



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO DE LA
INTERACCIÓN BRONCODILATADORA ENTRE
Gnaphalium liebmanii CON ISOPROTERENOL
Y TEOFILINA EN TRÁQUEA AISLADA DE
COBAYO. "**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LETICIA GARCÍA DE LA CRUZ

MÉXICO, D.F.

2004.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

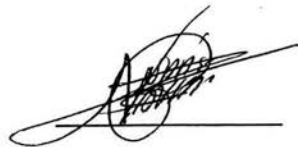
Análisis Isobológico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

Jurado Asignado

Presidente: **Rafael Rion Arriola.**
Vocal: **Elia Brosla Naranjo Rodríguez.**
Secretario: **Andrés Navarrete Castro.**
1er. suplente: **Alejandro Ortiz Osornio.**
2do. suplente: **María Eva González Trujado.**

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 126 del conjunto " E ". Departamento de Farmacia Facultad de Química.UNAM.

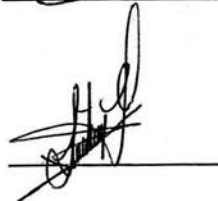
Asesor de Tema: **Dr. Andrés Navarrete Castro**



Supervisor Técnico: **M. en C. Jesús Arrieta Valencia**



Sustentante: **Leticia García de la Cruz.**



El presente proyecto de tesis se realizó en el laboratorio 126 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos: PAIP 6390-18 (Facultad de Química), IN203902 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y 41231 – M del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de este trabajo se presentó en el XXVII Congreso Nacional de Farmacología, efectuado en Villahermosa Tabasco, del 7 de Marzo al 11 de Marzo del 2004.

Sánchez-Mendoza M.E., Torres G., García-de la Cruz L., Arrieta, J., Aguilar A., Castillo-Henkel y Navarrete A.

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BRONCODILATADOR DE *Gnaphalium liebmanii*
EN ANILLOS DE TRÁQUEA DE COBAYO “**

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su apoyo, conocimiento y experiencia en la realización de este proyecto, por brindarme la maravillosa oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y por enseñarme que las adversidades en la vida ponen a prueba la fortaleza de nuestro espíritu.

A la M. en C. Abigail Aguilar del Herbario del IMSS, por la clasificación de la especie objeto de este estudio.

Al Bioterio del Edificio A de la Facultad de Química por las facilidades brindadas en el manejo y distribución de animales en la parte experimental de la tesis.

A la Dirección General de Asunto del Personal Académico (DGAPA) a través del Proyecto IN203902, a la Facultad de Química a través del proyecto PAIP 6390-18 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 41231 – M.

Al M. en C. Jesús Arrieta y la Q.F.B. Ma. Elena Sánchez, por la asesoría recibida para la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS.

A mis padres.

Por ayudarme día a día, a cruzar con firmeza el camino de la superación por que con su apoyo hoy he logrado uno de mis grandes anhelos y lo que falta, gracias por soportar mis palabras, lo lamento. Con amor y eterno agradecimiento.

To Mary and Hanna for beliving in me.

Gracias, por aguantar mi mal humor y compartir, mis locuras de niña de secundaria Recuerdan ?? Nos queda mucho por vivir, sentir, reir, pelear... y amarnos. ¿Yo, les cuanto todo y ustedes? ja, ja, ja...

Bety, Paty, Donato, Javier y Gerardo.

Muchas gracias por su apoyo y ánimo, ya son más de tres días, los amo por tres vidas más. Javier tus palabras son mágicas y llenas de verdad, sinceridad. Donato eres mi hermano, te quiero mucho.

A mis grandes amigos Josa, Rene, Sergio, Fede, Apio y Dana.

Por estar conmigo, por enseñarme a ser héroe en mi propia vida, por transmitirme energía, dominio, fe, valor, paz dentro del caos y elevación espiritual. Fede: después de la tormenta, siempre viene la calma NO? Recuerdas?.

Y a todos mis amigos que han estado en las buenas y en las malas, Carlos, Rebe, Poncho, Liz, Mariana, Rubén, Rosalba, Aldo. Chicos gracias por aguantar tanta locura de mi parte, espero que no sea contagioso ja, ja, ja... *Muchas veces es difícil que alguien sea sincero, en especial cuando es la primera vez que se cruza palabra, alguna... recuerdan. Ustedes saben NO? Les suena El ena????*

A todos los que pasaron y quedaron ahí y los que vendrán...

A las dificultades de los últimos años, que crearon tantas inseguridades y abrieron puertas del pasado y disculpas a los pocos o muchos que pise para entender lo que fui y lo que soy.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
LISTA DE CUADROS	IV
LISTA DE GRÁFICAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
I. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
1.1 Aparato Respiratorio.....	3
1.2 Mediadores del broncoespasmo.....	6
1.3 Receptores adrenérgicos.....	8
1.4 Antagonistas de los receptores β -adrenérgicos.....	10
1.5 Agonistas β_2 - adrenérgicos.....	11
1.6 Fosfodiesterasas.....	12
1.7 Enfermedades Respiratorias.....	15
1.7.1 Bronquitis.....	15
1.7.2 Asma.....	16
1.8 Tratamientos con fármacos.....	18
1.8.1 Teofilina y derivados.....	23
1.9 Uso de plantas medicinales.....	26
1.10 El Género <i>Gnaphalium</i>	31
1.10.1 Estudios botánicos y etnobotánicos.....	32

1.10.2 Antecedentes farmacológicos.....	37
1.11 Análisis Isoblográfico.....	39
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
III. HIPÓTESIS.....	46
IV. OBJETIVOS.....	47
4.1 Objetivo General.....	47
4.2 Objetivos específicos.....	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
5.1 Material vegetal.....	49
5.2 Preparación del extracto.....	49
5.3 Animales.....	49
5.4 Fármacos y sustancias.....	50
5.5 Ensayo biológico.....	50
5.5.1 Disección de la tráquea y montaje de la preparación.....	50
5.5.2 Determinación de las Curvas Concentración - Respuesta.....	51
5.5.3 Experimento clásico de interacción.....	53
5.5.4 Estudio de interacción por el método isoblográfico.....	53
5.5.5 Análisis Estadístico.....	54
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
VII. CONCLUSIONES.....	74
VIII. PERSPECTIVAS.....	75
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	76

RESUMEN.

Como parte del estudio del mecanismo de acción farmacológica de plantas medicinales mexicanas, en el presente trabajo de tesis se describe mediante un análisis isobolográfico, la interacción entre el extracto hexánico de *G. liebmanii*, mejor conocido como gordolobo y los fármacos con actividad broncodilatadora isoproterenol y teofilina, con el propósito de elucidar parte de el mecanismo de acción broncodilatadora de *G. liebmanii*.

Como primer paso se determinó la concentración efectiva treinta (CE_{30}) a través de la construcción de curvas concentración respuesta individual de cada fármaco y del extracto hexánico, se realizó el cálculo teórico de las concentraciones aditivas de las combinaciones *G. liebmanii* -fármaco.

Posteriormente se determinó las CE_{30} de las combinaciones *G. liebmanii* – Isoproterenol y *G. liebmanii* –Teofilina, en las proporciones 1:1, 7:3 y 3:7. También se realizó el estudio de la interacción Isoproterenol - Teofilina en las proporciones ya mencionadas. Lo anterior se llevo a cabo en un ensayo *in vitro* en tráquea aislada de cobayo.

La interacción *G. liebmanii* e Isoproterenol indicó un efecto sinergista en las combinaciones evaluadas. En la interacción de *G. liebmanii* y teofilina se presentó un efecto aditivo en las proporciones 1:1 y 3:7, esto permite postular que el posible mecanismo de acción de *G. liebmanii* es a través de la inhibición de las fosfodiesterasas, ya que la teofilina, es un inhibidor inespecífico de estas enzimas.

El presente trabajo representa una contribución al conocimiento de la forma en que actúa esta planta medicinal mexicana y representa el sustento científico de su uso etnomédico.

LISTA DE ABREVIATURAS.

AMP: Adenosina 3',5'-monofosfato.

AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.

ATP: Adenin trifosfato.

BK_{ca}: Canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia.

CE₃₀: Concentración efectiva treinta.

f: Fracción del fármaco en la combinación.

GMP: Guanosina 3',5'-monofosfato.

GMPc: Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico.

Gs: Proteína Gs.

GTP: Guanidin trifosfato.

EEM: Error estándar de la media.

LT: Leucotrienos.

MLCK: Cinasa de las cadenas ligeras de la miosina.

n: Número de Concentraciones del fármaco.

n_{ex}: Número de concentraciones de la combinación.

NO: Oxido nítrico.

PDE: Fosfodiesterasa.

PGE: Prostaglandina.

PKA: Protein Cinasa A.

PKG: Protein Cinasa G.

SE: Error Estándar.

tad: Valor en la tabla de distribución t, con $n_1+n_2 - 2$ grados de libertad.

tex: Valor en la tabla de distribución t, con $n_{ex} - 2$ grados de libertad.

Z*: Concentración efectiva del fármaco.

Z_{exp}: Concentración efectiva experimental.

Z_{teo}: Concentración efectiva teórica.

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Clasificación de las isoenzimas de la fosfodiesterasa en humanos.....	14
Cuadro 2. Propiedades Farmacológicas de algunos fármacos sobre receptores adrenérgicos.....	21
Cuadro 3. Plantas con efecto broncodilatador estudiadas en diferentes regiones del mundo.....	28
Cuadro 4. Plantas medicinales usadas en México a las que se les atribuyen propiedades broncodilatadoras y antiasmáticas.....	30
Cuadro 5. Valores de la $CE_{30} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$) del efecto broncodilatador de isoproterenol, teofilina y extracto hexánico de <i>G.liebmanii</i> en tráquea aislada de cobayo.....	57
Cuadro 6. Niveles de concentración evaluadas, interacción <i>G. liebmanii</i> – Isoproterenol.....	62
Cuadro 7. Niveles de concentración evaluadas, interacción <i>G.liebmanii</i> – Teofilina.....	63
Cuadro 8. Niveles de concentración evaluadas, interacción Isoproterenol – Teofilina.....	64
Cuadro 9. Concentraciones efectivas teóricas (Z_{teo}) \pm EEM y experimentales (Z_{exp}) \pm EEM de las combinaciones.....	69

LISTA DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Curva Log Concentración – % Respuesta para determinar CE ₃₀ de Isoproterenol, Teofilina y <i>G. liebmanii</i>	56
Gráfica 2. Experimento clásico. Interacción <i>G. liebmanii</i> e Isoproterenol.....	58
Gráfica 3. Experimento clásico. Interacción <i>G. liebmanii</i> y Teofilina.....	59
Gráfica 4. Interacción <i>G. liebmanii</i> y Isoproterenol a diferentes combinaciones.....	65
Gráfica 5. Interacción <i>G. liebmanii</i> y Teofilina a diferentes combinaciones...	66
Gráfica 6. Interacción Teofilina e Isoproterenol a diferentes combinaciones.....	67
Gráfica 7. Isoblograma de la interacción entre <i>G. liebmanii</i> e Isoproterenol * ($p < 0.05$).....	70
Gráfica 8. Isoblograma de la interacción entre <i>G. liebmanii</i> y Teofilina. * ($p < 0.05$).....	71
Gráfica 9. Isoblograma de la interacción entre Teofilina e Isoproterenol. * ($p < 0.05$).....	72

LISTA DE FIGURAS.

Figura A. Estructura del Isoproterenol.....	22
Figura B. Estructura de la Teofilina.....	24
Figura C. Isoblograma.....	42
Figura D. Registro de Concentración - Respuesta acumulativa de isoproterenol a concentraciones molares de 10^{-7} a 3×10^{-5} , en las preparaciones <i>in vitro</i>	52

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades respiratorias agudas, representaron la primera de diez causas de morbilidad en el país durante el año 2000, con una tasa de 348.7 por 100 mil habitantes, según datos de la Secretaria de Salud. La bronquitis aguda y asma ocupan el octavo sitio de diez, en causa de mortalidad con una tasa de 8.5 por 100 mil habitantes.

El broncoespasmo y la hiperreactividad bronquial, son un síndrome que se presenta en algunas enfermedades respiratorias agudas como son la bronquitis y el asma, en este síndrome existe una disfunción en la regulación autónoma del tono bronquial, en el que participan mediadores químicos, tal como los mastocitos y la acetilcolina (Barnes, 1998b). Esto se traduce en el estrechamiento de las vías aéreas creando problemas de insuficiencia respiratoria por falta de oxígeno. Para el tratamiento de este problema se emplean fármacos con actividad broncodilatadora, como el isoproterenol y el salbutamol que actúan sobre los receptores β_2 -adrenérgicos (Thirstrup, 2000), o la teofilina que es bloqueador inespecífico de las fosfodiesterasas (Cortijo y Bou, 1993).

Un tratamiento alternativo, para las enfermedades respiratorias. es el uso de plantas medicinales, entre las cuales destaca el Gordolobo, (*G. liebmanii*) como una de las plantas más empleadas.

En un trabajo previo (Torres, 2002) se demostró el efecto broncodilatador de *G. liebmanii*, sin embargo no se conoce su mecanismo de acción. Con base en lo anterior se decidió realizar este estudio con la finalidad de elucidar parte del mecanismo de acción de esta planta mexicana.

I. FUNDAMENTO TEORICO.

1.1 Aparato respiratorio.

El aparato respiratorio está destinado a poner en contacto el aire atmosférico con la sangre venosa. Por su mediación, se exhala anhídrido carbónico y se absorbe oxígeno, que transforma la sangre venosa en sangre arterial. El aparato respiratorio comprende: a los pulmones, en los cuales se producen los intercambios gaseosos; y las vías respiratorias, que conducen el aire a los pulmones, estas vías están constituidas por las fosas nasales, la parte superior de la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios (Rouviere y Delmas, 1999).

En los seres humanos, la tráquea se extiende entre la laringe y los bronquios, y se sitúa por delante del esófago. La tráquea es un conducto semirrígido, fibromusculocartilaginoso, por donde circula el aire inspirado y espirado. Es la continuación de la laringe y termina bifurcándose en los bronquios; tiene forma de cilindro aplastado en su parte posterior, donde es plana, músculo-fibrosa y ligeramente convexa. Sus cartílagos forman el esqueleto semirrígido del conducto, son anillos cartilaginosos incompletos, se encuentran de 15 a 20, su forma es muy variable, algunos son regulares con bordes paralelos y extremidades posteriores idénticas; otros son irregulares con desdoblamientos (Latarjet y Ruiz, 1995).

Su altura varía de 2 a 5 mm, y cada uno de ellos se modifica sensiblemente de un punto a otro (Rouviere y Delmas, 1999).

La longitud de la tráquea cambia con la edad y talla. En el adulto mide 13 cm y termina al dividirse en dos bronquios derecho e izquierdo (Latarjet y Ruiz, 1995).

Las vías aéreas están dotadas de una cubierta espiral de músculo involuntario que frecuentemente sufren de modo inapropiado constricción grave en reacción 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 (Rouviere y Delmas, 1999).

El músculo traqueal está formado por una lámina de fibras musculares lisas transversales u oblicuas, entremezcladas como una red de malla, localiza en la parte posterior de la tráquea, interpuesto entre la membrana fibrosa y la mucosa (Latarjet y Ruiz, 1995).

Las estructuras anatómicas más importantes de la vía aérea desde el punto de vista fisiológico, son el músculo liso, el epitelio ciliado y las glándulas bronquiales (Zimet, 1983).

El epitelio que reviste la mucosa de las vías aéreas es ciliado y contiene glándulas mucosas y serosas (Ganong, 1998).

La submucosa es la capa de tejido conectivo vascular que se encuentra debajo del epitelio, contiene glándulas bronquiales especializadas, cuyas células producen secreciones seromucosas que son llevadas a la superficie del epitelio ciliado a través de conductos excretores también ciliados. Las glándulas bronquiales contienen tanto células secretoras mucosas como serosas (Ziment, 1983).

Las glándulas bronquiales se encuentran principalmente en la tráquea y en los bronquios; existe una marcada disminución de su presencia en sitios más distantes. El músculo liso de las vías aéreas está innervado por nervios simpáticos y parasimpáticos. La innervación contráctil de vías aéreas en mamíferos es exclusivamente colinérgica, mientras que la innervación relajante es adrenérgica y no adrenérgica. (Canning y Fisher, 2001)

En las paredes de los bronquios y bronquiolos hay abundantes receptores muscarínicos y la descarga colinérgica produce broncoconstricción. En el epitelio bronquial, así como en el músculo liso, hay receptores adrenérgicos β_1 y β_2 . (Ganong, 1998).

En el ser humano, predominan los receptores β_2 ; además hay una inervación no colinérgica, no adrenérgica de los bronquiolos, que producen broncodilatación. Existen algunas sustancias que son potentes broncoconstrictores, por ejemplo: los leucotrienos LTC₄, LTD₄ y LTE₄. Algunos de los nervios en los pulmones contiene sustancia P, y esta sustancia produce broncoconstricción (Ganong, 1998).

En íntima asociación con la musculatura bronquial se encuentran los mastocitos. Estas células están colmadas con gránulos, que almacenan heparina, así como, histamina y otros mediadores, su liberación afecta a las células musculares adyacentes y causa broncoespasmo (Ziment, 1983).

1.2 Mediadores del broncoespasmo.

Dependiendo del mecanismo de acción de fármacos broncodilatadores, estos se pueden dividir en dos grupos. El primer grupo consiste en fármacos que bloquean el efecto contráctil de mediadores en músculo liso de las vías aéreas, es decir, son antagonistas de receptores específicos. El segundo grupo abarca fármacos que producen una relajación del músculo liso prescindiendo de un mediador contráctil. Esta relajación, es activada a través de diferentes vías las cuales disminuyen la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, existen cuatro mecanismos centrales que causan broncodilatación en músculo liso a través de la estimulación de

segundos mensajeros cíclicos, 1) adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico (AMP_c), 2) guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico (GMP_c), 3) Inhibición de la degradación de nucleotidos cíclicos y 4) Modulación de canales iónicos de la membrana (Thirstrup, 2000).

Las alteraciones del tono muscular de las vías aéreas son provocadas por estimulación de los nervios aferentes de estas. La existencia de caminos opuestos de inervación parasimpática en el músculo liso de las vías aéreas sugiere que el broncoespasmo puede ser mediado por un incremento de la actividad nerviosa colinérgica o un decremento en la actividad nerviosa del tono inhibitorio no colinérgico. (Canning y Fischer, 2001).

La sinapsis de fibras vágales, la actividad nicotínica y los receptores m₁-muscarínicos en los ganglios parasimpáticos, localizados en la pared de las vías aéreas, liberan acetilcolina con acción sobre los receptores muscarínicos en el músculo liso de las vías aéreas (Jordan, 2001).

Hay evidencias fisiológicas que sostiene la hipótesis de que la disfunción o irregularidad de la inervación autonómica de vías aéreas contribuyen a la patología del asma y enfermedades crónicas obstructivas. Las cuales son caracterizadas por la obstrucción de vías aéreas, hipersensibilidad de estas, dificultad para respirar, tos, disnea y sensación de estar sin aliento (Canning y Fischer, 2001).

Cada uno de estos síntomas han sido directa o indirectamente vinculados con alteraciones en la función nerviosa de las vías aéreas (Canning y Fischer, 2001).

Se sabe que las fibras nerviosas simpáticas liberan las hormonas transmisoras naturales, noradrenalina y adrenalina, mientras que las fibras parasimpáticas liberan acetilcolina. La adrenalina provoca relajación, mientras que la acetilcolina causa contracción; la noradrenalina por sí misma posee un efecto broncodilatador menor (Ziment, 1983).

Muchos mediadores tienen efecto en las vías aéreas por la activación de células epiteliales, que tiene la capacidad de incrementar su número por mediadores del broncoespasmo, como endotelina-a, prostaglandinas (PGE2), óxido nítrico (NO) (Barnes, 1998b).

1.3 Receptores adrenérgicos.

Los receptores adrenérgicos son las estructuras moleculares que en las células del organismo reciben selectivamente la señal de la adrenalina y la noradrenalina, y responden transformándola en una respuesta celular específica. A partir de las respuestas obtenidas en diversos órganos a las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina, y a la sintética isoproterenol, Ahlquist en 1948, clasificó a los

receptores adrenérgicos en dos clases, α y β . Se definieron como receptores alfa a los que eran estimulados por las tres catecolaminas con el orden de potencia: adrenalina > noradrenalina >> isoproterenol, y como receptores β los que eran estimulados con el orden de potencia: isoproterenol > adrenalina >> noradrenalina (Flórez, 1997).

Los receptores α median la contracción del músculo liso en algunos sitios, que comprenden: las arteriolas de la piel, las mucosas, las vísceras y los riñones, las venas de todo el organismo; así como, el útero, el bazo, los órganos sexuales masculinos y el músculo radial del iris. Los receptores β_2 , son los que median la relajación del músculo liso en diversos sitios como son: las arteriolas en el músculo esquelético e hígado, muchas venas en todo el cuerpo, el músculo bronquial y el útero. La activación de los receptores β_1 , da como resultado el aumento de la frecuencia cardíaca y el aumento de la fuerza de contracción del corazón (Smith y Reynard, 1993).

El músculo bronquial posee dos tipos de diferentes receptores adrenérgicos: α y β_2 . Los receptores β_2 están distribuidos principalmente en el músculo bronquial, vasos sanguíneos periféricos, músculos de las extremidades, en algunos músculos lisos y en el sistema nervioso central. Otros receptores como histaminérgicos y serotoninérgicos, se encuentran en el tejido pulmonar, y también los

de prostaglandinas, desempeñan un papel importante en el broncoespasmo (Ziment, 1983).

Los receptores β_2 en el pulmón median la relajación del músculo bronquial (Ziment, 1983).

1.4 Antagonistas de los receptores β -adrenérgicos.

Los antagonistas de los receptores β -adrenérgicos, son sustancias que muestran alta afinidad y especificidad por estos e inhiben tanto la actividad simpática en su manifestación β -adrenérgica, como la respuesta a los fármacos agonistas β -adrenérgicos. La inhibición es de carácter competitivo (Flórez, 1997).

En los bronquios, los β -bloqueadores reducen el tono broncodilatador, por lo que predomina el tono broncoconstrictor α -adrenérgico y colinérgico. En consecuencia aumenta la resistencia bronquial, especialmente en pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas (Jordan, 2001).

El propranolol es un β -bloqueador ampliamente utilizado, ya que es un antagonista competitivo que muestra una afinidad similar por los receptores β_1 y β_2 y

carece de actividad intrínseca simpaticomimética. Como β -bloqueante inespecífico, su empleo en patología cardiovascular está condicionado por los importantes efectos adversos derivados del bloqueo de β_2 -adrenoreceptores (broncoespasmo y vasoconstricción) (Floréz, 1997).

1.5 Agonistas β_2 -adrenérgicos.

La unión de agonistas a receptores β_2 - activan a una proteína G (Gs). El acoplamiento de la subunidad α , a un receptor ocupado por un agonista permite el intercambio de GTP unido con GTP intracelular, el complejo α -GTP se disocia entonces del receptor y activa a la adenilato ciclasa que cataliza la conversión intracelular de ATP a AMP cíclico (AMP_c). El aumento resultante de los niveles intracelulares de AMP_c produce la activación de la proteín cinasa, la cual fosforila, entre otras proteínas a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK). La fosforilación de MLCK disminuye la afinidad de esta proteína por el calcio-calmodulina y por tanto estabiliza su forma inactiva. En consecuencia, en músculo se relaja (Kotlikoff y Kamm, 1996).

La estimulación del músculo liso de tráquea aislada de cobayo, por fármacos β_2 -adrenérgicos provoca una hiperpolarización de la célula, acompañada de una broncodilatación (Honda et al., 1986).

Se ha demostrado que la apertura de canales de potasio (K^+) dependientes de calcio de alta conductancia (BK_{Ca}), son los responsables de la hiperpolarización inducida por fármacos β_2 -adrenérgicos y que esta activación se obtiene a través de vías dependientes de fosforilación (Proteína cinasa A y G: PKA y PKG) así como también por vías independientes de fosforilación (por proteínas G) (Kume et al., 1989).

1.6 Fosfodiesterasas.

Las fosfodiesterasas (PDEs) son un grupo de isoenzimas, encargadas de la hidrólisis de segundos mensajeros, adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico (AMP_C) y guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico (GMP_C) a 5' nucleótidos (Beavo, 1995).

Cinco isoenzimas de PDE (PDE I-V) han sido identificados en el músculo liso en humanos (Torphy, 1998) y en cobayos (Miyamoto et. al., 1994).

Las PDE3 y PDE4 degradan al AMP_C, mientras que la PDE5 es la encargada de la disminución del GMP_C en músculo liso bronquial (Hamad et al., 1997).

Existen fármacos específicos e inespecíficos, destinados a la inhibición de las fosfodiesterasas. Esta inhibición promueve el incremento de la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, lo que se traduce en una broncodilatación, a través de un mecanismo equivalente producido por un agonista β_2 -adrenérgico (Bryson y Rodger, 1987).

La teofilina provoca broncodilatación a través de una inhibición inespecífica de las fosfodiesterasas (Rabe et al., 1995). Actualmente la teofilina es ampliamente usada, en el tratamiento del asma, es un inhibidor no-selectivo de las fosfodiesterasas (incluyendo PDE IV) (Torphy y Undem, 1991).

Los inhibidores de la PDE IV no sólo producen broncodilatación, sino que también son agentes antiinflamatorios. (Teixera, et al., 1997). Estudios recientes con teofilina indican una actividad antiinflamatoria y en concentraciones bajas es recomendado como broncodilatador (Kleerup, 1997).

En el Cuadro 1 se muestra la clasificación de las isoenzimas de la fosfodiesterasa en humanos (Ensayan, 2001).

Cuadro 1. Clasificación de las isoenzimas de la fosfodiesterasa en humanos.

<i>Familia</i>	<i>Características</i>	<i>K_m (μg/mL)</i> <i>AMP_c; GMP_c</i>	<i>Distribución en tejidos.</i>	<i>Inhibidores</i>
PDE 1	Dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina	1-30; 3	Corazón, cerebro, pulmón, músculo liso.	Vinpocetina.
PDE 2	Estimulada por GMP _c	50; 50	Glándulas adrenales, corazón, pulmón, hígado	EHNA (MEP-1)
PDE 3	Selectiva para AMP _c Inhibida por GMP _c	0.2; 0.3	Tejido adiposo, corazón, hígado, pulmón,	Cilostamine Milrinone
PDE 4	Selectiva para AMP _c	A; >3000	Riñón, cerebro, hígado, pulmón,	Rolipram
PDE 5	Selectiva para GMP _c	150; 1	Pulmón, plaquetas, músculo liso.	Dipyridamole MY – 5445 Sildenafil
PDE 6	Selectiva para GMP _c	2000; 60	Fotoreceptores	Dipyridamole
PDE 7	Específica para AMP _c	0.2; > 1000	Músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro.	Varios en desarrollo
PDE 8	Selectiva para AMP _c	0.06; N/A	Ojos, músculo esquelético, Linfocitos T.	Ninguno selectivo
PDE 9	Selectiva para GMP _c	N/A; 0.17	Riñón, pulmón, cerebro	Ninguno selectivo

1.7 Enfermedades respiratorias.

Las enfermedades obstructivas principales de vías aéreas son asma, enfisema, bronquitis crónica, fibrosis quística y bronquiolitis. En pacientes con estas enfermedades, la capacidad pulmonar total es normal o está elevada, pero lo característico es una disminución de la tasa de flujo respiratorio. La obstrucción de la respiración puede ser resultado del estrechamiento anatómico de las vías aéreas, observado clásicamente en el asma (Vinay et al., 1992).

1.7.1 Bronquitis.

La bronquitis es una enfermedad que afecta las vías respiratorias de conducción. Debido a la inflamación crónica, las paredes bronquiales se estrechan por vasodilatación, congestión y edema de la mucosa. Cuando la irritación bronquial continúa, causa que las glándulas bronquiales se agranden y aumente el número de células en copa, dando como resultado la producción excesiva de moco, el árbol traqueobronquial disminuye y los bronquios periféricos suelen estar parcial o totalmente ocluidos por la inflamación y tapones mucosos. Los cambios estructurales principales relacionados con la bronquitis son: inflamación crónica y tumefacción de vías respiratorias periféricas, producción y acumulación excesiva de moco; obstrucción de vías respiratorias bronquiales (Cosio et al., 1984).

La bronquitis crónica es común en los fumadores y en los habitantes de ciudades con altos niveles de smog; se define como una tos productiva persistente por lo menos durante tres meses seguidos, en dos años consecutivos. Se puede presentar en varias formas. La mayoría de los pacientes tiene bronquitis crónica simple: la tos productiva origina expectoración mucoide, pero no está ocluido el flujo aéreo. Algunos pacientes con esta enfermedad, pueden mostrar vías aéreas hiperreactivas y episodios intermitentes de asma (Vinay et al., 1992).

Los factores etiológicos más importantes de este padecimiento son: tabaquismo, contaminantes atmosféricos e infecciones (Cosio et al., 1984).

1.7.2 Asma.

El asma bronquial es una enfermedad común, que llega a afectar a un 20% de la población en algunos países. La morbilidad y mortalidad asociada a ella van en aumento en la mayoría de los países, a pesar del uso cada vez mayor de los fármacos antiasmáticos (Barnes, 1993).

El asma se caracteriza por la broncoconstricción reversible, episódica, resultado de una reactividad aumentada del árbol traqueobronquial ante varios estímulos. El asma se puede clasificar en dos categorías principales: **asma**

extrínseca, en la cual el episodio asmático es iniciado por una reacción de hipersensibilidad tipo inducida por la exposición a un antígeno extrínseco; y **asma intrínseca**, en la cual los mecanismos desencadenantes no son inmunitarios, en esta forma, varios estímulos pueden iniciar broncoespasmo, incluyendo la aspirina, infecciones pulmonares, especialmente las causadas por virus, el frío, el estrés psicológico, el ejercicio y los irritantes inhalados (Vinay et al., 1992).

Se cree que los rasgos clínicos característicos del asma bronquial son originados por una reacción inflamatoria crónica de las vías respiratorias, la cual lleva a un acúmulo local de eosinófilos, los cuales liberan químicos que afectan el epitelio respiratorio ciliado (Barnes, 1993).

Los mediadores químicos más importantes en la respuesta asmática son (Vinay et al., 1992):

❖ Histamina, esta sustancia se encuentra preformada y de manera particular se almacena en los gránulos de los mastocitos. Su liberación se asocia al desarrollo de la contracción del músculo bronquial, aumento de la secreción de las glándulas bronquiales y también aumento de la permeabilidad vascular, con edema de la submucosa bronquial.

- ❖ La sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A), es producida por los mastocitos y basófilos luego de la estimulación inmunológica.
- ❖ El factor quimiotáctico eosinofílico de la anafilaxia.
- ❖ La prostaglandina D₂ (PGD₂), que provoca broncoconstricción y vasodilatación.
- ❖ Factor activante plaquetario (PAF), que causa agregación de las plaquetas y liberación de la histamina a partir de sus gránulos.
- ❖ Leucotrienos C₄, D₄ y E₄; éstos son mediadores extremadamente potentes, que causan broncoconstricción prolongada, aumento de la permeabilidad vascular así como de la secreción de mucina.

1.8 Tratamiento con fármacos.

En el tratamiento para el asma y otros trastornos respiratorios se utilizan fármacos de acceso directo a la pared bronquial; como lo son los broncodilatadores que comprenden a los estimulantes de los β_2 -adrenoceptores, los relajantes directos de la fibra muscular lisa (teofilina y derivados), y los inhibidores de la actividad parasimpática (bromuro de ipratropio). Dada la importancia del

componente inflamatorio en la patogenia del asma, el tratamiento incluye además de los broncodilatadores, modificadores de la respuesta inflamatoria: corticoesteroides e inhibidores de la liberación de histamina (cromoglicato y nedocromilo) (Page, 1997).

Los efectos terapéuticos de los agonistas β -adrenérgicos comprenden: 1) broncodilatación como consecuencia de la actuación de la enzima adenilciclasa de la membrana celular, que convierte el trifosfato de adenosina en monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) con capacidad inherente para relajar el músculo liso, 2) aumento del movimiento ciliar, que elimina las secreciones, y 3) efecto sobre los mastocitos que consiste en la disminución de la liberación de mediadores (Smith y Reynard, 1993).

Los fármacos β -adrenérgicos son los broncodilatadores más rápidos y eficaces de que se dispone. La acción broncodilatadora aumenta con la dosis pero, por encima de una dosis máxima, no aumenta la intensidad sino la duración del efecto (Waldeck, 2002).

Con base a su selectividad, los agonistas β_2 -adrenérgicos además de acción broncodilatadora también producen efectos adversos como es, taquicardia por varios mecanismos: a) como mecanismo reflejo a la vasodilatación y la hipotensión; b) porque la selectividad β_2 es sólo relativa y dosis suficientemente elevadas pueden

producir efectos β_1 , y c) porque en el corazón existe una pequeña población de receptores β_2 , cuando mayor es la selectividad por los β_2 -adrenoreceptores, menor es el efecto taquicardizante y arritmógeno β_1 para un determinado efecto broncodilatador (Waldeck, 2002). Además de la taquicardia se producen con frecuencia temblor fino de las extremidades (efecto β_2) intranquilidad y nerviosismo (Waldeck, 2002).

La mayoría de las reacciones adversas son consecuencia de su acción adrenérgica y guardan relación con la dosis y la vía de administración (Flórez, 1997).

En el Cuadro 2 se resumen algunas propiedades farmacológicas de los agonistas β_2 - adrenérgicos.

Los antagonistas muscarínicos son el bromuro de ipratropio, el bromuro de oxitropio y la atropina. En la práctica clínica, los dos primeros se usan en muchos países por vía inhalatoria, con el fin de reducir los efectos adversos sistémicos que van asociados a esta clase de fármacos cuando se usan por otras vías. Cuando se inhala, se absorben escasamente desde el pulmón a la circulación, no cruzan la barrera hematoencefálica y tiene pocos efectos adversos. La broncodilatación máxima se suele observar a partir de los 30 minutos de la administración y llega a durar hasta 5 horas (Page, 1997).

Cuadro. 2 Propiedades Farmacológicas de algunos fármacos sobre receptores adrenérgicos (Flórez, 1997).

FÁRMACO	SELECTIVIDAD			DURACIÓN DEL EFECTO SOBRE LOS RECEPTORES (horas)
	α	β_1	β_2	
Adrenalina	+++	++	++	1-2
Efedrina	++	+	++	2-3
Isoprenalina	---	+++	+++	2-3
Fenoterol	—	+	+++	4-6
Orciprenalina	---	++	+++	3-5
Salbutamol	---	+	+++	4-6
Terbutalina	---	+	+++	4-6
Formoterol	---	+	+++	12
Salmeterol	---	+	+++	12

El isoproterenol (**Figura A**) mantiene una fuerte acción β_1 , que provoca efectos cardiacos indeseables, incluso por vía inhalatoria, su acción es de 1-2 horas. La orciprenalina o metaproterenol carece de acción α y su acción β_1 es notablemente inferior a la de la adrenalina y la isoprenalina; su acción es más prolongada y se puede administrar por vía inhalatoria, parenteral y oral. (Waldeck, 2002).

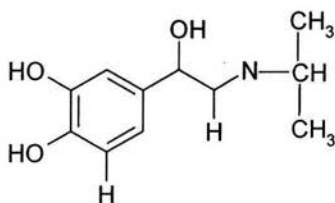


Figura A. Estructura del Isoproterenol.

El salbutamol, el fenoterol y la terbutalina presentan mayor selectividad β_2 , con lo que ha mejorado la seguridad de su acción, la duración del efecto (4-8 horas) y la posibilidad de utilizar la vía oral. El salmeterol y el formoterol inhalados son eficaces durante más de 12 horas, por lo que resultan particularmente útiles en el tratamiento del asma nocturna (Flórez, 1997).

La inhalación de isoprenalina se convirtió en un popular remedio contra el asma, pero se tienen problemas serios a nivel cardiaco. Las catecolaminas como

adrenalina e isoprenalina, son rápidamente metabolizadas, lo que es un limitante en la duración del efecto (Inman y Adelstein, 1969).

La mayoría de las reacciones adversas son consecuencia de su acción adrenérgica y guardan relación con la dosis y vía de administración. Por vía oral producen temblor fino de las extremidades (efecto β_2). Taquicardia y palpitaciones (por acción directa β_1 y por vasodilatación), intranquilidad y nerviosismo. Estas reacciones son menores y prácticamente indetectables si se administra adecuadamente por vía inhalatoria a las dosis prescritas. Por vía subcutánea son más frecuentes los efectos cardiovasculares. Las arritmias se observan más a menudo por vía intravenosa (Flórez, 1997).

1.8.1 Teofilina y derivados.

Las xantinas han sido utilizadas ampliamente en el tratamiento del asma desde finales del siglo XIX, a raíz de observaciones de que el café cargado aliviaba los síntomas asmáticos. (Page, 1997).

Las xantinas son metabolizadas rápidamente y tiene un tiempo de vida medio muy corto. Sin embargo, esta limitación queda superada cuando se usan preparados

de <<liberación lenta>>, los cuales consiguen mantener concentraciones plasmáticas eficaces durante 18 a 20 horas (Page, 1997).

El problema de usar xantinas como broncodilatadores, es que tienen un rango terapéutico muy estrecho; se requieren concentraciones plasmáticas superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$ para conseguir una broncodilatación efectiva, y por el contrario las concentraciones mayores de 20 $\mu\text{g/mL}$ se asocian a una mayor probabilidad de efectos adversos, entre los que figuran náuseas, arritmias cardíacas y convulsiones (Page, 1997).

La teofilina (**Figura B**), la cafeína y la teobromina son un conjunto de alcaloides que pertenecen al grupo de las metilxantinas.

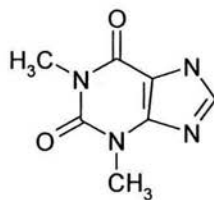


Figura B. Estructura de la Teofilina.

La teofilina es ampliamente usada, en el tratamiento del asma, es un inhibidor no-selectivo de las fosofodiesterasas (Torphy y Udem, 1991).

Además de producir broncodilatación, la teofilina mejora la excursión diafragmática y el transporte ciliar y estabiliza el mastocito. Este último efecto se relaciona con las propiedades antiinflamatorias de la teofilina que se manifiestan mediante la inhibición de la liberación de mediadores por los mastocitos con una reducción de la permeabilidad vascular, vasodilatación y producción de moco, inducidos por mediadores. La ampliación del calibre de las vías respiratorias se manifiesta por la reducción de la resistencia pulmonar y disminuye la sintomatología (Flórez, 1997).

La teofilina no sólo interfiere en la acción de otros broncodilatadores antiasmáticos, sino que, en algunos casos, se observa una acción sinérgica entre esta y los receptores β_2 -adrenérgicos: a) su administración restaura la eficacia de los β_2 ; b) con dosis bajas de teofilina y β_2 pueden conseguirse efectos aditivos terapéuticos con pocos efectos secundarios, y c) la asociación de esta puede aumentar el efecto máximo conseguido con un β_2 . La teofilina debe utilizarse prestando cuidadosa atención en los niveles sanguíneos. De manera característica, una concentración sérica de teofilina de 10-20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ se correlaciona con una eficacia óptima. Cuando se incrementa la dosis, los efectos colaterales se tornan más problemáticos y puede

presentarse toxicidad (Smith y Reynard, 1993).

El ipratropio es un agente anticolinérgico que reduce la hiperrreactividad colinérgica presente en muchos pacientes con bronquitis crónica, enfisema y asma. Este agente puede ser útil solo o, de manera más característica, en combinación con un simpaticomimético β_2 adrenérgico selectivo, con el cual puede producir un efecto sinérgico (Smith y Reynard, 1993).

1.9 Uso de las plantas medicinales

El hombre a lo largo de su evolución ha utilizado a las plantas para satisfacer muchas de sus necesidades primarias entre las que se encuentran los usos medicinales (Cox, 2000).

El empleo de las plantas medicinales en nuestro país se remonta hasta tiempos inmemorables. Documentos del periodo novohispano certifican y comprueban la continuidad de la práctica médica tradicional en México-Tenochtitlan y en las principales ciudades de la Nueva España, con particular referencia al uso de las plantas medicinales (Campos, 1993). Alrededor del mundo

se emplean plantas con fines curativos, algunos ejemplos de plantas que han sido estudiadas por sus propiedades como broncodilatadores aparecen en el Cuadro 3.

Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal, e incluso único, recurso del que disponían los médicos. La medicina tradicional en México tiene sus raíces en las tradiciones de las antiguas culturas mesoamericanas poseedoras de una rica cultura herbolaria medicinal. El uso de remedios vegetales persiste aún en nuestro país, donde un porcentaje elevado de la población, recurre a la medicina tradicional para resolver sus problemas prioritarios de salud (Mata, 1993).

En México, el uso de las plantas medicinales se da exclusivamente en el contexto de la llamada "medicina tradicional". Se tiene registrado un número aproximado de 4500 especies botánicas con propiedades medicinales y que son utilizadas por la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes (Bye, 1993).

La medicina tradicional mexicana, se basa en una cultura y forma de entender el mundo, que a lo largo de la historia ha funcionado como "cultura madre" sumando y ordenando elementos de otras medicinas a las suyas (Cox, 2000).

Análisis Isobolográfico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

Cuadro. 3 Plantas con efecto broncodilatador estudiadas en diferentes regiones del mundo.

ESPECIE	ORIGEN	POSIBLE MECANISMO DE ACCION	REFERENCIA
<i>Carum opticum</i>	India, Iran y Egipto	Efecto anticolinergico. Antagonismo competitivo sobre receptores H ₁	Boskabady y Shaikhi, 2000.
<i>Drymis winteri</i>	Brasil	Efecto antagonista reversible de contracciones inducidas por algunos mediadores que participan en la etiología del asma	El Sayah et al., 1998.
<i>Galphimia glauca</i>	México	Inhibición de contracciones del músculo de vías aéreas inducidas por leucotrienos.	Campos et al., 2001.
<i>Desmodium adscendens</i>	Ghana	Inhibición de contracciones del músculo de vías aéreas inducidas por leucotrienos.	Addy y Burka, 1988.
<i>Hydrastis canadensis</i>	U.S.A.	Efecto relajante debido a la interacción con receptores adrenérgicos y receptores adenosinicos e inhibición de la fosfodiesterasa.	Abdel-Haq et al., 2000.

En un estudio realizado en la Unidad de Medicina Familiar No. 37, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hermosillo Sonora, México se encontró que el 83% de los médicos aceptan la herbolaria y un 75% la utilizan como recurso terapéutico. Las plantas más utilizadas en orden decreciente fueron, el gordolobo (*Gnaphalium sp.*), el eucalipto (*Eucalyptus*, probablemente *E. globulus*), la hierbabuena (*Mentha sp.*), la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y el nopal (*Opuntia sp.*) (Taddei et al., 1999)

En el Cuadro 4 se enlistan algunas plantas medicinales usadas en México a las que se les atribuyen propiedades broncodilatadoras y antiasmáticas.

A pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal mexicana, el porcentaje de las especies botánicas estudiadas desde el punto de vista fitoquímico es bajo y aún es menos la fracción de estas que ha sido objeto de una evaluación biológica (Mata, 1993).

Cuadro 4. Plantas medicinales usadas en México a las que se les atribuyen propiedades broncodilatadoras y antiasmáticas.

Nombre Científico	Nombre común	Uso	Referencia
<i>Calea zacatechichi</i>	Tam huñi (Goma agria)	Tos, asma	Leonti et al., 2003
<i>Datura stramonium</i>	Toloache	Asma	Estrada, 1996
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Enfermedades Respiratorias	Estrada, 1996
<i>Gnaphalium roseum</i>	Gordolobo	Tos, bronquitis	Frei et al.,1998
<i>Schinusmolle l.</i>	Pirul	Enfermedades Respiratorias	Estrada, 1996
<i>Petiveria alliacea</i>	Albaca	Tos, asma	Leonti et al., 2003

1.10 El género *Gnaphalium*.

En la región central del país se aplica popularmente el nombre "gordolobo" a diversas especies del género *Gnaphalium*, perteneciente a la familia de las compuestas (Compositae). Los miembros de esta familia son arbustos, árboles plantas herbáceas, con los tallos y hojas vellosos afelpados; hojas alternas y sésiles, las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capítulos. Esta familia cuenta con más de 250 géneros y cerca de 20 000 especies, de amplia distribución en toda la tierra (Sánchez, 1986).

El género *Gnaphalium* comprende subarbustos o hierbas anuales o bianuales; tallos erectos, nuda o profusamente ramificados; hojas alternas, enteras, generalmente sésiles, lanceoladas; inflorescencia compuesta de cabezuelas solitarias, o más frecuentemente de glomérulos de cabezuelas agrupadas arreglados en forma solitaria, de color blanquecino, amarillento, café o rojizo, y brillantes (Rzedowski, 1985).

Las propiedades medicinales que se le atribuyen de forma tradicional a esta planta son: predominantemente contra algunos padecimientos de vías respiratorias, comúnmente para el alivio de la tos y bronquitis, entre otras. Además, en algunas regiones la emplean para algunos padecimientos del aparato digestivo (Argueta et al., 1994).

1.10.1 Estudios botánicos y etnobotánicos

Las especies que son empleadas en nuestro país son las siguientes (Argueta et al., 1994).

❖ ***G. attenuam* DC.** Hierba originaria de México. Habita en clima cálido. Asociada a vegetación, derivada de bosque tropical. Hierba anual de 60 cm de altura, de tallos rectos o ligeramente inclinados. Las hojas son aterciopeladas de color verde grisáceo. Las flores son de color blanco amarillentas.

Sus cualidades medicinales se aprovechan en Michoacán, para quitar el dolor de estómago y el espasmo. En Oaxaca, contra la gastritis y en Puebla para aliviar el ardor de estómago y la bilis. Así mismo, se utiliza contra trastornos respiratorios como tos, ronquera y gripa. El tratamiento implica la utilización de la parte aérea de la planta preparado en decocción y administrada por vía oral (Argueta et al., 1994).

❖ ***G. chartaceum*.** Hierba anual o bianual de 1.2 m de alto aproximadamente, fuertemente aromática, profusamente ramificada; tallos con pubescencia lanosa aracnoidea laxa y granular, hojas oblongo-lanceoladas, cabezuelas subglobosas, cada una con 15 a 25 flores hermafroditas, de color verde pardoso. Es una especie escasa en el Valle de México. Se conoce de Jalisco, Puebla y Oaxaca (Rzedowski, 1985).

El principal uso medicinal que se hace de esta planta, en el centro del país, es contra la tos. Se emplea toda la planta preparada en infusión junto con mercadela, se toma caliente. El cocimiento solo de la planta, suele ser usado para lavar heridas (Argueta et al., 1994).

❖ ***G. conoideum* Kunth.** Planta originaria de México de uso muy antiguo que coincide con el actual en su aplicación para problemas respiratorios. Hierba anual de 30 a 80 cm de altura, de ramificación múltiple desde la base o bien sólo en el área de la inflorescencia; tallos procumbentes o erectos de apariencia aterciopelada. Las hojas son alargadas y angostas pegadas al tallo, aterciopeladas. Sus flores son amarillas y brillantes dispuestas en cabezuelas y los frutos como capsulitas alargadas. Se encuentra en clima templado asociada a matorral xerófilo (Argueta et al., 1994).

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata los siguientes usos: antirreumático, antitusígeno, bronquitis, como emoliente, para el dolor de garganta y para los humores flemáticos (Argueta et al., 1994).

En el Estado de México y Michoacán, se indica su uso en enfermedades respiratorias como tos, gripa o bronquitis. Para su administración se hace un cocimiento de las flores y las hojas, que se endulza con miel y se toma muy caliente,

de preferencia por las noches. Además del Valle de México se conoce en Durango y Tlaxcala (Rzedowski, 1985).

❖ ***G. oxyphyllum* DC.** Planta de origen desconocido, habita en climas cálidos, semicálido y templado. Planta silvestre, crece en terrenos de cultivo, de riego y temporal, y abandonados. Asociada a bosques tropicales, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino. Planta que mide entre 30 a 75 cm de altura, los tallos están cubiertos de vellitos que le dan una apariencia blanca, las hojas son angostas. Las flores son blancas o crema y aparecen en cabezuelas. Los frutos son pequeños y las semillas tienen un penacho en la punta.

Se emplea para la tos en los estados de Hidalgo, Morelos, Puebla Tlaxcala, Michoacán y Sonora (Lara y Márquez, 1996).

La planta es útil también si hay problemas pectorales, infecciones de la garganta, bronquitis, asma y para la descongestión de bronquios. Se reporta además como antirreumático, antitusígeno, contra bronquitis, y dolor de garganta. En trastornos gástricos interviene en el tratamiento de las úlceras, dolor de estomago y parásitos intestinales (Lara y Márquez, 1996).

Si se emplea para la tos, que es debida al resfriado, se ingiere el cocimiento de la planta o se prepara un cocimiento en leche junto con otras plantas del mismo género y se toma en ayunas durante nueve días; si la tos es crónica sólo se hierven las flores en leche para tomarse tres veces al día. Por otro lado interviene en la terapia del cáncer, heridas, fiebre, hidropesía y lumbago (Lara y Márquez, 1996).

❖ ***G. salicifolium***. Su origen es desconocido. Habita en clima templado. Presente en laderas rocosas, asociada a vegetación de bosques de pino encino. Planta de 12 a 60 cm de altura, los tallos se ven aterciopelados. Las hojas son angostas y aterciopeladas. Cabezuelas con flores que se ven lanosas y los frutos son pequeños de color café y púrpura (Rzedowski, 1985).

En Puebla y Veracruz se ocupa contra la tos al igual que en Hidalgo, en donde suele emplearse el cocimiento de las ramas, como té, cuando hay tos o contra los "aires". También usado para curar calambres, heridas e hinchazones (Argueta et al., 1994).

❖ ***G. semiamplexicaule* DC.** Originaria de México, habita en clima templado. Asociado a la vegetación de pastizal, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino. Planta herbácea de 30 a 80 cm. de altura con los tallos aterciopelados, de color blanquecino.

Las hojas son más largas que anchas pero pequeñas, un poco velludas. Las flores son amarillentas o blanquecinas y están reunidas en cabezuelas que se ven plateadas. (Argueta et al.,1994).

Las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente a esta planta se relacionan con la cura de padecimientos respiratorios como: bronquitis, asma e irritación de la garganta (Veracruz) pero su uso más frecuente que se registra en el centro del país (Distrito Federal, Hidalgo; Tlaxcala), es contra la tos. En el tratamiento de estos padecimientos se emplea la parte aérea preparada en cocimiento y administrada por vía oral. Así mismo se le ocupa para estimular la circulación sanguínea, en varices y hemorroides (Argueta et al.,1994).

❖ ***G. viscusum kunth.*** Es de origen desconocido. Presente en el clima templado. Crece en aéreas de vegetación perturbada de matorral xerófilo, bosques de pino, de encino, mixtos de encino-pino. Planta anual herbácea de 30 cm a 1 m de altura; los tallos tienen apariencia lanosa. Sus hojas son angostas, de color verde en el anverso y en el reverso se ven blancas porque son muy velludas. Las flores están agrupadas en cabezuelas que tienen alrededor de 200 flores de color crema. Se emplea en algunos estados del centro de la Republica Mexicana, se le usa en infusión para curar la tos. Por otra parte, la infusión de la planta preparada junto con hojas de encino, sirve para curar el dolor de estómago.

Las ramas y hojas se ocupan para el empacho. Sin dar más datos se recomienda su empleo contra el cáncer, las úlceras, el dolor de cabeza y las inflamaciones. Se le atribuyen propiedades como expectorante (Argueta et al., 1994).

❖ ***G. wrightii***. Pertenece a la familia Compositae. Se distribuye en el valle de México, San Luis Potosí e Hidalgo. Planta herbácea de 30 a 80 cm de altura, lanosa con hojas alternas, largas y angostas, inflorescencias terminales, agrupadas en cabezuelas amarillas y brillantes.

El cocimiento se usa como emoliente y pectoral contra la tos y el dolor de garganta y de pecho ocasionado por la bronquitis, contra el asma y el dolor de estómago. Mezclado con otras plantas (té ulcerio) se usa para resfriados. También, se les da a mujeres antes y después del parto (Lara y Márquez, 1996).

1.10.2 Antecedentes farmacológicos

Aunque algunas plantas del género *Gnaphalium*, se han estudiado desde el punto de vista químico, son muy pocos los estudios que permiten validar su uso tradicional. Solamente las siguientes especies se han estudiado desde el punto de vista farmacológico:

- ❖ *G. robustum*, una especie de origen chileno, se aisló 8-O-(2-metil-2-butenoil)-5,7-dihidroxi-3-metoxi flavona y se comprobó que tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli*. (Cuadra et al., 1994).

- ❖ *G. stramineum* y *G. viscosum*, conocidas popularmente en Guatemala con el nombre de sanalotodo, inhiben el crecimiento de *S. aureus* la primera, y *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* la segunda (Caceres et al., 1991).

- ❖ El extracto etanólico de *G. indicum* inhibe la concepción en ratas en un 50% (Prakash, 1986).

- ❖ *G. semiamplexicaule* se estudió como posible antotusígeno, encontrándose que no tiene efecto significativo como tal (Meckes y Medallo, 1986).

- ❖ A *G. liebmanii* se le ha demostrado efecto broncodilatador en anillos de tráquea aislada de cobayo (Torres, 2002).

1.11 Análisis isoblográfico.

En los últimos años el estudio entre sustancias activas se ha realizado utilizando el análisis isoblográfico (Tallarida et., al 1997a), que ofrece una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas, para definir una simple adición de los efectos individuales, una atenuación o bien un sinergismo entre ellas (Tallarida, 2000). La aplicación de esta metodología se ha dado tanto en estudios en animales de laboratorio como en estudios clínicos (Vinik et al., 1999). Para dos fármacos que presentan el mismo tipo de efecto o muy similar (por ejemplo, dos analgésicos, dos vasodilatadores o dos depresores del sistema nervioso central) se puede calcular la dosis de cada uno que da lugar al mismo nivel de efecto, por ejemplo la dosis efectiva 50 (DE_{50}), la dosis efectiva 70 (DE_{70}) o la dosis efectiva 30 (DE_{30}), etc., que se representará como Z^* , con un subíndice para identificar a cada fármaco (Z_1^* o Z_2^*). En este método el valor de Z^* se calcula de la región de la curva dosis-respuesta en donde existe una clara relación entre la dosis y el efecto y que pueden relacionarse linealmente, aunque también puede existir una relación no lineal y entonces se puede utilizar el análisis no lineal de Z^* (Tallarida, 1992; Tallarida, 2000). Se calcula la Z^* para cada fármaco de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la dosis, de donde se obtiene el $\log Z^*$ y el error estándar estimado SE ($\log Z^*$) para cada fármaco, que posteriormente se utilizará para realizar el análisis estadístico (Tallarida et al., 1997b). El valor de Z^* del fármaco menos activo (A) se grafica sobre el eje de las abscisas (Z_1^*). La unión de estos dos puntos forma la línea de aditividad,

que está formada por los pares de datos (a, b), de las combinaciones binarias del fármaco A y del fármaco B que provocan el mismo nivel de efecto de los fármacos sin combinarse y que satisfacen la ecuación:

$$a / A + b / B = 1$$

en donde A y B son las dosis equiefectivas (Z_1^* y Z_2^* que producen el mismo nivel de efecto) de los fármacos individuales cuando cada uno está presente solo. Las cantidades a y b son las dosis respectivas (Z_1 y Z_2) en la combinación binaria que proporcionan el mismo nivel de efecto alcanzado por la dosis A sola o la dosis B sola (Tallarida, 2000). Los pares de dosis equiefectivas son denominadas *isoboles*, de tal forma que (A, 0), (0, B) y los pares (a, b) son *isoboles*. Cuando la combinación de la dosis a del fármaco A y la dosis b del fármaco B cumple con la relación $a/A + b/B = 1$. Se dice que los fármacos puede exagerar o puede atenuar el efecto de uno u otro fármaco. El efecto exagerado se denomina *efecto superaditivo o sinergista* y el efecto atenuado se denomina *efecto subaditivo*. La relación $a/A + b/B < 1$ indica la relación subaditiva entre los fármacos A y B. El análisis isoblográfico consiste en definir el tipo de interacción que presentan dos fármacos con el mismo tipo de efecto cuando se administran juntos en un sistema biológico. La gráfica del total de los pares de datos (a, b) de las combinaciones posibles forma la *línea de aditividad*. Al mismo tiempo todos los pares de datos (a, b) representan teóricamente los pares de dosis

aditivas para que los fármacos administrados juntos den el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales. A esta línea junto con las coordenadas de la combinación de los pares (a, b) que resulten de los datos experimentales se le denomina *isobograma*. En la **Figura C** se representa un isobograma.

Para realizar el análisis primero se determinan las dosis o concentración que provocan un determinado nivel de efecto (Z^*) de cada fármaco. La Z^* del fármaco A se denotará como A y para el fármaco B, se denotará B. Las cantidades en la combinación aditiva son $a = f A$ del fármaco A y $b = (1-f)B$ del fármaco B. La f se refiere a las fracciones de cada fármaco y la suma de las fracciones de los dos fármacos debe resultar 1. Para que sea una combinación aditiva debe cumplir con la relación $a/A + b/B = 1$. Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa comunes (mg o μg) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada Z_{ad} :
 $Z_{ad} = f A + (1-f) B$.

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. Las proporciones de cada fármaco en la mezcla estará dado por $\rho_A = f A / Z_{ad}$ y $\rho_B = (1-f) B / Z_{ad}$ respectivamente. La combinación que resulte con estas proporciones se administra experimentalmente al sistema biológico, como si fuese un tercer fármaco. Esto es, se administra en diferentes dosis o concentración conservando la misma proporción (ρ). Se calcula la dosis o concentración que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales y a este valor se

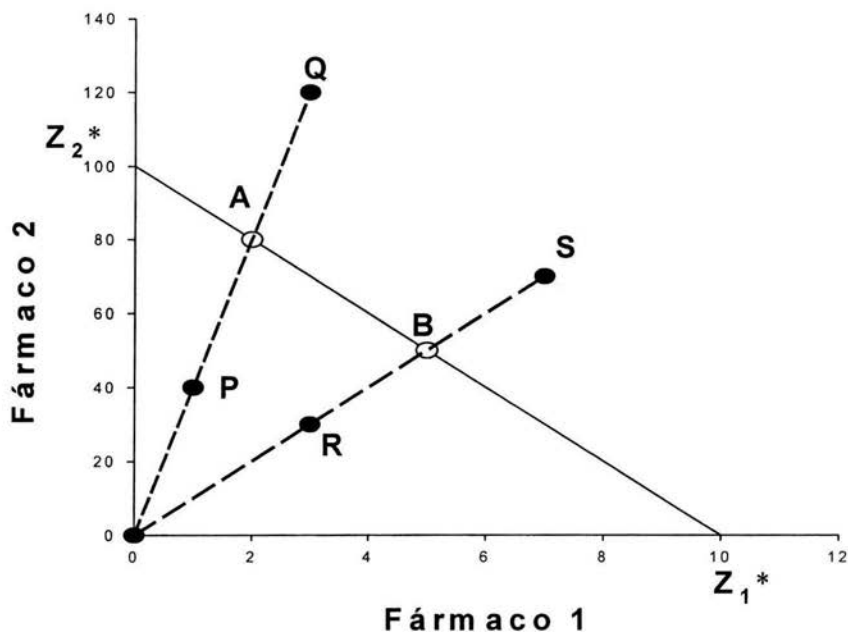


Figura C. Isoblograma. En donde: Z_1^* y Z_2^* : Dosis equiefectivas de los fármacos 1 y 2. A y B representan las dosis teóricas aditivas (Z_{teo}) de la combinación de las sustancias 1 y 2 en dos proporciones definidas. P y R representan las dosis experimentales (Z_{exp}) con un efecto superaditivo. Q y S representan las dosis experimentales (Z_{exp}) con un efecto subaditivo. La línea continua es la línea de aditividad. Las líneas discontinuas radiales 0-S y 0-Q representan las combinaciones de las sustancias en diferentes proporciones.

le denomina Z_{ex} (Cantidad experimental que provoca el mismo nivel del efecto). Se realiza el análisis estadístico a la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{ex}$. Si la diferencia no es significativamente diferente de cero se concluye que la combinación es una simple adición del efecto de cada uno de los fármacos. En contraste una diferencia significativa indicará una relación no aditiva entre los dos fármacos como sigue:

Se establecerá una relación sinergista si $Z_{ex} < Z_{ad}$ y una relación de subaditividad si $Z_{ex} > Z_{ad}$. Se aplica un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isoblográfico (Tallarida et al., 1997 b; Tallarida, 2002).

La prueba de significancia de la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{ex}$, brevemente consiste en determinar el valor de t' dado por:

$$t' = M / [SE(Z_{a*})^2 + SE(Z_{e*})^2]^{1/2}$$

En la ecuación anterior los subíndices se refieren a los valores aditivos y experimentales respectivamente. Los errores estándar estimados se calculan con la relación: $SE(Z^*) = 2.3 \times SE(\log Z^*)$, con lo que se calculan las varianzas respectivas:

$$V(Z^*) = [SE(Z^*)]^2$$

La varianza de Za^* está dada por $V(Za^*) = f^2 V(Z^*) + (1-f)^2 V(Z^{2*})$; de esta relación se obtiene el error estándar de Zad :

$$SE(Za^*) = [V(Za^*)]^{1/2}$$

Conociendo el valor de Zad y Zex con sus respectivos errores estándar, se calcula el valor t' y se compara con el valor de T dado por:

$$T = [t_{ad} (SE Za^*)^2 + t_{ex} (SE Ze^*)^2] / [SE (Za^*)^2 + SE (Ze^*)^2]$$

El valor de t_{ad} es el valor en la tabla de distribución t con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, en donde n_1 y n_2 son el número de concentraciones del fármaco 1 y fármaco 2 respectivamente que se utilizaron en el cálculo y t_{ex} es el valor en la tabla de distribución t para $n_{ex} - 2$ grados de libertad, en donde n_{ex} es el número de dosis de la combinación. Si $|t'| > T$ la diferencia es significativa (Tallarida, 2000).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Tradicionalmente, en nuestro país, se utilizan plantas para aliviar algunas enfermedades, dentro de las cuales, se encuentran las de vías respiratorias. Un problema que a menudo se presenta en la población mexicana es el estrechamiento parcial de las vías aéreas respiratorias en menor o mayor grado de acuerdo a la enfermedad en la que se presenta. Varias especies del género *Gnaphalium*, entre las cuales, se encuentra el *G. liebmanii*, se emplea predominantemente en México para aliviar enfermedades respiratorias.

Existen estudios químicos de algunas especies del género *Gnaphalium* de donde se han identificado compuestos y se ha evaluado la actividad antimicrobiana de algunas especies, como *G. oxyphyllum* y *G. viscusum*, los cuales muestran actividad contra *E. coli* (Rojas, et al., 2001), sin embargo, existen muy pocos estudios biológicos para esta planta, uno de ellos es un trabajo de tesis (Torres, 2002) en el que se demuestra que el extracto hexánico de *G. liebmanii*, es el que presenta mayor efecto broncodilatador, en anillos de tráquea de cobayo, sin embargo no se conoce su mecanismo de acción.

Con el propósito de investigar el mecanismo de acción de esta planta medicinal, se realizó el análisis isoblográfico de la interacción entre el extracto hexánico de *G. liebmanii* y dos fármacos broncodilatadores: isoproterenol y teofilina.

III. HIPOTESIS.

La acción broncodilatadora del extracto de *G. liebmanii* puede ser a través de la inhibición de las fosfodiesterasas, por lo que mediante el análisis isobolográfico se espera encontrar un efecto sinergista entre el extracto y el isoproterenol, en el que se sabe se elevan los niveles del AMP_C y la interacción entre el extracto y la teofilina, un inhibidor de las fosfodiesterasas, se espera que se presente un efecto aditivo, que indicará que el extracto actúa por un mecanismo de acción similar a la teofilina, es decir inhibiendo a las fosfodiesterasas.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General

Realizar el estudio de la interacción entre el extracto hexánico de *G. liebmanii* y los fármacos isoproterenol y teofilina, mediante un análisis isoblográfico en el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.

4.2 Objetivos específicos.

❖ Determinar la CE_{30} broncodilatadora a través de la construcción de las curvas concentración-respuesta individual de cada fármaco y del extracto de la planta en anillos de tráquea aislada de cobayo.

❖ Realizar el cálculo teórico de las concentraciones aditivas de las combinaciones planta-fármaco.

❖ Determinar la CE_{30} de las combinaciones planta-fármaco en las proporciones 1:1, 7:3 y 3:7.

- ❖ Determinar el tipo de interacción entre el extracto hexánico de *G. liebmanii* y fármacos con actividad broncodilatadora.

- ❖ Establecer, si existen evidencias de que el extracto de *G. liebmanii* actúa a través de la inhibición de las fosfodiesterasas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Material vegetal.

La parte aérea de *G. liebmanii* se colectó en el pueblo de San Pablo Ixayoc, Texcoco México. Una muestra fue depositada en el Herbario de IMSS en Febrero 2003.

5.2 Preparación del extracto

El extracto se preparó con flores secas de *G. liebmanii* por maceración con hexano a temperatura ambiente por 3 días, se filtró y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida.

5.3 Animales

Se emplearon cobayos machos con un peso corporal entre 300 y 400 g mantenidos en condiciones normales de alojamiento para esta especie con libre acceso al alimento y al agua. Los animales se trataron siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, actualmente, adoptada en nuestro laboratorio para el cuidado y experimentación con animales de laboratorio.

5.4 Fármacos y sustancias

El clorhidrato de acetilcolina, carbacol, (+)-isoproterenol y teofilina se adquirieron en Sigma Aldrich Co. (St. Louis MO). Las soluciones se prepararon minutos antes de ser utilizados. El resto de las sustancias fueron de grado analítico.

5.5 Ensayo biológico.

5.5.1 Disección de la tráquea y montaje de la preparación.

Los animales se sacrificaron con un golpe en la nuca, posteriormente se realizó la disección de la tráquea, limpiándola de tejido adherido. El órgano se mantuvo en una solución Krebs a 37 ° cuya composición fue (mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄, 1.2, MgSO₄ 7 H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂ 2H₂O y glucosa 11.0. La tráquea se cortó en 8 anillos aproximadamente de 2 mm de longitud y cada uno fue colocado en una cámara para tejido aislado con 10 mL de solución Krebs a 37 ° C y con un burbujeo constante con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La preparación se colocó entre dos ganchos de alambre Nicromel, uno de los extremos se fija a la cámara y el otro al transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado al polígrafo Biopac System. Los datos se obtuvieron mediante el programa Acknowledge MP100 versión 3.53.

El tejido se sometió a una tensión inicial de 1 g y se dejó estabilizar por una hora, realizando lavados con solución Krebs cada 15 minutos en este período.

Posteriormente el tejido fue estimulado con clorhidrato de Acetilcolina 3×10^{-5} M por tres veces a intervalos de treinta minutos. Después de cada estimulación el tejido se lavó tres veces con solución Krebs.

5.5.2 Determinación de las curvas concentración-respuesta.

Para el extracto hexánico de *G. liebmanii* y para cada uno de los fármacos de prueba, se construyeron curvas concentración-respuesta.

En el caso del extracto hexánico de *G. liebmanii*, el tejido fue precontraído con carbacol (3×10^{-4} M) dejando en contacto al fármaco con el tejido hasta alcanzar la meseta (5 minutos). Una vez alcanzada la meseta se aplicó el extracto suspendido en agua destilada con trazas de Tween 80, a las concentraciones 100, 133, 177, 237 y 316 $\mu\text{g/mL}$ en forma acumulativa.

Las preparaciones se dejaron en contacto con cada concentración hasta observar una meseta de broncodilatación.

Para la construcción de las curvas concentración-respuesta de los fármacos de referencia se utilizaron concentraciones de 10^{-10} – 10^{-4} M en el caso de isoproterenol (**Figura D**) y de 10^{-9} – 3×10^{-3} M para la teofilina.

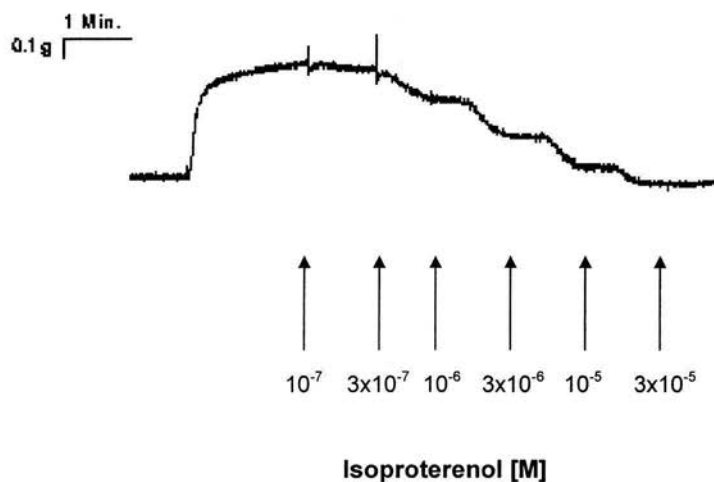


Figura D. Registro de Concentración - Respuesta acumulativa de isoproterenol a concentraciones molares de 10^{-7} a 3×10^{-5} , en las preparaciones *in vitro*.

Se determinó la porción de las curvas concentración - respuesta en la cual existe una relación lineal entre el efecto y el logaritmo de la concentración, para calcular la concentración efectiva 30 (CE_{30}) (Tallarida, 2000).

5.5.3 Experimento clásico de interacción.

Para evaluar la interacción entre el extracto hexánico de *G. liebmanii* y fármacos con actividad broncodilatadora, se obtuvieron curvas concentración-respuesta para isoproterenol y teofilina en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del extracto hexánico de *G. liebmanii*.

El tejido fue precontraído con carbacol (3×10^{-4} M) dejando en contacto al fármaco con el tejido hasta alcanzar la meseta (5 minutos). Una vez alcanzada la meseta se aplicó el extracto suspendido en agua destilada con trazas de Tween 80, a las concentraciones 87, 130, 174, 261 y 316 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubando por 5 minutos, posteriormente se realizan las curvas de isoproterenol y teofilina, a las concentraciones ya mencionadas en experimentos independientes.

5.5.4 Estudio de interacción por el método isoblográfico.

Para evaluar la interacción entre extracto de *G. liebmanii* y los fármacos isoproterenol y teofilina, se calcularon las concentraciones aditivas teóricas (Z_{ad}^*) de la combinación binaria para la administración simultánea, las proporciones evaluadas fueron 1:1, 7:3 y 3:7 de cada uno de los fármacos con el extracto de acuerdo a los valores de CE_{30} individuales (Z_i^*) siguiendo el procedimiento descrito por Tallarida et

al., (1989). Se administraron al menos 7 niveles de concentraciones de la combinación y se calculó el valor de la CE_{30} de la combinación (Z_{ex}^*)

5.5.5 Análisis estadístico.

Para demostrar la existencia de una interacción aditiva o no aditiva se calcularon los valores del logaritmo de la concentración efectiva 30 teórica ($\log Z^*_{ad}$) y experimentales ($\log Z^*_{ex}$) para cada una de las combinaciones. Se realizó el análisis estadístico basado en la prueba t de Student, siguiendo lo descrito en el punto 1.11 de la sección del fundamento teórico y de acuerdo al procedimiento descrito por Tallarida (2000) para demostrar la existencia de una diferencia significativa de cero del valor absoluto de la diferencia entre $\log Z^*_{ad} - \log Z^*_{ex}$. Se consideró que existe un efecto aditivo si no hay diferencia entre el valor teórico (Z_{ad}) y el valor experimental (Z_{ex}) es decir que el valor de t calculado (t') sea menor del valor de T para una $p < 0.05$ (Tallarida, 2000). Si el valor teórico (Z_{ad}) es estadísticamente mayor ($p < 0.05$) al valor experimental (Z_{ex}) se consideró un efecto sinergista o superaditivo y si por el contrario el valor teórico (Z_{ad}) es estadísticamente menor ($p > 0.05$) al valor experimental (Z_{ex}) se consideró un efecto subaditivo (Tallarida, 2002).

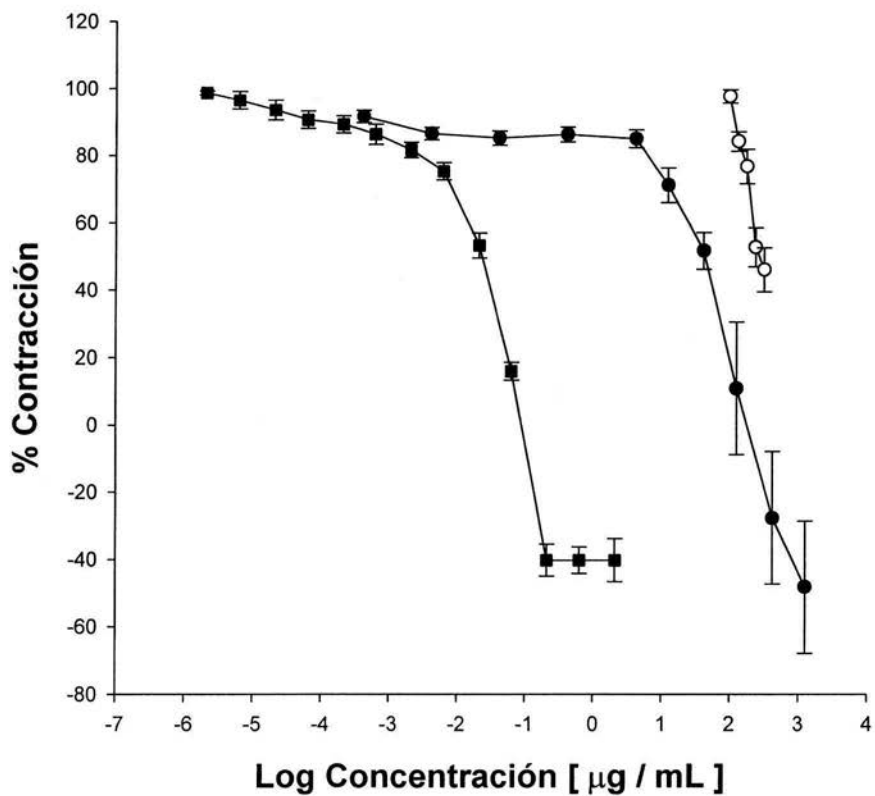
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El extracto hexánico de *G. liebmanii* y los fármacos isoproterenol y teofilina presentaron efecto dependiente de la concentración. En la Gráfica 1 se presentan las Curvas Concentración - Respuesta para cada uno de los fármacos y el extracto evaluado.

Se decidió evaluar la CE_{30} , para trabajar dentro del efecto producido por la máxima concentración de extracto utilizada (316 $\mu\text{g/mL}$). En el Cuadro 5 se presentan los valores de la CE_{30} de cada uno de los fármacos y del extracto, determinados por un análisis lineal.

En las Gráficas 2 y 3 se muestran las Curvas Concentración-Respuesta de los experimentos clásicos de interacción Isoproterenol- Extracto y Teofilina - Extracto.

Se puede observar un desplazamiento a la izquierda de las curvas en ambos experimentos, lo que nos indica que existe un aumento del efecto. En el caso de la interacción Isoproterenol-Extracto se observa además, un aumento del efecto máximo.



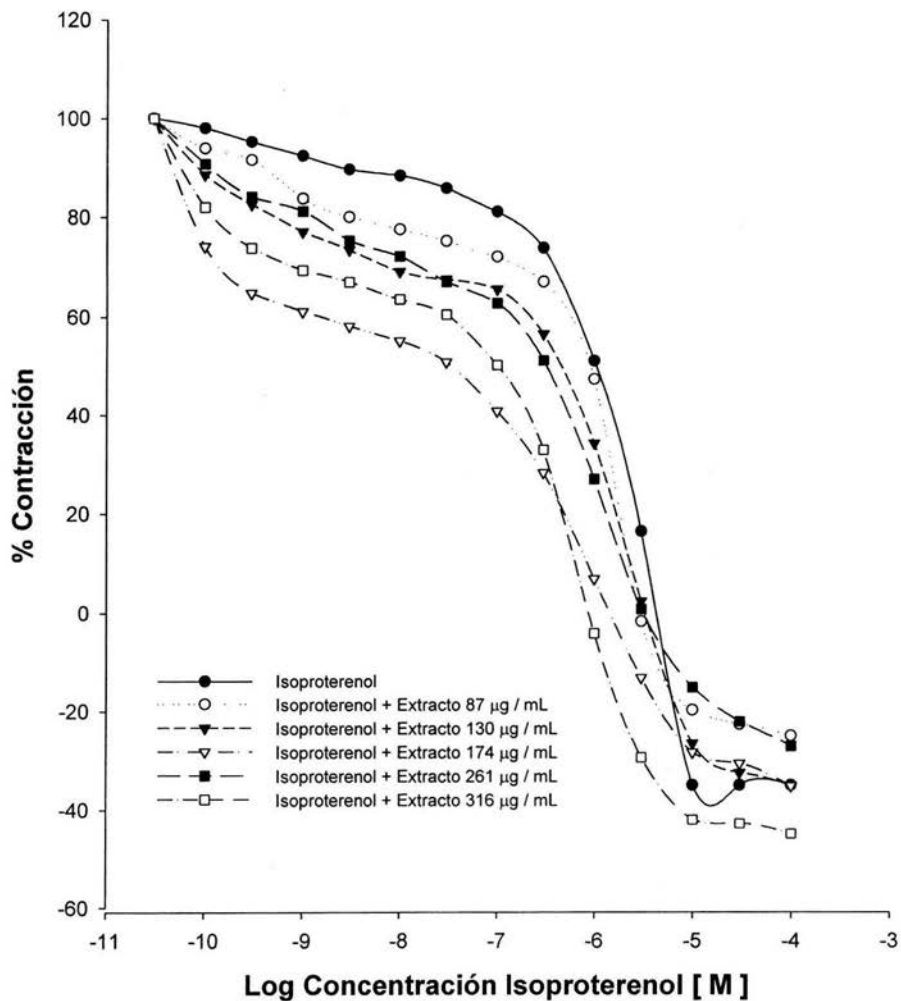
Gráfica 1. Curva Log Concentración – % Respuesta para determinar la CE_{30} .

(■) Isoproterenol, (●) Teofilina, (○) Extracto hexánico de *G. liebmanii*. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos seis observaciones.

Cuadro 5. Valores de la $CE_{30} \pm EEM$ ($\mu\text{g/mL}$) del efecto broncodilatador de isoproterenol, teofilina y extracto hexánico de *G. liebmanii* en tráquea aislada de cobayo.

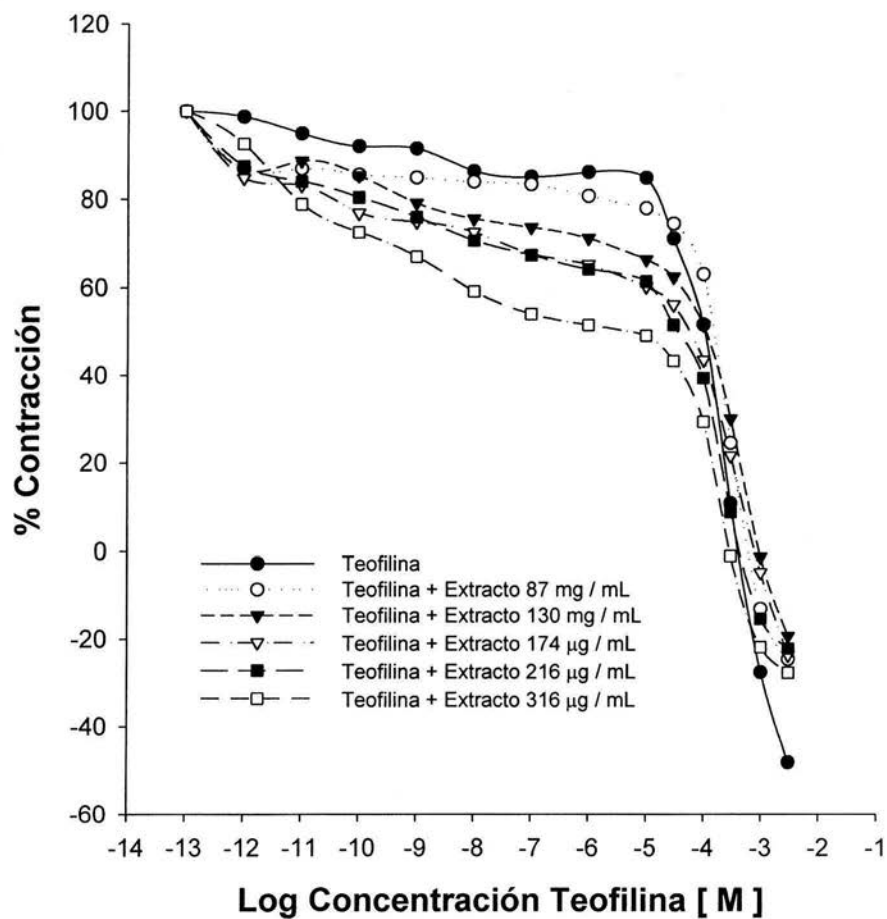
Compuesto	$CE_{30} \pm EEM$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
Isoproterenol	0.005986 ± 0.001421
Teofilina	11.27974 ± 1.029103
<i>Gnaphalium liebmanii</i>	174.54 ± 12.33184

EEM = Error estándar de la media de al menos 5 niveles de concentración. Con $n \geq 8$ de al menos 3 cobayos y un valor de $r > 0.8$ del análisis lineal.



Gráfica 2. Experimento clásico. Interacción *Gnaphalium liebmanii* e Isoproterenol.

Cada punto representa la media de al menos seis observaciones.



Gráfica 3. Experimento clásico. Interacción *Gnaphalium liebmanii* y Teofilina. Cada punto representa la media de al menos seis observaciones.

En la interacción Teofilina–Extracto, se observa que las curvas tienen un desplazamiento, hacia la izquierda. Este desplazamiento de las curvas, nos indica que existió una potenciación ya que se requieren menores concentraciones, para observar el efecto. (Gráfica 3).

En los experimentos de clásicos, se observó un desplazamiento hacia la izquierda en la interacción Isoproterenol – Extracto (Gráfica 2) lo que nos indica un aumento del efecto. El isoproterenol al ser un fármaco β - adrenérgico, desencadena en las células del músculo liso la cascada de la adenilato ciclasa (Thirstrup, 2000).

El aumento resultante de los niveles intracelulares de AMP_C produce la activación de la proteína cinasa, la cual fosforila a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). La fosforilación de la MLCK disminuye la afinidad de está proteína por el calcio-calmodulina, y por lo tanto estabiliza su forma inactiva. En consecuencia se disminuye la proporción de miosina fosforilada en el músculo liso, que entonces se relaja (Thirstrup, 2000).

La fosfodiesterasa es una enzima encargada de la degradación de AMP_C intracelular (Barnes, 1998a), un compuesto inhibidor de las fosfodiesterasas, incrementa los niveles de AMP_C intracelular, el cual va a provocar la fosforilación de proteínas y una respuesta (broncodilatación). El sinergismo observado en la interacción Isoproterenol–Extracto, se debe a que ambos compuestos actúan por

diferentes mecanismo de acción que provocan en el incremento de AMP_c, el primero posiblemente por la inhibición de las fosfodiesterasas y el segundo a través de receptores β -adrenérgicos, esto se ve reflejado en el incremento del efecto máximo (Gráfica 2).

Las interacciones de *G. liebmanii* – Isoproterenol, *G. liebmanii* – Teofilina y Teofilina – Isoproterenol, a las proporciones 1:1, 7:3 y 3:7 se muestran en las Gráficas 4, 5 y 6, respectivamente. En las tres gráficas, se observa un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda, lo que indica que se presentó un aumento del efecto de relajación del músculo traqueal.

En las gráficas clásicas de interacción (Gráficas 4 a 6) no es posible saber si el aumento del efecto se debe a un sinergismo a una simple adición. La teoría de sinergismo desarrollada en 1950 por Ariëns et al., y los estudios de Pösch y Holzmann (1980) explican la interacción entre dos o más fármacos. Una interacción puede ser definida como un efecto producido por la combinación de diferentes agentes. Un análisis común para el estudio de interacciones, es el empleo de isoblogramas. Este método no sólo nos ayuda a determinar la interacción entre dos sustancias, si no que también es útil para elucidar mecanismos de acción farmacológicos (Tallarida, 1992).

En los Cuadros 6 – 8 se muestran los niveles de concentración evaluados, para las distintas combinaciones.

Análisis Isobolográfico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

Cuadro 6. Niveles de concentración evaluadas, interacción *G. liebmanii* – Isoproterenol.

Proporción	Extracto [µg / mL]	Isoproterenol [µg / mL]	Concentración total en la combinación. [µg / mL]
7 : 3	977.424	0.01528	977.439
	488.712	7.64×10^{-3}	488.719
	244.356	3.82×10^{-3}	244.359
	122.178	1.91×10^{-3}	122.179
	61.09	9.55×10^{-4}	61.09
	30.545	4.77×10^{-4}	30.545
	15.272	2.38×10^{-4}	15.272
	7.636	1.19×10^{-4}	7.636
3.818	5.96×10^{-4}	3.818	
3 : 7	418.896	0.0356	418.931
	209.448	0.0178	209.465
	104.724	8.91×10^{-3}	104.732
	52.362	4.45×10^{-3}	52.366
	26.181	2.22×10^{-3}	26.183
	13.090	1.11×10^{-3}	13.091
	6.545	5.57×10^{-4}	6.545
	3.272	2.28×10^{-4}	3.272
1 : 1	698.16	0.0254	698.185
	349.08	1.2734×10^{-2}	349.093
	174.54	6.367×10^{-3}	174.546
	87.27	3.183×10^{-3}	87.273
	43.63	1.591×10^{-3}	43.636
	21.81	7.95×10^{-4}	21.818
	10.90	3.975×10^{-4}	10.818
	5.45	1.987×10^{-4}	5.454
2.72	9.937×10^{-5}	2.727	

Análisis Isobolográfico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

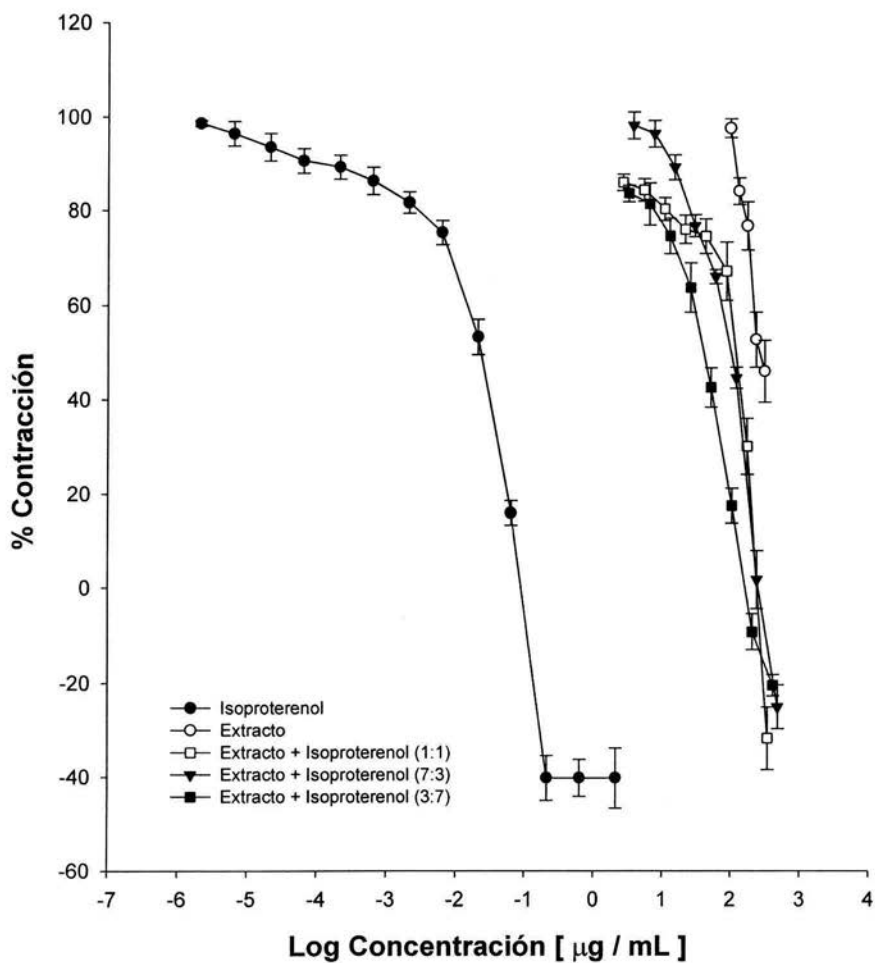
Cuadro 7. Niveles de concentración evaluadas, interacción *G. liebmanii* – Teofilina.

Proporción	Extracto [μg / mL]	Teofilina [μg / mL]	Concentración total en la combinación. [μg / mL]
7 : 3	977.424	27.0696	1004.50
	488.712	13.5348	502.24
	244.356	6.7674	251.12
	122.178	3.3837	125.56
	61.09	1.6918	62.78
	30.545	0.84592	31.39
	15.272	0.42296	15.69
	7.636	0.21148	7.8474
	3.818	0.1057	3.915
3 : 7	418.896	63.1624	482.058
	209.448	31.5812	241.029
	104.724	15.7906	120.514
	52.362	7.8953	60.257
	26.181	3.9476	30.128
	13.090	1.9738	15.064
	6.545	0.9869	7.532
	3.272	0.49345	3.766
1 : 1	698.16	44.46	742.62
	349.08	22.23	371.31
	174.54	11.11	185.65
	87.27	5.55	92.82
	43.63	2.77	46.4
	21.81	1.38	23.20
	10.90	0.69	11.6
	5.45	0.34	5.79
	2.72	0.17	2.89

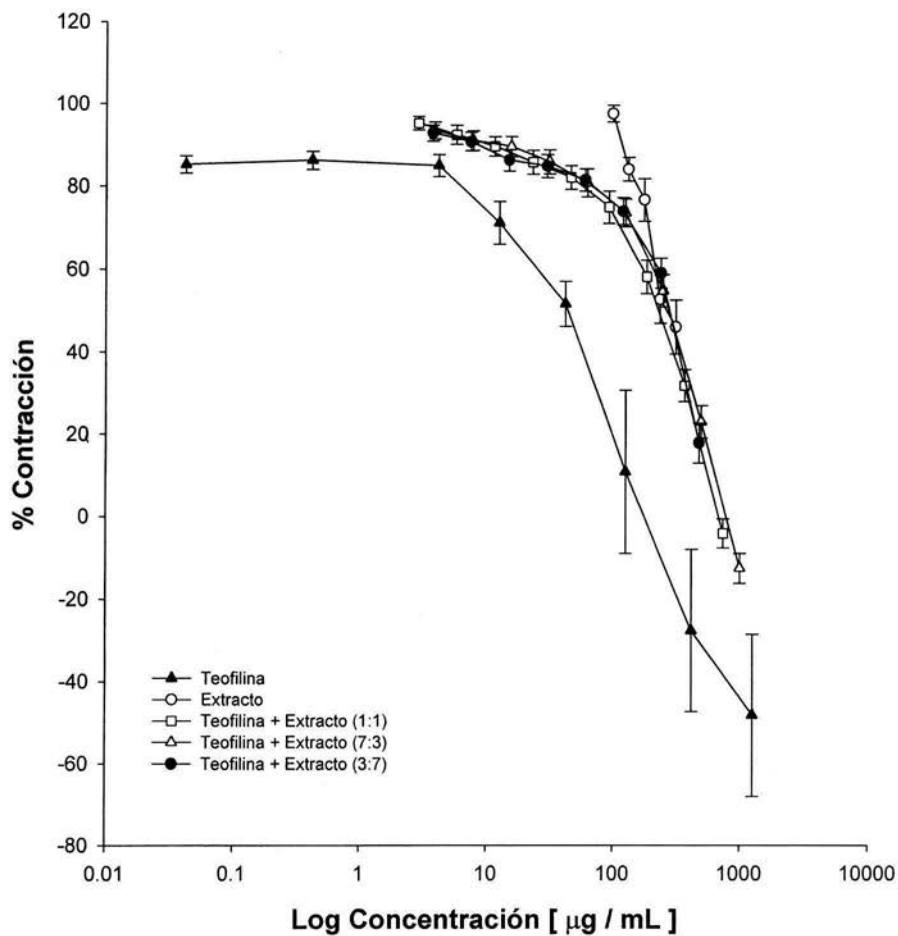
Análisis Isobolográfico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

Cuadro 8. Niveles de concentración evaluadas, interacción Teofilina – Isoproterenol.

Proporción	Teofilina [µg / mL]	Isoproterenol [µg / mL]	Concentración total en la combinación. [µg / mL]
7 : 3	63.1624	0.01528	63.287
	31.5812	7.640×10^{-3}	31.588
	15.7906	3.820×10^{-3}	15.794
	7.8953	1.910×10^{-3}	7.8972
	3.9476	9.550×10^{-4}	3.9486
	1.9738	4.775×10^{-4}	1.9742
	0.9869	2.387×10^{-4}	0.9871
3 : 7	27.0696	0.0356	27.1052
	13.5348	0.0178	13.5526
	6.7674	8.91×10^{-3}	6.77631
	3.3837	4.45×10^{-3}	3.3881
	1.6918	2.22×10^{-3}	1.6940
	0.84592	1.11×10^{-3}	0.8470
	0.42296	5.57×10^{-4}	0.4235
	0.21148	2.28×10^{-4}	0.2117
0.1057	1.14×10^{-4}	0.105	
1 : 1	88.93	0.0509	88.98
	44.46	0.0254	44.48
	22.23	1.2734×10^{-2}	22.24
	11.11	6.367×10^{-3}	11.12
	5.55	3.183×10^{-3}	5.56
	2.77	1.591×10^{-3}	2.78
	1.38	7.95×10^{-4}	1.39
	0.69	3.975×10^{-4}	0.69
	0.34	1.987×10^{-4}	0.34
	0.17	9.937×10^{-5}	0.17

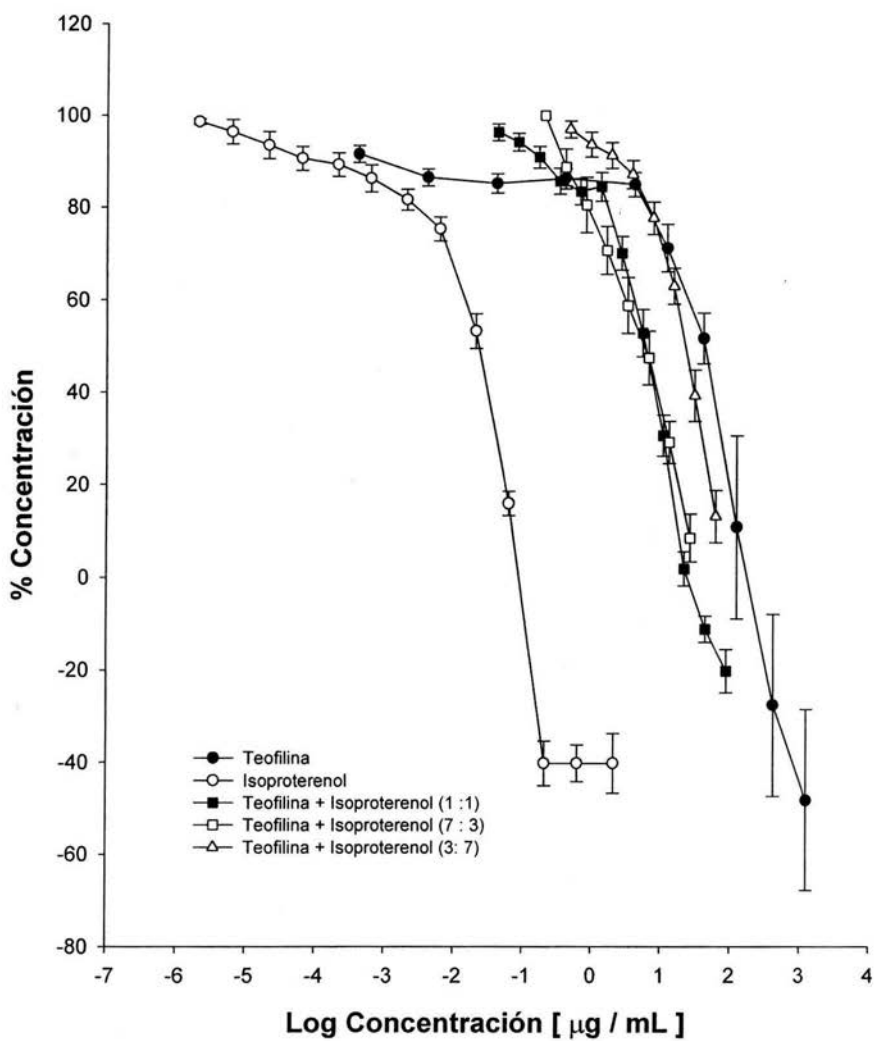


Gráfica 4. Interacción *Gnaphalium liebmanii* e Isoproterenol a diferentes combinaciones. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos seis observaciones.



Gráfica 5. Interacción *Gnaphalium liebmanii* y Teofilina a diferentes combinaciones.

Cada punto representa la media \pm EEM de al menos seis observaciones



Gráfica 6. Interacción Teofilina e Isoproterenol a diferentes combinaciones. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos seis observaciones.

En la interacción *G. liebmanii* – Isoproterenol, (Gráfica 7) los puntos experimentales (círculos vacíos) cayeron por debajo de la línea de aditividad, indicando un sinergismo significativo ($* p < 0.05$) en las 3 proporciones evaluadas. Esto nos indica que el extracto y el isoproterenol actúan por diferentes mecanismos de acción. También es importante considerar que al tratarse de un extracto es posible, que este presente no solo un principio activo, sino varios, que de manera conjunta actúen dando el efecto broncodilatador de la planta.

En la interacción *G. liebmanii*–Teofilina, (Gráfica 8) los puntos experimentales (círculos vacíos) cayeron por arriba de la línea de aditividad, sin embargo no fueron lo suficientemente diferentes para que en el análisis estadístico, presentaran diferencia significativa ($*p < 0.05$), indicando un efecto aditivo en las proporciones 1:1 y 3:7, esto indica un mecanismo de acción similar, probablemente a través de la inhibición de las fosfodiesterasas. Lo anterior se reforzó con la interacción Isoproterenol – Teofilina (Gráfica 9) los puntos experimentales (círculos vacíos) cayeron por debajo de la línea de aditividad, indicando un sinergismo significativo ($*p < 0.05$) en las proporciones 1:1 y 3:7. Esto comprueba que el extracto hexánico de *G. liebmanii* actúa a través de la inhibición de las fosfodiesterasas.

Las proporciones, los valores teóricos y experimentales de la concentración equiefectiva de las diferentes concentraciones evaluadas se proporcionan en el Cuadro 9.

Análisis Isoblográfico de la interacción broncodilatadora entre
Gnaphalium liebmanii con isoproterenol y teofilina en tráquea aislada de cobayo.

Cuadro 9. Concentraciones efectivas teóricas (Zteo) \pm EEM y experimentales (Zexp) \pm EEM de las combinaciones.

Combinación	Proporción	Zteo \pm EEM	Zexp \pm EEM	Fracción Total ^b
<i>G. liebmanii</i> – Isoproterenol	7 : 3	122.18 \pm 8.631	30.74 \pm 3.270	0.2515 *
	3 : 7	52.37 \pm 3.7	11.18 \pm 0.898	0.2134 *
	1 : 1	87.27 \pm 6.165	63.52 \pm 5.365	0.7278 *
Teofilina - <i>G. liebmanii</i>	7 : 3	125.56 \pm 8.63	152.92 \pm 10.26	1.8969*
	3 : 7	60.25 \pm 3.7	114.30 \pm 12.094	1.2179
	1 : 1	92.90 \pm 6.187	119.93 \pm 9.164	1.2908
Teofilina - Isoproterenol	7 : 3	1.47 \pm 0.171	3.38 \pm 0.308	1.4127 *
	3 : 7	11.15 \pm 1.125	7.89 \pm 0.72	0.4357 *
	1 : 1	2.532 \pm 0.21	5.64 \pm 0.514	0.4487 *

^a Las concentraciones son el total de la combinación expresada en $\mu\text{g/mL}$.

^b De acuerdo a la descrito en el marco teórico, los valores > 1 indican aditividad y los valores < 1 indican superaditividad o sinergismo. Diferencia significativa con un valor de $*p < 0.05$.

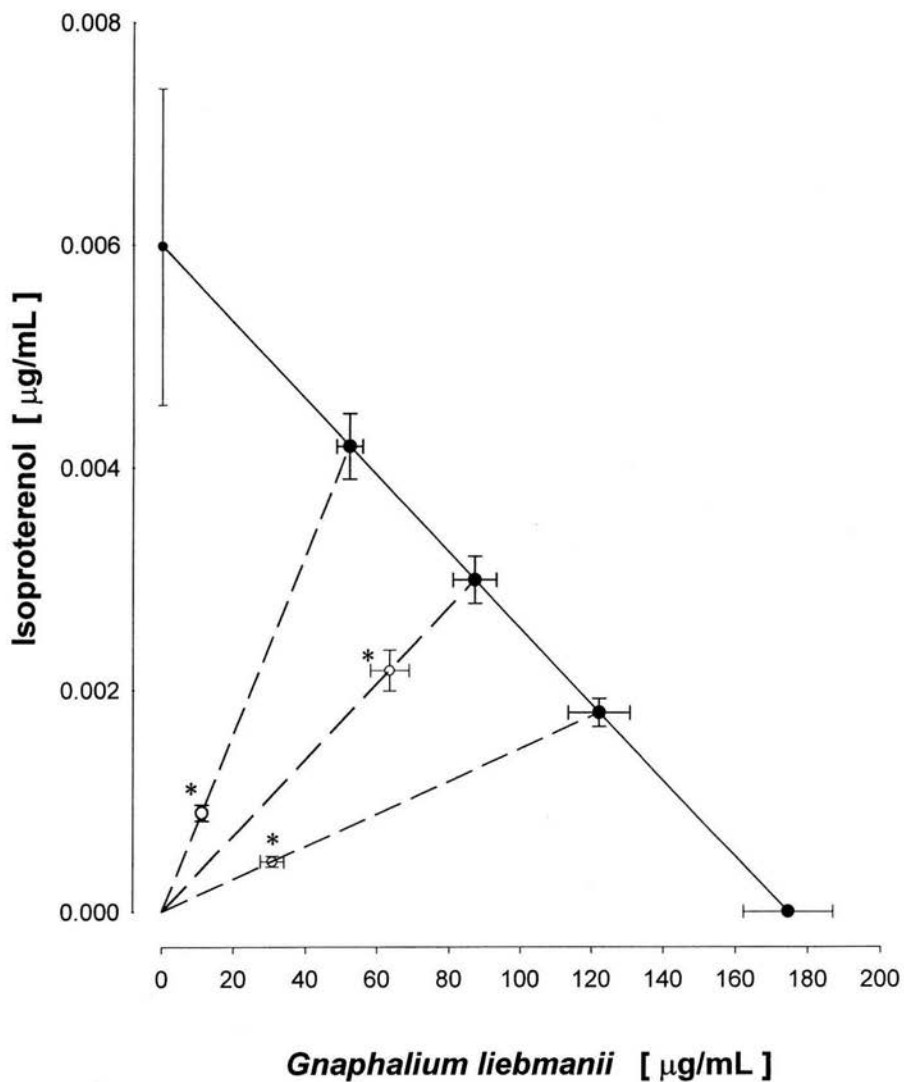
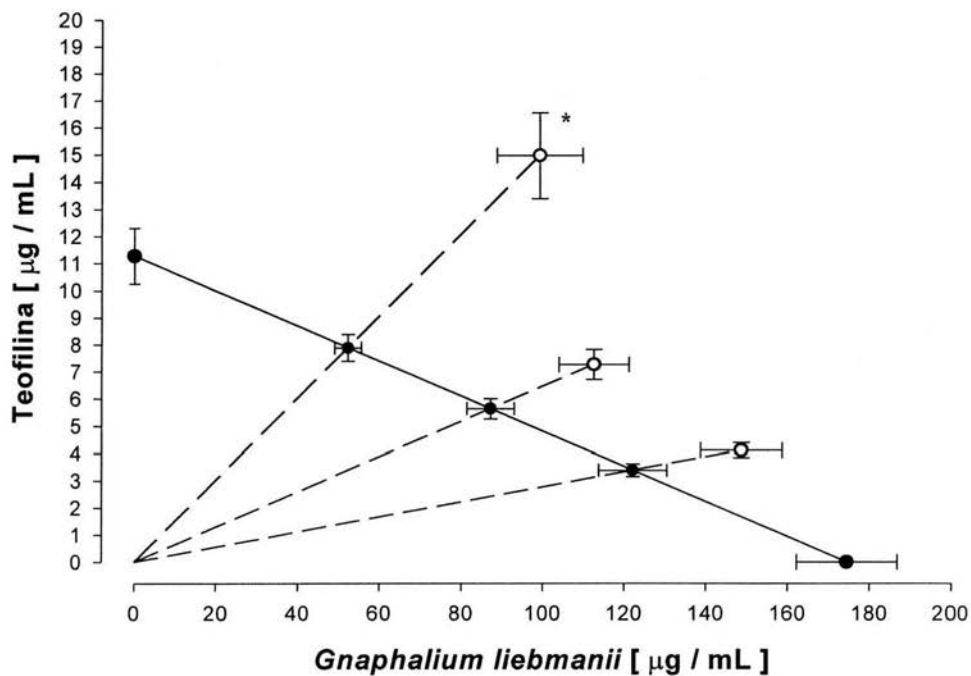


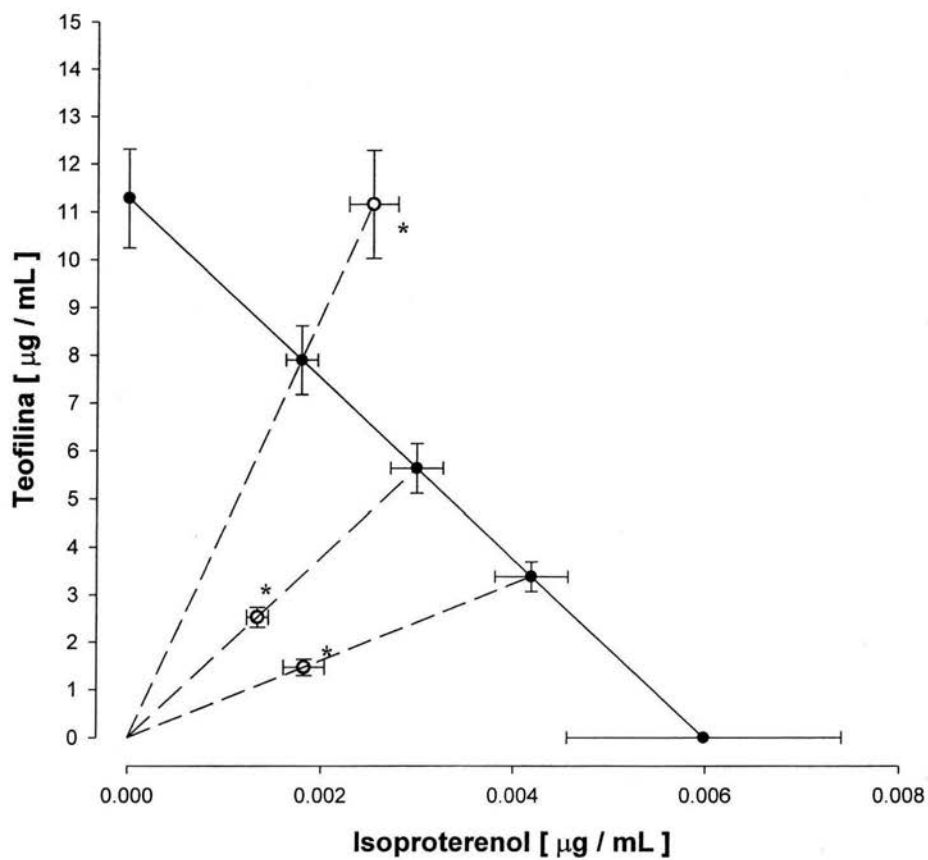
Gráfico 7. Isoblograma de la interacción entre *Gnaphalium liebmanii* e Isoproterenol.

* ($p < 0.05$)



Gráfica 8. Isoblograma de la interacción entre *Gnaphalium liebmanii* y Teofilina.

* ($p < 0.05$)



Gráfica 9. Isoblograma de la interacción entre Teofilina e Isoproterenol. * ($p < 0.05$)

En la proporción 7:3 de la interacción Teofilina – Extracto y Teofilina - Extracto se presentó una atenuación del efecto, posiblemente a una desensibilización del tejido, por la exposición a concentraciones altas de teofilina, este fenómeno es llamado taquifilaxia o tolerancia aguda.

El análisis isoblográfico de la interacción del extracto hexánico de *G. liebmanii* y fármacos con actividad broncodilatadora, constituye el primer estudio cuantitativo que se realiza con el extracto y estos fármacos. Al mismo tiempo es de los primeros estudios en los que se aplica el análisis isoblográfico a la investigación farmacológica de productos naturales (Navarrete et al., 2003).

Finalmente es importante señalar las bondades y el potencial que tiene el análisis isoblográfico, para determinar mecanismos de acción no sólo de plantas, sino también de fármacos, abriéndose un nuevo campo de estudio necesario y útil en la farmacología de productos naturales.

VII. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden de este trabajo son:

1. El extracto hexánico de *G. liebmanii* y los fármacos isoproterenol y teofilina presentaron efecto relajante de la musculatura lisa, dependiente de la concentración, en tráquea aislada de cobayo.

2. El extracto hexánico de *G. liebmanii* presentó un efecto sinergista sobre las propiedades broncodilatadoras del Isoproterenol y un efecto aditivo sobre las propiedades broncodilatadoras de la teofilina, lo que indica que el posible mecanismo de acción del extracto, puede ser a través de la inhibición de las fosfodiesterasas.

3. El Análisis Isobolográfico es útil para elucidar el mecanismo de acción de plantas, en las cuales la mayoría de las veces no se conocen los principios activos responsables de su actividad.

VII. PERSPECTIVAS.

1. Llevar a cabo un estudio biodirigido para aislar, identificar y purificar el o los principios activos responsables de la actividad broncodilatadora del extracto hexánico, obtenido de las flores secas de *G. liebmanii*.

2. Llevar a cabo ensayos enzimáticos con fosfodiesterasas para demostrar el efecto inhibitor de el extracto y / o el compuesto activo de *G. liebmanii* para confirmar que este es su mecanismo de acción broncodilatador.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdel-Haq H., Cometa M., Pamery M. (2000) Relaxant Effects of Hydrastis Canadensis L. and its Major Alkaloids on Guinea Pig Isolated Trachea. *Pharmacology and Toxicology*. 87, 218-222.
- Addy M.y Burka J. (1988). Effect of desmodium adscendens fractions on antigen-and arachidonic acid-induced contractions of guinea pig airways. *Journal of Pharmacology*. 66; 820 - 825.
- Argueta A., Cano L., Gallardo C., Jiménez R. (1994) Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México. p. 675 – 680.
- Barnes P. (1998a) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacological Review*. 50; 515 – 596.
- Barnes P. (1998b) Pharmacology of Airway Smooth Muscle. *American Journal of respiratory and critical care medicine*. 158; S123 - S132.
- Barnes P. (1993) Anti-inflammatory therapy for asthma. *Annual Review Respiration Medical*. 44; 229 - 249.

- Beavo J. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterase: functional implications of multiple isoforms. *Physiology Review*. 75; 725 – 248.
- Boskabady M.. y Shaikhi H. (2000) Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H₁) receptors of isolated guinea-pig tracheal chains. *Journal of Ethnopharmacology* 69; 217 - 227.
- Bryson S., Rodger I. (1987). Effects of phosphodiesterase inhibitors on normal and chemically-skinned isolated airway smooth muscle. *British Journal Pharmacology* 92; 673 - 681.
- Bye R. (1993). The role of human in the diversification of plants in Mexico. In: Rammorth, T. P. *Biological Diversity of Mexico, Origins and Distribution*. Oxford University Press, London, p. 707.
- Caceres A., Alvarez A., Ovando A. (1991) Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteris. *Journal of Ethnopharmacology*. 31; 193 – 208.
- Campos M., Toxqui E., Tortoriello J., Orpeza M., Ponce H., Vargas H., Montaña L. (2001) *Galphimia glauca* fraction antagonizes LTD₄-induced contraction in guinea pig airways. *Journal of Ethnopharmacology* 74; 7 - 15.

Campos R. (1993) Estudios Químicos y Aspectos Biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México, en la Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaria de Salud. México. Secretaria de Salud. p. 130.

Cannig B. y Fischer A. (2001) Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respiration Physiology*, 125; 113 – 127.

Cortijo J., Bou J. (1993) Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *British Journal Pharamcology*. 108; 526 – 568.

Cosio I., Celis A., Cosio M. (1984) Aparato Respiratorio Patología, clinica y terapeutica. 11ª edición. México. p. 91 – 93.

Cox P. (2000). Hill tribal knowlegde survive the millennium. *Science* 287; 44-45.

Cuadra P., Fajardo V., Muñoz O., Arrieta A., Urzúa A. (1994) Determination of the effect of 8-O-(2-Methyl-2-butenoyl) –5,7-dihydroxy-3-methoxyflavone from *Gnaphalium robustum* on Growth of *Escherichia coli* K-12 by Optical Density and Electrical Conductance Measurements. *Planta Medica*, 60; 598 - 599.

El Sayah M., Filho V., Yunes R., Pinheiro T., Calixto J. (1998). Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea "in vitro". *European Journal of Pharmacology* 334; 215 - 221.

Ensayan D. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterasases. *Journal Allergy Clinical Immunology* 108; 671-680.

Estrada E. (1996) *Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio. 4ª edición.* México, p. 531 – 534.

Flórez J. (1997) *Farmacología Humana. 3ª edición* Ed. Masson S.A, México. p.705 – 709.

Frei B, Baltisberger M., Sticher O. (1998) Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology.* 62; 149 - 165.

Ganong W. (1998) *Fisiología Medica. 16ª edición.* Ed. Manual Moderno. México. P. 722-723.

Hamad A., Range S., Holland E., Knox A. (1997). Regulation of cGMP by soluble and particulate guanylyl cyclases in cultured man airway smooth muscle. *American Journal Physiology*. 273; L807-L813.

Honda K., Satake T., Takagi K. (1986) Effects of relaxants on electrical and mechanical activities in the guinea-pig traqueal muscle. *British Journal Pharmacology* 87; 665 - 671.

Inman W. y Adelstein A.(1969) Rise and fall of asthma mortality in England and Wales in relation to use pressurised aerosols. *Lancet* 2; 279 - 285.

Jordan D. (2001) Central nervous pathways and control of the airways. *Respiration Physiology*. 125; 67 – 81.

Kleerup E. (1997) Broncodilators: new drugs and controversies. *Respiratory Critical Care Medical* . 3; 17-22.

Kotlikoff M. y Kamm K. (1996) Molecular mechanisms of β -adrenergic relaxation of airway smooth muscle. *Annual Review Physiology* 58; 115 - 141.

Kume H., Takai A., Tokuno H. (1989) Regulation of Ca^{2+} - dependent K^{+} -channel activity in traqueal miocytes by phosforilation. Nature 341; 152 - 154.

Lara F. y Márquez C. (1996) Plantas Medicinales de México. Dirección General de Publicaciones. Instituto de Química UNAM. p.63.

Latarget M. y Ruiz A. (1995) Anatomía Humana, Tomo II. 3ª edición. Ed. Panamericana México. p. 1241-1243.

Leonti M., Sticher O., Heinrich M. (2003). Antiquity of medicinal planta usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). Journal of Ethnopharmacology. 88; 119-124.

Mata R. (1993) Estudios Químicos y Aspectos Biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. En la Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaria de Salud. México. Secretaria de Salud p. 143 – 144.

Meckes L. y Medallo C. (1986) Pharmacological Screening of Mexican Plants popularity used for the treatment of cough. Fitoterapia. 5; 365 - 370.

Miyamoto K., Kurita M., Sakai R., Sanea F. (1994) Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in guinea-pig tracheal muscle and bronchorelaxation by alkylxanthines. *Biochemistry Pharmacology*. 48; 1219-1223.

Navarrete A., Flores A., Sixtos C., Reyes B. (2003) Análisis isobolográfico de la interacción entre α -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida y piperina sobre la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus* Say. *Revista de la Sociedad Química de México*. 42(2); 178 – 185.

Page C. (1997) *Farmacología integrada*. Harcourt. España. p. 231 – 240.

Prakash A., (1986) Potentialities of some indigenous Plants for Antifertility activity. *International Journal Crude Drug*. 24; 19-24.

Rabe K., Magnussen H., Hamel L. (1995) Theophylline and selective PDE inhibitors as broncodilators and smooth muscle relaxants. *European Respiration Journal*. 8; 637 - 642.

Rojas G., Lévaro J., Tortoriello J., Navarro V. (2001) Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 74; 97 – 101.

- Rouviere H. y Delmas A. (1999) Anatomía Humana, Descriptiva, Topográfica y Funcional 10ª ed. Ed. Masson Barcelona. 27.
- Rzedowski J. y Rzedowski G. (1985) Flora fanerogámica del Valle de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. Volumen II. p. 507-508.
- Sánchez O. (1986). La flora del valle de México Ed. Herrero 6ª ed. México.
- Smith C. y Reynard, A. (1993) Farmacología Ed. Panamericana México. p. 158 – 159, 996.
- Taddei G., Santillana A., Romero T. (1999) Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. Salud Pública de México. 41; 216 – 220.
- Tallarida R., Porreca F., Cowan A. (1989). Statistical análisis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. Life Science 45; 947 - 961.
- Tallarida R. (1992) Statistical analysis of drug combination for synergism. Pain 49; 93-97.
- Tallarida R., Kimmel H., Holtzman S. (1997a) Theory and statics of detecting synergism between two drug. Physcopharmacology 133; 378 - 380.

- Tallarida R., Stones D., Raffa RB. (1997b). Efficient designs for studying synergistic combinations. Life Science 61; PL417-PL425.
- Tallarida R. (2000). Drug synergism and dose-effect data análisis. Champman & Hall/CRC, Florida. USA.
- Tallarida R. (2002) The interaction index: a measure of drug synergism. Pain. 98; 163-168.
- Texeira M., Gristwood R., Cooper N., Hellewell P. (1997) Phosphodiesterase (PDE4) inhibitors: antiinflammatory drugs of the future ? Trends Pharmacology Science. 18; 164 - 171
- Thirstrup, S. (2000) Control of airway smooth muscle tone: II-Pharmacology of relaxation. Respiratory Medicine. 94; 519 – 528.
- Torphy T., Udem B. (1991) Phosphodiesterase isoenzymes - molecular targets for new antiasthma agents. American Journal Respiratory Critical Care Medical. 157; 351-370.

Torres G. (2002) Evaluación del efecto broncodilatador de extractos de *Gnaphalium sp.* en anillo de tráquea de cobayo. Tesis. UNAM.

Vinay K., Ramzis C., Stanley R. (1992) Patología Humana. 5ª ed. Ed. Interamericana. USA. P 401 – 407.

Vinik H., Bradley E., Kissin I. (1999) Isoblographic analysis of propofol-tiopental hypnotic interaction in surgical patients. *Anesthesiology Analgesia*. 88: 667-670.

Waldeck B. (2002) β -adrenoceptor agonists and asthma-100 years of development. *European Journal of Pharmacology*. 445; 1 – 12.

Ziment I. (1983) Farmacología y Terapéutica del Aparato Respiratorio. Ed. Panamericana. Buenos Aires. p.126 – 141.