



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PARTICIPACIÓN DE ADENILATO CICLASA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN  
RELAJANTE DE BERBERINA EN EL MÚSCULO LISO DE VÍAS AÉREAS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**GLORIA MELISA GONZÁLEZ ANDUAGA**



**MÉXICO, D.F. ENERO 2016**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Andrés Navarrete Castro  
**VOCAL:** Alejandro Ortiz Osornio  
**SECRETARIO:** María Eva González Trujano  
**1er. SUPLENTE:** Alejandro Alfaro Romero  
**2° SUPLENTE:** Gerardo David Anaya Eugenio

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**Asesor del tema:**

Dr. Andrés Navarrete Castro

---

**SUSTENTANTE:**

Gloria Melisa González Anduaga

---

## ÍNDICE TEMÁTICO

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Introducción</b>	2
<b>3. Marco teórico</b>	4
3.1 Vías aéreas y músculo liso	4
3.2 Contracción del músculo liso bronquial	5
3.3 Relajación del músculo liso bronquial	9
3.4 Vías de señalización	12
3.4.1 Adenilato ciclasa y AMPc	12
3.4.2 Inhibición de fosfodiesterasas	13
3.5 Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias	15
3.5.1 Berberina	15
<b>4. Justificación</b>	19
<b>5. Hipótesis</b>	19
<b>6. Objetivos</b>	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos particulares	20
<b>7. Materiales y métodos</b>	21
7.1 Fármacos	21
7.2 Animales	21
7.3 Bioensayo	22
7.3.1 Disección de la tráquea y montaje de la preparación	22
7.3.2 Mecanismos de acción	22
7.3.2.2 Inhibición de la enzima adenilato ciclasa	23
7.3.3 Ensayo enzimático	23
7.3.4 Determinación de AMPc	24
7.3.4.1 Tratamiento del tejido	24
7.3.4.2 Desalinización del tejido por filtración en gel	24
7.3.4.3 Curva patrón	25

7.3.4.4	Curso/linealidad	25
7.3.4.5	Cuantificación de fosfatos	26
7.3.5	Análisis estadístico	26
7.3.6	Acoplamiento molecular (“ <i>docking</i> ”)	27
<b>8.</b>	<b>Resultados</b>	29
8.1	Curva estándar 5'-AMP	33
8.2	Curva curso/linealidad AMPc	34
8.3	Acoplamiento molecular (“ <i>docking</i> ”)	35
<b>9.</b>	<b>Discusión</b>	36
<b>10.</b>	<b>Conclusión</b>	41
<b>11.</b>	<b>Perspectivas</b>	42
<b>12.</b>	<b>Referencias</b>	43
<b>13.</b>	<b>Anexo</b>	51

## ÍNDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

<b>Imagen 1.</b>	Mecanismo de contracción del músculo liso	8
<b>Imagen 2.</b>	Mecanismo de relajación en músculo liso	10
<b>Imagen 3.</b>	Molécula de Berberina	16
<b>Tabla 1.</b>	Ejemplo de realización del curso/linealidad de ensayos en microplaca	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Comparación del efecto relajante de berberina y rolipram	29
<b>Figura 2.</b>	Comparación del efecto relajante de forskolina y rolipram	30
<b>Figura 3.</b>	Comparación del efecto relajante de berberina y aminofilina	31
<b>Figura 4.</b>	Comparación del efecto relajante de forskolina y aminofilina	31
<b>Figura 5.</b>	Disminución del efecto relajante de berberina en presencia y ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina	32

<b>Figura 6.</b> Disminución del efecto relajante de forskolina en presencia y ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina	32
<b>Figura 7.</b> Curva estándar 5'-AMP	33
<b>Figura 8.</b> Curso/linealidad AMPc	34
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de 5'-AMP en tráquea de cobayo con diferentes tratamientos	34
<b>Figura 10.</b> Modo de unión de forskolina y acoplamiento de berberina	35
<b>Figura 11.</b> Adenilato ciclasa co-cristalizada	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AC</b> Adenilato ciclasa
<b>ACm</b> Adenilato ciclasa transmembranal
<b>ACs</b> Adenilato ciclasa soluble
<b>AMPc</b> monofosfato de adenosina 3',5' cíclico
<b>ANP</b> Péptido natriurético auricular
<b>ATP</b> Adenosín trifosfato
<b>BKCa<sup>2+</sup></b> Canales de alta conductancia a K <sup>+</sup> inducidos por calcio
<b>DAG</b> 1,2-diacilglicerol
<b>DDA</b> 2',5'-dideoxiadenosina
<b>G<sub>αi</sub></b> Subunidad α de la proteína Gi
<b>G<sub>αq</sub></b> Subunidad α de la proteína Gq
<b>G<sub>βγ</sub></b> Subunidad βγ de la proteína G
<b>GC</b> Guanilato ciclasa
<b>GDP</b> Guanosín difosfato
<b>GMPc</b> monofosfato de guanosina 3',5' cíclico
<b>GPCR</b> Receptores acoplados a proteínas G
<b>G<sub>sα</sub></b> Subunidad α de la proteína Gs
<b>GTP</b> Guanosín trifosfato
<b>IP<sub>3</sub></b> Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>MAPK</b> Cinasa de proteínas activada por mitógenos

**MLCK** Cinasa de cadena ligera de miosina

**NO** Óxido nítrico

**PDE** Fosfodiesterasas

**PIP<sub>2</sub>** Fosfoinositol 4,5-difosfato

**PLA<sub>2</sub>** Fosfolipasa A<sub>2</sub>

**PLC** Fosfolipasa C

**PKA** Cinasa A de proteínas

**PKC** Cinasa de proteínas C

**Ser** Serina (aminoácido)

**VIP** Péptido vasoactivo intestinal

## 1. Resumen

La berberina es un alcaloide isoquinolínico identificado como uno de los principales metabolitos secundarios de la especie *Argemone ochroleuca*. Las hojas de esta planta se utilizan en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de asma y otras enfermedades respiratorias, además se le ha determinado actividad relajante sobre el músculo liso bronquial, entre otros efectos, sin embargo, el mecanismo farmacológico aún se desconoce. En el presente trabajo se tiene como propósito elucidar el mecanismo para este efecto sobre la musculatura lisa de las vías aéreas considerando como blanco molecular a la enzima adenilato ciclasa en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Como estrategia experimental se utilizaron inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) uno específico como rolipram (PDE4) e inespecífico como aminofilina para inhibir la degradación de AMPc formada como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa. De igual manera se realizó la inhibición de esta enzima con 2',5'-dideoxiadenosina. Posteriormente, la cuantificación de fosfatos se realizó mediante una reacción enzimático-colorimétrica en el tejido de tráquea de cobayo. Cuando la berberina se administra cuatro minutos previos a la inhibición de PDE se incrementó su efecto relajante con rolipram ( $91.18 \pm 6.08$  %) y con aminofilina ( $85.3 \pm 7.00$  %), no así cuando se administran las sustancias simultáneamente, berberina con rolipram ( $45.88 \pm 7.28$  %) o berberina con aminofilina ( $45.89 \pm 7.89$  %). La 2',5'-dideoxiadenosina, inhibidor de adenilato ciclasa, disminuye el efecto relajante de la berberina de  $46.71 \pm 4.49$  % a  $25.84 \pm 3.52$  %. Como fármaco de referencia se empleó forskolina, activador de adenilato ciclasa, el cual produce efecto relajante como la berberina en el modelo de órgano aislado. Los ensayos enzimáticos-colorimétricos mostraron que berberina y forskolina incrementan el nivel de AMPc en el tejido incubado con ambos compuestos, en tanto que la 2',5'-dideoxiadenosina los disminuye. Por último, en el acoplamiento molecular "*docking*" se observó que berberina puede interaccionar en el mismo sitio de unión que forskolina, compartiendo el aminoácido serina 942 como sitio de unión. Los bioensayos en conjunto con el "*docking*" dan evidencia de que el mecanismo de berberina involucra la activación de la enzima adenilato ciclasa.

## 2. Introducción

El asma bronquial es un padecimiento que afecta a 235 millones de personas a nivel mundial, siendo la enfermedad crónica más común en la población infantil.<sup>1</sup> El asma se define como la enfermedad inflamatoria que produce una obstrucción reversible recurrente en las vías respiratorias como respuesta a estímulos irritantes (corrientes de aire, bajas temperaturas, alérgenos, contaminantes atmosféricos, consumo de tabaco y algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos y  $\beta$ -bloqueadores). Esta se caracteriza por inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial, opresión torácica y tos.<sup>2</sup> En el asma existen dos etapas principales la inmediata y la tardía. La fase inmediata ocurre abruptamente y se desencadena por un alérgeno o estímulo inespecífico. Esta fase se caracteriza por un espasmo del músculo liso bronquial y la liberación de mediadores espasmógenos como: cisleucotrienos (cisLts), histamina (H) y prostaglandinas D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), en esta fase también se liberan quimiotaxinas y quimiocinas que actúan en la fase tardía. La fase tardía ocurre por la infiltración de prolinfocitos Th2 y monocitos liberadores de citocinas, los cuales desencadenan una respuesta inflamatoria e hiperreactividad de la vía respiratoria generando un broncoespasmo, sibilancias y tos.<sup>3</sup>

Para el asma existen diversos tratamientos farmacológicos como: antiinflamatorios y broncodilatadores (antihistamínicos, anticolinérgicos, antileucotrienos, xantinas y  $\beta$ -adrenérgicos). Los broncodilatadores son el grupo de fármacos más utilizados y pueden dividirse en dos grupos dependiendo de su mecanismo de acción: los primeros consisten en bloquear los mecanismos de los mediadores contráctiles en el músculo liso de las vías aéreas, ya sea como antagonista del receptor o inhibiendo la biosíntesis o liberación de los mediadores contráctiles. El segundo grupo comprende a los fármacos que actúan como antagonistas independientes del tipo de mediador contráctil produciendo una relajación por diferentes vías celulares: p.ej. la reducción de la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular.<sup>4</sup> Los broncodilatadores intervienen en el

broncoespasmo de la fase inmediata, mientras que los antiinflamatorios inhiben los componentes antiinflamatorios de ambas fases. La desventaja de estos fármacos es que ocasionan efectos secundarios indeseados como deficiencias en el crecimiento o llegan a generar tolerancia al principio activo.<sup>5-6</sup>

Como alternativa de tratamiento, se utilizan los productos naturales, los cuales son aún ampliamente utilizados en todo el mundo para conservar la salud y prevenir enfermedades. En años recientes han despertado el interés por su investigación<sup>7</sup> y especialmente por la elucidación de sus mecanismos de acción. Un caso específico en la medicina tradicional Mexicana son varias especies de *Argemone*, a las que se les conoce como “Chicalote” y son utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias y afecciones oculares,<sup>8</sup> en México se destacan dos especies más utilizadas: *Argemone platyceras* Link & Otto y *Argemone ochroleuca* Sweet.

La especie *Argemone ochroleuca* (Papaveraceae) cuenta con estudios químicos que han determinado la presencia de diversos alcaloides y ácidos grasos como principales metabolitos secundarios, entre los cuales destaca el alcaloide isoquinolínico berberina. De este se ha reportado que produce un efecto relajante sobre el músculo liso bronquial.<sup>9</sup>

En estudios previos se ha reportado que berberina presenta una acción inespecífica como antagonista de la contracción sobre los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> en tráquea aislada de cobayo<sup>10</sup> y una disminución de su efecto relajante en presencia del fármaco 2', 5'-dideoxiadenosina (inhibidor de AC) en el músculo liso de tráquea de cobayo.<sup>9</sup>

### **3. Marco teórico**

#### **3.1 Vías aéreas y músculo liso**

El aparato respiratorio estructuralmente, es un arreglo complejo que en conjunto con el sistema circulatorio permite la captura de oxígeno para su distribución en los tejidos y la eliminación de dióxido de carbono.<sup>11</sup> El aparato respiratorio se divide en tres vías: las vías aéreas altas, las vías aérea medias o de conducción y las vías aéreas bajas. Las vías aéreas altas incluyen las fosas nasales y la boca. Las vías aéreas medias son las encargadas del transporte de gases dentro y fuera del pulmón e incluye a la tráquea, faringe y laringe. Mientras que las vías aéreas bajas son el bronquio y los bronquiolos.<sup>12</sup>

Las vías aéreas se conforman principalmente por estructuras anatómicas como: tejido epitelial, músculo liso y glándulas bronquiales. El tejido epitelial está adaptado para defender, con ayuda de la mucosa, a las vías respiratorias mediante el aclaramiento mucociliar, regulación del líquido en las vías aéreas, producción de mediadores de la inflamación y como fuente de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). El músculo liso bronquial (MLB) se distribuye principalmente en las vías conductuales, presentando como función primaria la contracción, permitiendo la regulación del tono de las vías respiratorias y el estrechamiento. Esto permite controlar la distribución de flujo de aire en el pulmón con el intercambio de gases y regulación de la cantidad de aire a cualquier gradiente de presión, además, participa en la expulsión de material extraño por medio de la tos, la respiración profunda y la espiración forzada. Finalmente, las glándulas bronquiales se componen de dos tipos de células secretoras: las serosas y mucosas, cuya función es producir mucina para formar una barrera protectora entre el epitelio y el medio ambiente.<sup>13-15</sup>

En los humanos, las vías conductuales son constantemente estudiadas debido a diferentes alteraciones que en ellas se presentan. La tráquea es una estructura semirrígida con una longitud de 11 a 13 cm, variable con la edad, que comprende de 15–20 anillos incompletos con fibras músculo-cartilaginosas en forma de C. El aspecto abierto de estos anillos se localiza en la parte posterior cercana al esófago y se cierra con una delgada membrana fibromuscular que une los extremos libres del anillo. La parte cartilaginosa de la tráquea le provee rigidez a la vía respiratoria, evitando que colapse; mientras que la porción fibromuscular permite la expansión del esófago cuando la comida pasa al estómago, además de permitir que se extienda y descienda durante la inspiración.<sup>16</sup>

### **3.2 Contracción del músculo liso bronquial**

En la mayoría de los mamíferos, el sistema nervioso parasimpático es el principal encargado de la broncoconstricción de las vías aéreas, pero también cuenta con una inervación no adrenérgica y no colinérgica. Esta división del sistema nervioso autónomo se divide en un componente excitador (e-NANC) involucrado en la contracción y un componente inhibitorio (i-NANC) involucrado en la relajación de las vías aéreas. La acetilcolina, es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático y se libera tanto en la sinápsis ganglionar como en la postganglionar y actúa por medio de la activación de los colinoreceptores (muscarínicos y nicotínicos).<sup>4</sup>

Los receptores nicotínicos están ligados a canales iónicos, los cuales pueden activarse por la afluencia de iones con carga positiva como sodio ( $\uparrow \text{Na}^+$ ) y calcio ( $\uparrow \text{Ca}^{+2}$ ) que despolarizan la membrana. Están conformados por cinco subunidades homólogas o idénticas que forman un poro central. Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), son la familia más grande de moléculas transcelulares

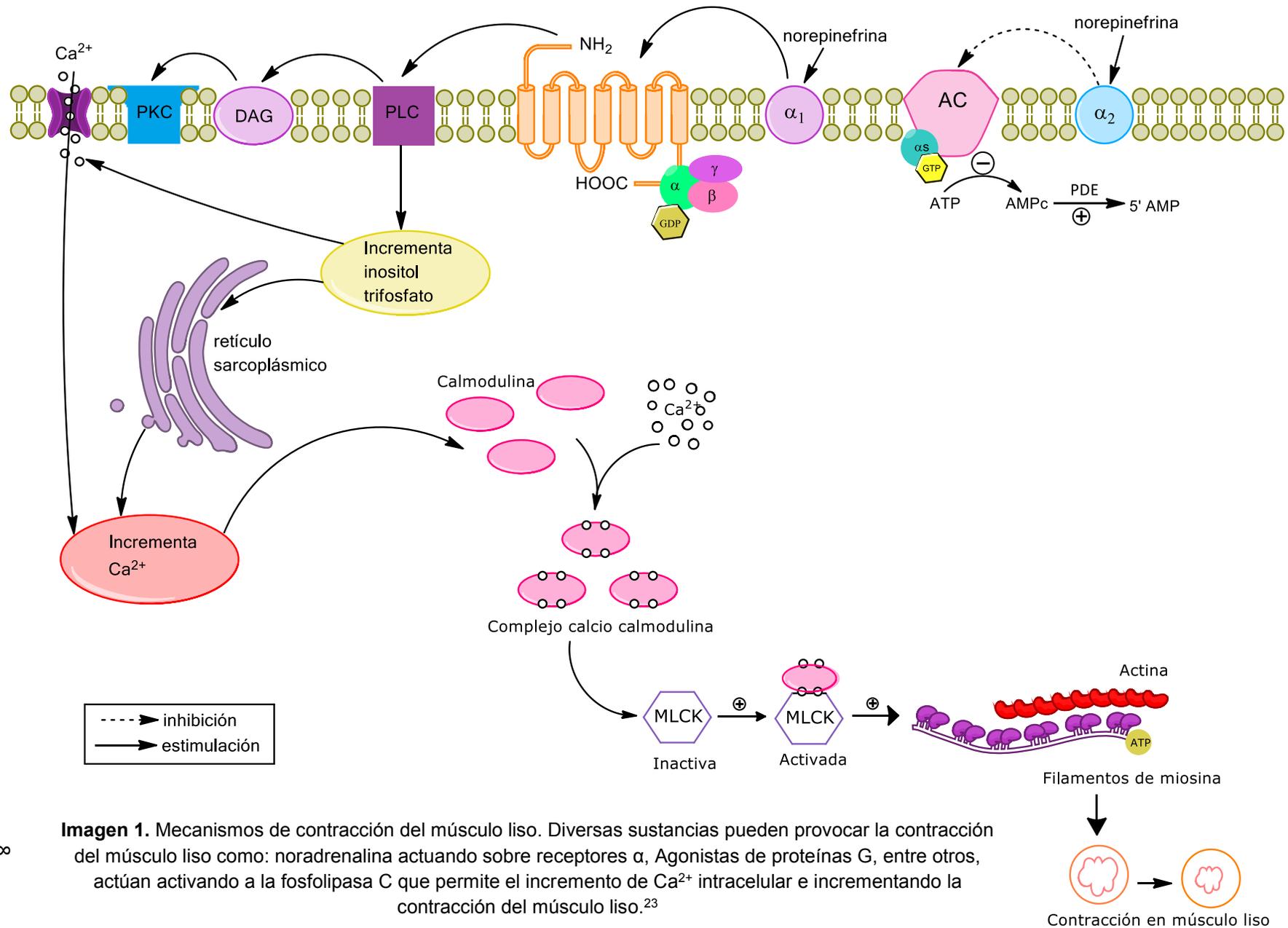
involucradas en la transmisión de señales, las cuales se activan por una gran cantidad de ligandos como: neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, entre otros.

La proteína G es una estructura trimérica presentando a las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Se clasifican de acuerdo a la subunidad  $\alpha$ , de la cual se han identificado hasta 20 isoformas  $\alpha$  diferentes, 5 isoformas  $\beta$  y 10 subunidades  $\gamma$ . Basándose en la subunidad  $\alpha$ , se subdividen en 4 familias más representativas:  $G_{sa}$ ,  $G_{ai/o}$ ,  $G_{aq}$  y  $G_{\alpha 12/13}$ .<sup>17-18</sup> Las principales dianas de las proteínas G, a través de la cuales los GPCR controlan las diferentes funciones de la célula son: adenilato ciclasa (AC) enzima responsable de la formación de 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc o monofosfato de adenosina 3',5' cíclico); fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) enzima responsable de la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2-diacilglicerol (DAG); canales iónicos, especialmente los canales de Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup> y; la cinasa Rho A/Rho B, es un sistema que controla la actividad de numerosas vías de señalización que regulan el crecimiento y la proliferación celular, la contracción del músculo liso, entre otras.<sup>19</sup>

Como se mencionó anteriormente, los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de los GPCR y se han descrito cinco subtipos diferentes de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>–M<sub>5</sub>). Los que se presentan comúnmente en el aparato respiratorio son: M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> en la mayoría de los mamíferos incluyendo a los seres humanos. Los M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> se localizan en las vías respiratorias conductuales, mientras que los M<sub>1</sub> están en el tejido pulmonar periférico y pared alveolar.<sup>17</sup>

Los receptores M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> se acoplan a una proteína G<sub>q</sub>, mientras que los M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> inhiben la AC a través de proteínas G<sub>i</sub>. Los nucleótidos de guanina se unen a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G disociándose de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  posee actividad enzimática y cataliza la conversión de

guanosín trifosfato (GTP) en guanosín difosfato (GDP). La fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) es el principal efector de las proteínas  $G_q$ . La PLC, al activarse, hidroliza el fosfoinositol 4,5-difosfato ( $PIP_2$ ) en: 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ). El DAG promueve la activación de la cinasa de proteínas C (PKC). La PKC estimula la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) que induce la formación de mediadores de la inflamación partiendo del ácido araquidónico. También fosforila numerosos sustratos incluyendo a la calponina, lo que resulta en la disociación de la actina y con ello pierde la capacidad de inhibir a la actino-miosina ATPasa favoreciendo la contracción. La PKC también fosforila intermediarios de la vía de señalización de MAPK lo que activa varios factores de transcripción involucrados en promover el crecimiento de las vías aéreas. Por otro lado, el  $IP_3$  llega a receptores del retículo sarcoplásmico liberando  $Ca^{+2}$  al citosol y facilita el flujo de calcio al interior de la célula por los canales de calcio dependientes del voltaje tipo L y tipo T.<sup>20</sup> El aumento de calcio intracelular promueve la formación del complejo calcio-calmodulina que activa la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), esta fosforila la cadena ligera de miosina facilitando la interacción con la actina, la activación de la miosina-ATPasa, la ciclación de los puentes cruzados de miosina a lo largo de la actina lo que provoca la contracción muscular.<sup>21-22</sup>



### 3.3 Relajación del músculo liso bronquial

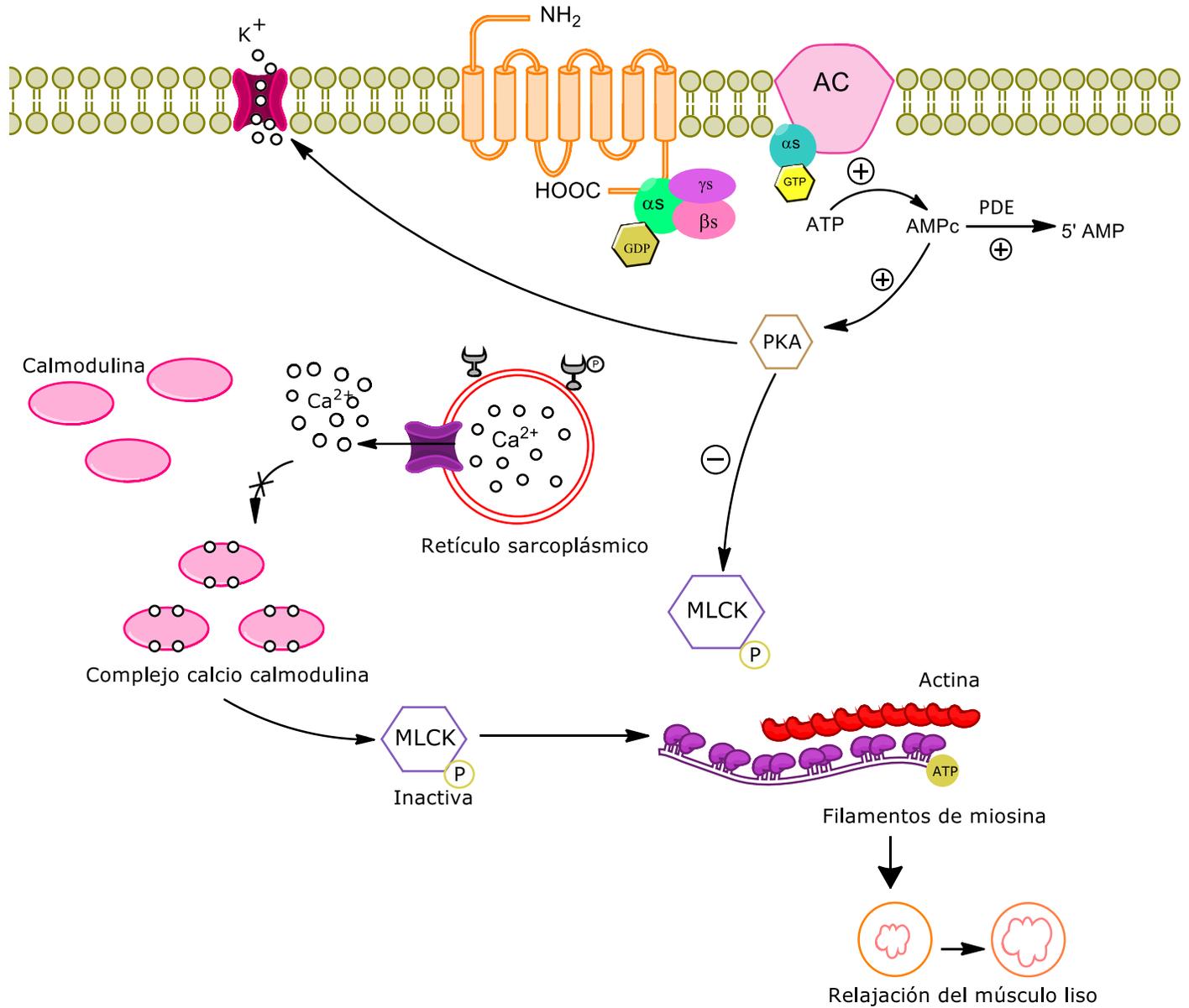
La relajación en el músculo liso de las vías aéreas ocurre por los efectos simpaticomiméticos (adrenérgicos) y por la inervación no adrenérgica y no colinérgica mediante los componentes inhibitorios (NO; y péptido vasoactivo intestinal, VIP por sus siglas en inglés). El proceso de relajación generalmente ocurre por la disminución del calcio libre intracelular y/o por la afección de sensibilidad al calcio por las proteínas contráctiles. Existen diferentes mecanismos celulares encargados del proceso de relajación como: a) el incremento de AMPc; b) el aumento de GMPc; c) la inhibición de PDE; y d) la modulación de los canales iónicos en la membrana celular.<sup>3-4</sup>

El incremento de AMPc ocurre después de la activación de los receptores acoplados a proteínas  $G_s$ , ya sea por las catecolaminas (adrenérgicos  $\beta_2$ , altamente expresados en el músculo liso de las vías aéreas), prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ), adenosina ( $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ) y el VIP. La activación de  $G_{s\alpha}$  activa a la AC, incrementando el nivel de AMPc, lo que permite la activación de la cinasa A de proteínas (PKA). La PKA fosforila a proteínas intracelulares en residuos de serina y treonina, lo que inactiva a la MLCK. Por otra parte la PKA fosforila ciertos canales de  $K^+$  los cuales se abren permitiendo el flujo de  $K^+$  ocasionando hiperpolarización en el tejido.<sup>23</sup>

Por otro lado, el aumento de GMPc se debe a la acción de NO y el péptido natriurético auricular (ANP, por sus siglas en inglés), los cuales activan a guanilato ciclasa (GC). La GC se presenta en dos formas: soluble y particulada, y esta enzima al ser activada cataliza la conversión de GTP en GMPc, con la subsecuente activación de la cinasa G de proteínas, la cual fosforila diversos sustratos produciendo la relajación. La GC soluble presenta una estructura heterodimérica que contiene una subunidad larga  $\alpha$  y una pequeña  $\beta$ . Es activada por el NO endógeno y por los nitrovasodilatadores. El NO provoca la relajación del músculo liso de las vías aéreas por el

incremento de GMPc y se ha sugerido que en el músculo liso de las vías aéreas activa los canales BKCa<sup>+2</sup> (alta conductancia a potasio), oxida proteínas intracelulares (como las cabezas de miosina o proteínas reguladoras involucradas en la contracción) y disminuye la sensibilidad al calcio intracelular. Por otra parte, la GC particulada se compone de un dominio transmembranal con una región variable extracelular y una región intracelular más conservada y con un dominio catalítico, esta activada por el ANP y péptidos relacionados.<sup>24</sup>

La modulación de canales iónicos es muy extensa, entre los más importantes se encuentran: los canales de Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup>. Existen dos tipos de canales de Ca<sup>+2</sup> los operados por voltaje o ligandos, cuya apertura permiten el incremento de Ca<sup>+2</sup> intracelular provocando la contracción, mientras que los fármacos que pueden bloquear el ingreso de Ca<sup>+2</sup> intracelular permiten la relajación del músculo liso. Los canales de K<sup>+</sup> desempeñan un importante papel en el control del músculo liso de las vías aéreas, su apertura produce hiperpolarización que cierra los canales de Ca<sup>2+</sup> y reduce el influjo de Ca<sup>+2</sup> y la contracción del tejido, ocurriendo lo opuesto si estos canales se cierran.<sup>20</sup>



**Imagen 2.** Mecanismos de relajación en músculo liso. Puede ocurrir por diversas vías de señalización. En el caso de forskolina, realiza una activación de adenilato ciclasa, se produce AMPc a partir de ATP, el cual si no es degradado por PDE 2, 3 y 4 se une a la cinasa A de proteína (PKA) disminuyendo su afinidad por el complejo calcio calmodulina, fosforilando la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) evitando la interacción de la miosina con la actina provocando la relajación del músculo liso.<sup>23</sup>

### 3.4 Vías de señalización

#### 3.4.1 Adenilato ciclasa y AMPc

La AC es una enzima que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP.<sup>24</sup> Se encuentra cascada abajo en los receptores acoplados a proteína G. Los receptores que tienen la capacidad de modificar la actividad de AC se activan por las proteínas G<sub>s</sub> y se inhiben por las proteínas G<sub>i</sub>.<sup>22, 26–27</sup>

En los mamíferos se expresan nueve isoformas de AC transmembranal (ACm) y una de AC soluble (ACs). La ACs es directamente activada por calcio y metabolitos de ATP, esta actúa como un sensor metabólico intracelular. La ACm consiste en doce hélices transmembranales y dos dominios catalíticos citoplasmáticos. Los dos dominios catalíticos son homólogos en ciertas regiones y se denominan C1 y C2, están separados por un dominio hidrofílico y este sitio de unión se ha designado sitio P. Los dominios C1 y C2 tienen una organización pseudosimétrica y en la interfase forma dos sitios de unión a ligandos (p.ej. sitio catalítico y regulatorio de diterpenos).<sup>28</sup>

Existen diferentes moduladores de la actividad de AC como la adenosina. Esta sustancia ha demostrado tener un efecto bifásico en la estimulación de AC, con bajas concentraciones puede activar a la enzima y con altas concentraciones puede inhibirla. Es por esto que se han diseñado algunas moléculas para modificar la actividad de esta enzima de manera específica conservando el núcleo de adenosina.<sup>29</sup> El mejor activador conocido de AC es el diterpeno forskolina (FSK), proveniente de la planta de la India *Coleus forskohlii* que activa a las isoformas 1–8 de la ACm pero no a la 9. Los estudios cristalográficos revelan que la FSK interactúa con AC en el sitio hidrofóbico creado por las subunidades catalíticas C1 y C2. Específicamente, FSK se une al sitio opuesto donde se une ATP en el núcleo catalítico.

Por otra parte, los inhibidores de AC se dividen en cuatro clases: (i) inhibidores competitivos con el substrato ATP en el sitio catalítico; (ii) inhibidores no competitivos del sitio P de AC; (iii) inhibidores no competitivos alostéricos del sitio diterpenos; (iv) inhibidores no competitivos alostéricos de sitio indefinido. El más utilizado es la 2',5'-dideoxiadenosina (DDA), un potente inhibidor no competitivo del sitio P de AC, que disminuye el AMPc.<sup>27</sup>

El AMPc es un segundo mensajero descubierto por Earl W Sutherland y Theodore W Rall en 1956. El AMPc se sintetiza continuamente y se inactiva por hidrólisis convirtiéndose a 5'-AMP por acción de las enzimas fosfodiesterasas (PDEs, por sus siglas en inglés). En las vías respiratorias el AMPc posee propiedades de señalización en numerosos tipos de células, es un regulador del tono muscular siendo el principal efector prorelajante en el músculo liso de las vías aéreas, además de la supresión de la actividad proinflamatoria en varias células inmunes y células implicadas en la inflamación, proliferación celular y en células epiteliales con la secreción de moco, cicatrización de heridas, transporte de aniones y movimiento ciliar (importante en el aclaramiento ciliar). Estos efectos tan diferentes del AMPc corresponden a un mecanismo en común: activación de proteínas cinasas (PKs), las cuales están encargadas de la fosforilación de proteínas. Las PKs regulan la función de muchas proteínas celulares al controlar la fosforilación de proteínas.<sup>30</sup>

### **3.4.2 Inhibición de fosfodiesterasas**

Las enzimas PDEs son las responsables de la degradación de nucleótidos cíclicos intracelulares AMPc y GMPc por la ruptura de sus enlaces 3'-fosfoester, hidrolizándose a inactivo 5'-AMP y 5'-GMP respectivamente, lo que restablece la función contráctil del músculo liso.<sup>31</sup> Se han descrito más de 60 diferentes isoformas de PDEs en diversos tejidos de los mamíferos, y se han agrupado en once familias (PDE1–PDE11) dependiendo de: su

estructura, cinética, propiedades reguladoras y sensibilidad a los inhibidores químicos; además de su localización, pero sólo cinco de ellas se han detectado en el músculo liso de las vías aéreas de humano y cobayo. Inhibidores selectivos de estas isoenzimas (particularmente inhibidores de PDE 3, 4 y 5) han incrementado el interés como fármacos antiasmáticos por su actividad broncodilatadora y antiinflamatoria. Las PDE 3 y 4 son responsables de la ruptura del AMPc, mientras que la PDE5 hidroliza al GMPc.<sup>31-32</sup>

La inhibición de las PDEs permite la relajación del músculo liso. Entre los inhibidores de estas enzimas se han encontrado a la teofilina que actúan como inhibidor inespecífico sobre las PDEs y se utilizan ampliamente en la clínica como broncodilatadores.<sup>33</sup> Otro ejemplo de inhibidor inespecífico es la aminofilina. Esta molécula es una metilxantina resultante es la combinación de teofilina (componente activo) y etilendiamina, cuya función es incrementar la solubilidad de la teofilina pero sin modificar sus efectos broncodilatadores por la inhibición de PDEs. Además, esta puede ejercer efectos antiinflamatorios mediante la inducción de la apoptosis de los neutrófilos a través de la inhibición de la adenosina.<sup>34-35</sup> Aminofilina es también un antagonista de los receptores de adenosina, modulador de la liberación del calcio intracelular mediante el antagonismo de los receptores de rianodina, además de poseer efectos inmunomoduladores.<sup>36</sup>

Existen diversos fármacos capaces de inhibir específicamente a las PDEs, tal es el caso de los inhibidores selectivos de la PDE4, donde rolipram es el prototipo. El rolipram (4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona) evita la degradación selectiva de AMPc en el músculo liso bronquial, lo que le confiere propiedades antiinflamatorias en el tracto respiratorio, enfermedades obstructivas en las vías aéreas bronquiales, incluidos los diferentes tipos de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis infecciosa y eosinofílica, enfisema, fibrosis quística, infecciones como

tuberculosis y aspergilosis, entre otras enfermedades por hongos, actividad antitusiva en enfermedades crónicas, poliposis nasal. También posee actividades en otros padecimientos como: osteoartritis, dermatitis y propiedades antidepresivas, por mencionar algunas. Algunos inhibidores de PDE4 de segunda generación como: roflumilast y cilomilast han demostrado efectos beneficiosos en el EPOC y asma.<sup>26, 37</sup>

### **3.5 Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias**

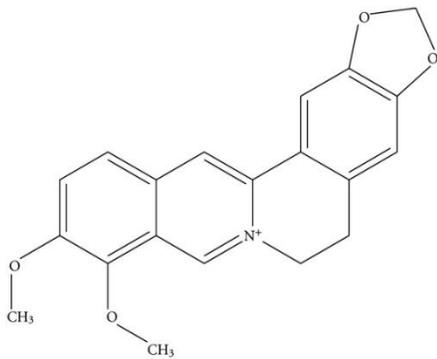
En años recientes, el interés y el uso de los productos naturales en la medicina tradicional Mexicana ha ido incrementando su popularidad alrededor del mundo para tratar diversos padecimientos como el asma. No obstante, se debe realizar una selección de ellas considerando actividades farmacológicas acorde a la fisiopatología del padecimiento, como en el caso del asma donde se necesita poseer actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora, antihistamínica, relajante del músculo liso y antialérgicas.<sup>38</sup>

Diversos alcaloides se han aislado de las plantas produciendo actividad: antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, anticancerígena, entre otras.<sup>7</sup> Recientemente se ha determinado que las plantas como las especies: *Argemone ochroleuca* (“chicalote”), *Hydrastis canadensis* L., *Coptis chinensis*, *Berberis* ssp., *Rhizoma coptidis* y *Cortex phellodendri* contienen como metabolito activo a la berberina.<sup>39</sup>

#### **3.5.1 Berberina**

La berberina (Imagen 3, fórmula molecular  $C_{20}H_{19}NO_5$  y peso molecular 33) es un alcaloide isoquinolínic sintetizado a partir de la L-tirosina, suele presentarse como sólido cristalino en forma de agujas de color amarillo

soluble en agua y etanol, pero insoluble en cloroformo, éter y benceno. Generalmente se presenta en forma de sal (clorhidrato, sulfonato y carbonato). Posee actividad relajante sobre el músculo liso bronquial<sup>40</sup> y algunos investigadores suponen que presenta una actividad anticolinérgica.<sup>41</sup> Diversos efectos farmacológicos se han descrito para la berberina, entre los que se encuentran: actividad analgésica, antitumoral, antitusiva, antiinflamatoria, antisecretora, antioxidante, hipoglucemiante, antimicrobiana, antidepresiva,<sup>42</sup> entre otras y se ha utilizado contra enfermedades como: hiperlipidemia, hipertensión, síndrome metabólico, el SOP (síndrome de ovario poliquístico), obesidad, enfermedades de hígado graso y como tratamiento para la diarrea, diabetes mellitus tipo II, arritmias e insuficiencia cardiaca.<sup>39,43-44</sup>



**Imagen 3.** Molécula de berberina

Adicionalmente, los mecanismos de acción descritos para este alcaloide son diversos; entre ellos se ha reportado que el efecto relajante de berberina sobre el músculo liso de las vías aéreas no se modifica por timolol,<sup>40</sup> ni por propanolol<sup>9</sup> ( $\beta$ -bloqueadores), o por un congénere de xantil-amina (antagonista de adenosina). Otro mecanismo de relajación propuesto es la apertura de canales de  $K^+_{ATP}$ . Se ha descrito que berberina produce un efecto hipoglucemiante y un efecto benéfico sobre las arritmias isquémicas, atribuido por algunos autores a la acción inhibitoria sobre los canales de  $K^+_{ATP}$ , en células  $\beta$ <sup>45</sup> y en miocitos cardiacos.<sup>46</sup> Sin embargo, el efecto relajante de berberina no se ve disminuido en presencia de glibenclamida (bloqueador de canales  $K^+_{ATP}$ ).<sup>9, 47</sup>

El NO, presenta una amplia gama de actividades sobre el músculo liso de las vías aéreas en condiciones fisiológicas y patológicas, entre las que se encuentran: un efecto vasodilatador bronquial, inmunoprotector, estimular la secreción de moco y formación de radicales libres.<sup>48</sup> Varios liberadores de NO, como el nitroprusiato de sodio o el NO endógeno activan a la GC soluble incrementando el GMPc (relajante en vías aéreas), y algunos autores suponen que berberina participa en la liberación de NO y como un posible inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés).

Por otra parte se ha reportado que berberina induce a los receptores del sabor amargo en el tracto gastrointestinal liberando GLP-1,<sup>49</sup> y algunos otros reportan que interactúa directamente con los ácidos nucleicos y varias proteínas como las telomerasas, p53, NF-κB y receptores de estrógeno.<sup>44</sup> En cuanto a sus propiedades antidepresivas se ha reportado con actividad inhibitoria sobre la enzima monoaminoxidasa (MAO), lo que incrementa la concentración de norepinefrina, serotonina (5-HT) y dopamina en el cerebro lo que presenta el efecto antidepresivo.<sup>42</sup> En el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo II es utilizado para la complicación de nefropatía diabética, disminuyendo el daño renal en este padecimiento.<sup>50</sup> Se afirma que produce disminución de la hiperglicemia al disminuir la glucosa en sangre por la disminución del estado de resistencia a la insulina influenciando en la función de las células β-pancreáticas. Otros autores dicen que actúa inhibiendo la gluconeogénesis por la activación de la AMPK en la vía LKB1-AMPK-TORC2.<sup>7, 50</sup> También se le ha descrito un efecto gastroprotector en úlceras inducidas por etanol y un efecto inhibidor sobre la citotoxicidad inducida por agentes químicos, pero el mecanismo de acción para este alcaloide no es claro.<sup>41</sup>

Altas dosis de este alcaloide son moderadamente tóxicas para el clorhidrato de berberina dihidratado por vía oral la DL<sub>50</sub> en rata es de 15 000 mg/kg y por vía intraperitoneal se ha reportado una DL<sub>50</sub> de 30mg/kg y 205mg/Kg en

ratón y rata respectivamente. El sulfato de berberina se reporta una DL<sub>50</sub> superior a los 1 000mg/Kg. En el nivel de exposición experimental no se observan efectos tóxicos (NOAEL) tanto en rata como ratón, ha sido 500 veces mayor a la cantidad máxima de berberina que puede obtenerse de una planta (0.5–7%) utilizada como suplemento alimenticio.<sup>52–53</sup>

#### **4. Justificación**

Considerando los estudios previos donde el alcaloide berberina presenta actividad relajante del músculo liso bronquial,<sup>9</sup> y además se ha descrito una variedad de efectos farmacológicos contradictorios, no existe un consenso sobre la vía en que actúa este compuesto. Por lo que la elucidación de su mecanismo de acción relajante cobra importancia tanto para futuros estudios farmacológicos como para una posible alternativa a tratamientos de asma actuales. Lo anterior será posible demostrar en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Con el inhibidor de la enzima adenilato ciclasa, 2',5'-dideoxiadenosina, se verá inhibido el efecto relajante del alcaloide y los inhibidores de fosfodiesterasas aminofilina y rolipram incrementarán el efecto relajante. La elevación del nivel de AMPc se verá reflejado en la elevación de los niveles de fosfatos, que será posible determinarlos por la reacción de verde de malaquita. Si el alcaloide berberina activa a la adenilato ciclasa presentará resultados en el mismo sentido que forskolina, que se sabe es un activador de esta enzima.

#### **5. Hipótesis**

El efecto relajante del alcaloide berberina se debe a la activación de adenilato ciclasa e incremento de AMPc en la musculatura lisa de las vías aéreas de la tráquea aislada de cobayo.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar la participación de adenilato ciclasa y AMPc en el mecanismo de acción relajante de berberina en la musculatura lisa de vías aéreas de cobayo.

### **6.2 Objetivos particulares**

Determinar en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas como, aminofilina (inhibidor inespecífico de PDE) y rolipram (inhibidor selectivo de PDE4) el efecto relajante de berberina.

Determinar el efecto relajante de berberina y forskolina mediante la inhibición de adenilato ciclasa con 2',5'-dideoxiadenosina.

Determinar la activación de la adenilato ciclasa midiendo los niveles de AMPc a través de la cuantificación de fosfatos en el tejido de músculo liso de vías aéreas por la acción de fosfodiesterasas y nucleotidasa con el reactivo de verde de malaquita.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Fármacos

El sulfato de berberina fue adquirido de Delta Chemical Works, dos fármacos contráctiles de tipo colinérgico: cloruro de acetilcolina y cloruro de carbacol, un inhibidor de adenilato ciclasa: 2',5'-dideoxiadenosina, un activador de adenilato ciclasa: forskolina y dos inhibidores de fosfodiesterasas: rolipram y aminofilina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis Mo. USA). Todos los fármacos se solubilizaron en agua destilada. El pentobarbital sódico fue adquirido como solución inyectable para uso veterinario de los laboratorios PISA agropecuaria (Pisabental®).

Las enzimas PDE de cerebro de bovino, la enzima 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox*, el nucleótido cíclico 3',5'-AMPc y el estándar 5'-AMP, el buffer de ensayo (10 mM Tris-HCl, pH 7.4), el reactivo de color Biomol® Green, el inhibidor de PDEs (IBMX) y la columna de resina de intercambio iónico para desalinización, se obtuvieron de Enzo Life Science, Inc. El agua desionizada se obtuvo del purificador de agua Milli-Q system (Millipore S.A. de C.V., México).

### 7.2 Animales

Para los experimentos se utilizaron cobayos macho con un peso corporal entre 300 – 450 g obtenidos de Biossupply, S. A. de C. V. México, mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) con libre acceso al alimento y agua. Los procedimientos involucrados en el cuidado y manejo de los animales se realizaron conforme lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Cuidado y mantenimiento de los animales. Especificaciones y técnicas para la producción, uso y cuidado de los animales de laboratorio. (ver anexo, página 52)

## **7.3 Bioensayo**

### **7.3.1 Disección de la tráquea y montaje de la preparación**

Los animales se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.). Inmediatamente se realizó la disección de la tráquea y se retiró el tejido circundante. El tejido se colocó en disolución de Krebs Henseleit (KHS) cuya composición fue (mM): NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.5, glucosa 11.1 y EDTA. Esta disolución se mantuvo a  $37 \pm 1$  °C y con burbujeo constante de gas carbógeno (95 %  $\text{O}_2$  y 5 %  $\text{CO}_2$ ). Posteriormente, se obtuvieron 16 anillos de aproximadamente 2 mm de longitud, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de disolución Krebs Henseleit a  $37 \pm 1$  °C. El tejido se suspendió entre dos anillos de alambre de Nicromel, uno se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado a un polígrafo Biopack System MP100. Los datos se obtuvieron mediante el programa de Acknowledge versión 3.5.3. El tejido se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se estabilizó durante una hora realizando lavados con KHS cada 15 minutos. Transcurrida una hora, se procedió a estimular el tejido con una solución de acetilcolina 30  $\mu\text{M}$  dos veces (para conocer la viabilidad del mismo) a intervalos de 30 minutos, posteriormente se alcanzó una contracción basal constante y se iniciaron los experimentos.

### **7.3.2 Mecanismos de acción**

#### **7.3.2.1 Inhibición de fosfodiesterasas**

Al término de la estabilización del tejido, se estimuló con carbacol (1  $\mu\text{M}$ ), cuando el tejido presentó una meseta de contracción se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones de estudio: (i) berberina (118.5  $\mu\text{M}$ ) o forskolina (0.26  $\mu\text{M}$ ) y rolipram (1  $\mu\text{M}$ ) o aminofilina (0.1 mM) administrados simultáneamente; (ii)

berberina (118.5  $\mu\text{M}$ ) o forskolina (0.26  $\mu\text{M}$ ) y al transcurrir 4 minutos rolipram (1  $\mu\text{M}$ ) o aminofilina (0.1 mM); (iii) berberina (118.5  $\mu\text{M}$ ), forskolina (0.26  $\mu\text{M}$ ), rolipram (1  $\mu\text{M}$ ) o aminofilina (0.1 mM); (iv) control tratado sólo con el vehículo.

### **7.3.2.2 Inhibición de la enzima adenilato ciclasa**

Al finalizar el periodo de estabilización del tejido éste se estimuló con carbacol (1  $\mu\text{M}$ ) y al alcanzar la meseta de contracción se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones de estudio: primero se incubó durante 5 minutos con 2',5'-dideoxiadenosina (DDA, 30  $\mu\text{M}$ ) al finalizar la incubación se adicionó berberina (190  $\mu\text{M}$ ) o forskolina (2.67  $\mu\text{M}$ ), el otro experimento consistió en incubar el vehículo de disolución de los fármacos durante 5 minutos y al transcurrir la incubación se adicionó berberina o forskolina o DDA, en sus respectivas concentraciones.

### **7.3.3 Ensayo enzimático**

El ensayo enzimático fue diseñado a través de una adaptación del kit de ensayo de BIOMOL® GREEN "Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Assay Kit". Éste es un método colorimétrico no radiactivo diseñado para ser llevado a cabo en una microplaca. La base del ensayo es la degradación de AMPc o GMPc producido por la activación de la enzima AC o GC respectivamente. La degradación se llevó a cabo por las enzimas PDEs produciendo 5'-AMP o 5'-GMP. Posteriormente, la enzima 5'-nucleotidasa liberó el grupo fosfato del nucleótido cíclico (adenosina). El fosfato inorgánico liberado se cuantificó a través de una reacción colorimétrica con verde de malaquita contenido en el reactivo de color Biomol® Green.

Los principios activos y fármacos fueron probados a una sola concentración en experimentos independientes: forskolina (2.6  $\mu\text{M}$ ), berberina (190  $\mu\text{M}$ ) y DDA (30  $\mu\text{M}$ ).

### **7.3.4 Determinación de AMPc**

#### **7.3.4.1 Tratamiento del tejido**

Los animales se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/Kg, i.p.) Se realizó la disección de la tráquea y se retiró el tejido circundante. Se obtuvieron cuatro fragmentos de aproximadamente 70 mg y se colocaron en una disolución KHS libre de fosfatos, utilizando agua desionizada y todas las sales exceptuando el  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Cada fragmento se colocó en una cámara de órgano aislado a 37°C y con burbujeo constante de gas carbógeno y se incubaron durante 15 minutos con DDA, 30  $\mu\text{M}$ ; berberina 190  $\mu\text{M}$ ; forskolina 2.6  $\mu\text{M}$  o agua, respectivamente. Al finalizar la incubación se lavó el tejido con 1 mL de agua desionizada, para eliminar el exceso de fosfatos libres. El tejido se homogeneizó con Ultra-Turrax (IKA T18) a 15 000 rpm. El homogenado se centrifugó a 2400 rpm durante 3 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para hacer la cuantificación de fosfatos.

#### **7.3.4.2 Desalinización del tejido por filtración en gel**

La resina de intercambio iónico (BML-KI100) se rehidrató con 20 mL de agua desionizada por 12 h. Posteriormente se empacó un volumen de 5 mL en la columna; se agregaron 45 mL de buffer de ensayo para equilibrar la columna al pH de 7.4; se centrifugó a 2400 rpm durante 3 minutos a 4 °C para desplazar el buffer de ensayo. Entonces, se agregó una muestra de 350  $\mu\text{L}$  de sobrenadante del homogenizado de tejido en la columna. La columna se centrifugó a 2400 rpm durante 3 min a 4 °C, los eluatos se recogieron y se congelaron inmediatamente a -70 °C y se guardaron hasta su análisis. Y por

último se verificó la eliminación de fosfatos libres añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Biomol® Green para 1  $\mu\text{L}$  de eluato o 1  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. Si no hay fosfato libre la muestra se mantiene amarilla en un tiempo de 30 min. El desarrollo de color verde visible indica la presencia de fosfato.

#### **7.3.4.3 Curva patrón**

Partiendo del 5'-AMP estándar 100  $\mu\text{M}$ , se prepararon concentraciones de 75 y 50  $\mu\text{M}$  en buffer de Tris-HCl, pH=7.4. Se tomaron 80  $\mu\text{L}$  de la solución de 75  $\mu\text{M}$  y se colocaron en el pocillo A de una microplaca de 96 pozos, de aquí se transfirieron 40  $\mu\text{L}$  al pocillo C que contiene 40  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, se mezcló y de aquí se transfirieron 40  $\mu\text{L}$  al pocillo E que contiene 40  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, se mezcló y se desecharon 40  $\mu\text{L}$  de esta mezcla. De la solución de 50  $\mu\text{M}$ , se transfirieron 80  $\mu\text{L}$  al pocillo B, en forma sucesiva se transfieren 40  $\mu\text{L}$  a los pocillos D, F y G que contienen 40  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo. Se descartan los últimos 40  $\mu\text{L}$  del último pocillo. El pocillo H sólo contiene 40  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo. Las concentraciones anteriores corresponden a 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 y 0 nmol de 5'-AMP en la placa de 96 pozos. Posteriormente se adicionó: 10  $\mu\text{L}$  de 5'-nucleotidasa y buffer de ensayo para obtener un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  y se incubó la placa a 30 °C durante 30 minutos. Al terminar la incubación se adicionó el reactivo Biomol® Green a temperatura ambiente y se realizaron lecturas a 620 nm transcurridos 20, 25 y 30 minutos de adición del reactivo colorido.

#### **7.3.4.4 Curso/linealidad**

En la placa de 96 pozos se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de AMPc (0.5 mM) del pocillo A al H, 15  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, 10  $\mu\text{L}$  de 5'-nucleotidasa y se inició la reacción adicionando 5  $\mu\text{L}$  de PDE (4 U/mL) para diferentes tiempos de incubación, como se muestra en la siguiente tabla, se incubó a 30 °C y una

vez transcurrido el tiempo se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Biomol® Green para la cuantificación de fosfatos libres.

<b>Ejemplo pocillo</b>	<b>Tiempo de adición de PDE (min)</b>	<b>Tiempo de Reacción (min)</b>
<b>A</b>	0	90
<b>B</b>	30	60
<b>C</b>	45	45
<b>D</b>	60	30
<b>E</b>	70	20
<b>F</b>	80	10
<b>G</b>	85	5
<b>H</b>	90	0

**Tabla 1.** Ejemplo de realización del curso/linearidad de ensayos en microplaca. Al finalizar los 90 minutos de incubación se detiene la reacción con la adición de Biomol® Green.

#### **7.3.4.5 Cuantificación de fosfatos**

Utilizando una placa de 96 pocillos, a cada pocillo se adicionó 15  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo, 20  $\mu\text{L}$  del eluato del homogenado de cada tratamiento (ya sea de: berberina, forskolina, DDA o control); 10  $\mu\text{L}$  de 5'-nucleotidasa y 5  $\mu\text{L}$  de PDE (4 U/mL). Todas las muestras se incubaron durante 30 min. Al finalizar este tiempo se adicionó el reactivo Biomol® Green, las lecturas se realizaron transcurridos 20, 25 y 30 minutos después de adición del reactivo. El compuesto se cuantificó a una absorbancia a 620 nm en lector de placas (Bio-Rad Laboratories, Inc. Modelo 680).

#### **7.3.5 Análisis estadístico**

Los datos de los bioensayos se presentaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó con el software

Graphpad Prism® versión 5.00, utilizando una ANOVA de una vía con una significancia de 0.05 y una prueba post hoc de Tukey. Para cada tratamiento se utilizaron al menos 16 experimentos, obtenidos de al menos 3 animales.

Los datos obtenidos de los ensayos enzimáticos se interpolaron en la curva patrón de fosfatos y se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó con el software Graphpad Prism® versión 5.00, utilizando una ANOVA de una vía con una significancia de 0.05 y una prueba post hoc de Tukey. Para cada ensayo enzimático se utilizaron al menos 6 experimentos, obtenidos de 3 animales.

### **7.3.6 Acoplamiento molecular (“*docking*”)**

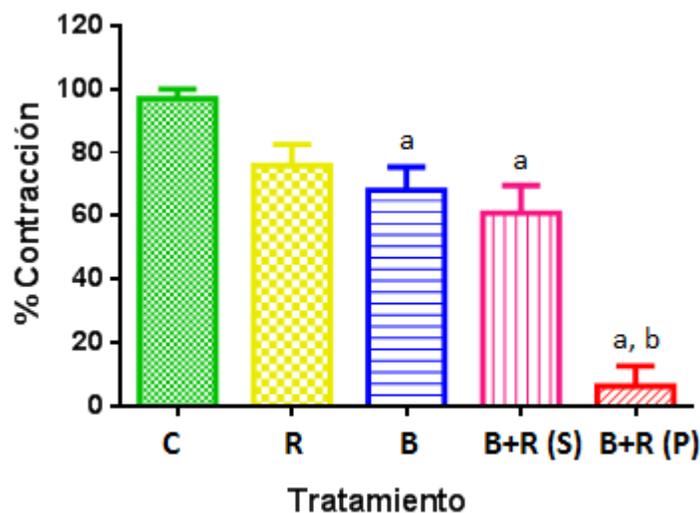
a) *Preparación de la proteína.* Del servidor Protein Data Bank (PDB)<sup>54</sup> se descargó la estructura cristalizada de la adenilato ciclasa (PDB: 3G82, subunidades A y B).<sup>54</sup> Se removieron las moléculas de agua, cosolventes y el activador forskolina, manteniendo únicamente al ATP y a los iones  $Mg^{2+}$  con los que interacciona. La energía de la estructura proteica se minimizó utilizando el campo de fuerza AMBER99SB empleado por el programa Chimera 1.9.<sup>55</sup> La estructura final fue preparada con la interfaz gráfica de AutoDockTools-1.5.6,<sup>56</sup> agregando los hidrógenos polares y asignando las cargas a los aminoácidos.

b) *Preparación del ligando.* La estructura de la berberina se construyó y optimizó con el programa Spartan'02,<sup>57</sup> utilizando un método semi-empírico con la base PM3. Para el caso de la forskolina se extrajo la estructura de la proteína cristalizada, esto con la finalidad de comparar y validar el modo de unión del resultado experimental con la predicción. Finalmente, se utilizó el programa AutoDockTools-1.5.6 para agregar hidrógenos polares y detectar los centros de torsión y enlaces rotables de las moléculas.

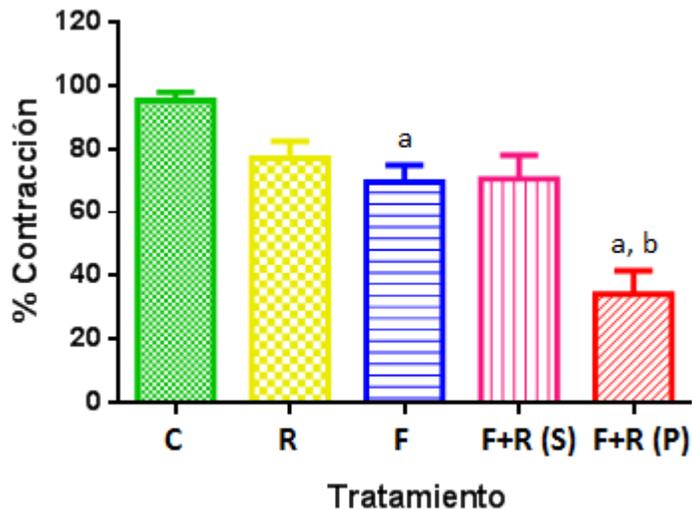
c) *Docking*. Los cálculos fueron realizados con el programa AutoDock 4.2.6<sup>56</sup> en la modalidad de acoplamiento de tipo rígido-flexible (proteína rígida y ligandos flexibles). La caja de búsqueda se centró en el sitio de unión de la forskolina, con 60 x 60 x 60 puntos de tamaño y un espaciado de 0.375 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano como método de búsqueda, con un total de 20 corridas, un número máximo de 2 500 000 evaluaciones energéticas y una población inicial de 150 conformeros. El mejor modo de unión se seleccionó con base a la menor energía de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) y el mayor número de integrantes en el clúster (CS, *cluster size*).

## 8. Resultados

El efecto relajante de berberina ( $39.06 \pm 6.38 \%$ ) se incrementó significativamente cuando rolipram se administró 4 minutos después, alcanzando una relajación de  $91.18 \pm 6.08 \%$  (Figura 1). Sin embargo, cuando rolipram se administró simultáneamente con berberina el efecto relajante ( $45.88 \pm 7.28 \%$ ) no se modificó. El experimento con forskolina presentó resultados parecidos; el efecto de forskolina ( $32.04 \pm 5.41 \%$ ) se incrementó cuando rolipram se administró 4 minutos después, alcanzando una relajación de  $64.81 \pm 7.57 \%$  (Figura 2). La administración simultánea de forskolina y rolipram, a la concentración utilizada ( $0.26 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente) fue de  $31.64 \pm 3.16 \%$  (Figura2).

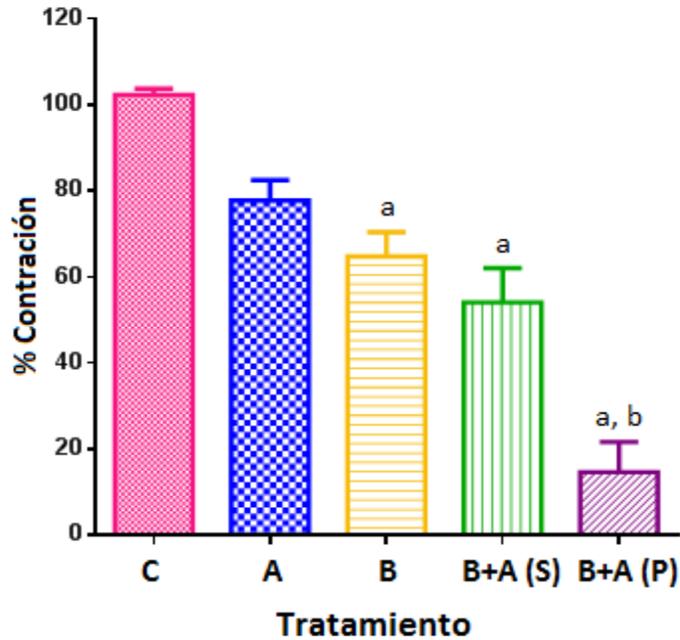


**Figura 1.** Comparación del efecto relajante de berberina y rolipram tras una administración simultánea o pre-incubación de berberina. Se realizó un análisis de varianza seguido por la prueba Tukey ( $n=6$ ). C= Control; R=Rolipram ( $1 \mu\text{M}$ ); B= Berberina ( $190 \mu\text{M}$ ); S= Simultánea y P= pre-incubación. **a** ( $p<0.0004$  respecto al control). **b** ( $p<0.0004$  respecto al grupo tratado con berberina)

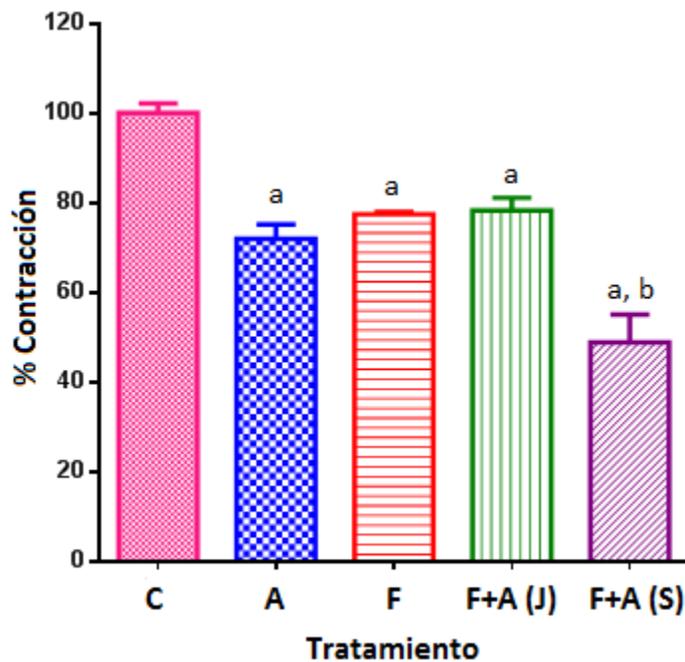


**Figura 2.** Comparación del efecto relajante de forskolina y rolipram tras una administración simultánea o pre-incubación. Se realizó un análisis de varianza seguido por una prueba Tukey (n=6). C= Control; R=Rolipram (1  $\mu$ M); F= Forskolina (0.26  $\mu$ M); S= simultánea y P= pre-incubación. **a** ( $p < 0.05$  respecto al control), **b** ( $p < 0.05$  respecto al grupo tratado con forskolina)

Al igual que en el caso de rolipram, la aminofilina administrada 4 minutos después de berberina incrementó significativamente su efecto relajante alcanzando  $85.3 \pm 7.00$  % de relajación (Figura 3) comparada con la relajación alcanzada cuando se administraron juntas, que provocó una relajación de  $45.89 \pm 7.89$  %, efecto que no fue significativo respecto a la relajación de berberina sola ( $35.27 \pm 5.67$  %). Para el caso de forskolina, el efecto de aminofilina fue menor, ya que sólo alcanzó  $48.82 \pm 6.28$  % de relajación (Figura 4), aún así fue mayor al de forskolina sola ( $22.51 \pm 1$  %) o cuando se administró simultáneamente con aminofilina ( $21.69 \pm 2.89$  %).

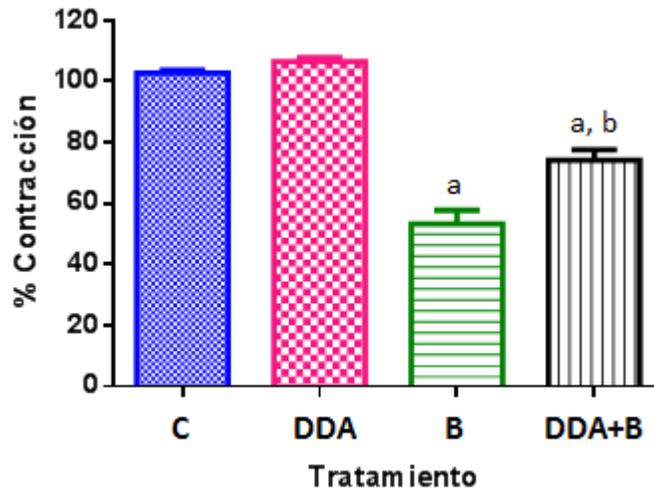


**Figura 3.** Comparación del efecto relajante de berberina y aminofilina tras la administración simultánea y pre-incubación. Se realizó un análisis de varianza seguido por la prueba Tukey (n=6). C= Control; A= Aminofilina (100  $\mu$ M); Berberina (190  $\mu$ M); S= simultáneo; P= pre-incubación. **a** ( $p < 0.0001$  respecto al control), **b** ( $p < 0.0001$  respecto al grupo tratado con berberina),

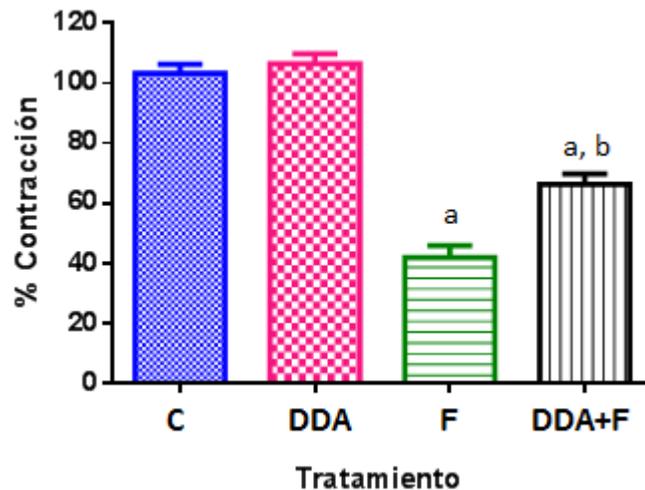


**Figura 4.** Comparación del efecto relajante de forskolina y aminofilina juntos o separados. Se realizó un análisis de varianza seguido por la prueba Tukey (n=6). C= Control; R= Rolipram (1  $\mu$ M); F = Forskolina (0.26  $\mu$ M); J= juntos y S= simultáneo. **a** ( $p < 0.05$  respecto al control), **b** ( $p < 0.05$  respecto a grupo tratado con forskolina).

La 2',5'-dideoxiadenosina (DDA) redujo el efecto relajante de berberina de  $46.71 \pm 4.49 \%$  a  $25.84 \pm 3.52 \%$  (Figura 5) y de forskolina de  $58.01 \pm 3.81 \%$  a  $33.68 \pm 3.55 \%$  (Figura 6). La DDA por sí sola no presentó un efecto relajante (Figura 5 y 6).



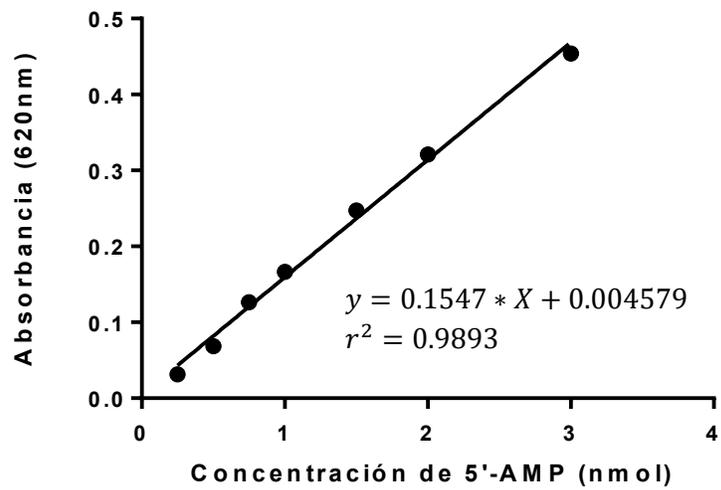
**Figura 5.** Disminución del efecto relajante de berberina en presencia y ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina. Se realizó un análisis de varianza seguido por la prueba Tukey (n=6). C= Control; DDA= 2',5'-dideoxiadenosina (30  $\mu$ M); B= Berberina (190  $\mu$ M). **a** ( $p < 0.0001$  respecto al control) y **b** ( $p < 0.0001$  respecto al grupo tratado con berberina).



**Figura 6.** Disminución del efecto relajante de forskolina en presencia y ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina. Se realizó un análisis de varianza seguido por la prueba Tukey (n=6). C= Control; DDA= 2',5'-dideoxiadenosina (30  $\mu$ M); F= Forskolina (2.62  $\mu$ M) **a** ( $p < 0.0001$  respecto al control) y **b** ( $p < 0.0001$  respecto al grupo tratado con forskolina),

La curva de calibración para cuantificación de 5'-AMP siguió una relación lineal entre 0.25 nM y 3 nM con una  $r^2$  de 0.9893 (Figura 7).

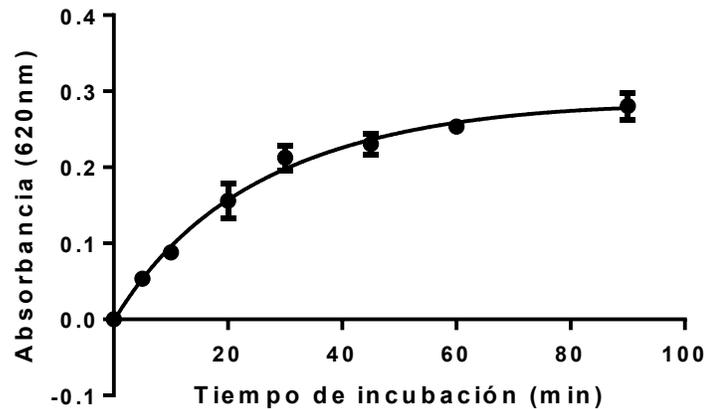
### 8.1 Curva estándar 5'-AMP



**Figura 7.** Curva estándar, utilizando 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 nmol de 5'-AMP. Se midió la absorbancia a 620 nm y t=25 min.

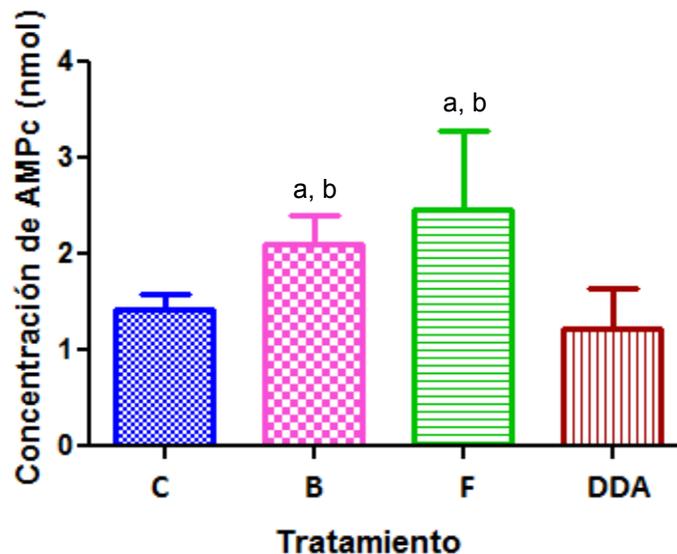
## 8.2 Curva curso/linealidad AMPc

Se realizó el curso/linealidad de la degradación de AMPc a diferentes tiempos de incubación.



**Figura 8.** Curso/linealidad de la degradación de AMPc en presencia de PDE y 5'-nucleotidasa. Se midió la absorbancia a 620 nm durante 90 minutos.

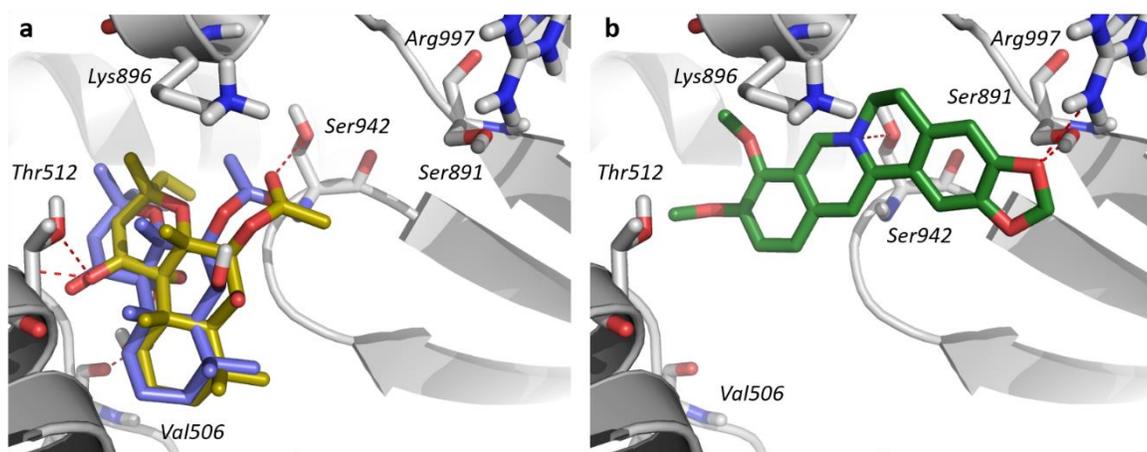
Berberina y forskolina presentaron un incremento en el nivel de AMPc respecto al control ( $1.22 \pm 0.42$  nmol de AMPc), con valores de  $2.10 \pm 0.31$  nmol y  $2.46 \pm 0.81$  nmol respectivamente (Figura 9). En tanto que DDA provocó una disminución ( $1.42 \pm 0.14$  nmol).



**Figura 9.** Cuantificación de 5'-AMP en tráquea de cobayo con diferentes tratamientos. **a** ( $p < 0.05$  respecto al control) y **b** ( $p < 0.05$  respecto al grupo tratado con DDA= 2',5'-dideoxiadenosina).

### 8.3 Acoplamiento molecular (“docking”)

De manera complementaria se realizó el estudio de acoplamiento molecular de la berberina con la enzima AC co-cristalizada con forskolina. El re-acoplamiento de la forskolina mostró un *Root Mean Square Deviation* (RMSD) de 1.04 Å con respecto a la estructura cristalizada. Este obtuvo una energía de unión de -8.35 kcal/mol y una proporción de la población del clúster de 20/20. Cabe mencionar que la estructura acoplada presentó los mismos puentes de hidrógeno con los aminoácidos Ser942, Thr512 y Val506 de la estructura co-cristalizada. Una parte de la molécula de berberina, se une al mismo sitio de unión a forskolina, con una energía de unión de -7.34 kcal/mol con la proporción del clúster 20/20, formando puentes de hidrógeno con Ser942, Ser891 y Arg997 (Figura 10).



**Figura 10.** Modo de unión de la (a) forskolina co-cristalizada (amarillo), la predicha por el acoplamiento (azul) y (b) acoplamiento de la berberina (verde).

## 9. Discusión

La berberina es un alcaloide isoquinolínico aislado de numerosas especies de plantas, y ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional para distintos padecimientos como: infecciones parasitarias, diarrea bacteriana, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, hipercolesteremia, diabetes,<sup>59</sup> obesidad, hígado graso,<sup>60</sup> efecto neuroprotector, entre otros.<sup>61</sup> En México, la especie *Argemone ochroleuca* es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias como: tos, bronquitis y asma.<sup>62</sup>

Entre los mecanismos propuestos para berberina se encuentran: activación de AMPK, inhibición de PPAR $\gamma$ , inhibición de la aldosa reductasa y su actividad inhibitoria sobre MAPK.<sup>60</sup> Sin embargo, no existe un mecanismo confirmado para su actividad relajante en musculo liso bronquial.

Debido a la búsqueda bibliográfica y a estudios anteriores realizados en el laboratorio que exploraron varias vías de señalización (como el antagonismo de receptores muscarínicos<sup>10</sup>), este estudio propone como mecanismo de acción relajante de este alcaloide la activación de la enzima AC. Para confirmar lo anterior se realizaron experimentos *in vitro*; donde se observó que el efecto relajante producido por berberina se veía potenciado con la administración de los inhibidores de PDEs con pre-incubación del alcaloide. Las PDEs presentan una variedad de isoformas, de las cuales los tipos 3, 4 y 5 presentan efectos terapéuticos en diferentes órganos,<sup>32-33</sup> por lo que se emplearon a los fármacos: rolipram, inhibidor selectivo sobre PDE4, y aminofilina, inhibidor inespecífico de PDEs. Para comparar los efectos producidos por berberina se utilizó a forskolina como fármaco de referencia debido a que se conoce que este fármaco es un activador de AC de las isoformas 1-8.<sup>27</sup>

La PDE tipo 4 tiene como sustrato al AMPc, por lo que al inhibir esta isoforma se evita la degradación de AMPc producido tras la activación de AC con berberina y forskolina, lo que incrementa el efecto relajante de estos compuestos. En tanto que la inhibición inespecífica de fosfodiesterasas evita la degradación tanto de AMPc como de GMPc, lo que involucra un incremento en el efecto relajante<sup>33</sup> tanto de berberina como de forskolina, siendo mayor el efecto sobre berberina.

Por otra parte, la administración simultánea de berberina o forskolina con los inhibidores de PDEs, no incrementó el efecto relajante de las mismas, probablemente a causa de la activación simultánea de ambos procesos; la formación de AMPc por la activación de la AC y la inhibición de la degradación de este segundo mensajero. Esto en contraste con la pre-incubación de berberina o forskolina, que incrementaron considerablemente el nivel de AMPc y al inhibir a las PDEs el nivel producido del nucleótido se mantuvo elevado incrementando así el efecto relajante debido a la activación de la proteína cinasa A (PKA). La PKA fosforila a proteínas intracelulares en residuos de serina y treonina, lo que inactiva a la MLCK. Por otra parte PKA fosforila ciertos canales de K<sup>+</sup> los cuales se abren permitiendo el flujo de potasio ocasionando hiperpolarización en el tejido.<sup>23</sup>

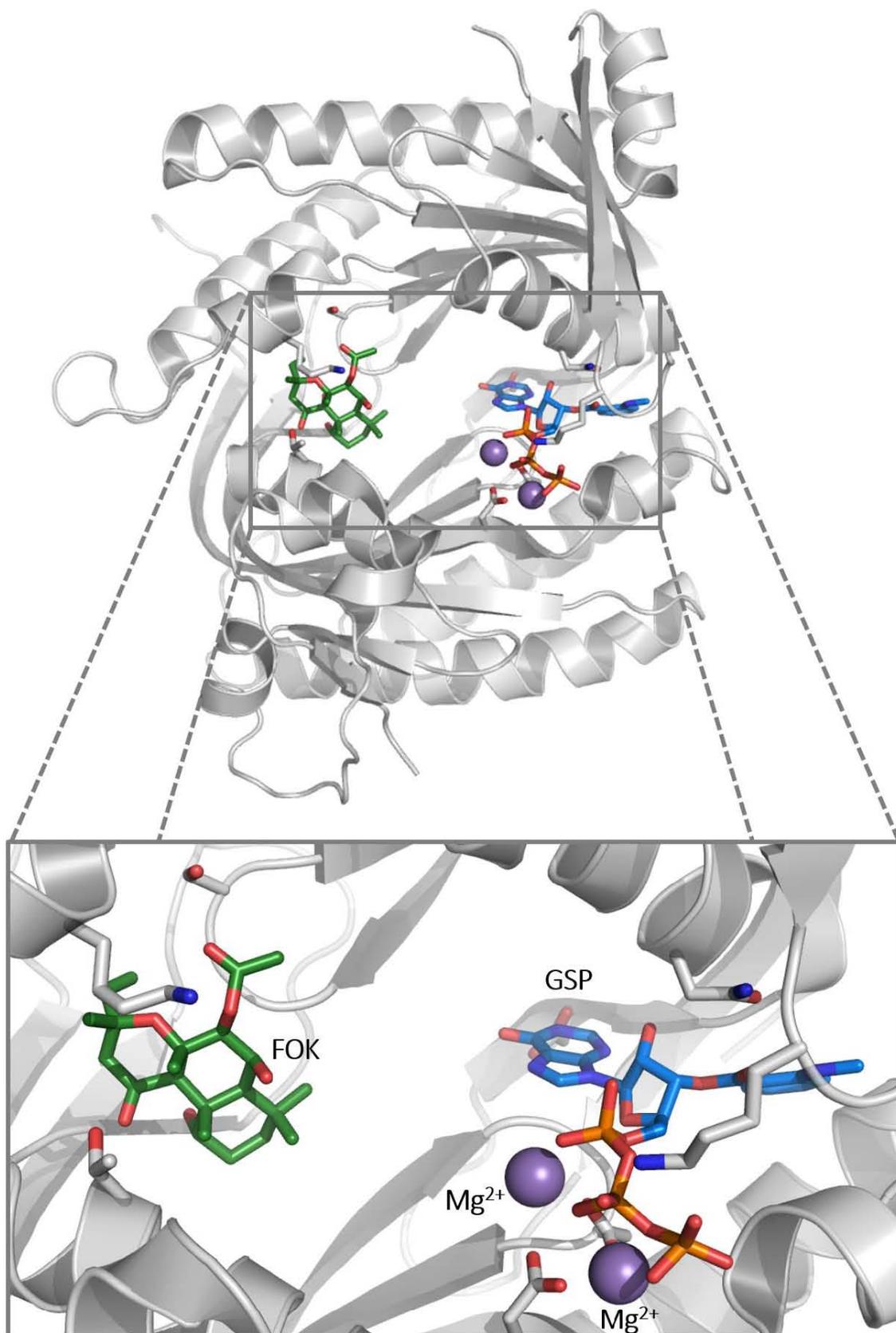
Otro experimento llevado a cabo *in vitro* consistió en la inhibición de la enzima adenilato ciclasa con 2',5'-dideoxiadenosina, el cual presentó un efecto contrario de berberina. Estos resultados concuerdan con los observados por Sánchez-Mendoza, 2008<sup>9</sup> en los que se demuestra que la relajación de berberina y forskolina se antagoniza por la 2',5'-dideoxiadenosina, dando mayor sustento que berberina puede estar activando a AC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el mecanismo de acción relajante de berberina sobre el músculo liso de tráquea de cobayo involucra la participación de la enzima adenilato ciclasa.

Para corroborar lo antes mencionado se realizaron los ensayos enzimáticos, donde se observó un incremento de la concentración de fosfatos cuantificados, relacionados a la cantidad de AMPc producidos tras la administración de las sustancias. En estos resultados se muestra que los tejidos incubados previamente con berberina y forskolina, incrementaron el nivel de AMPc, mientras que al incubar el tejido con 2',5'-dideoxiadenosina disminuyó la concentración de fosfatos. El kit enzimático utilizado en este trabajo está constituido por una mezcla de isoformas de PDE que pueden hidrolizar a los nucleótidos cíclicos. Sin embargo, las diferentes isoformas de PDE, como se mencionó anteriormente, tienen selectividad hacia uno u otro nucleótido, por ejemplo: la PDE1 inactiva al GMPc y AMPc pero a diferencia de las demás isoformas esta requiere del complejo calcio-calmodulina para activarse, el cual no se encontraba presente en la metodología empleada. La PDE 3 y 4 degradan al AMPc, mientras que la PDE 5 hidroliza al GMPc. Cabe destacar que existe evidencia de que el efecto relajante de berberina no es inhibido por la inhibición con ODQ, un inhibidor de la GC soluble, por lo que se sugiere que la relajación inducida con berberina no es por la activación de GC soluble/GMPc.<sup>9</sup> Esto implica que berberina puede estar actuando preferentemente sobre AC.

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular en el sitio de unión del sustrato de la enzima AC (Figura 11), con el ligando berberina. Mediante esta técnica se encontró lo siguiente: la enzima co-cristalizada con forskolina se desacopló y se realizó con ella un estudio de acoplamiento en la estructura, lo que finalmente mostró un modo de unión similar a la forskolina co-cristalizada en la enzima, lo que nos permitió validar la metodología de docking y conocer la energía de unión de la forskolina ( $\Delta G_{\text{unión}} = -8.35$  kcal/mol). Una vez realizada la validación, se procedió a realizar el acoplamiento de la berberina, la cual mostró un acoplamiento similar en todas las evaluaciones con una energía de unión de  $\Delta G_{\text{unión}} = -7.34$  kcal/mol. Tanto la forskolina como la berberina formaron puentes de hidrógeno en el sitio de unión con la enzima, siendo la interacción con el residuo de Ser942 lo que compartían ambas moléculas. Dado que ambas

estructuras presentaron un tamaño de clúster de 20/20 (es decir, una conformación similar en todas las evaluaciones), nos indica que existe una alta probabilidad de que las moléculas adquieran la conformación predicha al unirse al sitio de unión (figura 10). Aunado a esto, la energía de unión puede indicar la posible causa de que la forskolina tenga mayor afinidad a la adenilato ciclasa que la berberina, ya que esta última presenta una mayor energía de unión; sin embargo, el modo de unión y energía nos sugieren que existe una alta probabilidad de que la berberina también podría activar a dicha enzima.



**Figura 11.** Se muestra los ligandos de la estructura de adenilato ciclasa co-cristalizada FOK= Forskolina; GSP= 5'-guanosina-difosfato-monotiofosfato y Mg<sup>2+</sup> el cofactor magnesio.

## **10. Conclusión**

El efecto relajante de berberina involucra la participación de la vía AC-AMPC y sugiere su utilidad en el tratamiento de asma

## 11. Perspectivas

- Evaluar el efecto de berberina en un modelo de asma.
- Estudiar la vía del óxido nítrico en el efecto relajante de berberina.
- Realizar estudios de “*docking*” para berberina en otras dianas moleculares.
- Evaluar otras aminas terciarias de *Argemone* y su actividad relajante en tráquea.

## 12. Referencias

1. Asthma, vínculo disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/> el 3 de agosto de 2015.
2. Black J., Panettieri R., Banerjee A., Berger P. Airway smooth muscle in asthma. Just a target for Broncodilation?. *Clinics In Chest Medicine*. 2012, 33: 543–558.
3. Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. Rang y Dale Farmacología, 6a ed., España, Edit. Elsevier, 2008.
4. Thirstrup S. Control of airway smooth muscle tone: II-Pharmacology of relaxation. *Respiratory Medicine*. 2000, 94: 519–528.
5. Philippe L., Laviolette M., Boucher S., Knight A., Hébert J., Chapman K. A twelve-week comparison of salmeterol and salbutamol in the treatment of mild-to-moderate asthma: A Canadian multicenter study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1997, 99: 13–21.
6. Glucocorticoides para el tratamiento de asma, mecanismo de acción y deficiencias en el crecimiento infantil, vínculo disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/res/vol12\\_4\\_99/res04499.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/res/vol12_4_99/res04499.htm), consultado el 4 de agosto de 2015.
7. Qiu S., Sun H., Zhang A., Xu H., Yan G., Han Y., Wang X. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2014, 12: 401–406.
8. Brahmachari G., Gorai D., Roy R. *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013, 23: 559–575.

9. Sánchez-Mendoza M., Castillo-Henkel C., Navarrete A. Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in the guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008, 60: 229–236.
10. Hernández C. Identificación de los subtipos de receptores muscarínicos implicados en la acción antagonista de berberina sobre músculo liso de tráquea de cobayo. Tesis de licenciatura, UNAM; Facultad de Química, 2014. México.
11. Redlarski G., Jaworski J. A new approach to modeling of selected human respiratory system diseases, directed to computer simulations. *Computers in Biology and Medicine*. 2013, 43: 1606–1613.
12. BéruBé K., Prytherch Z., Job C., Huges T. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*. 2010, 278: 311–318.
13. Mitchell H. Airway smooth muscle contraction – Perspectives on past, present and future. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009, 22: 363–369.
14. Rydell-Törmänen K., Risse P., Kanabar V., Bagchi R., Czubyrt M., Johnson J. Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: Airways and arteries. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 26: 13–23.
15. Finkbeiber W. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respiratory Physiology*. 1999, 158: S123–S132.
16. Suarez C., Dintzis S., Frevert C. 9 – Respiratory. *Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas*. 2012, 121–134.
17. Racké K., Juergens U., Matthiesen S. Control by cholinergic mechanism. *European Journal of Pharmacology*. 2006, 533: 57–68.

18. Roux E., Molimard M. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *General Pharmacology*. 1998, 31: 349–356.
19. Deshpade D., Pen R. Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cellular Signalling*. 2006, 18: 2105–2120.
20. Beech D. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997, 73: 91–119.
21. Yang Z., Biggs D. Muscarinic receptors and parasympathetic neurotransmission in guinea-pig trachea. *European Journal of Pharmacology*. 1991, 193: 301–308.
22. Billington C., Ojo O., Penn R., Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 26: 112–120.
23. Billington C., Penn R. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*. 2003, 4: 1–23.
24. Hamad A., Clayton A., Islam B., Knox A. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003, 285: L973–L983.
25. Seifert R., Lushington G., Mou T. Gille A., Sprang S. Inhibitors of membranous adenylyl cyclases. *Trends in Pharmacology Sciences*. 2012, 33: 64–78.
26. Wohlsen A., Hirrlinger A., Tenor H., Marx D., Beume R. Effect of cyclic AMP-elevating agents on airway ciliary beat frequency in central and lateral airways in rat precision-cut lung slices. *European Journal of Pharmacology*. 2010, 635: 177–183.

27. Pavan B., Biondi C., Dalpiaz A. Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discovery Today*. 2009, 14: 982–991.
28. Hurley J. The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*. 1998, 8: 770–777.
29. Haslam R., Davidson M., Desjardins J. Inhibition of Adenylate Cyclase by Adenosine Analogues in Preparations of Broken and Intact Human Platelets. *Biochemical Journal*. 1978, 176: 83–95.
30. Billington C., Hall I. Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease. *British Journal of Pharmacology*. 2012, 166: 401–410.
31. Thirstrup S., Dahl R., Nielsen-Kudsk F. Interaction between prostaglandins and selective phosphodiesterase inhibitors in isolated guinea-pig trachea in vitro. *European Journal of Pharmacology*. 1997, 333: 215–221.
32. Gresele, P., Momi, S., Falcinelli, E., Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011, 72: 634–646.
33. Yokoba M., Ichikawa T., Takakura A., Ishii N., Kurosaki Y., Yamada Y., Tsukushi T., Masuda N., Easton P., Katagiri M. Aminophylline increases respiratory muscle activity during hypercapnia in humans. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2015, 30: 96–101.
34. Neame M., Aragon O., Fernandes R., Sinha I. Salbutamol or aminophylline for acute severe asthma: how to choose which one, when and why?. *Archives of Disease in Childhood – Education and Practice Journal*. 2015, 100: 215–222.

35. Tey S., Lee W., Lee P., Lu C., Chen H. Neurodevelopmental Outcomes in Very Low Birth Weight Infants Using Aminophylline for the Treatment of Apnea. *Pediatrics and Neonatology*. Article in press, 1–6.
36. Dalabih A., Bondi S., Harris Z., Saville B., Wang W., Arnold D. Aminophylline infusion for status asthmaticus in the pediatric critical care unit setting is independently associated with increased length of stay and time for symptom improvement. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2014, 27: 57–61.
37. Henriksson, K., Lisius, A., Sjö, P., Storm, P., Novel 5,6-Dihydropyrazolo[3,4-E][L,4]Diazepin-4 (IH) -One Derivatives for the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. US Patent & Trademark Office, Patent Application Full Text and Image Database. 2009, vínculo disponible en: <http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?p=1&u=%2Fmetahtml%2FPTO%2Fsearch-adv.html&r=1&f=G&l=50&d=PG01&s1=20090054413.PN.&OS=PN/20090054413&RS=PN/20090054413> consultada el 22 julio 2014.
38. Yang N., Liang B., Srivastava K., Zeng J., Zhan J., Brown L., Sampson H., Goldfarb J., Emala C., Li X. The *Sophora flavescens* flavonoid compound trifolirhizin inhibits acetylcholine induced airway smooth muscle contraction. *Phytochemistry*. 2013, 96: 259–267.
39. Li C., Xi Y., Li S., Zhao Q., Cheng W., Wang Z., Zhong J., Niu X., Chen G. Berberine ameliorates TNBS induced by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation. *Molecular immunology*. 2015, 67: 444–454.
40. Abdel-Haq H., Cometa M., Palmery M., Leone M., Silvestrini B., Saso L. Relaxant effects of *Hydrastis canadensis* L. and its major alkaloids on guinea pig isolated trachea. *Pharmacology & Toxicology*. 2000, 87: 218–222.

41. Patil S., Tawari S., Mudhada D., Nadeem S. Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2015, 136: 13–20.
42. Kulkarni S., Dhir A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride. *European Journal of Pharmacology*. 2008, 589: 163–172.
43. Hsu Y., Tseng Y., Lo Y. Berberine, a natural antidiabetes drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth. *Molecular Immunology*. 2013, 272: 787–796.
44. Gali-Muhtasib H., Hmadi R., Kareh M., Tohme R., Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis. An International Journal on Programmed Cell Death*. 2015, 20: 1531–1562.
45. Hua Z., Wang X. Inhibitory effect of berberine on potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1994, 29: 576–580.
46. Wang Y., Zheng Y., Zhou X. Inhibitory effects of berberine on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes. *European Journal of Pharmacology*. 1996, 326: 307–315.
47. Drug bank de Canadá para glibenclamida, vínculo disónible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01016> consultada el 5 de noviembre de 2015.
48. Fischer A., Folkerts G., Geppetti P., Groneberg D. Pharmacology and Therapeutic mediators of asthma: Nitric oxide. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2002, 15: 73–81.

49. Yu Y., Hao G., Zhang Q., Hua W., Wang M., Zhou W., Zong S., Huang M., Wen X. Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways. *Biochemical Pharmacology*. 2015,
50. Wu D., Wen W., Qi C., Zhao R., Lü J., Zhong C., Chen Y. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Phytomedicine*. 2012, 19: 712–718.
51. Jiang S., Dong H., Li J., Xu L., Zou X., Wang K., Lu F., Yi P. Berberine inhibits hepatic gluconeogenesis via the LKB1-AMPK-TORC2 signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, 21: 7777–7785.
52. Jahnke G., Price C., Marr M., Myers C., George J. Developmental Toxicity Evaluation of Berberine in Rats and Mice, Wiley-Liss, Inc. *Birth Defects Research (Part B)*, 2006, 77: 195–206.
53. Upton R. Goldenseal root. *Hydrastasis Canadensis.*, Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopeia, 2001.
54. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer Jr. EE, Brice MD, Rodgers JR, et al. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *Journal of Molecular Biology*. 1977. 112: 535–542.
55. Huebner M, Mou T.-C., Sprang SR, Seifert R. Complex of GS-alpha with the catalytic domains of mammalian adenylyl cyclase: complex with MANT-ITP and Mn. *In press*.
56. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, 25 (13): 1605–1612.

57. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009. 30 (16): 2785–2791.
58. Spartan'02, Wavefunction & Q-Chem, Windows, 2002.
59. Cok A., Plaiser C., Salie M., Oram D., Chenge J., Louters L. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1. *Biochimie*. 2011, 93 (7): 1187–1192.
60. Xu M., Xiao Y., Yin J., Hou W., Yu X., Shen L., Liu F., Wei L., Jia W. Berberine Promotes Glucose Consumption Independently of AMP-Activated Protein Kinase Activation. *PLOS ONE*. 2014, 9 (7): e103702. Doi:10.1371.
61. Lu J., Cao Y., Cheng K., Xu B., Wang T., Yang Q., Yang Q., Feng X., Xia Q. Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status. *Experimental cell research*. 2015, 334: 194–206.
62. Inagaki N., Inagaki H. Drug for the treatment of allergic diseases. *Japanese Journal of Pharmacology*. 2001, 86: 275–280.

### 13. Anexo



## CERTIFICADO DE SALUD Y CALIDAD

CLIENTE: UNAM  
FECHA: 26 de Octubre de 2015

No.	Descripción/Especie	Sexo	Peso
3	Cobayos Hartley	Macho	250-350 grs

ESTATUS AMBIENTAL: Animales nacidos, criados y mantenidos en instalaciones con condiciones controladas: control de luz 12:12, ruido que no excede los 85 db, temperatura controlada mantenida entre 19-23°C, humedad relativa mantenida entre 40-70%, ventilación entre 15 y 18 vca/h, alimentación con Lab Diet Guinea Pig, el material de cama es autoclaveado, agua filtrada por ósmosis inversa y baja en sales.

ESTATUS SANITARIO: Animales clínicamente sanos, los animales se encuentran libres de ecto y endoparásitos y bacterias patógenas para la especie. No se han presentado signos de enfermedades en los últimos 6 meses.

MVZ Carlos G. Escamilla W. Ced. Prof.1107143

FIRMA:

Vigencia por 72 horas a la recepción de animales

## CONSTANCIA

El que suscribe hace constar que el Protocolo de Investigación:

**"EFECTO BRONCORRELAJANTE DE GNAFALIINA A Y B EN COMBINACIÓN  
CON SALBUTAMOL Y BROMURO DE IPRATROPIO EN TRÁQUEA AISLADA  
DE COBAYO"**

Propuesto ante el Comité de Bioética, por el:

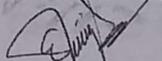
**DR. FERNANDO RODRÍGUEZ RAMOS**

El presente proyecto recibe una opinión favorable por parte del Comité de Bioética, por considerarlo seguro en el sentido de que las instalaciones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación cuenta con las condiciones de Bioseguridad para el desarrollo del mismo, además no implica ningún daño a los participantes, terceras personas, ni al medio ambiente en general.

Se emite este Acuerdo dentro del marco de la reunión del Comité de Bioética celebrada el día miércoles 30 de septiembre del 2015. (No. de registro: ENMH-CB-149 -2015).

Se extiende la presente, para los fines legales que al(a) interesado(a) convengan, al día 16 del mes de octubre del año Dos Mil Quince.

ATENTAMENTE  
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"



**DRA. VICTORINA ELIZABETH JIMENEZ SÁNCHEZ**  
**PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA**

COMITÉ DE BIOÉTICA

"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019"

"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2011/2016"

Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México, D.F.

Tels. 57-29-60-00 ext. 55512

E-mail: [cnmh@ipn.mx](mailto:cnmh@ipn.mx)

Bhm)