mediando los efectos relajantes de bradicinina y endotelina (Fischer *et al.*, 2002)

1.4.2.2. Guanilil ciclasa particulada (GC_P)

Esta enzima está compuesta por un solo dominio transmembrana, con una región variable extracelular y una región intracelular más conservada con un dominio catalítico (Hamad *et al.*, 2003). Es activada por el péptido natriurético auricular (PNA) y péptidos relacionados (Barnes, 1998; Hamad *et al.*, 2003). El PNA es producido principalmente en el corazón,

pero es liberado en otros tejidos incluyendo a los pulmones. En las vías aéreas sus sitios de unión se han detectado tanto en músculo liso como en el epitelio. El PNA actúa a través de tres tipos de receptores PNA_A, PNA_B y PNA_C los primeros dos incorporan una parte de la enzima catalítica de la GC_P y el último esta acoplado a la inhibición de AC (Devillier *et al.*, 2001).

1.4.3. Inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos

Las fosfodiesterasas (PDEs) comprenden una gran superfamilia de proteínas cuyos miembros son responsables de la hidrólisis de AMPc y GMPc a sus correspondientes nucleósidos inactivos 5'-monofosfatos AMP y GMP, respectivamente. Consecuentemente, la inhibición de las PDEs resulta en una broncodilatación. En el MLA de animales y del humano por lo menos existen 5 subtipos (I, II, III, IV y V) (Santing *et al.*, 2001), siendo los más importantes las PDEs III, IV y V. Ya que los inhibidores de ellas, son potentes broncodilatadores del MLA. Las PDEs III y IV, degradan AMPc, en tanto que la PDE V degrada GMPc (Kian, 2006). Actualmente, la principal atención recae sobre los inhibidores de la PDE IV, debido a que tienen una importancia especial como agentes antiasmáticos, ya que regulan la función de casi todas las células pro-inflamatorias e inmunes (Kian, 2006; Spina, 2008). Además, se tiene la evidencia de que actúan como antiinflamatorios y broncodilatadores en diferentes especies de animales (Burnouf y Pruniaux, 2002).

1.4.4. Broncorrelajación relacionada con influencia sobre canales iónicos

1.4.4.1. Canales de calcio

En el MLA existen canales de calcio operados por voltaje (VOC) y canales de calcio operados por receptor (ROC), cuya apertura permite el incremento intracelular de calcio que es necesario para la contracción. En la actualidad, los fármacos que bloquean dichos canales, no forman parte de la terapia para tratar el asma, sin embargo, no se descarta su utilidad ya que en estudios clínicos, se ha demostrado que los bloqueadores de los canales de calcio ofrecen una pequeña pero significativa protección contra estímulos broncoconstrictores inducidos por histamina, metacolina, ejercicio y aire frío (Thirstrup, 2000; Mustafa *et al.*, 2008).

1.4.4.2. Canales de potasio K^+

Los canales de K^+ desempeñan un papel importante en el control del potencial de membrana del MLA, su apertura induce una hiperpolarización y broncodilatación. Se han identificado diferentes canales y por lo menos, tres de ellos desempeñan un papel fisiológico y farmacológico en la modulación de la respuesta contráctil en MLA siendo estos: 1) los activados por calcio; 2) rectificador retardado y 3) los sensibles a ATP (Hall, 2000; Pelaia *et al.*, 2002).

1.4.4.2.1. Canales de K^+ activados por calcio

Se han identificado varios canales de K^+ activados por calcio los cuáles se clasifican de acuerdo a la conductancia del canal. De este modo se tienen canales de alta conductancia (maxi- K_{Ca}), de conductancia intermedia (IK_{Ca}) y de baja conductancia (SK_{Ca}), pero los más importantes son los maxi- K , que son abiertos tanto por una despolarización de la membrana como por el incremento de las concentraciones de calcio del citosol (Pelaia *et al.*, 2002).

1.4.4.2.2. Canales de K^+ rectificador tardío

Los canales de K^+ rectificador tardío, son dependientes de voltaje e independientes de calcio, por lo cuál responden a una despolarización de la membrana y contribuyen significativamente al potencial de reposo de la misma (Pelaia *et al.*, 2002).

1.4.4.2.3. Canales de K^+ sensibles a ATP (K^+_{ATP})

La apertura de los canales de K^+_{ATP} es inhibida por un incremento en los niveles citosólicos de ATP. El canal es un complejo octamérico cuyo poro incluye 4 subunidades proteicas, cada una asociada con un receptor para sulfonilurea, la activación de este receptor induce un cambio conformacional que incrementa la probabilidad de apertura del poro del canal (Pelaia *et al.*, 2002).

1.5. Fármacos broncodilatadores

Los fármacos broncodilatadores pueden dividirse en dos grupos dependiendo del mecanismo farmacológico responsable de la actividad relajante. El primer grupo comprende a los fármacos que bloquean el efecto de agonistas contráctiles (tales como anti-colinérgicos, anti-leucotrienos e inhibidores de 5-lipooxigenasas) y el segundo grupo

comprende fármacos que actúan directamente como relajantes del MLA a través de la liberación de AMPc, GMPc, inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos y/o modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana celular (Thirstrup, 2000).

1.5.1. Fármacos que bloquean el efecto de mediadores contráctiles

1.5.1.1. Anticolinérgicos

En las últimas dos décadas, los medicamentos anticolinérgicos han llegado a ser muy utilizados en el tratamiento de rutina de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) y también para el asma en ciertas circunstancias (Gross, 2006).

Actualmente existen antagonistas no selectivos como: ipratropio, oxitropio y tiqizium, que se unen con igual afinidad a los subtipos M_2 y M_3 , sin embargo, pueden incrementar la broncoconstricción al inhibir a los autoreceptores M_2 , cuyo bloqueo ocasiona incremento en la liberación de acetilcolina. También existen antagonistas selectivos, como el tiotropio (cuya selectividad es cinética, puesto que se une con igual afinidad a los subtipos M_1 , M_2 y M_3 , pero con una rápida disociación del M_2 (3.6 h) comparándola con la unión a los tipos M_1 (14.6 h) y M_3 (34.7 h), flutropio (con selectividad M_3 además de acción anti-histamínica), revatropato (selectivo para M_1 y M_3), zamifenacin y darifenacin (selectivos para M_3). Sin embargo de todos los anteriores el que mayor éxito sigue teniendo en clínica es el tiotropio (Lee *et al.*, 2001).

Los anticolinérgicos inhalados tienen un amplio margen de seguridad terapéutico y son bien tolerados, en el uso clínico el efecto adverso más frecuente es sequedad de boca y tos ocasional (Gross, 2006).

1.5.1.2. Antihistamínicos

La histamina liberada de las células mastocito y de los basófilos, puede provocar broncoconstricción, secreción de moco y aumento en la broncoconstricción colinérgica a través de la interacción con receptores H_1 , los cuáles están acoplados a proteínas $G_{(q/11)}$, además han mostrado activación de fosfolipasa D y A_2 , cuyas consecuencias funcionales se desconocen. Los receptores H_2 y H_3 , también han sido identificados en vías aéreas, pero de igual forma se desconoce su importancia (Belvisi *et al.*, 2004). Recientemente, se han desarrollado antihistamínicos nuevos con elevada selectividad y poca capacidad de cruzar

barrera hematoencefálica, disminuyendo de tal forma sus efectos depresores del sistema nervioso central. Algunos de estos antihistamínicos nuevos, son aplicados al tratamiento del asma bronquial y entre ellos se incluyen la loratadina, la fexofenadina, la ebastina y la cetirizina (Barnes, 2001; Inagaki, 2001; Gelfand, 2002).

1.5.1.3. Fármacos anti-leucotrienos

Cuando el ácido araquidónico es metabolizado vía 5-lipoxigenasa se forman los leucotrienos los cuales están implicados en diversos procesos tales como: el incremento en la permeabilidad vascular, hipersecreción de moco, inflamación y broncoconstricción. Para contrarrestar su acción se ha desarrollado un fármaco inhibidor de su síntesis, zileuton que inhibe la enzima 5-lipoxigenasa, así como también fármacos antagonistas competitivos selectivos de los cisteinil leucotrienos LTC₄, LTD₄, y LTE₄ tales como pranlukast, montelukast y zafirlukast, que han mostrado utilidad en el tratamiento del asma pero poco beneficio en pacientes con EPOC (Donohue, 2004; Bossé *et al.*, 2009).

1.5.1.4. Glucocorticoides

Los glucocorticoides producen potentes acciones antiinflamatorias, antialérgicas e inmunosupresoras y son los medicamentos más eficaces en el tratamiento de enfermedades alérgicas, aunque pueden causar severos efectos adversos que incluyen supresión adrenal y desarrollo de osteoporosis, cuando son utilizados a elevadas dosis por un periodo prolongado (Inagaki, 2001). Son efectivos en la terapia del asma y la mayoría se administran por vía oral, sin embargo, son mucho más seguros por vía inhalatoria. Ejemplo de ellos son la beclometasona, la budesonida y la fluticasona (Inagaki, 2001), y recientemente furoato de mometasona, etabonato y ciclesonida que reducen el perfil de efectos adversos (Gunen *et al.*, 2009).

1.5.2. Fármacos relajantes

1.5.2.1. β_2 -Adrenérgicos

En el tratamiento para el asma y otros trastornos respiratorios se utilizan fármacos de acceso directo a la pared bronquial; como son los broncodilatadores que comprenden a los estimulantes de los β_2 -adrenoreceptores. Los cuales se pueden dividir en aquellos que

presentan una duración intermedia de (3-6 h) y los que presentan una larga duración (>12 h). Dentro de los primeros se encuentran el bitolterol, terbutalina y metoproterenol, y dentro de los de larga duración el salmeterol y el formoterol (Harold, 1995).

Sus efectos colaterales principales son el temblor, el incremento de la frecuencia cardiaca y las palpitaciones, las cuales son menos comunes cuando se utilizan agonistas selectivos de los receptores β_2 como el albuterol, el salmeterol y el formoterol, en comparación con agonistas no selectivos tales como el isoproterenol (Harold, 1995).

1.5.2.2. Inhibidores de fosfodiesterasas (PDEs)

El interés en estos compuestos nace del hecho de que durante muchos años se ha utilizado la teofilina en cuadros broncoconstrictivos, no obstante, en los países industrializados ocupa el tercer lugar como agente terapéutico ya que presenta alta frecuencia de efectos adversos en comparación con su baja eficacia. Su mecanismo de acción broncodilatadora es parcialmente explicado por la inhibición de las PDEs, lo que resulta en un incremento de los niveles de AMPc (al inhibir a las PDE III y PDE IV), y GMPc (al inhibir a la PDE V). La teofilina además actúa antagonizando a los receptores de adenosina (Belvisi *et al.*, 2004; Kian, 2006; Spina, 2008).

Actualmente se tiene gran interés por inhibidores de las PDE IV como posible blanco terapéutico para el tratamiento del asma y otras enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, ya que presentan propiedades broncodilatadoras y anti-inflamatorias. Entre los inhibidores de las PDE IV de segunda generación se encuentra: roflumilast que ha mostrado utilidad en el asma y en EPOC (Belvisi *et al.*, 2004; Kian, 2006; Spina, 2008).

1.5.2.3. Canales de K^+

El análisis de los canales de K^+ representa el punto de partida para el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas en el tratamiento del asma y de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Sería muy importante el desarrollo de fármacos de uso inhalatorio, más selectivos para actuar específicamente en las vías aéreas que en el músculo liso vascular, sin embargo, son limitados los estudios clínicos con fármacos que abran canales de K^+ . De los estudios clínicos realizados, cabe mencionar los efectuados con cromakalim con el que se observó que protegía contra la broncoconstricción inducida con histamina pero inducía dolor de cabeza. En tanto que bimakalim, no producía efectos cardiovasculares

significativos, pero era incapaz de facilitar una broncodilatación en pacientes asmáticos (Pelaia *et al.*, 2002).

1.5.2.4. Canales de K⁺ sensibles a ATP

La actividad de los canales de K⁺_{ATP}, es bloqueada selectivamente por derivados de la sulfonilurea, tales como la glibenclamida y son abiertos por fármacos como levromakalim y HOE234, los cuales son efectivos relajantes de las vías aéreas humanas *in vitro*. Sin embargo, tales fármacos se han desaprobado en estudios clínicos, ya que son más potentes como vasodilatadores que como broncodilatadores pudiendo inducir efectos cardiovasculares (Barnes, 1998).

1.6. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias

El uso de la medicina complementaria o alternativa es frecuente en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Ziment, 2000), sobre todo en las de tipo crónico como lo es el asma, en cuyo tratamiento destaca el empleo de preparaciones herbales (Huntley y Ernst, 2000) que son utilizadas ampliamente por diferentes culturas. Algunas de las plantas se han evaluado en clínica, obteniéndose resultados favorables para algunas y poco convincentes para otras. En los cuadros 3 y 4 se muestran algunos ejemplos de las plantas utilizadas en el tratamiento del asma por la medicina tradicional de China e India. En el cuadro 5 se presentan algunos ejemplos de plantas utilizadas en otros países. La medicina herbal para el tratamiento del asma ha tenido una importancia histórica innegable, ya que cuatro clases de fármacos frecuentemente utilizados para su tratamiento como son: los agonistas β_2 -adrenérgicos, anticolinérgicos, metilxantinas y cromonas han tenido sus orígenes en tratamientos herbales (Huntley y Ernst, 2000; Chu y Drazen, 2005), razón por la que en la actualidad, se siguen las prácticas medicas tradicionales como fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos (Fabricant y Farnsworth, 2001).

Cuadro 3. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de China.

Planta	Compuestos activos	Mecanismos de acción	Estudios clínicos / Resultados	Referencia
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolidos.	Relajan el músculo liso, además de actuar como antagonistas del factor de activación plaquetario.	Sí / Mejoramiento en la función pulmonar comparado con placebo y grupo control.	Li <i>et al.</i> , 1997.
<i>Glycyrrhiza uvale</i>	Glicirrizina, ácido glicerritínico, ácidos tánnicos, licorice, etc.	Inhibición del factor de activación plaquetario, bloquea la conversión de cortisol a cortisona.	No / -----	Bielory y Lupoli, 1999.
<i>Ligusticum wallichii</i>	No reportados.	No reportado.	Sí / Mejora de síntomas subjetivos.	Shao <i>et al.</i> , 1994.
<i>Ephedra sínica</i>	Efedrina, pseudoefedrina y alcaloides.	Activadores de receptores adrenérgicos.	Sí / Mecanismo broncodilatador.	Graham y Blaiss, 2000.

Cuadro 4. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de la India.

Planta	Compuestos activos	Mecanismos de acción	Estudios clínicos / Resultados	Referencia
<i>Picrorrhiza kurroa</i>	No reportados.	No reportados.	Sí / No se presentaron cambios en los parámetros de función pulmonar.	Doshi <i>et al.</i> , 1983.
<i>Solanum xanthocarpum</i> / <i>trilobatum</i>	No reportados.	No reportados.	Sí / Mejora en síntomas subjetivos, broncodilatación, reducción de edema bronquial y de secreciones.	Govindan <i>et al.</i> , 1999.
<i>Tylophora indica</i>	Tiloforina.	Se ha reportado inhibición de anafilaxis.	Sí / Existen 5 reportes clínicos, pero su eficacia es inconclusa.	Huntley y Ernst, 2000.
<i>Coleus forskohlii</i>	Forskolina.	Estimula la enzima adenilil ciclasa.	Sí / Efecto broncodilatador.	Huntley y Ernst, 2000.

Cuadro 5. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de diferentes países.

Planta	País	Compuestos activos	Mecanismos de acción (estudios <i>in vitro</i>)	Referencia
<i>Petasites formosanus</i>	Taiwán	s-petasina y la s-isopetasina.	Efecto antiespasmódico no específico y un efecto antimuscarínico.	Ko <i>et al.</i> , 2001.
<i>Rhamnus nakaharai</i>	Taiwán	3-O-metilquercetina.	Inhibición de fosfodiesterasas y reducción de los niveles de calcio.	Ko <i>et al.</i> , 2002.
<i>Carum copticum</i>	India, Iran y Egipto	No reportados.	Anticolinérgico, y antagonista competitivo sobre receptores H ₁ .	Boskabady y Shaikhi, 2000.
<i>Entada africana</i>	Africa	No reportados.	Antihistamínico.	Occhiuto <i>et al.</i> , 1999.
<i>Clerodendrum petasites</i>	Tailandia	Hispidulina.	No descrito.	Hazekamp <i>et al.</i> , 2001.
<i>Hydrastis canadensis</i>	Estados Unidos de América	Berberina, β -hidrastina, canadina y canadalina.	Activación de receptores adrenérgicos y adenosínicos e inhibición de fosfodiesterasas.	Abdel-Haq <i>et al.</i> , 2000.

1.6.1. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias en México

En nuestro país, la medicina tradicional tiene un amplio uso para el tratamiento de los padecimientos respiratorios ya que es una práctica común preparar infusiones o decocciones herbales, entre las cuales destaca el uso de *Croton reflexifolius* (huilocuahuilt), *Allium sativum* (ajo), *Argemone* (chicalote), *Bougainvillea glabra* (bugambilia), *Crescentia alata* (cirian), *Cunila lythrifolia* (poleo de campo), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Gnaphalium* sp. (gordolobo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Mentha pulegium* (poleo), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Sambucus nigra* (sauco) y *Thymus vulgaris* (tomillo) entre otras (Lozoya *et al.*, 1987; Argueta y Cano, 1994; Andrade-Cetto, 2009).

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de plantas utilizadas para tratar estos padecimientos, las investigaciones científicas encaminadas a demostrar el valor terapéutico de ellas es limitado (Rojas *et al.*, 2001). Cabe mencionar algunos de los estudios efectuados a plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades respiratorias los cuáles se muestran en el cuadro 6.

1.7. El género *Croton*

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae establecida por Carolus Linnaeus en 1737, y está constituido por 700 especies (Catalán *et al.*, 2003).

Son arbustos hasta de 4.5 metros con las ramillas estrelladas pilosas, presentan hojas membranosas de 3 a 5 cm, con dos glándulas en el ápice de lámina ovada o elíptica, son agudas o acuminadas; en la parte superior presentan la característica de ser estrellado pubescentes y en la parte inferior son densamente estrellado tomentosas; presentan inflorescencia generalmente en racimos largos, con flores unisexuales, además de fruto y cápsula trilobulada. Se encuentran distribuidos comúnmente en los estados de Hidalgo, Sinaloa, Veracruz, Chiapas y Yucatán (Martínez, 1987).

1.7.1. Estudios químicos del género *Croton*

En estudios químicos del género *Croton* se han identificado diversos diterpenoides, diterpenos (ésteres de forbol, clerodeno, labdano, kaureno, etc) y flavonoides (Block *et al.*, 2004; Adelekan *et al.*, 2008)

Cuadro 6. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Planta	Extracto o compuestos activos identificados	Actividad reportada/Mecanismo propuesto	Referencia
<i>Argemone ochroleuca</i>	Berberina	Actividad relajante en la tráquea de cobayo. Antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2008
<i>Argemone platyceras</i>	Isoquercitrina	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe las contracciones provocadas por carbacol y leucotrieno D ₄ .	Fernandez <i>et al.</i> , 2005.
<i>Croton reflexifolius</i>	Ácido poliáltico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Presentó actividad anti-muscarínica.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2008.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Aceite esencial	Actividad anti-inflamatoria en ratas. Inhibe la hipersecreción de mucinas en vías aéreas.	Lu <i>et al.</i> , 2004.
<i>Galphimia glauca</i>	Fracciones de acetato de etilo	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe la broncoconstricción inducida por leucotrieno D ₄ .	Campos <i>et al.</i> , 2001.
<i>Gnaphalium conoideum</i>	Extracto metanólico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Bloqueador parcial de canales de Ca ⁺⁺ .	Campos-Bedolla <i>et al.</i> , 2005.
<i>Gnaphalium liebmannii</i>	Extracto hexánico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Probable inhibición de fosfodiesterasas.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2008.
<i>Thymus vulgaris</i>	Extracto acuoso	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe la expresión del mRNA de la iNOS.	Boskabady <i>et al.</i> , 2006.

1.7.2. Estudios de actividad biológica del género *Croton* y de *Croton reflexifolius*

Se han reportado diversas propiedades biológicas para diferentes especies del género *Croton* entre las que se encuentran: anti-hipertensiva (Baccelli *et al.*, 2005), insecticida (Nihei *et al.*, 2005), antiplasmódica (Adelekan *et al.*, 2008), antibacteriana, antimicótica (Shahid *et al.*, 2008), vasodilatadora (Magalhaes *et al.*, 2008) y antidiabética (Govindarajan *et al.*, 2008).

En el caso particular de *Croton reflexifolius*, se ha descrito actividad gastroprotectora (Reyes-Trejo *et al.*, 2008) y actividad relajante del músculo liso de tráquea aislada de cobayo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008). En dichos estudios, ambos efectos fueron atribuidos al ácido poliáltico.

El ácido poliáltico además de presentar las actividades biológicas descritas anteriormente, actúa como repelente al caracol marino *Monodonta neritoides* (Ohta y Nawamaka, 1978) y presenta una actividad antimutagénica (Miyasawa *et al.*, 1995).

1.7.3. Mecanismos de acción relajante del ácido poliáltico en músculo liso de tráquea aislada de cobayo

En un estudio previo se demostró que el ácido poliáltico es capaz de relajar el músculo liso de tráquea aislada de cobayo, independientemente de haber sido pre-contraído con carbacol, histamina y KCl. Además, su efecto no fue modificado por glibenclamida (bloqueador de canales de K^+_{ATP}), L-NAME (inhibidor de la sintasa de NO) o propanolol (bloqueador de receptores β -adrenérgicos) sugiriendo que los canales de K^+_{ATP} , el NO y los receptores β -adrenérgicos no participan en su mecanismo de acción. Adicionalmente, se demostró que no inhibe la respuesta contráctil inducida con histamina, pero sí produjo un efecto anti-muscarínico no competitivo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la medicina tradicional de nuestro país, una de las plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias es *Croton reflexifolius*, para la cuál ha quedado demostrado que posee metabolitos relajantes del músculo liso de tráquea de cobayo, siendo uno de los principales el ácido poliáltico. Asimismo, se han hecho aproximaciones de su posible mecanismo de acción, las cuáles sugieren un efecto anti-muscarínico no competitivo, descartando la activación de receptores β -adrenérgicos, de los canales de K^+_{ATP} , y del NO, así como actividad anti-histamínica. Considerando lo anterior, el presente proyecto se enfoca en ampliar el conocimiento del mecanismo de acción del ácido poliáltico, para lo cual se determinará la participación de los canales de calcio, y de las enzimas guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa. En ese sentido, la generación de dicho conocimiento podría servir para enriquecer las alternativas terapéuticas actuales, donde es frecuente la administración de una combinación de dos o más fármacos para obtener un incremento en la actividad relajante en el MLA o para reducir los efectos adversos de alguno de ellos.

III. HIPÓTESIS

El ácido poliáltico ejerce un efecto relajante en el músculo liso de tráquea aislada de cobayo, que involucra la inhibición de los canales de Ca^{++} , así como la activación de las enzimas guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los canales de Ca^{++} , y de las enzimas: guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa en el mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico, en el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.

4.1. Objetivos específicos

1. Determinar si en el mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico participan los canales de Ca^{++} .
2. Identificar la participación de las enzimas: guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa en el mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico.

V. METODOLOGÍA

5.1. Animales

Para los experimentos se utilizaron cobayos machos con un peso corporal entre 300 y 400 g, mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso al alimento y agua. Los procedimientos involucrados en el cuidado y manejo de los animales se realizaron en conformidad con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Mantenimiento de los Animales (NOM-62-ZOO-1999). Especificaciones Técnicas para la Producción Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

5.2. Fármacos

La acetilcolina, carbacol, nitroprusiato de sodio, forskolina, ODQ (1H-[1, 2, 4]-oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-ona), la 2',5'-dideoxiadenosina y el diltiazem fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El ODQ, la 2',5'-dideoxiadenosina y la forskolina se disolvieron primero en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente fueron diluidos en agua destilada. La concentración final de DMSO fue menor a 0.1%. Los fármacos restantes, fueron disueltos en agua destilada y suspendidos en agua destilada con Tween 80 al 0.5%.

5.3. Aislamiento e identificación del ácido poliáltico

El ácido poliáltico (figura 1) se aisló del extracto de diclorometano, el cuál fue preparado a partir de hojas secas de *Croton reflexifolius* vía maceración siguiendo la metodología descrita por Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008. La identificación del mismo se realizó con base en sus propiedades físicas, y por análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , en base a los datos reportados en la literatura (Carreras *et al.*, 1998).

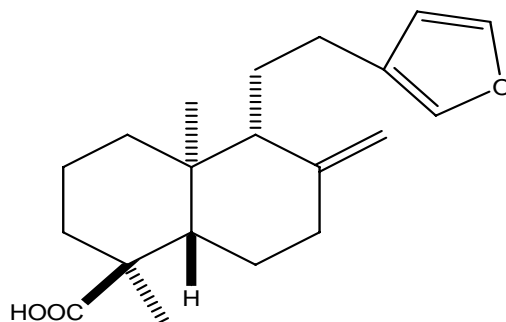


Figura 1: Estructura del ácido poliáltico.

5.4. Ensayos biológicos

5.4.1. Disección de la tráquea y montaje de la preparación

Los animales se sacrificaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (95 mg/kg), posteriormente de forma inmediata se realizó la disección de la tráquea limpiándola del tejido circundante. La tráquea se mantuvo en solución de Krebs a 37° C cuya composición fue (mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, CaCl₂·2H₂O 2.2 y glucosa 11, a 37 °C, con un pH de 7.4 manteniéndola en aeración constante con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Posteriormente se obtuvieron 11 anillos de aproximadamente 2 mm de longitud, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs. Cada anillo fue suspendido entre dos ganchos de alambre de Nicromel, uno de los extremos se fijó en una cámara para órgano aislado y el otro a un transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado en un polígrafo Biopack System que permitió obtener los datos mediante el programa Acknowledge MP100 versión 3.5.3.

Cada anillo de la tráquea se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se estimuló con clorhidrato de acetilcolina (3×10^{-5} M). Después de la estimulación, se realizaron tres lavados con solución de Krebs. Posteriormente, se permitió que los anillos se estabilizaran por una hora, realizando lavados cada 15 minutos en el transcurso de la misma, antes de la realización de los experimentos correspondientes (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007).

5.4.2. Evaluación del efecto relajante del ácido poliáltico

Para evaluar el efecto relajante, el tejido se contrajo previamente con carbacol 3 µM dejando en contacto al fármaco con el tejido hasta alcanzar una meseta de contracción (aproximadamente 6 minutos). Una vez en la meseta se aplicaron diferentes concentraciones crecientes de ácido poliáltico (5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M), en forma acumulativa. El control, consistió en la aplicación de Tween 80 al 0.5% disuelto en agua destilada. El efecto relajante de ácido poliáltico fue expresado como valor de CE₅₀ (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

5.4.3. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta contráctil inducida con calcio

Después de que los tejidos se estabilizaron de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 5.4.1., la solución de Krebs fue sustituida por una solución de Krebs libre de calcio, (cuya composición fue modificada, sustituyendo 60 mM de NaCl por 60 mM de KCl), transcurridos 15 minutos, se adicionó a los tejidos una solución de EDTA (0.2 M), la cuál permaneció en contacto con ellos por 5 minutos. Posteriormente se efectuaron lavados, con la solución de Krebs libre de calcio, y se repitió el procedimiento anterior hasta que los tejidos no presentaron efecto contráctil.

A continuación se construyeron curvas concentración respuesta acumulativas de Ca^{++} (1×10^{-4} - 0.0316 M), en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ácido poliáltico (1×10^{-4} , 1.77×10^{-4} y 3.16×10^{-4} M) y/o vehículo, las cuales fueron adicionadas 5 minutos antes del comienzo de las curvas de calcio. Las diferentes concentraciones de ácido poliáltico se aplicaron en experimentos independientes. La máxima respuesta contráctil producida por Ca^{++} (0.0316 M) fue considerada como el 100%. Como control positivo se utilizó diltiazem (1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M), un bloqueador de los canales de calcio (Mustafa *et al.*, 2008).

5.4.4. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta relajante de nitroprusiato de sodio y forskolina

Las preparaciones se pre-contrajeron con carbacol (3 μM), una vez alcanzada la meseta se incubaron por 5 minutos con ácido poliáltico, (1×10^{-4} y 3.16×10^{-4} M) o vehículo posteriormente se construyeron las curvas concentración-respuesta relajante de nitroprusiato de sodio (activador de GCs, 3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M) y forskolina (activador de AC, 1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M) en experimentos independientes. El vehículo consistió en la aplicación de Tween 80 al 0.5% en agua destilada (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007).

5.4.5. Evaluación de la participación de la guanilil ciclasa soluble en el efecto relajante del ácido poliáltico

Las preparaciones se pre-contrajeron con carbacol (3 μM), una vez alcanzada la meseta se incubaron por 5 minutos con ODQ (bloqueador de GCs, 30 μM) o vehículo, y

posteriormente se construyeron las curvas concentración respuesta relajante de ácido poliáltico (5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M). En esta parte experimental se utilizó nitroprusiato de sodio (3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M) como fármaco de referencia (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007).

5.4.6. Evaluación de la participación de la adenilil ciclasa en el efecto relajante del ácido poliáltico

Las preparaciones se pre-contrajeron con carbacol ($3 \mu\text{M}$), una vez alcanzada la meseta se incubaron por 5 minutos con 2',5'-dideoxiadenosina (bloqueador de AC, $40 \mu\text{M}$) o vehículo, y posteriormente se construyeron las curvas concentración respuesta relajante de ácido poliáltico (5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M). En esta parte experimental se utilizó forskolina (1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M) como fármaco de referencia (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007).

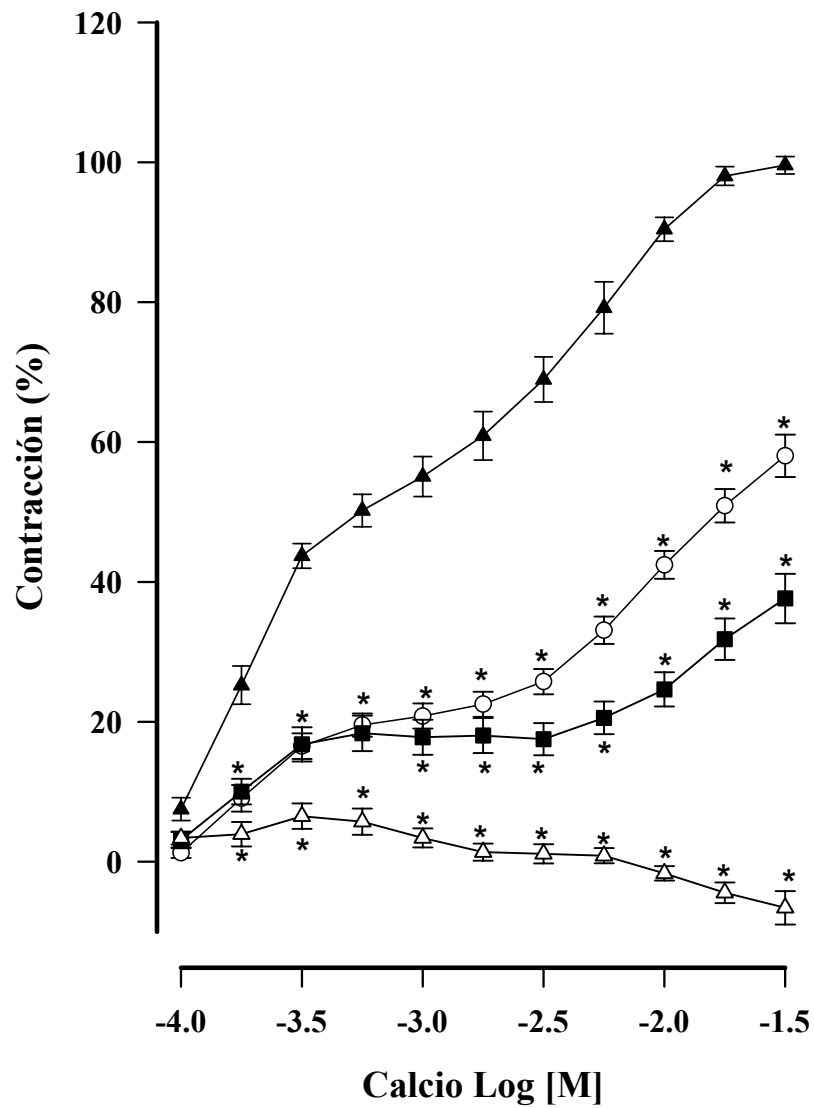
VI. ESTADÍSTICA

Los valores de CE_{50} fueron calculados por el método de regresión lineal (Tallarida, 2000). Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media. Las diferencias entre dos determinaciones se analizaron con una prueba t de Student no pareada. Las diferencias entre varias determinaciones se realizaron utilizando un análisis de varianza de una vía (ANADEVA), seguida de la prueba de Dunnett. Se consideraron diferencias estadísticas significativas para un valor de $p < 0.05$.

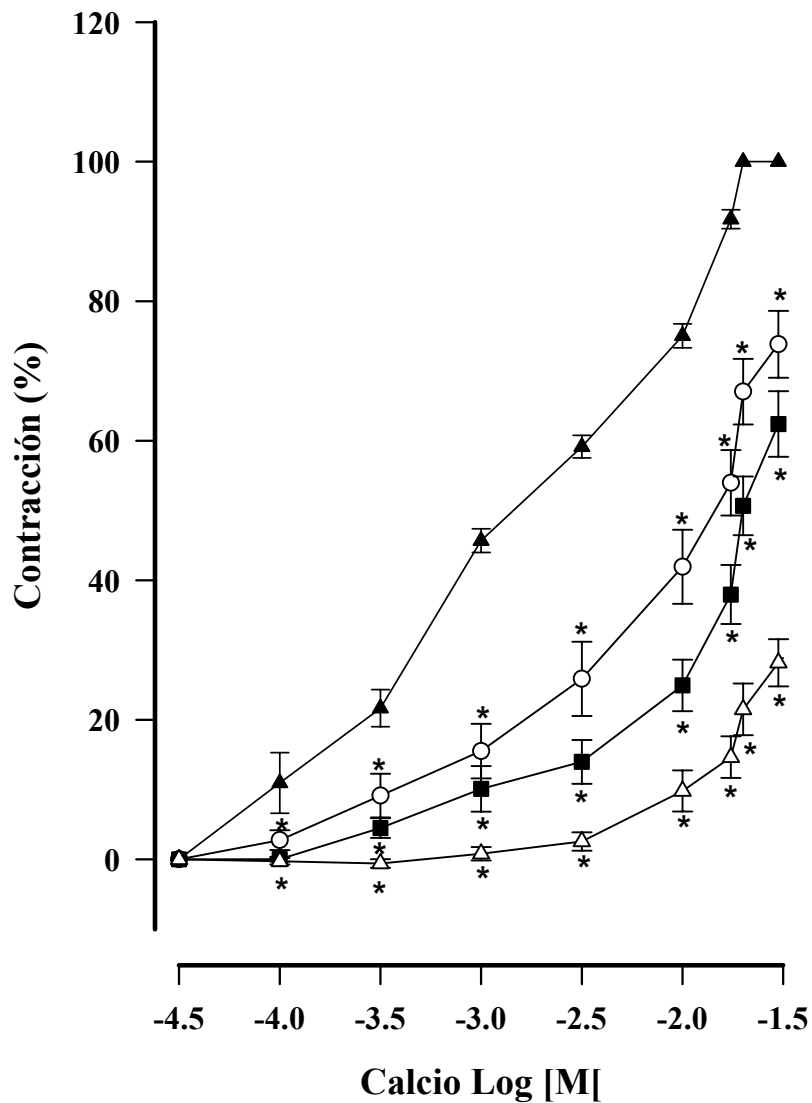
VII. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta contráctil inducida con calcio

Con la finalidad de aportar información acerca del mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico, y determinar si su efecto se debe a que actúa a través del bloqueo de canales de Ca^{++} , se aplicaron concentraciones crecientes de Ca^{++} (1×10^{-4} - 0.0316 M) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ácido poliáltico (1×10^{-4} , 1.77×10^{-4} y 3.16×10^{-4} M) en experimentos independientes. En las evaluaciones correspondientes, se observó que el ácido poliáltico, produce una inhibición del efecto contráctil de Ca^{++} en forma dependiente de la concentración y se comportó como un antagonista de tipo no competitivo (gráfica 1), ya que el ácido poliáltico disminuyó los porcentajes de máximo efecto contráctil de Ca^{++} (E_{max}) inducido con calcio (tabla 1). El fármaco utilizado como referencia: diltiazem (bloqueador de los canales de Ca^{++}), se comportó de igual forma como un antagonista no competitivo (gráfica 2, tabla 2).



Gráfica 1. Efecto inhibitorio del ácido poliáltico (○ 1×10^{-4} , ■ 1.77×10^{-4} y △ 3.16×10^{-4} M) sobre la respuesta contráctil de Ca^{++} (▲ 1×10^{-4} - 0.0316 M) en anillos de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba ANADEVa seguida de la prueba de Dunnet * $p < 0.05$ respecto al control.



Gráfica 2. Efecto inhibitorio del diltiazem (○ 1×10^{-9} , ■ 1×10^{-7} y △ 1×10^{-5} M) sobre las contracciones provocadas por Ca^{++} (▲ 1×10^{-4} - 0.0316 M) en anillos de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnet * $p < 0.05$ respecto al control.

Tabla 1. Valores de CE_{50} y de $E_{m\acute{a}x}$ de calcio en ausencia y presencia de ácido poliáltico. Los resultados se presentan como la media \pm EEM.

Ácido poliáltico (mM)	Calcio CE_{50} (mM)	$E_{m\acute{a}x}$ Contracción (%)
0	0.823 ± 0.096 ;	99.58 ± 1.25
0.1	$23.16 \pm 5.696^*$;	$58.02 \pm 3.04^{**}$
0.177	ND ;	$37.63 \pm 3.52^{**}$
0.316	ND ;	$-6.59 \pm 2.4^{**}$

La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de t * $p < 0.05$ o por una prueba ANADEVa seguida de la prueba de Dunnet ** $p < 0.05$ respecto al control. N.D= no definida.

Tabla 2. Valores de CE_{50} y $E_{m\acute{a}x}$ de calcio en ausencia y presencia de diltiazem. Los resultados se presentan como la media \pm EEM.

Diltiazem (M)	Calcio CE_{50} (mM)	$E_{m\acute{a}x}$ Contracción (%)
0	1.428 ± 0.163 ;	100 ± 0.0
1×10^{-9}	$9.691 \pm 2.157^*$;	$73.82 \pm 4.81^*$
1×10^{-7}	$273 \pm 10.785^*$;	$62.39 \pm 4.69^*$
1×10^{-5}	ND ;	$28.17 \pm 3.38^*$

La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnet * $p < 0.05$ respecto al control. N.D = no definida.

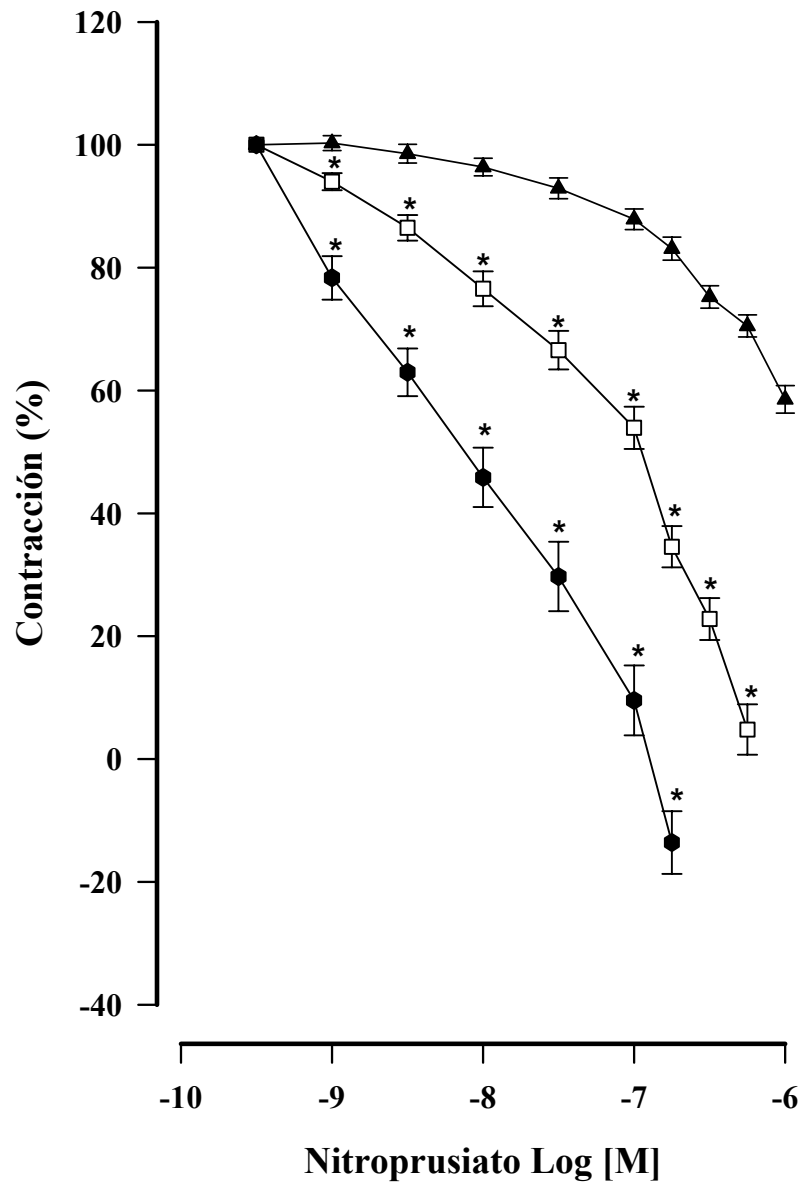
7.2. Evaluación del efecto del ácido poliáltico en la respuesta relajante de nitroprusiato de sodio y forskolina

En las evaluaciones enfocadas a determinar el efecto del ácido poliáltico (1×10^{-4} M y 3.16×10^{-4} M) sobre la acción relajante de nitroprusiato de sodio (3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M) y forskolina (1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M), se encontró que produce un desplazamiento hacia la izquierda en las curvas acumulativas concentración-respuesta de dichos agonistas, en forma dependiente de la concentración (gráficas 3 y 4 respectivamente) reduciendo significativamente los valores de CE_{50} respecto al control como se puede apreciar en la tabla 3.

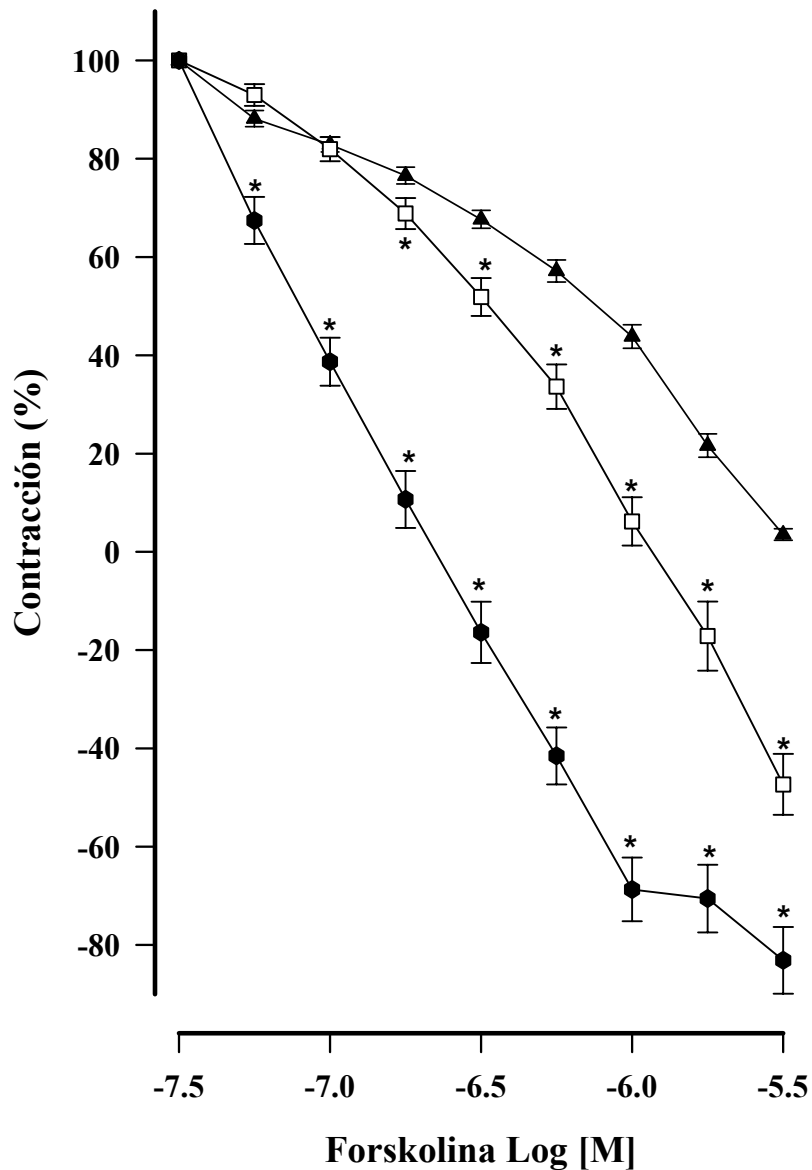
7.3. Evaluación de la participación de la guanilil ciclasa soluble en el efecto relajante del ácido poliáltico

Para establecer la participación de la enzima guanilil ciclasa soluble, en el mecanismo de relajación del ácido poliáltico (5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M) se realizaron curvas concentración-respuesta del mismo, en ausencia y en presencia del inhibidor ODQ (30 μ M). En las evaluaciones correspondientes, no se observa modificación significativa en sus curvas concentración-respuesta relajante (gráfica 5A). Por consiguiente tampoco presentó variación estadística en su valor CE_{50} , el cuál fue de 189 ± 10.9 μ M. Estos resultados sugieren que en el mecanismo de relajación del ácido poliáltico no está implicada la activación de la enzima guanilil ciclasa soluble.

En estos experimentos se utilizó como fármaco de referencia a nitroprusiato de sodio (3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M), cuyo efecto relajante se inhibió por la presencia de ODQ, como se puede apreciar en la gráfica 5B.



Gráfica 3. Efecto relajante de nitroprusiato (▲ 3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M) en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ácido poliáltico (□ 1×10^{-4} M y ● 3.16×10^{-4} M respectivamente). Cada punto representa \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett * $p < 0.05$ respecto al control.



Gráfica 4. Efecto relajante de forskolina (▲ 1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M) en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ácido poliáltico (□ 1×10^{-4} M y ● 3.16×10^{-4} M respectivamente). Cada punto representa \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett * $p < 0.05$ respecto al control.

Tabla 3: Valores de CE_{50} , de nitroprusiato y forskolina en ausencia y presencia de ácido poliáltico. Los resultados se presentan como la media \pm EEM (μ M).

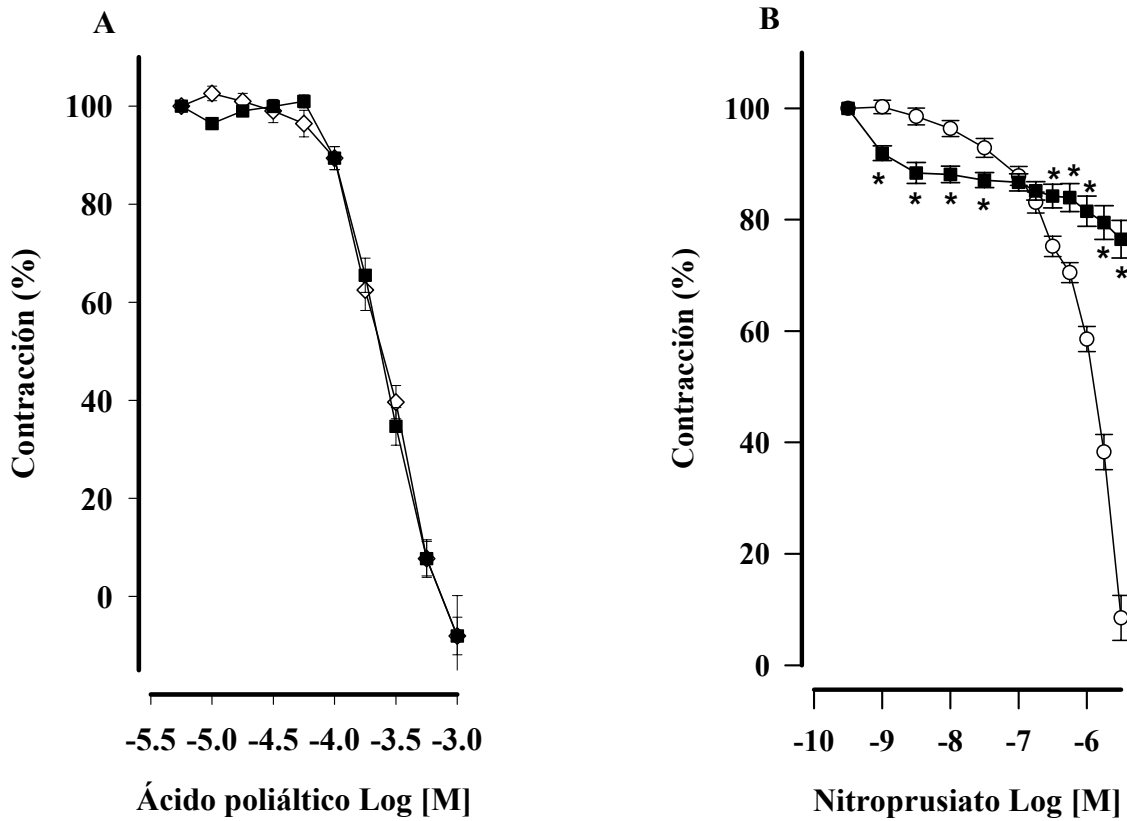
Ácido poliáltico (μM)	Nitroprusiato CE_{50} (μM)	Forskolina CE_{50} (μM)
0	0.727 ± 0.032	0.297 ± 0.040
100	$0.084 \pm 0.135^*$	$0.135 \pm 0.015^*$
316	$0.0065 \pm 0.0008^*$	$0.044 \pm 0.005^*$

La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett * $p < 0.05$ respecto al control.

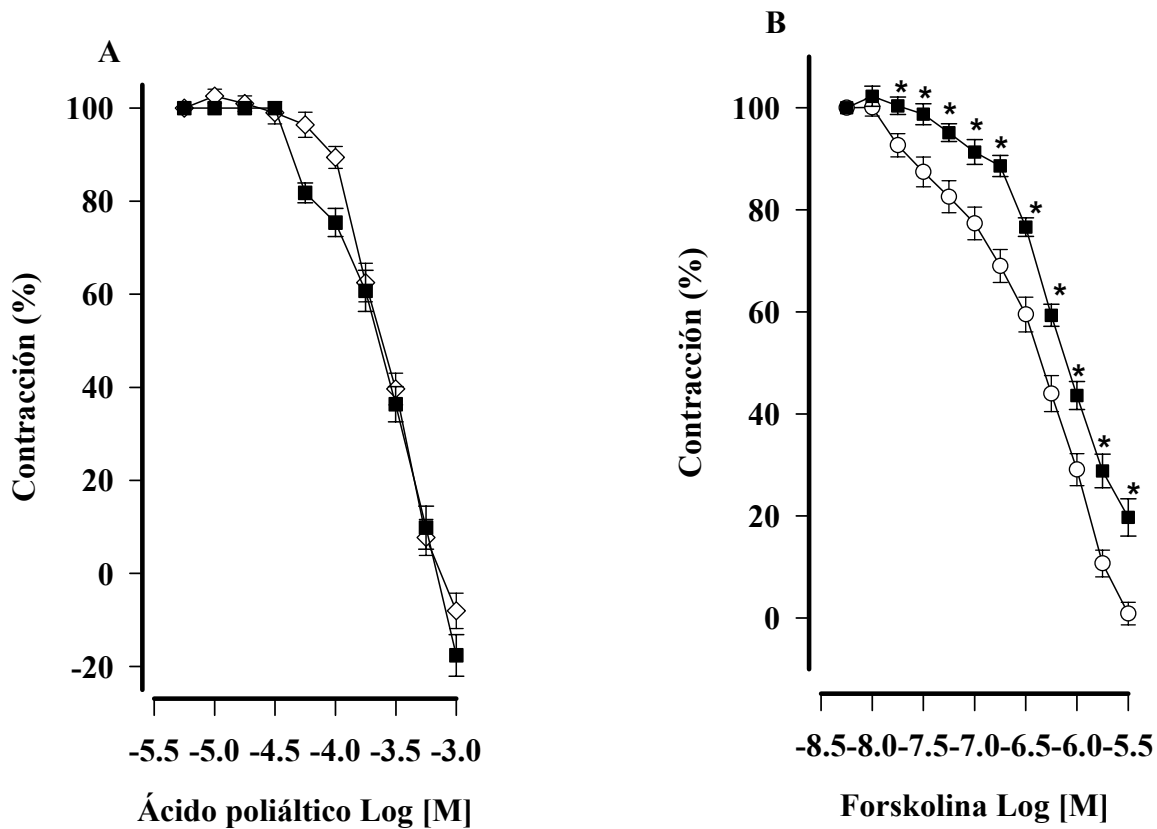
7.4. Evaluación de la participación de adenilil ciclasa en el efecto relajante del ácido poliáltico

Para determinar la participación de la enzima AC, se aplicaron concentraciones crecientes de ácido poliáltico (5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M) o forskolina (1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M) antes y después de exponer los tejidos con el inhibidor 2',5'-didieoxiadenosina (40 μ M). Las curvas de relajación del ácido poliáltico no se alteraron por la presencia del inhibidor (gráfica 6A). Por consiguiente, al realizar el análisis estadístico de los valores de CE_{50} y del % de $E_{m\acute{a}x}$ de relajación del ácido poliáltico, en ausencia (187 ± 9.73 μ M; 108.05 ± 3.28 %) y en presencia (189 ± 6.54 μ M; 117.61 ± 4.47 %) del inhibidor no se encontró diferencia estadística, lo cuál indica que al parecer la enzima AC no participa en su mecanismo de acción relajante.

En los experimentos con forskolina utilizado como fármaco de referencia, se observa un ligero desplazamiento hacia la derecha en la curva expuesta al inhibidor en comparación con la que no lo estuvo (gráfica 6B). Sin embargo, no se encontró diferencia estadística entre los valores de CE_{50} en ausencia (0.446 ± 0.193 μ M) y en presencia del inhibidor (0.693 ± 0.064 μ M). Aunque si en % de $E_{m\acute{a}x}$ de relajación, que fé de 99.11 ± 2.22 y de 80.27 ± 3.66 en ausencia y en presencia del inhibidor, respectivamente.



Gráfica 5. Efecto relajante del ácido poliáltico **A** (\diamond 5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M) y nitroprusiato **B** (\circ 3.16×10^{-10} - 3.16×10^{-6} M) en anillos de tráquea aislada de cobayo en ausencia y presencia de ODQ (\blacksquare $30 \mu\text{M}$). Cada punto representa el promedio \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de t * $p < 0.05$



Grafica 6. Efecto relajante de ácido poliáltico **A** (◇ 5.62×10^{-6} - 1×10^{-3} M) y forskolina **B** (○ 1.77×10^{-8} - 1.77×10^{-6} M) en anillos de tráquea aislada de cobayo, en ausencia y presencia de 2', 5'-dideoxiadenosina (■ 40 μ M). Cada punto representa \pm EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de t * $p < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

La especie de *Croton reflexifolius* conocida popularmente como “huilocuahuitl” se utiliza en la medicina tradicional de la Huasteca Hidalguense de nuestro país, para el tratamiento de la diabetes, la úlcera gástrica y de enfermedades respiratorias. Sobre estas dos últimas enfermedades es importante señalar que se han realizado dos estudios científicos que dan evidencia de su uso tradicional. Además, en dichos trabajos las actividades gastroprotectora y relajante del músculo liso traqueal, fueron atribuidas al ácido poliáltico (Reyes-Trejo *et al.*, 2008; Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

Asimismo, en uno de los trabajos antes mencionados se hicieron aproximaciones sobre el mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico, en el cuál se determinó que ejerce un efecto anti-muscarínico y se descartó la acción antihistamínica, así como la participación de canales de K^+_{ATP} , de receptores β -adrenérgicos y de ON (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008). Considerando lo anterior, este trabajo se desarrolló con la intención de aportar mayor información sobre el posible mecanismo de acción relajante del ácido poliáltico, utilizando el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.

8.1. Participación de los canales de calcio

El primer aspecto a evaluar fue la participación de los canales de calcio. Lo anterior en base a datos previos reportados por Sánchez-Mendoza, y col. (2008), donde se reportó que el ácido poliáltico relajaba el tejido pre-contráido con KCl, y considerando que la pre-contracción inducida con KCl se produce principalmente como resultado del incremento en el flujo de calcio extracelular, a través de la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes (Ca^{++}_v) (Campos-Bedolla *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2008), resultaba interesante determinar el efecto del ácido poliáltico sobre las contracciones provocadas por calcio.

El Ca^{++} es importante para la regulación del tono del MLA, ya que el incremento en su concentración intracelular, facilita la formación de complejos calcio-calmodulina, que a la vez activan a las enzimas MLCK, encargadas de fosforilar a las cadenas de miosina, las cuáles interactúan con actina y finalmente desencadenan el proceso contráctil (Janssen y Killian, 2006).

En la gráfica 1, se puede apreciar que el ácido poliáltico inhibe de forma no competitiva las contracciones inducidas con calcio, lo que sugiere un bloqueo de los canales de calcio

voltaje dependientes (Ca^{++}_v) en su mecanismo de acción, de manera similar al producido por diltiazem (gráfica 2) que fue el fármaco utilizado como referencia (Mustafa *et al.*, 2008).

En la actualidad el conocimiento de los procesos de contracción del MLA, plantea un papel importante de los canales de Ca^{++}_v en la broncoconstricción (Janssen, 2009). Sin embargo, en la literatura existe controversia sobre la utilidad de los antagonistas de calcio. Algunos autores reportan que los antagonistas de calcio, son ineficaces para el tratamiento del asma (Janssen y Killian, 2006) pero otros han demostrado un efecto relajante en broncoespamos inducidos tanto en pacientes como en animales de experimentación (Matsuda *et al.*, 2000; Franová *et al.*, 2004; Mustafa *et al.* 2008).

Adicionalmente, Matsuda y col. (2000) proponen el empleo de los antagonistas de calcio para evitar los broncoespamos que suelen presentarse durante la anestesia, especialmente en pacientes con asma bronquial y EPOC.

En ese sentido sería interesante continuar con el estudio del ácido poliáltico para definir su posible utilidad en el tratamiento de enfermedades respiratorias, ya que además de la acción inhibitoria de los canales de Ca^{++}_v , no se descarta la posible activación o inhibición de receptores, enzimas, y/o bombas intercambiadoras, todos ellos relacionados con la disminución de calcio intracelular, proceso implicado en la relajación del MLA (Janssen, 2009). En adición al efecto anti-muscarínico previamente reportado (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

8.2. Participación de la enzima guanilil ciclasa soluble

El segundo aspecto a evaluar fue la participación de la enzima guanilil ciclasa soluble. Se sabe que al ser activadas las enzimas guanilil ciclasas, estas incrementan los niveles de GMPc (Mullershausen *et al.*, 2006) segundo mensajero activador de la enzima PKG, la cuál inactiva a proteínas específicas implicadas en los procesos contráctiles, facilitando la relajación del MLA (Hall, 2000).

No obstante de haberse descartado previamente la participación del ON (activador de guanilil ciclasa soluble), en la actividad relajante del ácido poliáltico (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008), quedaba pendiente por determinar si este compuesto podía activar a la enzima guanilil ciclasa soluble. Considerando que el NO no es el único ligando activador de dicha enzima, ya que en la actualidad se han descubierto diferentes receptores de guanilil ciclasa

los cuáles se siguen considerando “huerfanos”, es decir, son receptores cuyo ligando activador se desconoce (Alberts *et al.*, 2000).

Con este propósito, en primer lugar se realizaron curvas concentración-respuesta de nitroprusiato de sodio (donador de NO) en presencia y ausencia de ácido poliáltico. En dichas evaluaciones se aprecia que los tejidos incubados con ácido poliáltico desplazaron hacia la izquierda las curvas concentración-respuesta de nitroprusiato de sodio (gráfica 3), reduciendo sus valores de CE_{50} (tabla 3).

Considerando que el incremento en el efecto relajante de nitroprusiato de sodio podía ser ocasionado por la activación de mecanismos celulares similares o diferentes, con la subsecuente potenciación en un mismo sentido, favoreciendo con ello la relajación, en segundo lugar se realizaron curvas de relajación del ácido poliáltico en presencia y ausencia de ODQ (inhibidor de la enzima guanilil ciclasa soluble). Los resultados obtenidos muestran que el efecto relajante del ácido poliáltico no fue inhibido por el pre-tratamiento con ODQ (gráfica 5A) caso contrario sucedió con nitroprusiato de sodio utilizado como control positivo (gráfica 5B).

Estos resultados sugieren, que la relajación inducida con ácido poliáltico no es a través de la activación de la enzima guanilil ciclasa soluble, pero podría ser a través de otro mecanismo implicado en la relajación del músculo liso de las vías aéreas.

8.3. Participación de la enzima adenilil ciclasa

En el trabajo anterior, sobre los posibles mecanismos de acción relajante del ácido poliáltico, se descartó la activación de los receptores β -adrenérgicos sin embargo, en ese mismo estudio, el ácido poliáltico potenció la relajación inducida con isoproterenol (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008). El isoproterenol es un fármaco activador de la enzima adenilil ciclasa responsable del incremento de los niveles de AMPc, segundo mensajero que inicia mecanismos intracelulares relacionados con los procesos de relajación del MLA (Hall, 2000; Ko *et al.*, 2002). En el presente estudio encontramos que el ácido poliáltico desplaza hacia la izquierda las curvas de concentración-respuesta de forskolina (activador de adenilil ciclasa) (Belik *et al.*, 2006), en forma dependiente de la concentración (gráfica 4), con la reducción de los valores de CE_{50} (tabla 3). Se sabe que las vías de señalización de los agonistas utilizados forskolina (en este estudio) e isoproterenol (en el trabajo previo) convergen en un punto en común activando a la enzima adenilil ciclasa, con la subsecuente

producción de AMPc (Hall *et al.*, 2002). Por lo tanto, se procedió a explorar el tercer aspecto de actividad relajante; la posible participación de la enzima adenilil ciclasa.

Para ello se construyeron curvas de relajación de ácido poliáltico y forskolina en presencia y ausencia de un inhibidor de la enzima adenilil ciclasa: 2',5'-dideoxiadenosina. En dichas evaluaciones se encontró que el efecto relajante y los valores CE_{50} del ácido poliáltico no se modificaron por la presencia del inhibidor (gráfica 6A), en cambio el máximo efecto relajante de forskolina si se redujo por la presencia del inhibidor (gráfica 6B). Por lo tanto, se plantea la posibilidad de otro mecanismo de acción relajante para el ácido poliáltico diferente de la activación de la enzima adenilil ciclasa.

IX. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son:

- 1) El ácido poliáltico inhibe de manera no competitiva las contracciones inducidas con calcio, lo cuál sugiere una posible acción bloqueante sobre los canales Ca^{++} .
- 2) El ácido poliáltico potencia el efecto relajante de forskolina y de nitroprusiato de sodio.
- 3) Se descarta la activación de las enzimas guanilil ciclasa soluble y adenilil ciclasa en el efecto relajante del ácido poliáltico.

X. PERSPECTIVAS

- Descartar la posible activación o inhibición de receptores, enzimas y/o bombas intercambiadoras de iones, relacionados con la disminución de calcio intracelular.
- Determinar la participación de las fosfodiesterasas de AMPc y GMPc.
- Evaluar en un modelo de asma el efecto relajante del ácido poliáltico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Haq, H., Cometa, M. F., Palmery, M., Leone, M. G., Silvestrini, B. and Saso, L. (2000) Relaxant effects of *Hydrastis canadensis* L. and its major alkaloids on guinea pig isolated trachea. *Pharmacol. Toxicol.* **87**: 218-222.
- Adelekan, A. M., Prozesky, E. A., Hussein, A. A., Ureña, L. D., Van Rooyen, P. H., Liles D. C, Meyer. J. J. and Rodríguez, B. (2008) Bioactive diterpenes and other constituents of *Croton steenkampianus*. *J. Nat. Prod.* **71**: 1919-1922.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, Y. Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell. 4^{ta} edición. Editorial Garland Science Taylor & Francis Group. E. U. A. p. 889.
- Amrani, Y. and Panettieri. R. (2003) Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 272-276.
- Anderson, D. S. and Kippelen, P. (2008) Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J. Allergy. Immunol.* **122**: 225-235.
- Andrade-Cetto, A. (2009) Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *J. Ethnopharmacol.* **122**: 163-171
- Argueta, A. y Cano, L. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I. Instituto Nacional Indigenista. pp. 399-404.
- Bacelli, C., Block, S., Van-Holle, B., Schanck, A., Chapon, D., Tinant, B., Meervelt, L. V., Morel, N. and Quetin-Leclercq, J. (2005) Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCl-induced contraction. *Planta. Med.* **71**: 1036-1039.
- Barnes, P. (1998) Pharmacology of airways smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **158**: S123-S132.
- Barnes, P. (2001) Histamine and serotonin. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**: 329-339.
- Batra, J., Chatterjee., R. and Ghosh, B. (2007) Inducible nitric oxide synthase (iNOS): Role in asthma pathogenesis. *Indian. J. Biochem. Biophys.* **44**: 303-309.
- Belik, J., Hehne, N., Pan, J. and Behrends, S. (2006) Soluble guanylate cyclase-dependent relaxation is reduced in the adult rat bronchial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **292**: L699-L703.
- Belmonte, K.E. (2005) Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**: 297-304.

- Belvisi, M. G., Hele, D. J. and Birrell, M. A. (2004) New advances and potential therapies for the treatment of asthma. *Bio. Drugs*. **18**: 211-223.
- Bielory, L. and Lupoli, K. (1999) Herbal interventions in asthma and allergy. *J. Asthma*. **36**: 1-65.
- Billington, C. and Penn R. (2003) Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* **4** (1): 2.
- Block, S., Baccelli, C., Tinant, B., Meervelt, L., Rozenberg, R., Habib, J - L., Llabres, G., Pauw-Gillet, M-C. and Quetin-Leclercq, J. (2004). Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochem* **65**: 1165-1171.
- Boskabady, M. H. and Shaikhi. (2000) Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H₁) receptors of isolated guinea-pig tracheal chains. *J. Ethnopharmacol.* **69**: 217-227.
- Boskabady, M.H., Aslani, M.R. and Kiani, S. (2006) Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanisms. *Phytotherapy. Res.* **20**: 28-33.
- Bossé, Y., Stankova, J. and Rola-Pleszczynski, M. (2009) Cysteinyl-leukotrienes in asthmatic airway smooth muscle cell hyperplasia. *Ann Allergy Asthma Immunol* **102**: 16-21.
- Burnouf, C. and Pruniaux, M.P. (2002) Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and antiinflammatory drugs. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 1255-1296.
- Campos, M. G., Toxqui, E., Tortoriello, J., Oropeza, M., Ponce, H., Vargas, M. and Montaña, L.M. (2001) *Galphimia glauca* organic fraction antagonizes LTD₄ induced contraction in guinea pig airways. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 7-15.
- Campos-Bedolla, P., Montaña, L. M., Flores-Soto, E., Aguilar, A., Puebla, A. M., Lozoya, X. and Vargas, M. H. (2005) Effect of *Gnaphalium conoideum* HBK on guinea pig airway smooth muscle: role of L-type Ca²⁺ channels. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 267-272.
- Carreras, C. R., Rossomando, P. C. and Giordano, O. S., (1998). Ent-labdanes in *Eupatorium buniifolium*. *Phytochem.* **48**: 1031-1034.
- Catalán, C., Heluani, C., Kotowicz, C., Gedris, T. and Herz, W. (2003). A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochem* **64**: 625-629.

- Chu, E. and Drazen, J. (2005) Asthma. one hundred years of treatment and onward. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **171**: 1202-1208.
- Devillier, P., Corompt, E., Bréant, D., Caron, F. and Bessard, G. (2001) Relaxation and modulation of cyclic AMP production in response to atrial natriuretic peptides in guinea pig tracheal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **430**: 325-333.
- Donohue, J. F. (2004) Therapeutic responses in asthma and COPD. *Chest.* **126**: 125S-137S.
- Doshi, V. B., Shetye, M. y Mahashur, A. A. (1983) *Picrorrhiza kurroa* in bronchial asthma. *J. Postgrad. Med.* **29**: 89-95.
- Ehlert, F. J. (2003) Pharmacological analysis of the contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in smooth muscle. *Recept. Channels.* **9**: 261-277.
- Fabricant, D. and Farnsworth, N. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health. Perspect.* (Suppl 1) **109**: 69-75.
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M. R., Jankowski, C. and Campos, M. G. (2005) Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D₄-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* **522**: 108-115.
- Finkbeiner, W. (1999) Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir. Physiol.* **118**: 77-83.
- Fischer, A., Folkerts, G., Geppetti, P. and Groneberg, D. (2002) Pharmacology and therapeutic mediators of asthma: Nitric oxide. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **15**: 73-81.
- Franová, S., Nosálová, G., Antosová, M. and Nosál, S. (2004) Enalapril and diltiazem co-administration and respiratory side effects of enalapril. *Physiol. Res.* **54**: 515-520.
- Gelfand, E. (2002) Role of Histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H₁-receptor antagonists. *Am. J. Med.* **113** (9A): 2S-7S.
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H. and Halayko, A. J. (2006) Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* **7**: 73.
- Govindan, S., Viswanathan, S., Vijayasekaran, V. and Alagappan, R. (1999) A pilot study on the clinical efficacy of *Solanum xanthocarpum* and *Solanum trilobatum* in bronchial asthma. *J. Ethnopharmacol.* **66**: 205-210.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, ChV., Pushpangadan, P., Asare-Anane, H., Persaud, S., Jones, P. and Houghton, P. J. (2008) Antidiabetic activity of *Croton*

- klozchianus* in rats and direct stimulation of insulin secretion in-vitro. *Pharmacogn and Ethnopharmacol.* **60**:371-6
- Graham, D. M. and Blaiss, M. (2000) Complementary/alternative medicine in the treatment of asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **85**: 438-449.
- Gross, N. J. (2006) Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 36-39.
- Gunen, H., Mirici, A., Meral, M. and Akgün, M. (2009) Steroids in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are nebulized and systemic forms comparable? *Curr. Opin. Pulm. Med.* **15**: 133-137
- Hall, I. P. (2000) Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* **15**: 1120-1127.
- Hamad, A., Clayton, A., Islam, B. and Knox, A. (2003) Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides and airway smooth muscle function. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **285**: L973-L983.
- Harold, S. N. (1995) β -adrenergic bronchodilators. *N. Engl. J. Med.* **333**: 499-506.
- Hazekamp, A., Verpoorte, R. and Panthong, A. (2001) Isolation of a bronchodilator flavonoid from the thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. *J. Ethnopharmacol.* **78**: 45-49.
- Huntley, A. and Ernst, E. (2000) Herbal medicines for asthma: a systematic review. *Thorax.* **55**: 925-929.
- Inagaki, N. and Nagai, H. (2001) Drugs for the treatment of allergic diseases. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**: 275-280.
- Jacoby, D. and Fryer, A. (2001) Anticholinergic therapy for airway diseases. *Life. Sci.* **68**: 2565-2572.
- Janssen, J. L. and Killian, K. (2006) Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. *Respir. Res.* **7**: 1-12
- Janssen, L.J. (2009) Asthma therapy: how far have we come, why did we fail and where should we go next? *Eur. Respir. J.* **33**:11-20.
- Kian, F. C. (2006) Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 110-117.

- Ko, W. C., Lei, C. B., Lin, Y.L. and Chen, C. F. (2001) Mechanisms of relaxant action of S-petasin and S-isopetasin sesquiterpenes of *Petasites formosanus* in isolated guinea pig trachea. *Planta Med.* **67**: 224-229.
- Ko, W. C., Wang, H. L., Lei, C. B., Shih, C. H., Chung, M. I. and Lin, C.N. (2002) Mechanisms of relaxant action of 3-O-Methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med.* **68**: 30-35.
- Latarget, M. y Ruiz, A. (1995) Anatomía humana Tomo II. 3ª edición. Editorial Panamericana. México. p.1241-1243.
- Lee, A. M., Jacoby, D. B. and Fryer, A. D. (2001) Selective muscarinic receptor antagonists for airway diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 223-229.
- Li, M., Zhang, H. and Yang, B. (1997) Effects of ginkgo leaf concentrated oral liquor in treating asthma. *Chung Kuo Ching His I Chieh Ho Tsa Chih.* **17**: 216-218.
- Lozoya, X., Abigail, A. y Camacho, R. (1987) Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. méd. IMSS.* **25**: 283-291.
- Lu, X. Q., Tang, F. D., Wang, Y., Zhao, T. and Bian, R. L. (2004) Effect of *Eucalyptus globulus* oil on lipopolysaccharide-induced chronic bronchitis and mucin hypersecretion in rats. *Zhonggou Zhong Yao Za Zhi.* **29**: 168-171.
- Magalhaes, P. J. C., Lahlou, S., Juca, D. M., Coelho-de-Souza, L. N., Frota, P. T. T., Costa, A. M. G. and Leal-Cardoso, J. H. (2008) Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. *Fundam. Clil. Pharmacol.* **22**:169-177.
- Martínez, M. 1987. Catálogo de Nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, p. 215.
- Matsuda, F., Sugahara, K., Sugita, M., Sadohara, T., Kiyota, T. and Terasaki, H. (2000) Comparative effect of amrinone, aminophylline and diltiazem on rat airway smooth muscle. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* **44**: 763-766
- McGraw, D. W., Elwing, J. M., Fogel, K. M., Wang, W.C.H., Glinka, C. B., Mihlbachler, K. A., Rothenberg, M. E. and Liggett, S. B. (2007) Crosstalk between G_i and G_q/G_s pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. *J. Clin. Invest.* **117**: 1391-1398.

- Michal, P., Lysíková, M. and Tuček, S. (2001) Dual effects of muscarinic M₂ acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **132**: 1217-1228.
- Mistry, R., Dowling, M. R. and Challiss, R. A. J. (2005) An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M₂ and M₄ muscarinic acetylcholine receptor signaling via Gi/o and Gs proteins. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 566-575.
- Miyasawa Mitsuo., Shimamura Hideo., Nakumura Sei-ichi. and Kameoka Hiromu. (1995) Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *vitex rotundifolia*. *J. Agric. Food. Chem.* **43**: 3012-3015.
- Mullershausen, F., Lange, A., Mergia, E., Friebe, A. and Koesling, D. (2006) Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol. Pharmacol.* **69**:1969-1974.
- Mustafa, S., Abdulraheem, A. and Alsughayer, A. (2008) Verapamil Induces calcium influx in the trachea. *J. Pharmacol. Sci.* **106**: 609-614.
- Nicosia, S., Capra, V. and Rovati, G. E. (2001) Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**: 3-19.
- Nihei, K., Asaka, Y., Mine, Y., Yamada, Y., Iigo, M., Yanagisawa, T. and Kubo, I. (2005) Musidunin and musiduol, insect antifeedants from *Croton jatrophioides*. *J. Nat Prod.* **69**: 975-977.
- Occhiuto, F., Sanogo, R., Germano, M. P., Keita, A., Angelo, D. and De Pascuale, R. (1999) Effects of some malian medicinal plants on the respiratory tract of guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 1299-1303.
- Ohta Keiichi. and Nawamaka Tsutomu. (1978) (+)-Polyalthic acid, a repellent against a sea snail *monodonta neritoides*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1957-1958.
- Pelaia, G., Gallelli, L., Vatrella, A., Grembiale, R., Maselli, R., De Sarro G. and Marsico, S. (2002) Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Life. Sci.* **70**: 977-990.
- Reyes-Trejo, B., Sánchez-Mendoza, M. E., Becerra-García, A. A., Cedillo-Portugal, E., Castillo-Henkel, C. and Arrieta, J. (2008) Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Cron reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Pharm and Pharmacol.* **60**: 931-936.

- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J. and Navarro, V. (2001) Antimicrobial evaluation of certain plants used in mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 97-101.
- Rouviere, H. y Delmas. (1999) Anatomía humana descriptiva topográfica y funcional. 10^a Edición. Editorial. Masson. Barcelona. p.27.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel C., and Navarrete, A. (2008) Relaxant action mechanism of beberine identified as the active principle of *Argemone ochoroleuca sweet* in guinea pig tracheal smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 229-2236.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Reyes-Trejo, B., De la Rosa, L., Rodríguez-Silverio J., Castillo-Henkel, C. and Arrieta, J. (2008) Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has relaxing effect in guinea pig tracheal smooth muscle. *Pharm. Biol.* **46**: 800-807.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Torres, G., Arrieta, J., Aguilar, A., Castillo-Henkel, C. y Navarrete, A. (2007) Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig trachea smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* **111**: 142-147.
- Santing, R., Boer, J., Rohof, A. and Zaagsma, J. (2001) Bronchodilatory and anti-inflammatory properties of inhaled selective phosphodiesterase inhibitors in a guinea pig model of allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* **429**: 335-344.
- Shahid, M., Tayyab, M., Naz, F., Jamil, A., Ashraf, M. and Gilani, AH. (2008) Activity-guided isolation of a novel protein from *Croton tiglium* with antifungal and antibacterial activities. *Phytochem.* **69**: 2406-10
- Shao, C., Chen, F. and Tang, Y. (1994) Clinical and experimental study on *Ligusticum wallichii* mixture in preventing and treating bronchial asthma. *Chung Kuo Ching His I Chich Ho Tsa Chih.* **14**: 465-468.
- Spina, D. (2008) PDE4 inhibitors: current status. *Bt. J. Pharmacol.* 155: 308-315.
- Tallarida, R. (2000) Drug synergism and dose-effect data analysis. *Chapman & Hall/CRC, USA.* pp. 21-39.
- Thirstrup, S. (2000) Control of airway smooth muscle tone. II. Pharmacology of relaxation. *Respir. Med.* **94**: 519-528.
- Walker, J. K. .L., Gainetdinov, R. R., Feldman, D. S., McFawn, P. K., Caron, M.G., Lefkowitz, R. J., Premont, R. T. and Fisher, J. T. (2004) G protein-coupled receptor

kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**: L312-L319.

Ziment, I. (2000) Recent advances in alternative therapies. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **6**: 71-78.

XII. ANEXO

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AC	Adenilil ciclase.
AMPC	3',5' -monofosfato cíclico de adenosina.
A	Adenosina.
AA	Ácido araquidónico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BK _{Ca} ⁺⁺	Canales de alta conductancia a potasio.
B ₂	Receptores de bradicinina.
CE ₅₀	Concentración efectiva 50.
Col	Colaboradores.
Ca ⁺⁺ V	Canales de calcio voltaje dependientes.
Cyslti	Cysteinil leucotrienos.
DAG	Diacilglicerol.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EEM	Error estándar de la media.
EPOC	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas.
ET-A	Endotelina.
Emáx	Efecto máximo.
Gi	Proteína G inhibidora.
GMPC	3', 5'- monofosfato cíclico de guanosina.
Gs	Proteína g estimulante.
Gc	Guanilil ciclase.
GTP	Trifosfato de guanosina.
GCs	Guanilil ciclase soluble.
GCP	Guanilil ciclase particulada.
IP3	1, 4, 5 trifosfato de inositol.
K ⁺ _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio.
K ⁺ ATP	Canales de potasio sensibles a ATP.
L-NAME	N (G)-Nitro-L-arginina metil éster.
ML	Músculo liso.

MLA	Músculo liso de las vías aéreas.
MLCK	Cinasas de las cadenas ligeras de miosina.
MAPK	Protein cinasa activada por mitogeno.
NANC	No adrenérgico no colinérgico.
NK	Neurocinina.
ON	Óxido nítrico.
ODQ	(1H-[1, 2, 4]-oxadiazol [4,3-a]quinoxalin-1-ona).
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂ .
PLC	Fosfolipasa C.
PLC β	Fosfolipasa C β .
PIP ₂	Fosfoinositol 4, 5- difosfato.
PGE	Prostaglandinas.
PKC	Protein cinasa.
PKA	Protein cinasa A.
PKG	Protein cinasa G.
PNA	Péptido natriurético auricular.
PDEs	Fosfodiesterasas.
ROC	Canales de calcio operados por receptor.
VOC	Canales de calcio operados por voltaje.