



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

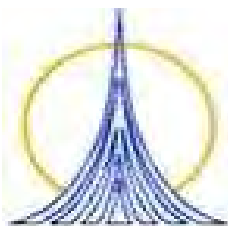
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“Evaluación de la actividad relajante de *Crataegus*  
*mexicana* en anillos de tráquea aislada de cobayo”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:  
SILES BARRIOS DIANA MARIA GUADALUPE

Director: Dra. María Elena Sánchez  
Mendoza

Asesor: Dr. Benito Reyes Trejo



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

A la **Dra. María Elena Sánchez Mendoza.**, por compartir tanto sus conocimientos, amistad, tiempo y paciencia.

Al **Dr. Jesus Arrieta Valencia.**, por su valioso apoyo, comentarios y amistad.

Al **Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez.**, por sus comentarios y consejos en desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Benito Reyes Trejo.**, por sus comentarios y amistad.

A mis sinodales por las observaciones y consejos para hacer de este un mejor trabajo.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

Odilón Siles y Anita Barrios por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi vida, por los consejos, enseñanzas y fe, que de ellos aprendí ya que gracias a eso he podido lograr muchos objetivos en mi vida.

### **A MIS HERMANOS**

David, Rafael, José, Efraín y Anita, por que siempre me han apoyado en todos los momentos de mi vida, por su ayuda incondicional y su amor.

**A MI TÍA** Martha Siles por todo su apoyo y cariño.

**A** Julio C. García, por todos los buenos momentos que he pasado a su lado y principalmente por brindarme su cariño y haberme regalado al principal amor de mi vida mi hijo Gabriel.

### **A MIS AMIGOS**

Mireya, Lucy, Karen, Juanita y Daniel por sus consejos y apoyo que me han brindado desde que los conozco.

**Al** Dr. Jesús A. y a la Dra. Elena Sánchez por haberme enseñado que todo debe realizarse de la mejor manera posible y por los buenos momentos que pase aprendiendo de ellos.

*"Si quieres conocer a una persona, no le preguntes lo que piensa sino lo que ama."*

*San Agustín de Hipona.*

# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE CUADROS .....	IV
LISTA DE ESQUEMAS.....	V
LISTA DE GRÁFICAS.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	2
2.1. APARATO RESPIRATORIO .....	2
2.2. EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS.....	3
2.2.1. Inervación colinérgica.....	4
2.2.2. Inervación adrenérgica.....	5
2.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica (NANC) .....	5
2.3. BRONCOCONSTRICCIÓN.....	5
2.3.1. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gq.....	6
2.3.2. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gi.....	7
2.4. BRONCORRELAJACIÓN.....	8
2.4.1. Broncorrelajación a través de los receptores acoplados a proteína Gs.....	8
2.4.2. Broncorrelajación a través de la enzima guanilil ciclasa .....	9
2.4.2.1. Guanilil ciclasa soluble.....	9
2.4.2.2. Guanilil cilelasa particulada.....	9
2.4.3. Inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos .....	10
2.4.4. Broncorrelajación relacionada con influencia sobre canales iónicos.....	10
2.4.4.1. Canales de calcio .....	10
2.4.4.2. Canales de potasio.....	11
2.4.4.2.1. Canales de K <sup>+</sup> activados por calcio .....	11
2.4.4.2.2. Canales de K <sup>+</sup> rectificador tardío.....	11
2.4.4.2.3. Canales de K <sup>+</sup> sensibles a ATP .....	12
2.5. FARMACOS BRONCODILATADORES .....	12
2.5.1. Fármacos que bloquean el efecto de mediadores contráctiles.....	12
2.5.1.1. Anticolinérgicos .....	12
2.5.1.2. Antihistamínicos.....	13
2.5.1.3. Fármacos anti-leucotrienos.....	14
2.5.1.4. Glucocorticoides.....	14
2.5.2. Fármacos relajantes.....	15

2.5.2.1. $\beta_2$ Adrenérgicos .....	15
2.5.2.2. Inhibidores de fosfodiesterasas.....	15
2.5.2.3. Canales de $K^+$ .....	16
2.5.2.4. Canales de $K^+$ sensibles a ATP.....	16
2.6. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS .....	17
2.7. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN MÉXICO.....	18
2.8. GÉNERO <i>Crataegus</i> .....	19
2.8.1. Usos del género <i>Crataegus</i> .....	19
2.8.2. Información etnomédica de <i>Crataegus sp.</i> en México.....	21
2.8.3. Estudios químicos .....	21
2.8.4. Estudios de actividad biológica del género <i>Crataegus</i> .....	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. OBJETIVO GENERAL .....	25
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
VI. METODOLOGÍA .....	26
6.1. Material vegetal.....	26
6.2. Preparación de los extractos .....	26
6.3. Estudio biodirigido.....	26
6.4. Material biológico .....	29
6.5. Fármacos y extractos .....	29
6.6. Ensayos biológicos .....	30
6.6.1. Disección de la tráquea y montaje de la preparación .....	30
6.6.2. Evaluación del efecto relajante de los extractos y fracciones de <i>Crataegus</i> <i>mexicana</i> .....	31
6.6.3. Evaluación del efecto relajante del extracto mas activo en tejidos precontraídos con diferentes agonistas.....	31
6.6.4. Evaluación de la participación de receptores $\beta$ -adrenérgicos, y de canales de $K^+_{ATP}$ , en el efecto relajante de la fracción F3' .....	31
VII. ESTADÍSTICA .....	32
VIII. RESULTADOS .....	33
8.1. Evaluación del efecto relajante de los extractos de hexano, cloruro de metileno y metanol de <i>Crataegus mexicana</i> .....	33

8.2. Evaluación del efecto relajante del extracto de hexano de <i>Crataegus mexicana</i> sobre las precontracciones inducidas por carbacol, histamina y KCl.....	33
8.3. Evaluación del efecto relajante de las fracciones del extracto hexánico de hojas de <i>Crataegus mexicana</i> .....	38
8.4. Evaluación de la participación de receptores $\beta_2$ -adrenérgicos y de canales de $K^+_{ATP}$ .....	43
IX. DISCUSIÓN .....	47
9.1. Evaluación del efecto relajante de los extractos de <i>Crataegus mexicana</i> .....	47
9.2. Evaluación del efecto relajante del extracto de hexano de <i>Crataegus mexicana</i> sobre las precontracciones inducidas por carbacol, histamina y KCl.....	48
9.3. Evaluación de la participación de receptores $\beta_2$ -adrenérgicos y de canales de $K^+_{ATP}$ .....	49
X. CONCLUSIONES .....	50
XI. PERSPECTIVAS .....	51
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	52
ANEXO.....	59



## ABREVIATURAS

---

A	Adenosina
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilil ciclase
AMPc	3', 5'- monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
B2	Receptores de bradicinina
BKCa <sup>++</sup>	Canales de alta conductancia a potasio
Ca <sup>++</sup> V	Canales de calcio voltaje dependientes
CE50	Concentración efectiva 50
Cyslti	Cysteinil leucotrienos
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEM	Error estándar de la media
EPOC	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas
ET-A	Endotelina
Emáx	Efecto máximo
Gi	Proteína G inhibidora
GMPc	3', 5'- monofosfato cíclico de guanosina
Gs	Proteína G estimulante
Gc	Guanilil ciclase
GTP	Trifosfato de guanosina

GCs	Canales de calcio operados por voltaje
GCP	Guanilil ciclasa soluble
IP3	Guanilil ciclasa particulada
$K^+_{Ca}$	1, 4, 5 trifosfato de inositol
$K^+_{ATP}$	Canales de potasio activados por calcio
ML	Canales de potasio sensibles a ATP
MLA	Músculo liso
MLCK	Músculo liso de las vías aéreas
MAPK	Cinasas de las cadenas ligeras de miosina
NANC	Proteína cinasa activada por mitógeno
NK	No adrenérgico no colinérgico
ON	Neurocinina
PLA <sub>2</sub>	Óxido nítrico
PLC	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC <sub>β</sub>	Fosfolipasa C
PIP2	Fosfolipasa C <sub>β</sub>
PGE	Fosfoinositol 4, 5- difosfato
PKC	Prostaglandinas
PKA	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa A
PNA	Proteína cinasa G
PDEs	Péptido natriurético auricular
ROC	Fosfodiesterasas

VOC

Canales de calcio operados por receptor

## LISTA DE CUADROS

---

Cuadro 1. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades respiratorias.....	20
Cuadro 2. Valores de % E <sub>max</sub> , CE <sub>50</sub> ó CE <sub>30</sub> del extracto hexánico en las contracciones inducidas con carbacol, histamina y KCl .....	36
Cuadro 3. Valores de %E <sub>máx</sub> y CE <sub>30</sub> de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto hexánico .....	40
Cuadro 4. Valores de % E <sub>máx</sub> y de CE <sub>50</sub> del fraccionamiento de F3 .....	42
Cuadro 5. Valores de % E <sub>máx</sub> y de CE <sub>50</sub> de F3' en ausencia y presencia de propranolol.....	45

# LISTA DE ESQUEMAS

---

Esquema 1. Obtención de extractos apartir de hojas de <i>Crataegus mexicana</i> .....	27
Esquema 2. Fraccionamiento del extracto hexánico obtenido apartir de hojas de <i>Crataegus mexicana</i> .....	28
Esquema 3. Fraccionamiento cromatográfico de F2 .....	28
Esquema 4. Fraccionamiento cromatográfico de F3.....	29

## LISTA DE GRAFICAS

---

Grafica 1. Efecto relajante de los extractos de hexano, metanol y diclorometano de <i>Crataegus mexicana</i> .....	34
Grafica 2. Efecto relajante del extracto de hexano de <i>Crataegus mexicana</i> en anillos de tráquea de cobayo precontraídos con carbacol, histamina y KCl. ....	35
Grafica 3. Efecto relajante de salbutamol en anillos de tráquea de cobayo precontraídos con carbacol, histamina y KCl .....	37
Grafica 4. Efecto relajante de las fracciones obtenidas de la percolación del extracto de hexano de <i>Crataegus mexicana</i> .....	39
Grafica 5. Efecto relajante de las fracciones obtenidas de la percolación de la fracción 9:1 obtenida de la percolación del extracto hexánico de <i>Crataegus mexicana</i> .....	41
Grafica 6. Evaluación del efecto relajante de la fracción activa más propranolol y fracción activa; salbutamol y salbutamol más propranolol .....	44
Grafica 7. Evaluación del efecto relajante de la fracción activa de <i>Crataegus mexicana</i> en presencia y ausencia de glibenclamida .....	46

## I. INTRODUCCIÓN

Entre los padecimientos más frecuentes que presenta la población mexicana, se encuentran las enfermedades respiratorias agudas. En los últimos seis años han ocupado el primer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad en la República Mexicana, mientras que el asma y estado asmático ocupan el lugar número 15 (SUIVE/DGAE/SSA 2007, 2009).

En la actualidad, aunque existen diversos fármacos para el tratamiento de las enfermedades respiratorias, un elevado porcentaje de la población sigue recurriendo a la medicina tradicional, ya sea en forma complementaria o como alternativa para resolver sus problemas de salud (Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

En nuestro país, se tiene el registro de al menos 36 plantas para el tratamiento de padecimientos respiratorios, entre las cuales se encuentra *Crataegus mexicana*, que de manera popular se conoce como tejocote. No obstante, el uso que se le da, no existen estudios que respalden dicha utilidad. Considerando lo anterior, el presente proyecto estuvo encaminado a efectuar un estudio biodirigido de la actividad relajante de *Crataegus mexicana* utilizando el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo. Dicho estudio, permitió llegar a una fracción de máxima actividad, que fue analizada por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, la cual muestra la separación de 14 picos que indica que al menos 14 compuestos se encuentran presentes en dicha fracción, la caracterización de los mismos está en proceso de estudio.

Adicionalmente, se trató de elucidar si el mecanismo de acción relajante, es a través de la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o modulando la actividad de canales de potasio dependientes de ATP.

## II. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. APARATO RESPIRATORIO

Gracias al aparato respiratorio, la sangre se oxigena y el dióxido de carbono se elimina. El aparato respiratorio comprende: 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, en los cuales se producen los intercambios gaseosos (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 expirado. 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 varía sensiblemente de un punto a otro (Rouviere y Delmas, 1999).

La longitud de la tráquea varía 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 estructuras anatómicas más importantes de la vía aérea desde el punto de vista farmacológico, son el músculo liso, el epitelio ciliado y las glándulas bronquiales. El músculo liso involuntario frecuentemente sufre de modo inapropiado constricción grave en 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 (Latarjet y Ruiz, 1995).

La submucosa es la capa de tejido conectivo vascular que se encuentra debajo del epitelio, contiene glándulas bronquiales especializadas, compuestas por dos tipos de células secretoras, serosas y mucosas. La función principal de las glándulas traqueobronqueales es la producción de mucina que ayuda a formar





una barrera protectora entre el epitelio de las vías aéreas y el medio ambiente. El control de la secreción de las vías aéreas es principalmente a través del sistema nervioso autónomo, el cual es colinérgico, adrenérgico, no adrenérgico y no colinérgico (Finkbeiner, 1999). El calibre de las vías aéreas esta determinado no solamente por el tono del músculo liso, sino también depende de la profundidad de la submucosa así como de las secreciones lumbinales. Además, en las vías aéreas de los humanos existe una distribución variable de algunos receptores, tal es el caso de los receptores para el péptido intestinal vaso activo (VIP) que se localizan con una alta densidad en las vías aéreas proximales y poco en las distales, en tanto que los receptores para taquicininas son más importantes en las vías aéreas distales. Asimismo existe una diferencia en la respuesta secretora y proliferativa a un estímulo tanto en las vías aéreas pequeñas como en las largas (Barnes, 1998).

## 2.2. EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

El músculo liso de las vías aéreas (MLA), es un importante tejido involucrado en la regulación del tono broncomotor que existe desde la tráquea hasta los bronquiolos (Amrani y Panttieri, 2003). Dicho tono, está regulado por nervios parasimpáticos, nervios simpáticos y nervios no adrenérgicos no colinérgicos, así como por la adrenalina circulante.

El MLA recibe inervación parasimpática a través del nervio vago (X par craneal), que al ser estimulado libera acetilcolina hacia los ganglios, en los cuales se inicia un proceso de despolarización, se libera acetilcolina y esta actúa sobre los receptores muscarínicos.

La inervación simpática, la recibe mediante las fibras nerviosas simpáticas que emergen de la médula espinal, activando a las fibras nerviosas postganglionares. En el ser humano, las fibras simpáticas inervan las glándulas submucosas, vasos sanguíneos y ganglios parasimpáticos, pero no inervan el músculo liso de las vías aéreas, sin embargo a pesar de la ausencia de la inervación simpática se tienen receptores adrenérgicos a través del pulmón (Page, Curtis, Hoffman. 1998).

La llamada «tercera vía nerviosa», no adrenérgica no colinérgica, está constituida por los neurotransmisores: óxido nítrico y polipéptido intestinal vaso activo (VIP) que producen relajación muscular y broncodilatación (Page, Curtis, Hoffman. 1998).

### 2.2.1. Inervación colinérgica

Las vías aéreas del ser humano, reciben una importante inervación colinérgica. La liberación de acetilcolina regula el tono de las vías aéreas, ocasionando contracción del músculo liso y secreción de moco, a través de la interacción con receptores muscarínicos de acetilcolina localizados en músculo liso bronquial, glándulas y vasculatura pulmonar (Belmonte, 2005). El MLA contiene dos tipos de receptores muscarínicos el  $M_2$  y el  $M_3$  (Belmonte, 2005; Gosens *et al.*, 2006).

Se ha establecido que la estimulación de los receptores muscarínicos  $M_3$  provoca la contracción del músculo liso, sin embargo la función de los del tipo  $M_2$ , no es totalmente clara. Algunos estudios plantean que la estimulación de los receptores  $M_2$  en músculo liso de vías aéreas, lleva a una inhibición de la activación de la adenilil ciclasa, lo que resulta en una disminución de los niveles de AMPc (Fryer y Jacoby, 1998), otros estudios proporcionan evidencia del papel contráctil de los receptores  $M_2$  cuando los receptores  $M_3$  están bloqueados (Ehlert, 2003; Walker *et al.*, 2004) y otros reportes han sugerido que desempeñan dos papeles: a corto plazo efectúan una inhibición de la enzima adenilil ciclasa y a largo plazo, regulan la alta expresión de esta enzima contrarrestando con ello, la acción de los agonistas de los receptores  $M_3$  acoplados a la fosfolipasa C (Hall, 2000; Michal *et al.*, 2001; Mistry *et al.*, 2005). En tanto que en los nervios parasimpáticos los receptores  $M_2$  actúan como auto receptores, inhibiendo la liberación de acetilcolina (Barnes, 1998; Thirstrup, 2000).

### 2.2.2. Inervación adrenérgica

La inervación adrenérgica de las vías aéreas de los seres humanos tiene una importancia funcional limitada con respecto a la broncodilatación, sin embargo la adrenalina liberada por la médula suprarrenal puede ejercer notable efecto relajante en ciertas circunstancias (Thirstrup, 2000; McGraw *et al.*, 2007). La activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos por norepinefrina se debe a los niveles de catecolaminas circulantes y no a una liberación directa de los nervios (Page, Curtis, Hoffman. 1998).

### 2.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica (NANC)

Se ha identificado que el péptido intestinal vaso activo (VIP) y el óxido nítrico (NO) son los transmisores que median la relajación NANC, en tanto que los probables candidatos del componente excitatorio del NANC son la capsaicina, taquicininas, sustancia P y neurocinina A (Thirstrup, 2000; Fischer *et al.*, 2002).

## 2.3. BRONCOCONSTRICCIÓN

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

El MLA puede ser contraído por agentes que estimulen directamente a receptores acoplados a proteínas G o a través de vías indirectas, que

involucran la liberación y/o síntesis de otros mediadores que actúan directamente (Thirstrup, 2000; Jassen y Killian, 2006; McGraw *et al.*, 2007). Entre los principales agentes contráctiles del músculo liso de las vías aéreas se encuentran: acetilcolina, adenosina, bradicinina, endotelina, histamina, leucotrienos, neuropéptidos, factor de activación plaquetaria, prostaglandinas, serotonina y tromboxano (Thirstrup, 2000).

### **2.3.1. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gq**

En el MLA existen receptores acoplados a proteínas Gq capaces de inducir contracción, entre los que se encuentran los receptores de acetilcolina ( $M_3$ ), histamina ( $H_1$ ), leucotrienos ( $CysLT_1$ ), endotelina (ET-A) y bradicinina ( $B_2$ ). Adicionalmente existen otros receptores tales como los de adenosina ( $A_3$ ), y neurocinina 1 y 2 (NK-1, NK-2 respectivamente) (Barnes, 1998; Aharony, 1998; Nicosia *et al.*, 2001; Billington y Penn, 2003; Anderson y Kippelen, 2008). Sin embargo, la importancia de estos últimos en la mediación de la contracción bajo condiciones fisiológicas o patológicas aún permanece incierta (Billington y Penn, 2003).

La señalización de estos receptores involucra la activación secuencial del receptor y del efector. Al unirse el agonista al receptor, este experimenta un cambio conformacional, con la subsiguiente activación de la subunidad  $\alpha$ , y la disociación de las subunidades  $\beta\gamma$ , la subunidad  $G_\alpha$  activa a la fosfolipasa C (PLC), que promueve la hidrólisis del 4,5-difosfato de fosfoinositol ( $PIP_2$ ) dando lugar a los segundos mensajeros intracelulares 1,2-diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ). El DAG activa a la cinasa C (PKC), que es capaz de fosforilar a numerosos sustratos incluyendo calponina, lo que resulta en la disociación de la actina, y con ello a la pérdida de la capacidad de inhibir a la actinmiosina ATPasa, favoreciendo la contracción. La PKC también fosforila intermediarios de la vía de señalización de la MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) lo cual activa varios factores de transcripción involucrados en promover el crecimiento de las vías aéreas. Los receptores acoplados a Gq también son capaces de activar al receptor de tirosina cinasas induciendo el

crecimiento del músculo liso de las vías aéreas. Por otra parte, tanto la PKC como intermediarios de la  $MAPK_{p43/p44}$  fosforilan y estimulan la actividad catalítica de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), que libera ácido araquidónico (AA). El otro producto de la hidrólisis de  $PIP_2$ , el  $IP_3$  se une a un receptor del retículo sarcoplásmico, la activación de estos receptores resulta en la apertura de canales de calcio y el flujo de este hacia el citosol. El incremento de calcio libre intracelular, promueve la unión de calcio a calmodulina formando un complejo que activa a las cinasas de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), la fosforilación de las cadenas de miosina, permite la unión con actina y la activación de miosina ATPasa requerida para la contracción (Hall, 2000; Thirstrup, 2000; Billington y Penn, 2003; Batra *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gi**

El MLA de los humanos expresa receptores muscarínicos ( $M_2$ ), de serotonina ( $5-HT_{2c}$ ) y de adenosina ( $A_1$ ) los cuales están acoplados a proteínas G inhibitorias  $G_i$  (Barnes, 1998; Hall, 2000; Jacoby y Fryer, 2001; Billington y Penn, 2003). Estos receptores tienen la capacidad de iniciar o modular la señalización a través de acciones derivadas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . Al disociarse  $G_{\alpha i}$  del complejo heterotrimérico se une a la adenilil ciclasa (AC) V y VI actuando como un modulador negativo de la señalización inducida por  $G_{\alpha s}$ . Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  modulan la actividad de AC, inhibiendo la AC tipo I, pero incrementa la activación inducida de AC II, IV y VII. Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  también pueden activar la fosfolipasa  $C_\beta$  ( $PLC_\beta$ ) resultando la generación de fosfoinosítidos, activación de PKC vía DAG y movilización de calcio. La activación del receptor acoplado a  $G_i$  también puede promover el crecimiento del músculo liso de las vías aéreas (Hall, 2000; Billington y Penn, 2003).

## 2.4. BRONCORRELAJACIÓN

Varias sustancias endógenas son relajantes del MLA y actúan ya sea activando receptores o liberando broncodilatadores endógenos (Barnes, 1998). Los principales mediadores relajantes del MLA son: epinefrina, prostaglandina E<sub>2</sub>, péptido intestinal vasoactivo, prostaciclina, péptido natriurético auricular, y óxido nítrico (Barnes, 1998).

El proceso de relajación a través de las diferentes vías de señalización finalmente tiende a reducir las concentraciones de calcio libre intracelular y/o afectan la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles. Para ello existen cuatro mecanismos celulares principales mediante los cuales actúan los relajantes del músculo liso de las vías aéreas; estos son a través del: a) incremento del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina AMPc; b) aumento del 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina GMPc; c) inhibición del rompimiento de los nucleótidos cíclicos y d) modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana celular (Thirstrup, 2000).

### 2.4.1. Broncorrelajación a través de los receptores acoplados a proteína Gs

Los receptores acoplados a Gs en el MLA son activados por agentes endógenos como las catecolaminas ( $\beta_2$ -adrenérgicos), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), adenosina (A<sub>2b</sub>) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Barnes, 1998; Hall, 2000; Billington y Penn, 2003). La activación de Gs activa a la adenilil ciclasa (AC) (Billington y Penn, 2003). La activación de la AC cataliza la formación de AMPc a partir del ATP citoplasmático, la función principal del AMPc es activar a la proteína cinasa A (PKA). La PKA puede fosforilar varias proteínas intracelulares en residuos específicos de serina y treonina (Barnes, 1998), lo que lleva a la inactivación de las MLCK (Batra *et al.*, 2007). Asimismo la PKA fosforila ciertos canales de K<sup>+</sup> los cuales se abren permitiendo un flujo de potasio con la consiguiente hiperpolarización (Barnes, 1998). También fosforila el factor de transcripción CREB, activa la señalización vía tirosin cinasas y regula la transcripción de numerosos genes (Billington y Penn, 2003).

## 2.4.2. Broncorrelajación a través de la enzima Guanilil ciclasa

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

### 2.4.2.1. Guanilil ciclasa soluble

La guanilil ciclasa es una enzima heterodimérica que contiene una subunidad larga  $\alpha$  y una pequeña  $\beta$ . Es activada por el óxido nítrico (NO) endógeno y por los nitrovasodilatadores. El NO ejerce su efecto relajante por el incremento de GMPc (Mullershausen *et al.*, 2006) y, además se ha sugerido que en el músculo liso de las vías aéreas activa directamente canales  $BKCa^{++}$  (alta conductancia a potasio), oxida proteínas contráctiles intracelulares (tales como las cabezas de miosina o proteínas reguladoras involucradas en la contracción) y disminuye la sensibilidad al calcio intracelular (Hamad *et al.*, 2003). Dependiendo del sitio de generación y de la cantidad, el NO presenta muchos efectos sobre las funciones de las vías aéreas en condiciones fisiológicas o patológicas (Fischer *et al.*, 2002; Hamad *et al.*, 2003) entre las que se encuentran el ejercer un efecto vasodilatador bronquial, presentar un efecto inmunoprotector, estimular la secreción de moco y la formación de radicales libres (Mullershausen *et al.*, 2006) Asimismo, el NO desempeña un papel importante como vía parácrina, mediando los efectos relajantes de bradicinina y endotelina (Fischer *et al.*, 2002).

### 2.4.2.2. Guanilil ciclasa particulada

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

PNA es producido principalmente en el corazón, pero es liberado en otros tejidos incluyendo a los pulmones. En las vías aéreas sus sitios de unión se han detectado tanto en músculo liso como en el epitelio. El PNA actúa a través de tres tipos de receptores PNAA, PNAB y PNAC, los primeros dos incorporan una parte de la enzima catalítica de la guanilil ciclasa particulada y el último esta acoplado a la inhibición de adenilil ciclasa (Devillier *et al.*, 2001).

### **2.4.3. Inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos**

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

### **2.4.4. Broncorrelajación relacionada con influencia sobre canales iónicos**

#### **2.4.4.1. Canales de calcio**

En el MLA existen canales de calcio operados por voltaje (VOC) y canales de calcio operados por receptor (ROC), cuya apertura permite el incremento



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

#### **2.4.4.2. Canales de potasio**

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

##### **2.4.4.2.1. Canales de $K^+$ activados por calcio**

Existen varios canales de  $K^+$  activados por calcio los cuáles se clasifican de acuerdo a la conductancia del canal. De este modo se tienen canales de alta conductancia (maxi-KCa), de conductancia intermedia (IKCa) y de baja conductancia (SKCa), pero los más importantes son los maxi-K, que son abiertos tanto por una despolarización de la membrana como por el incremento de las concentraciones de calcio del citosol (Pelaia *et al.*, 2002).

##### **2.4.4.2.2. Canales de $K^+$ rectificador tardío**

Los canales de  $K^+$  rectificador tardío, son dependientes de voltaje e independientes de calcio, por lo cual responden a una despolarización de la

membrana y contribuyen significativamente al potencial de reposo de la misma (Pelaia *et al.*, 2002).

#### **2.4.4.2.3. Canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP**

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

### **2.5. FÁRMACOS BRONCODILATADORES**

Los fármacos broncodilatadores pueden dividirse en dos grupos dependiendo del mecanismo farmacológico responsable de la actividad relajante. El primer grupo comprende a los fármacos que bloquean el efecto de agonistas contráctiles (tales como anti-colinérgicos, anti-leucotrienos e inhibidores de 5-lipooxigenasas) y el segundo grupo comprende fármacos que actúan directamente como relajantes del músculo liso de las vías aéreas a través de la liberación de AMPc, GMPC, inhibición de la degradación de los nucleótidos cíclicos y/o modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana celular (Thirstrup, 2000).

#### **2.5.1. Fármacos que bloquean el efecto de mediadores contráctiles**

##### **2.5.1.1. Anticolinérgicos**

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

Los anticolinérgicos producen broncodilatación al fijarse a receptores muscarínicos del músculo liso de las vías respiratorias, mecanismo por el cual antagonizan a la acetilcolina liberada por las terminaciones parasimpáticas del nervio vago. Por tanto, los anticolinérgicos no impiden todos los tipos de broncoespasmo, si no que son particularmente eficaces frente a las alteraciones de la función respiratoria inducidas por irritantes. Los antagonistas muscarínicos también disminuyen la secreción de moco (Page, Curtis, Hoffman. 1998).

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

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

### 2.5.1.2. Antihistamínicos

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

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

#### **2.5.1.3. Fármacos anti-leucotrienos**

Los leucotrienos son potentes broncoconstrictores, que se forman a partir del metabolismo del ácido araquidónico vía 5-lipoxigenasa. Para inhibir su acción, se han desarrollado diferentes fármacos, como el zileuton, que actúa inhibiendo su síntesis, al inhibir a la enzima 5-lipoxigenasa, así como también fármacos antagonistas competitivos selectivos de los cisteinil leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, y LTE<sub>4</sub> tales como pranlukast, montelukast y zafirlukast, que han mostrado utilidad en el tratamiento del asma pero poco beneficio en pacientes con EPOC (Belvisi *et al.*, 2004; Donohue, 2004; Bossé *et al.*, 2009).

#### **2.5.1.4. Glucocorticoides**

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

## 2.5.2. Fármacos relajantes

### 2.5.2.1. $\beta_2$ – Adrenérgicos

Los agonistas de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos son los fármacos que se prescriben con mayor frecuencia para tratar el broncoespasmo del asma y están disponibles para su uso por vía inhalatoria (mediante distintos dispositivos dosificadores y nebulizadores) y también para uso por vía oral. Los agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos de acción corta, que se emplean para el alivio rápido del broncoespasmo, son el salbutamol (albuterol), la terbutalina y fenoterol. Son excelentes antagonistas funcionales de la broncoconstricción causada por una amplia gama de estímulos. Por otra parte, uno de sus inconvenientes es su corta semivida biológica (2-3 horas). Sin embargo, ya se han comercializado distintos agonistas de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos de acción larga que producen una broncodilatación efectiva que llega a durar 15 horas. Los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de acción larga son el salmeterol, el formoterol y el bambuterol. Se cree que la acción prolongada del salmeterol es debida a la presencia de una cola lipofílica larga, que se fija aun exoreceptor en la vecindad del receptor  $\beta_2$  adrenérgico del músculo liso de las vías respiratorias. Estos fármacos de acción larga se emplean con el objetivo de prevenir a largo plazo los ataques de asma, y son especialmente útiles para tratar el asma nocturna, pero no son recomendables para el alivio rápido de los síntomas, especialmente el salmeterol, por tener un inicio de acción retardado.

Los efectos adversos de los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos son temblor e hipopotasemia y cuando se administran en cantidades excesivas, taquicardia (Page, Curtis, Hoffman. 1998).

### 2.5.2.2. Inhibidores de fosfodiesterasas

El interés en estos compuestos nace del hecho de que durante muchos años se ha utilizado la teofilina en cuadros broncoconstrictivos, no obstante, en los países industrializados ocupa el tercer lugar como agente terapéutico ya que presenta alta frecuencia de efectos adversos en comparación con su baja

eficacia. Su mecanismo de acción broncodilatador es parcialmente explicado por la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE), lo que resulta en un incremento de los niveles de AMPc (al inhibir a las PDE III y PDE IV), y GMPc (al inhibir a la PDE V). La teofilina además actúa antagonizando a los receptores de adenosina (Kian, 2006; Spina, 2008).

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

### **2.5.2.3. Canales de K<sup>+</sup>**

El análisis de los canales de K<sup>+</sup> representa el punto de partida para el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas en el tratamiento del asma y de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Sería muy importante el desarrollo de fármacos de uso inhalatorio, más selectivos para actuar en las vías aéreas que en el músculo liso vascular, sin embargo, son limitados los estudios clínicos con fármacos que abran canales de K<sup>+</sup>. De los estudios clínicos realizados, cabe mencionar los efectuados con cromakalim con el que se observó que protegía contra la broncoconstricción inducida con histamina pero provoca dolor de cabeza. En tanto que bimakalim, no producía efectos cardiovasculares significativos, pero era incapaz de facilitar una broncodilatación en pacientes asmáticos (Pelaia *et al.*, 2002).

### **2.5.2.4. Canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP**

La actividad de los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP, es bloqueada selectivamente por derivados de la sulfonilurea, como la glibenclamida y son abiertos por fármacos como levromakalim y HOE234, los cuales son efectivos relajantes de las vías aéreas humanas in vitro. Sin embargo, tales fármacos se

han desaprobado en estudios clínicos, ya que son más potentes como vasodilatadores que como broncodilatadores pudiendo inducir efectos cardiovasculares (Barnes, 1998).

## 2.6. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

En el tratamiento de enfermedades respiratorias es frecuente el uso de la medicina alternativa o complementaria (Ziment, 2000), sobre todo en las de tipo crónico como lo es el asma, en cuyo tratamiento destaca el empleo de preparaciones herbales (Huntley y Ernst, 2000).

Los remedios herbolarios han tenido una importancia trascendental en el tratamiento del asma. Ejemplo de ello son los fármacos  $\beta_2$  adrenérgicos, anticolinérgicos, metilxantinas y cromonas que han tenido sus orígenes en el uso de plantas medicinales (Huntley y Ernst, 2000; Chu y Drazen, 2005). Razón por la que en la actualidad, se siguen las prácticas medicas tradicionales como fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos (Fabricant y Farnsworth, 2001). Dentro de las investigaciones realizadas con esta finalidad, se consideran las siguientes:

En un estudio realizado en América Latina, se evaluaron 460 plantas por sus propiedades antiasmáticas y de ellas solamente el ajo, la cebolla, el orégano, el timol y la ipecacuana resultaron ser efectivos expectorantes (Zimet, 2000).

En Alemania se comercializa un producto herbolario llamado Sinupret®, del cual existe evidencia científica de que es broncolítico y curativo de la bronquitis y la sinusitis.

En la medicina tradicional China se utilizan abundantes combinaciones de hierbas, una de las más utilizadas es el Ma huang (que contiene efedrina y pseudoefedrina), sin embargo, su uso no controlado ha resultado en cientos de arritmias, infarto al miocardio y psicosis. Otros remedios herbales utilizados en ese país son los ginsenósidos (extracto de *Panax ginseng*) bupléurum y picorriza de los cuáles se ha reportado que inducen relajación en músculo liso bronquial humano a través de la estimulación de NO en células epiteliales y de la síntesis de GMPc (Zimet, 2000). *Ginkgo biloba* (contiene compuestos

activos conocidos como ginkgolidos) relaja el músculo liso además de actuar como antagonista del factor de activación plaquetario (Li *et al.*, 1997). *Glycyrriza uvale* (contiene los activos: glicirrizina, ácido glicerritínico, ácidos tánnicos, licorice, etc.) inhibe el factor de activación plaquetario, además de bloquear la conversión de cortisol a cortisona (Bielory y Lupoli, 1999.). *Ephedra sinica* (contiene efedrina, pseudoefedrina y alcaloides) activa receptores adrenérgicos (Graham y Blaiss, 2000).

Con respecto a la medicina herbolaria Japonesa, se tienen en el mercado diversos remedios antiasmáticos como “saibuko-to”, “shoseiryu-to”, y “sho-saiko-to”, además de plantas como la efedra, la magnolia y el licorice, que cuentan con varios estudios clínicos que corroboran su uso como antiasmáticos y les atribuyen un efecto broncodilatador y acciones antiinflamatorias incluyendo propiedades como antileucotrienos (Zimet, 2000).

En el sistema tradicional de la India destaca el uso de *Datura*, *Tylophora asthmatica*, *Adhatoda vasika* y *Coleus forskolii*, esta última provee la forskolina, compuesto que entra a la célula y estimula directamente la formación de AMPc (Zimet, 2000). Otras plantas utilizadas son: *Tylophora indica* (compuesto activo: tiloforina) cuyo mecanismo de acción es mediante la inhibición de la anafilaxis (Huntley y Ernst, 2000) y *Solanum xanthocarpum* la cual cuenta con estudios clínicos que muestran que un efecto broncodilatador, reducción de edema bronquial y de secreciones (Govindan *et al.*, 1999).

## 2.7. PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN MÉXICO

En nuestro país, la medicina tradicional tiene un amplio uso para el tratamiento de los padecimientos respiratorios ya que es una práctica común preparar infusiones o decocciones herbales, entre las cuales destaca el uso de *Crataegus* sp. (Tejocote), *Allium sativum* (ajo), *Argemone* (chicalote), *Bougainvillea glabra* (bugambilia), *Crescentia alata* (cirian), *Cunila lythrifolia* (poleo de campo), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Gnaphalium* sp. (gordolobo), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Mentha pulegium* (poleo), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Sambucus nigra*



(sauco) y *Thymus vulgaris* (tomillo) entre otras (Lozoya *et al.*, 1987; Argueta y Cano, 1994).

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de plantas utilizadas para tratar estos padecimientos, las investigaciones científicas encaminadas a demostrar el valor terapéutico de ellas es limitado (Rojas *et al.*, 2001). Algunos de los estudios efectuados a plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades respiratorias se muestran en el cuadro 1.

## 2.8 GÉNERO *Crataegus*

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae y está constituido por aproximadamente 280 especies. El nombre común para las especies de *Crataegus* es: majuelos o espinos, y en México también se les conoce como tejocote. Son árboles pequeños y arbustos, que generalmente miden de 2 a 5 m de altura, presentan hojas verdes y brillantes, racimos de flores blancas (o rosas), frutos que pueden ser amarillos, rojos o escarlatas y espinas que en ocasiones miden hasta 3 cm de largo (Zucker, 1992).

Las especies de *Crataegus*, están distribuidas en bosques cercanos a regiones de temperatura fría. A nivel mundial se utilizan cerca de 20 especies, como fármacos o materias para fármacos herbolarios (Mehlika *et al.*, 2008).

### 2.8.1 Usos del género *Crataegus*

En algunos países se utilizan diversas especies de *Crataegus* ya sea como alimento o en la medicina tradicional. En alimentación se consume el fruto tanto fresco o procesado en mermeladas, jaleas, vinos y postres. Respecto a su uso en la medicina tradicional, existen numerosas preparaciones del fruto, hojas y flores, solas o en combinación con otros extractos herbales en Europa y en China. Dichas preparaciones son utilizadas en el tratamiento del asma, en la prevención de enfermedades del corazón (angina de pecho e hipertensión con insuficiencia cardiaca), en la aterosclerosis, como diurético, contra la diarrea,

**Cuadro 1.** Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Planta	Nombre común	Extracto o compuestos activos identificados	Actividad reportada/Mecanismo propuesto	Referencia
<i>Argemone Ochroleuca</i>	Chicalote, amapola amarilla, cardo, etc.,	Berberina	Actividad relajante en la tráquea de cobayo. Antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2007.
<i>Argemone platyceras</i>	Chicalote	Isoquercitrina	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe las contracciones provocadas por carbacol y leucotrieno D <sub>4</sub> .	Fernández <i>et al.</i> , 2005.
<i>Croton reflexifolius</i>	Huilocuahuilt	Ácido poliáltico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Presentó actividad anti-muscarínica.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2008.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Aceite esencial	Actividad anti-inflamatoria en ratas. Inhibe la hipersecreción de mucinas en vías aéreas.	Lu <i>et al.</i> , 2004.
<i>Galphimia glauca</i>	Ojo de gallina	Fracciones de acetato de etilo	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe la broncoconstricción inducida por leucotrieno D <sub>4</sub> .	Campos <i>et al.</i> , 2001.
<i>Gnaphalium conoideum</i>	Gordolobo, popu	Extracto metanólico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Bloqueador parcial de canales de Ca <sup>++</sup> .	Campos-Bedolla <i>et al.</i> , 2005.
<i>Gnaphalium liebmannii</i>	Gordolobo	Extracto hexánico	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Probable inhibición de fosfodiesterasas.	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2007.
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Extracto acuoso	Actividad relajante en tráquea de cobayo. Inhibe la expresión del mRNA de la iNOS.	Boskabady <i>et al.</i> , 2006.

en el tratamiento de enfermedades nerviosas, así como para combatir el estrés, el nerviosismo, la depresión y el insomnio (World Health Organization Geneva 2002; Botanical pag web 2008; Niembro 1990; Biblioteca Digital 2009; Daniele. *et al.*, 2006; Tabach *et al.*, 2009).

### **2.8.2. Información etnomédica de *Crataegus* sp. en México**

En México, se recomienda comer el fruto hervido de tejocote para el tratamiento de enfermedades respiratorias como la tos, pulmonía, bronquitis, resfrío y dolor del pulmón. Adicionalmente en Jalisco, se dice que es útil en el caso de diarrea, contra las amibas y en casos de disentería. En el Estado de Guerrero, para el dolor de estómago y en corajes. En Michoacán, se ocupa en casos de kuenesi o chipilez. También se le prescribe en padecimientos de los riñones, para adelgazar, mejorar la circulación coronaria, moderar las contracciones en caso de taquicardia, como diurético y antiespasmódico. En la medicina maya de los Altos de Chiapas, se emplea cuando hay dolor de abdomen o lombrices (oxiuros). Además, la raíz se usa como antidiabética (Biblioteca Digital, pag web 2009).

### **2.8.3. Estudios químicos**

En estudios químicos del género *Crataegus* realizados en hojas, flores, y frutos, se han identificado diversos compuestos como: flavonoides, proantocianidinas oligoméricas, triterpenos, ácidos orgánicos, esteroides, y trazas de aminas cardioactivas, además de compuestos antioxidantes, tales como: epicatequina y ácidos clorogénicos (Mehlika *et al.*, 2008).

### **2.8.4. Estudios de actividad biológica del género *Crataegus***

Algunas especies del género *Crataegus*, han sido estudiadas y se han reportado las siguientes actividades biológicas: antimicrobiana (Mehlika *et al.*,

2008), antioxidante, hiperlipidémica (Manickam y Halagowder,. 2008), diurética, ansiolítica, sedativa y actividad cardiotónica (Daniele *et al.*, 2006; Tabach *et al.*, 2009). Referente a esta última aplicación, ya se han efectuado numerosos estudios clínicos al respecto que corroboran su utilidad (Long *et al.*, 2006; Daniele *et al.*, 2006; Tabach *et al.*, 2009).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país, es recurrente el empleo de la medicina herbolaria en el tratamiento de padecimientos respiratorios, siendo una práctica común preparar infusiones o decocciones herbales. Entre las plantas más utilizadas, para estas enfermedades, se encuentra *Crataegus mexicana*, que de manera popular se conoce como tejocote, sin embargo, no existe ningún reporte científico que avale su uso, por lo que el presente trabajo está encaminado a la generación del conocimiento que respalde su utilidad, empleando el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo, y de presentarse dicho efecto, se aportará información acerca de su mecanismo de acción.

#### IV. HIPÓTESIS

Considerando el uso empírico de *Crataegus mexicana* en la medicina tradicional mexicana, en el tratamiento de enfermedades respiratorias, se espera que presente actividad relajante en el músculo liso de anillos de tráquea aislada de cobayo.

## V. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad relajante de los extractos de hexano, diclorometano y metanol obtenidos de *Crataegus mexicana* en músculo liso de tráquea aislada de cobayo y analizar su posible mecanismo de acción.

### 5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar a través de un estudio biodirigido la fracción de mayor actividad relajante de *Crataegus mexicana*.
- Determinar si el efecto relajante de la fracción más activa se debe a la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y de canales de  $K^+$  sensibles a ATP.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Material vegetal

La especie *Crataegus mexicana* se colectó en Chapingo, municipio de Texcoco, en el Estado de México. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo. Y se le asignó el número de registro: 62654.

### 6.2. Preparación de los extractos

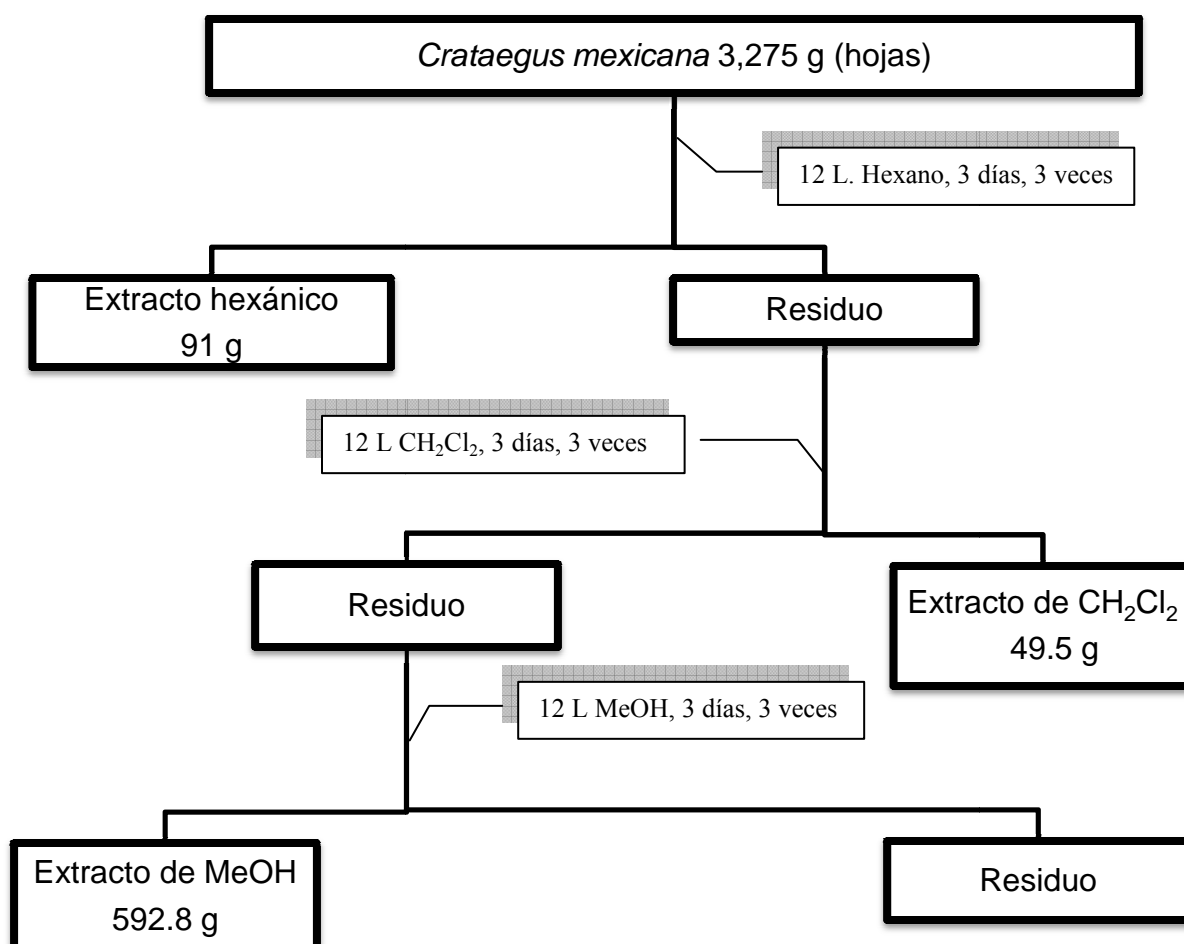
Los extractos se prepararon utilizando 3,275 g de hojas secas y molidas de *Crataegus mexicana* a través del proceso de maceración, empleando de forma sucesiva, hexano (12 Litros), diclorometano (12 Litros) y metanol (12 Litros). El material vegetal se mantuvo a temperatura ambiente por períodos de tres días con cada disolvente, posteriormente se filtró y se concentró en un rota evaporador a presión reducida, este procedimiento fue repetido 2 veces más, y permitió la obtención de los tres extractos correspondientes (Esquema 1). Los extractos crudos fueron evaluados a diferentes concentraciones (56.23, 100, 133.35, 177.82, 237.15, 316.22, 421.00, y 562.34  $\mu\text{g/mL}$ ), suspendidas en agua destilada con trazas de tween 80, en el modelo de anillos de tráquea de cobayo (inciso 6.6.2).

### 6.3. Estudio biodirigido

Los resultados obtenidos al evaluar los extractos crudos, permitieron identificar al extracto de hexano como el de mayor actividad relajante. Posteriormente, 77g de ese extracto se sometieron a una separación por cromatografía en columna empacada con sílica gel (770 g), utilizando como eluyentes diferentes disolventes o mezclas de estos en gradientes crecientes de polaridad (Esquema 2). Las fracciones fueron evaluadas a diferentes concentraciones (56.23 - 562.34  $\mu\text{g/mL}$ ) y los resultados correspondientes, permitieron



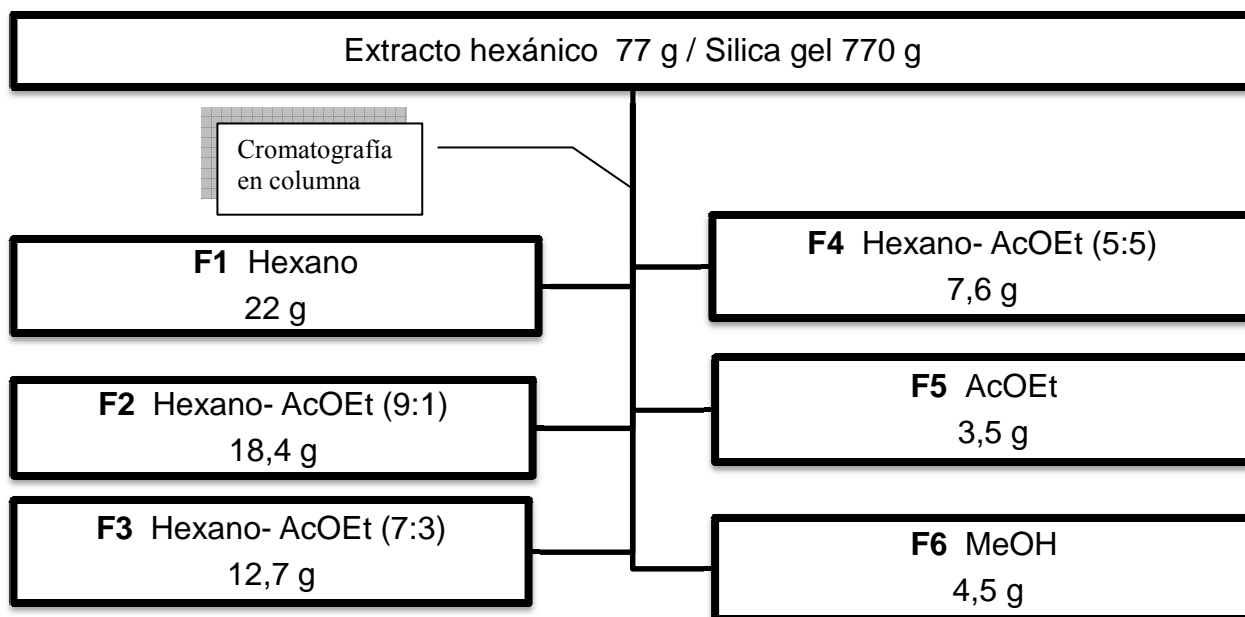
identificar dos fracciones activas: la F2 y la F3, las cuales se obtuvieron al utilizar como eluyentes hexano-AcOEt en proporción 9:1 y 7:3, respectivamente.



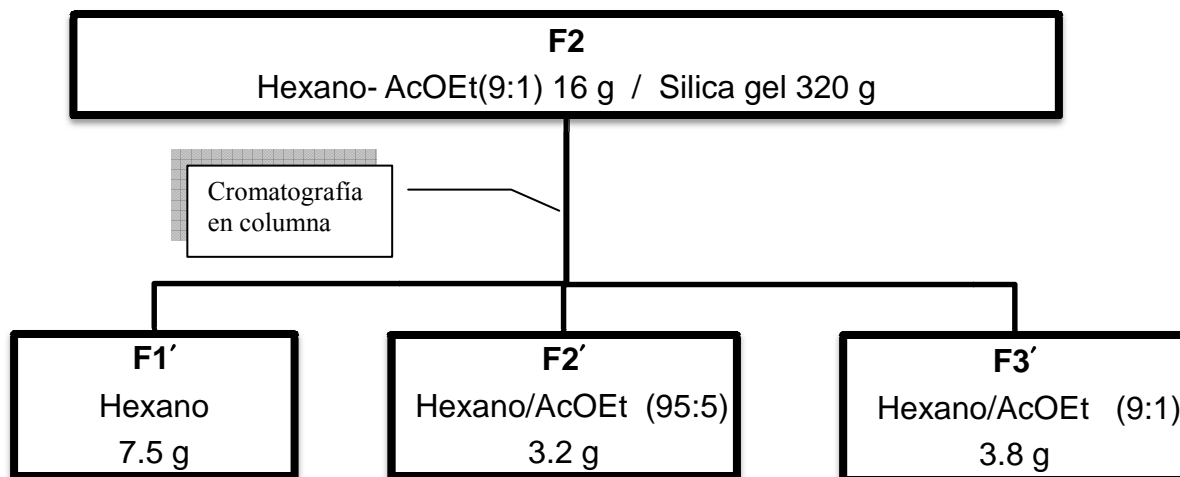
**Esquema 1.** Obtención de extractos a partir de hojas de *Crataegus mexicana*.

A continuación, 16 g de la fracción F2 fueron separados por cromatografía en columna. Dicho fraccionamiento permitió obtener solamente tres fracciones, en cantidad suficiente para poder realizar las evaluaciones biológicas (Esquema 3). Sin embargo, los resultados indicaron una disminución en la actividad relajante de las mismas.

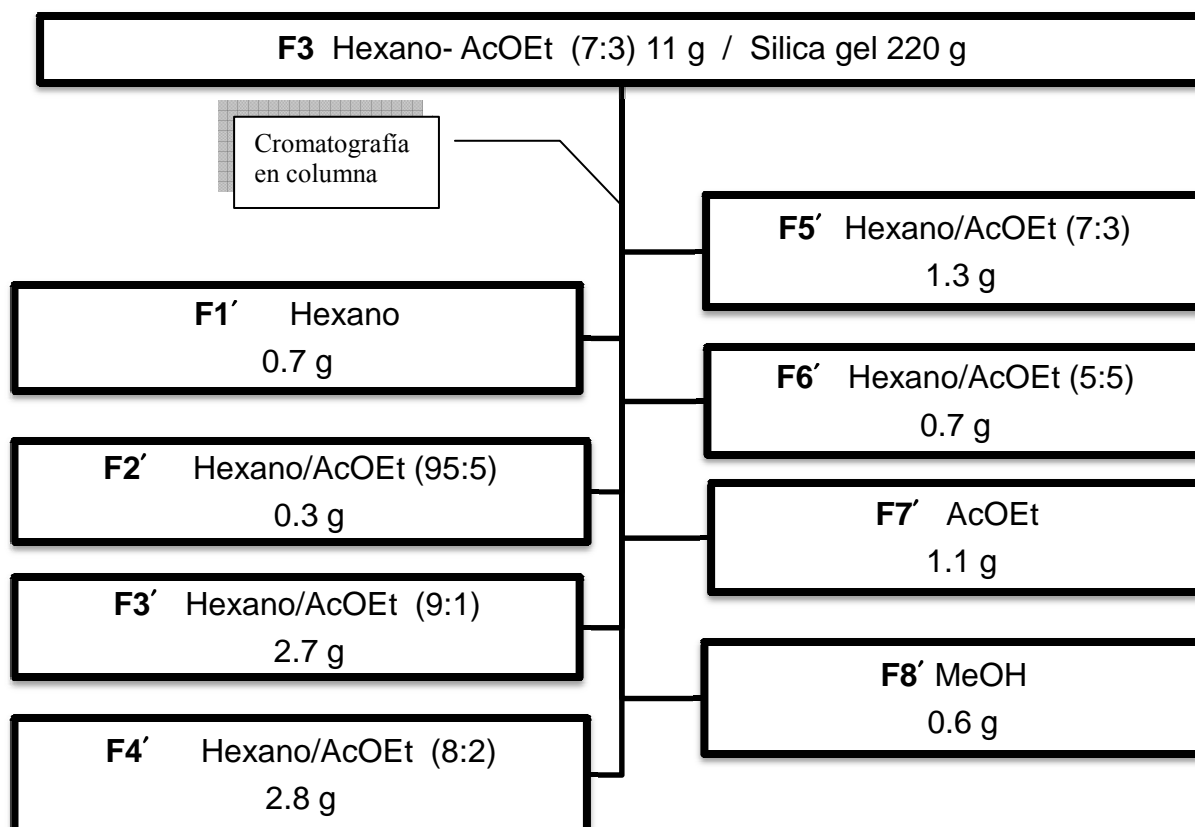
El siguiente paso, fue separar 11 g de la fracción F3. Se obtuvieron 8 fracciones (Esquema 4) y de ellas la F3' fue la más activa. Posteriormente dicha fracción fue analizada por cromatografía de líquidos (HPLC) acoplado a masas.



**Esquema 2.** Fraccionamiento del extracto hexánico, obtenido a partir de hojas de *Crataegus mexicana*.



**Esquema 3.** Fraccionamiento cromatográfico de F2.



**Esquema 4.** Fraccionamiento cromatográfico de F3.

#### 6.4. Material biológico

En el presente estudio se utilizaron cobayos macho, de un peso corporal de 300 a 400 g que fueron proporcionados por la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Los procedimientos involucrados en el cuidado y manejo de los animales fueron efectuados de acuerdo a los requerimientos que en la materia determinan la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”.

#### 6.5. Fármacos y extractos

La acetilcolina, histamina, carbacol, KCl, propranolol, salbutamol y glibenclamida, fueron adquiridos en la Compañía Sigma Aldrich. La glibenclamida, se disolvió primero en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente

en agua destilada. Los fármacos restantes, fueron disueltos en agua destilada. Los extractos, y fracciones de *Crataegus mexicana*, fueron suspendidos en agua destilada con Tween 80 al 0.5%. El pentobarbital sódico se compró en solución comercial de uso veterinario. Los demás compuestos de uso común en el laboratorio fueron grado reactivo analítico.

## 6.6. Ensayos biológicos

### 6.6.1. Disección de la tráquea y montaje de la preparación

Los animales se sacrificaron por una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (95 mg/kg). Inmediatamente se realizó la disección de la tráquea limpiándola del tejido circundante. El órgano se mantuvo en una solución Krebs cuya composición fue (mM): NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.2 y glucosa 11.0, a 37 °C, con un pH de 7.4 y con aeración constante con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se obtuvieron 12 anillos de aproximadamente 2 mm de espesor, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de solución Krebs. La preparación se suspendió entre dos ganchos de alambre de acero inoxidable, uno de los extremos se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (Biopack) conectado a un polígrafo Biopack System. El procesamiento de datos se realizó mediante el programa Acknowledge MP100 versión 3.5.3.

Los órganos se sometieron a una tensión inicial de 1.5 g y se dejaron estabilizar por una hora, realizando lavados con solución Krebs cada 15 minutos durante este periodo. A continuación, el órgano se estimuló con clorhidrato de acetilcolina 30  $\mu\text{M}$  dos veces a intervalos de treinta minutos. Después de cada estimulación los órganos se lavaron tres veces con solución Krebs. Posteriormente se permitió que la preparación se equilibrara media hora antes de la realización de los experimentos.

### **6.6.2. Evaluación del efecto relajante de los extractos, y fracciones de *Crataegus mexicana***

Para evaluar el efecto relajante, el tejido se pre-contrajo con carbacol 3  $\mu\text{M}$  dejando en contacto al fármaco con el tejido hasta alcanzar una meseta de contracción (aproximadamente 6 minutos). Una vez en la meseta se aplicaron los extractos y fracciones de *Crataegus mexicana*, a diferentes concentraciones en forma acumulativa, (56.23, 100, 133.35, 177.82, 237.15, 316.22, 421.00 y 562.34  $\mu\text{g/mL}$ ) de acuerdo con el experimento correspondiente. El control, consistió en la aplicación de agua destilada con Tween 80 al 0.5%. El efecto relajante de los extractos crudos y fracciones fueron expresados como  $\text{CE}_{50}$  o  $\text{CE}_{30}$  según fuera el caso.

### **6.6.3. Evaluación del efecto relajante del extracto hexánico en tejidos pre-contraídos con diferentes agonistas**

Para determinar si el extracto hexánico de *Crataegus mexicana*, relajaba los tejidos precontraídos con diferentes agonistas, se aplicó carbacol (3  $\mu\text{M}$ ), histamina (30  $\mu\text{M}$ ) y KCl (40 mM) en experimentos independientes. Una vez alcanzada la meseta se construyeron las curvas acumulativas concentración-respuesta, utilizando las concentraciones utilizadas en los experimentos de relajación. Como fármaco de referencia se utilizó salbutamol ( $1 \times 10^{-1} - 10^{-6}$  M). Los controles consistieron en la aplicación de agua destilada con Tween 80 al 0.5%.

### **6.6.4. Evaluación de la participación de receptores $\beta$ -adrenérgicos, y de canales de $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ , en el efecto relajante de la fracción F3'**

Las preparaciones se pre-contrajeron con carbacol (3  $\mu\text{M}$ ), una vez alcanzada la meseta se incubaron con propranolol (3  $\mu\text{M}$ ), glibenclamida (10  $\mu\text{M}$ ), o vehículo (en experimentos independientes) durante 5 minutos, posteriormente se aplicó la fracción F3' (que presentó la mayor actividad relajante en el estudio

biodirigido) en forma acumulativa a las mismas concentraciones empleadas en la evaluación del efecto relajante.

En la determinación de la participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el vehículo consistió en la aplicación de agua destilada y para el experimento de glibenclamida se utilizó como vehículo: DMSO (1.2 mL) disuelto en agua destilada (23.8 mL). Adicionalmente se obtuvieron datos de la actividad de controles, a los cuáles se les adicionó una mezcla de Tween 80 al 0.5% en agua destilada, similar a la que fue utilizada en la preparación de las concentraciones de la fracción F3'.

## VII. ESTADÍSTICA

Los valores de  $CE_{50}$  y  $CE_{30}$  se calcularon a través del método de regresión lineal descrito por Talladira, 2000. Las diferencias entre varias determinaciones se realizaron utilizando un análisis de varianza de una vía (ANADEVA) seguida de la prueba de Dunnett. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un valor de  $p < 0.05$ . (Montgomery, 1991).

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Evaluación del efecto relajante de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *Crataegus mexicana*

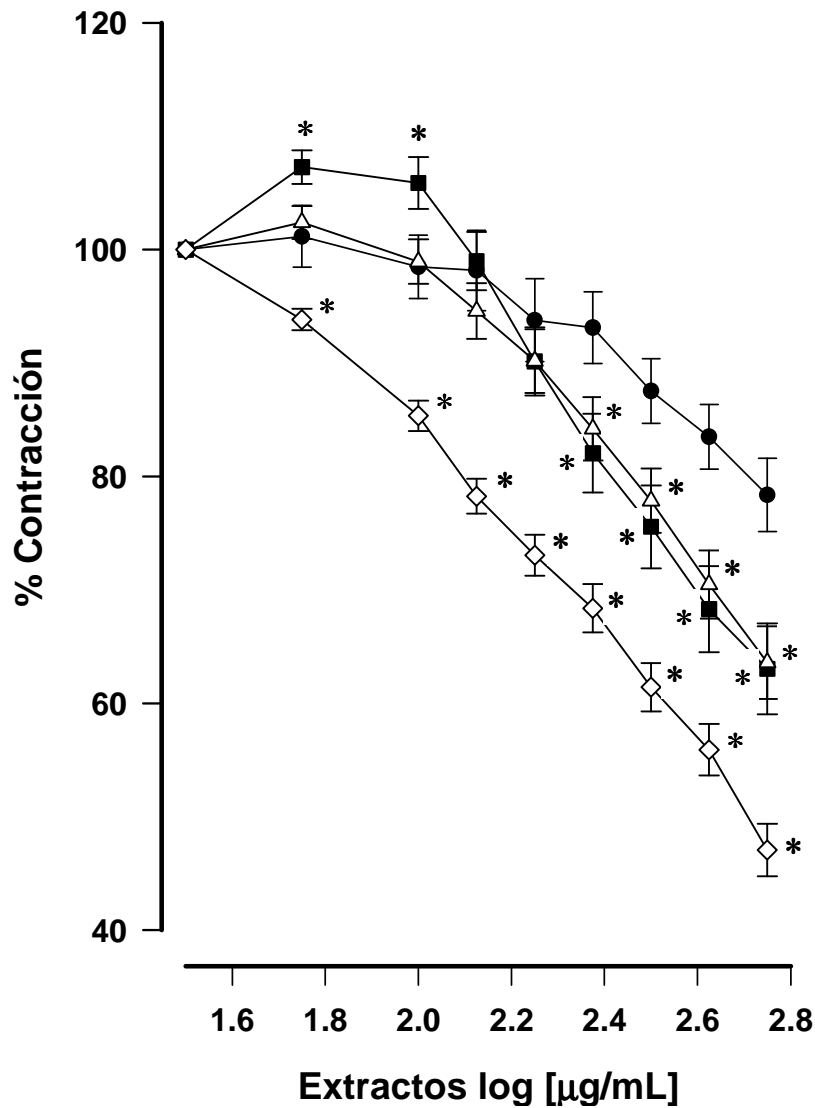
En la gráfica 1, se muestran los resultados obtenidos al administrar concentraciones crecientes de los extractos de *Crataegus mexicana* en anillos de tráquea de cobayo, previamente contraídos con carbacol ( $3 \times 10^{-6}$  M), se observa que los tres extractos produjeron una relajación dependiente de la concentración, siendo el extracto hexánico el que presentó mayor actividad, seguido por el de metanol y finalmente por el de diclorometano. Sus valores de máxima relajación fueron:  $52.9433 \pm 2.3222$ ,  $36.9739 \pm 4.0085$ , y  $36.4180 \pm 3.2031$  % respectivamente, considerando como 100% la contracción máxima obtenida con carbacol.

### 8.2. Evaluación del efecto relajante del extracto de hexano de *Crataegus mexicana* sobre las precontracciones inducidas por carbacol, histamina y KCl

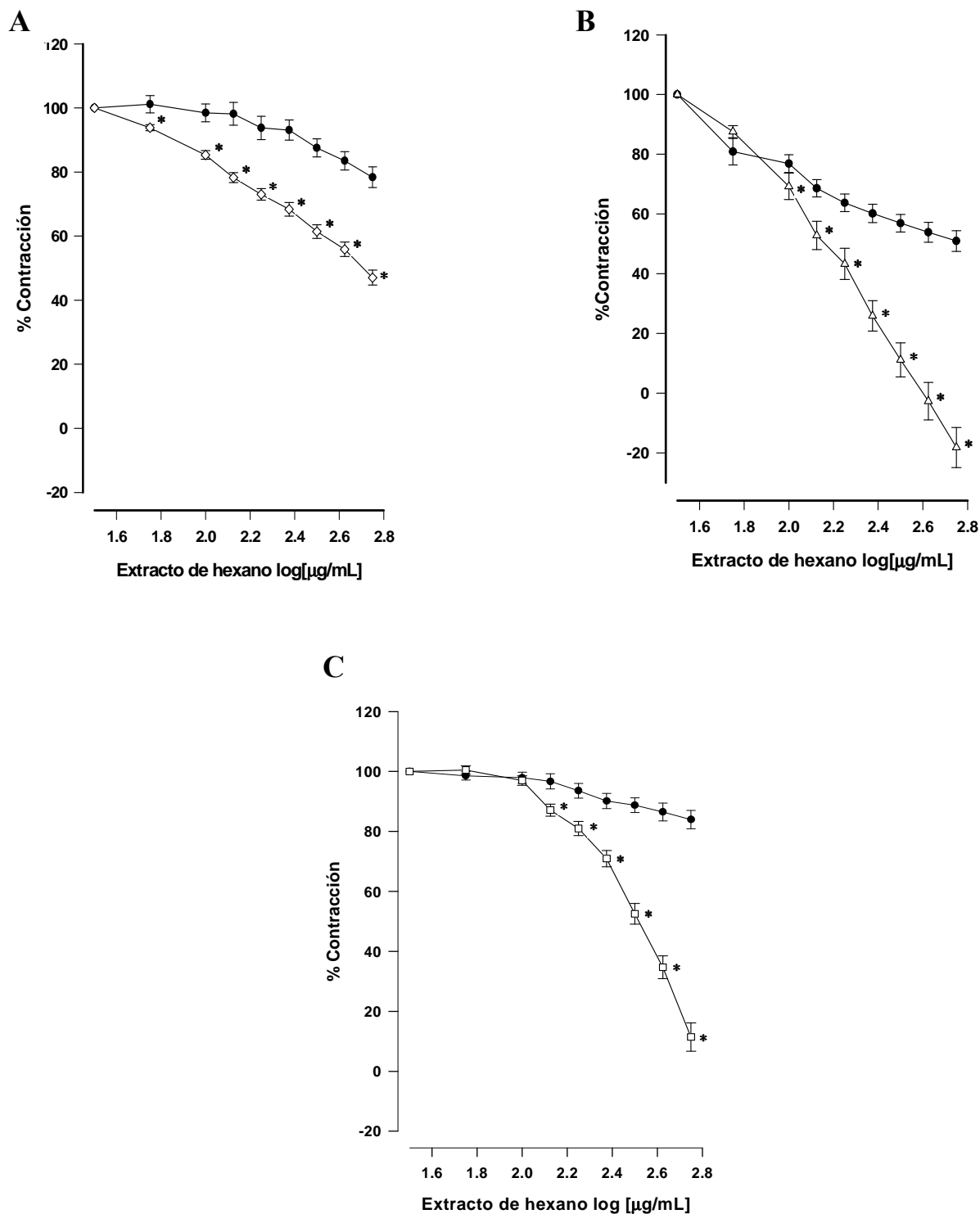
Ya que el extracto más activo fue el hexánico, posteriormente se evaluó su capacidad de relajar las precontracciones inducidas con carbacol, histamina y KCl, en dichos experimentos se encontró un mayor efecto relajante sobre las precontracciones inducidas con histamina (30  $\mu$ M, gráfica 2B), en comparación a las inducidas con KCl (40 mM, gráfica 2C), y con carbacol. (3  $\mu$ M, gráfica 2A). Cabe mencionar, que además de presentar un mayor efecto relajante a la precontracción inducida con histamina, también resultó ser más potente con este agonista, como se puede apreciar en los valores de  $E_{m\acute{a}x}$ , de  $CE_{50}$  y  $CE_{30}$  que se presentan en el cuadro 2.

Como fármaco de referencia se utilizó Salbutamol, el cual, relajó la precontracción inducida por los tres agentes contráctiles: carbacol (Gráfica 3A), histamina (Gráfica 3B) y KCl,(Gráfica 3C).





**Gráfica 1.** Efecto relajante de los extractos de ◇hexano, ■metanol y △diclorometano de *Crataegus mexicana* ó ● vehículo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de al menos seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett. \* $p < 0.05$  respecto al control.

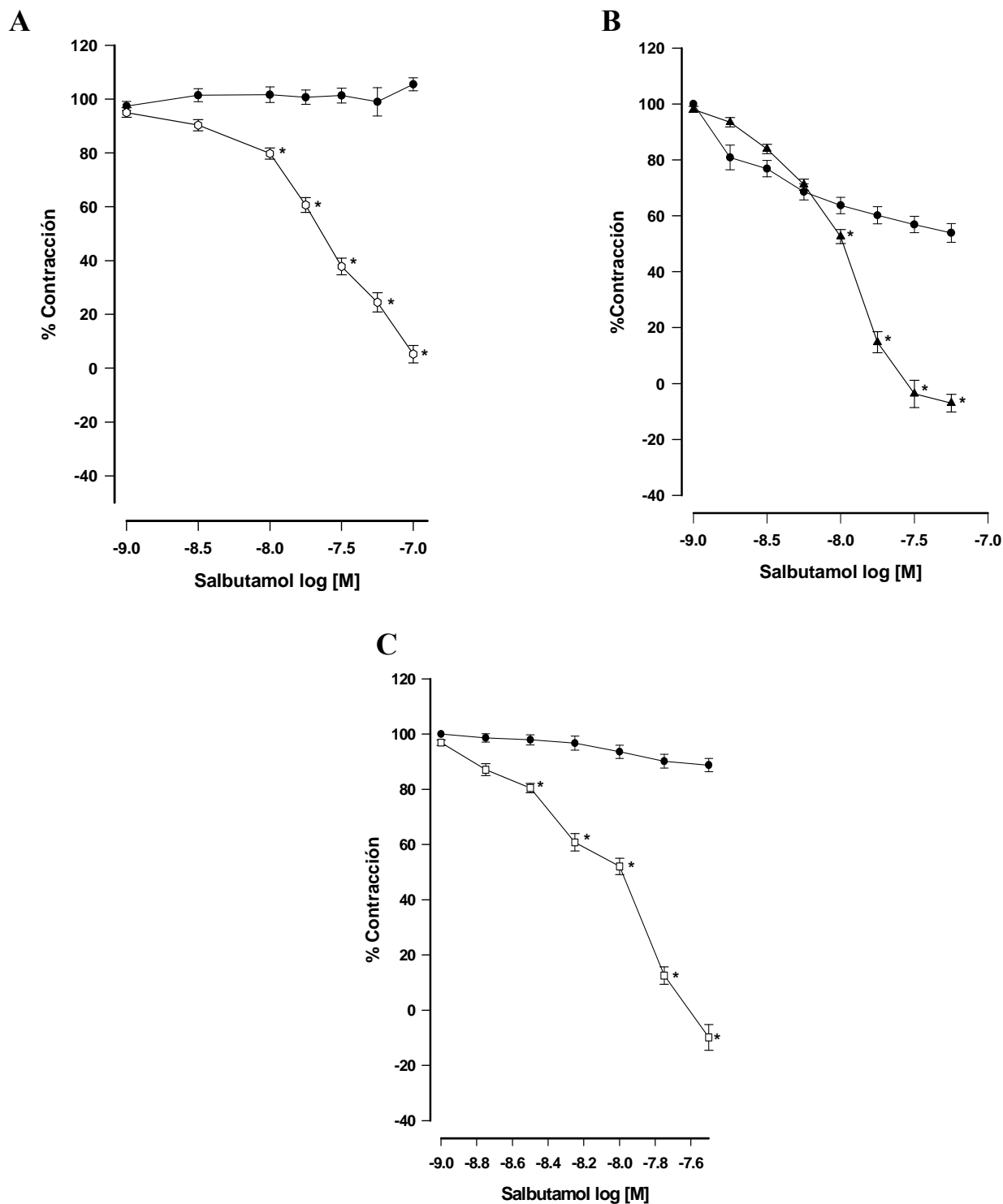


**Gráfica 2.** Efecto relajante del extracto de hexano de *Crataegus mexicana* (56.23-562.34  $\mu\text{g/mL}$ ) o vehículos (●) en anillos de tráquea aislada de cobayo precontractados con carbacol  $\diamond$  (A, 3  $\mu\text{M}$ ), histamina  $\triangle$  (B, 30  $\mu\text{M}$ ) y KCl  $\square$  (C, 40 mM). Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de seis observaciones. La diferencia fue obtenida por una prueba t con una  $*p < 0.05$  respecto al control.

**Cuadro 2.** Valores de %Em<sub>áx</sub>, CE<sub>50</sub>, y/o CE<sub>30</sub> del extracto hexánico en las contracciones inducidas con carbacol, histamina y KCl. Presentados como la media ± EEM (µg/mL).

AGENTE CONTRACTIL	% Em <sub>áx</sub>	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	CE <sub>30</sub> (µg/mL)
<b>Carbacol</b>	*52.94 ± 2.32	N.E.	224.94 ± 8.85
<b>Histamina</b>	*118.22 ± 6.73	144.01 ± 9.33	-
<b>KCl</b>	*88.56 ± 4.72	303.51 ± 8.17	-

La diferencia significativa fue obtenida por una prueba *t* con una \**p* ≤ 0.001 respecto al control de vehículos correspondiente a cada evaluación. N.E. (no especificado).



**Gráfica 3.** Efecto relajante de salbutamol ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M) o vehículos (●) en anillos de tráquea aislada de cobayo precontraídos con carbacol (◇A, 3  $\mu$ M), histamina (▲B, 30  $\mu$ M) o KCl (□C, 30 mM). Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de seis observaciones la diferencia fue obtenida por una prueba *t* con una  $*p < 0.05$  respecto al control en cada caso.

### 8.3. Evaluación del efecto relajante de las fracciones del extracto hexánico de hojas de *Crataegus mexicana*

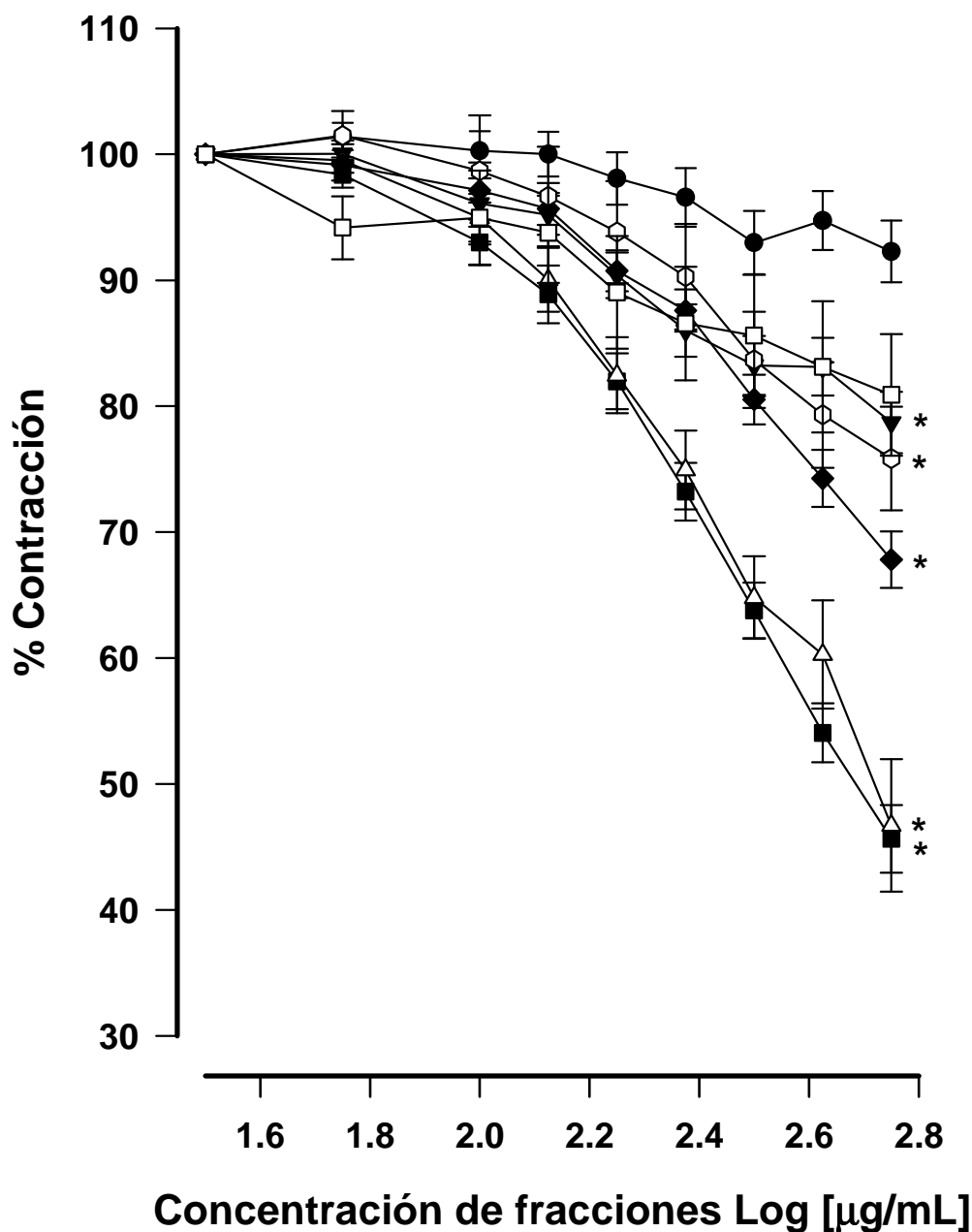
A continuación se prosiguió con el estudio biodirigido del extracto de hexano de *Crataegus mexicana*. Para ello, fue separado mediante un fraccionamiento por cromatografía en columna, que permitió obtener 6 fracciones. Los resultados de las evaluaciones se presentan en la gráfica 4, como se puede apreciar las seis fracciones produjeron una relajación dependiente de la concentración, pero de ellas, destacan las fracciones F2 y la F3 por ser las más activas. Estas fracciones fueron obtenidas al eluir la columna con Hexano/AcOEt en proporción 9:1 y 7:3 respectivamente. Ambas presentaron una eficacia y potencia similar. Sus valores de  $Emáx$  y de  $CE_{30}$  se muestran en el cuadro 3.

Posteriormente, F2 y F3 fueron separadas en un segundo fraccionamiento. En primer lugar, se trabajó con la F2, logrando obtener únicamente 3 fracciones en cantidad suficiente para las evaluaciones biológicas. Desafortunadamente, la actividad relajante de dichas fracciones fue menor al 20%, lo que indica que disminuye la actividad de F2 al ser fraccionada (Gráfica 5).

En segundo lugar, se trabajó con la fracción F3, de ella se obtuvieron 8 fracciones que presentaron un efecto relajante dependiente de la concentración. Sus valores de  $Emáx$  se presentan en el cuadro 4, en el cuál se puede apreciar que la fracción F3', (eluida con una mezcla de Hexano/ AcOEt 9:1) mostró la mayor actividad relajante, alcanzando un 100% de relajación, además un valor de  $CE_{50} = 285.9279 \pm 6.2047 \mu\text{g/mL}$ .

Posteriormente, la fracción activa F3' se analizó a través de un estudio de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS), que muestra la separación de 14 picos, que indican la presencia de al menos 14 compuestos (ver anexo I).

La caracterización (mediante estudios espectroscópicos y espectrométricos) de cada uno de los compuestos se encuentra en proceso de estudio, actividad que esta siendo realizada bajo la dirección del Dr. Benito Reyes Trejo de la Universidad Autónoma Chapingo.

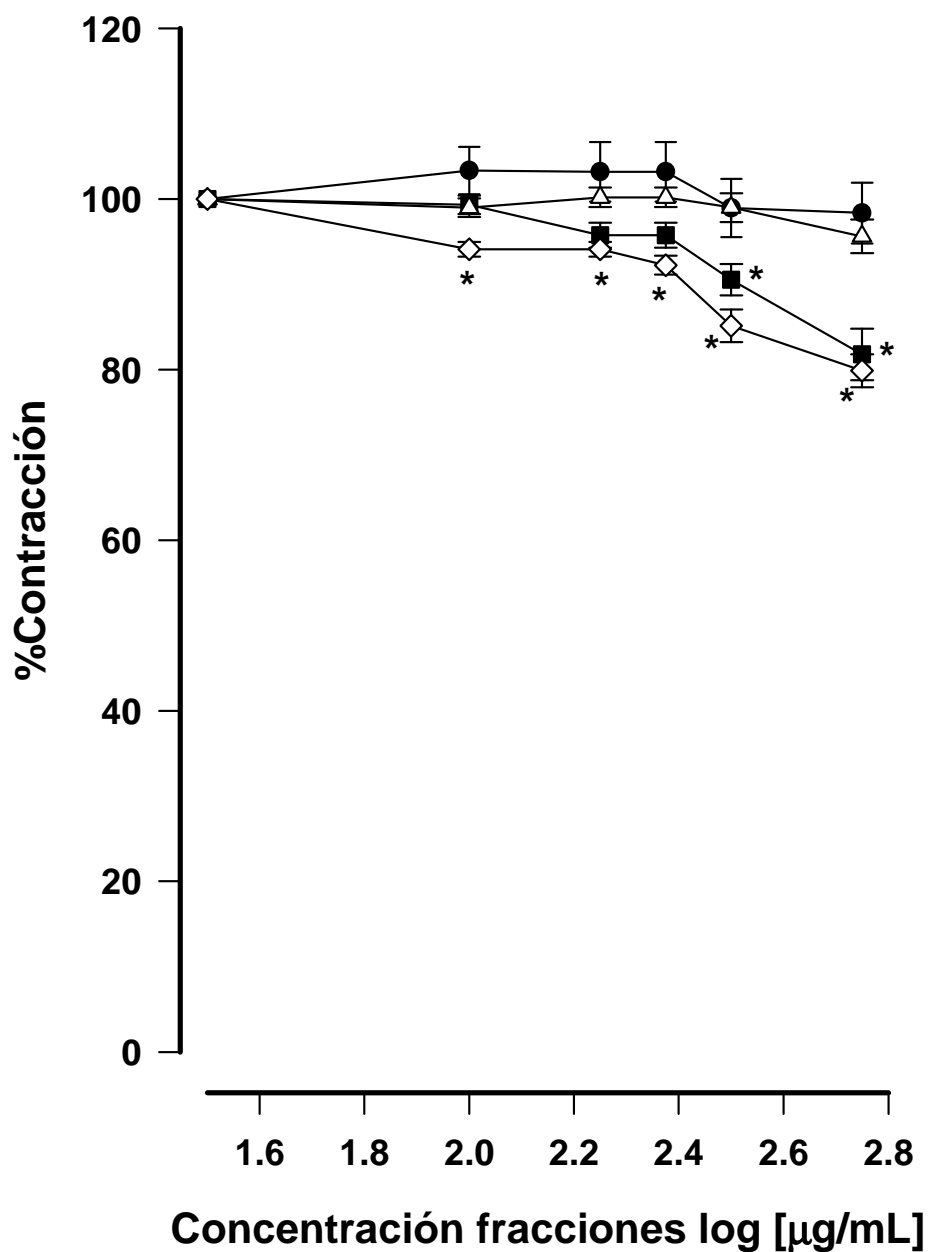


**Gráfica 4.** Efecto relajante de las fracciones obtenidas de la percolación del extracto de hexano de *Crataegus mexicana* (56.23-562.34  $\mu\text{g/mL}$ ): ▼Fracción Hexano, ■Fracción Hexano/AcOEt, (9:1), △Fracción Hexano/AcOEt, (7:3), ◆Fracción Hexano/AcOEt, (5:5), ○Fracción AcOEt, □Fracción-metanol o ● vehículo en anillos de tráquea aislada de cobayo precontraídos con carbacol (3  $\mu\text{M}$ ). Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett. \* $p < 0.05$  respecto al control.

**Cuadro 3.** Valores de % Em<sub>áx</sub> y CE<sub>30</sub> de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto hexánico. Presentados como la media ± EEM (µg/mL).

FRACCIONES	% Em <sub>áx</sub>	CE <sub>30</sub> (µg/mL)
Control	7.72 ± 2.45	
Hexano (F1)	*21.30 ± 2.44	-
Hexano/AcOEt (9:1); (F2)	*54.37 ± 2.68	246.23 ± 6.70
Hexano/AcOEt (7:3); (F3)	*53.30 ± 5.25	253.00 ± 5.65
Hexano/AcOEt (5:5); (F4)	*32.19 ± 2.24	-
Acetato de etilo (F5)	*24.16 ± 4.12	-
Metanol (F6)	19.11 ± 4.83	-

La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de una prueba de Dunnett con una \*p ≤ 0.050. Esto con respecto al control.



**Gráfica 5.** Efecto relajante de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de F2 (100.00-562.34 µg/mL): ■Fracción-Hexano, △Fracción Hexano/ AcOEt, (9:1), ◇Fracción Hexano/ AcOEt, (8:2) o ● vehículo en anillos de tráquea aislada de cobayo precontraídos con carbacol (3 µM). Cada punto representa el promedio ± EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett. \*p<0.05 respecto al control.



**Cuadro 4.** Valores de % Em<sub>áx</sub> y de CE<sub>50</sub> del fraccionamiento de F3. Presentados como la media ± EEM ( µg/mL).

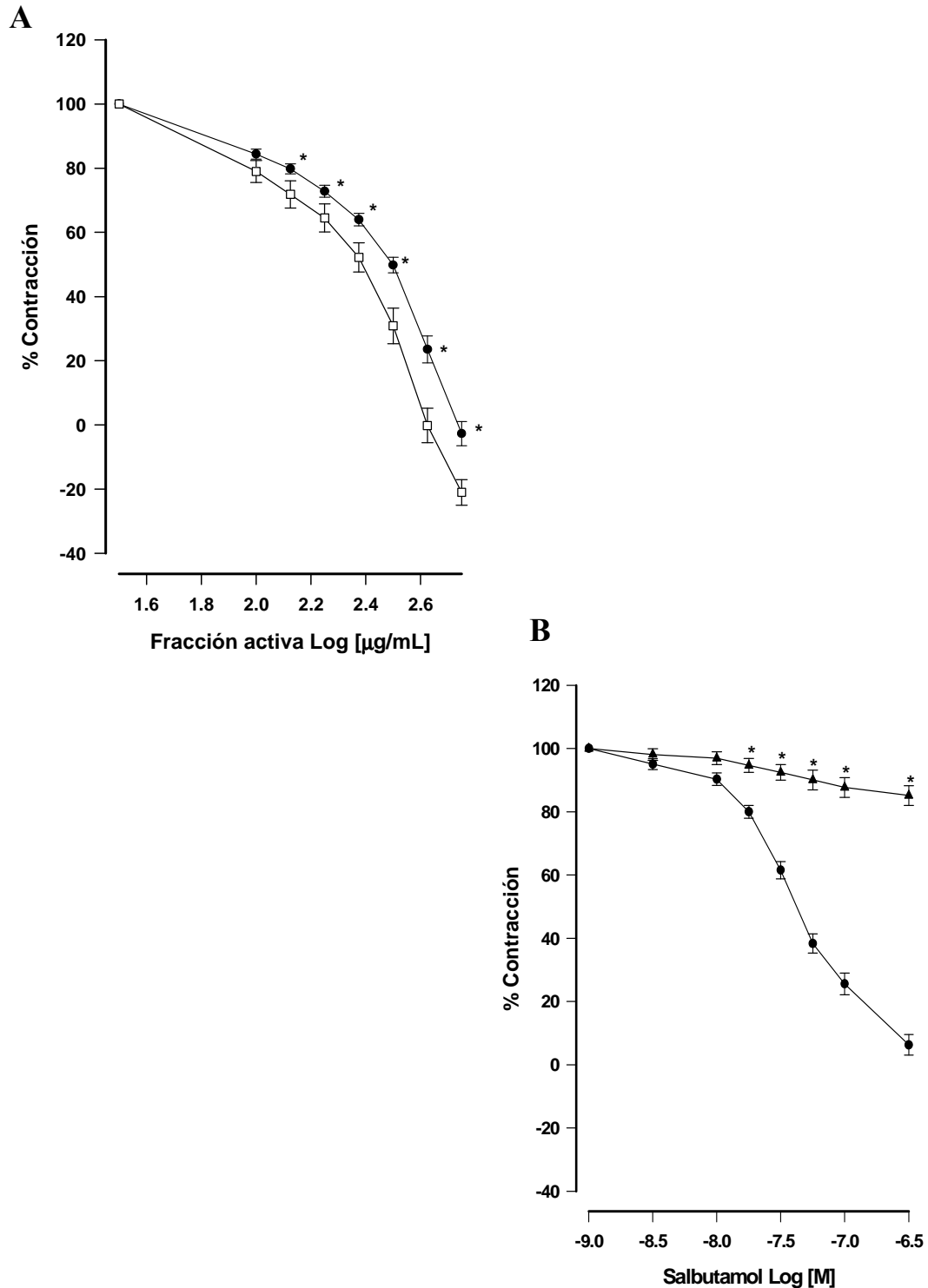
FRACCIONES DERIVADAS DE F3	% Em <sub>áx</sub>	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Control	26.22 ± 4.36	N.E.
Hexano (F1')	*50.42 ± 4.71	N.E.
Hexano/AcOEt (95:5); (F2')	*69.39 ± 3.43	380.36 ± 12.72
Hexano/AcOEt (9:1); (F3')	*97.57 ± 3.82	**285.93 ± 6.20
Hexano/AcOEt (8:2); (F4')	*53.10 ± 4.02	N.E.
Hexano/AcOEt (7:3); (F5')	*45.55 ± 3.22	N.E.
Hexano/AcOEt (5:5); (F6')	*56.51 ± 3.68	N.E.
Acetato de étilo (F7')	29.80 ± 2.70	N.E.
Metanol (F8')	36.09 ± 3.97	N.E.

La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett con \*p<0.05 respecto al control, o mediante una prueba de t con una \*\*p ≤ 0.001. N.E. (no especificado).

#### 8.4. Evaluación de la participación de receptores $\beta_2$ -adrenérgicos y de canales de $K^+_{ATP}$

Con la finalidad de aportar información acerca del mecanismo de acción relajante de la fracción F3' de *Crataegus mexicana* y determinar si su efecto relajante se debe a que actúa a través de la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se aplicaron concentraciones crecientes de la fracción F3' (56.23 - 562.34  $\mu\text{g/mL}$ ) o salbutamol ( $3.16 \times 10^{-10} - 10^{-6}\text{M}$ ) antes y después de exponer las preparaciones al bloqueador  $\beta$ -adrenérgico: propranolol (3  $\mu\text{M}$ ). Los resultados correspondientes se muestran en las gráficas 6A y 6B respectivamente. En el caso de la F3' la curva de relajación en presencia de propranolol se desplazó significativamente hacia la derecha, asimismo se encontró una diferencia en su valor de  $CE_{50}$  (Cuadro 5). Una situación similar se presentó para salbutamol, ya que su efecto relajante se inhibe por la presencia del antagonista.

Por otro lado, para determinar la participación de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, se realizaron curvas de relajación concentración-respuesta de F3', en ausencia y en presencia de un bloqueador de dichos canales: glibenclamida (10  $\mu\text{M}$ ). En la gráfica 7, se muestran los resultados, en ellos se puede apreciar que la glibenclamida no modificó el efecto relajante de la fracción F3'.

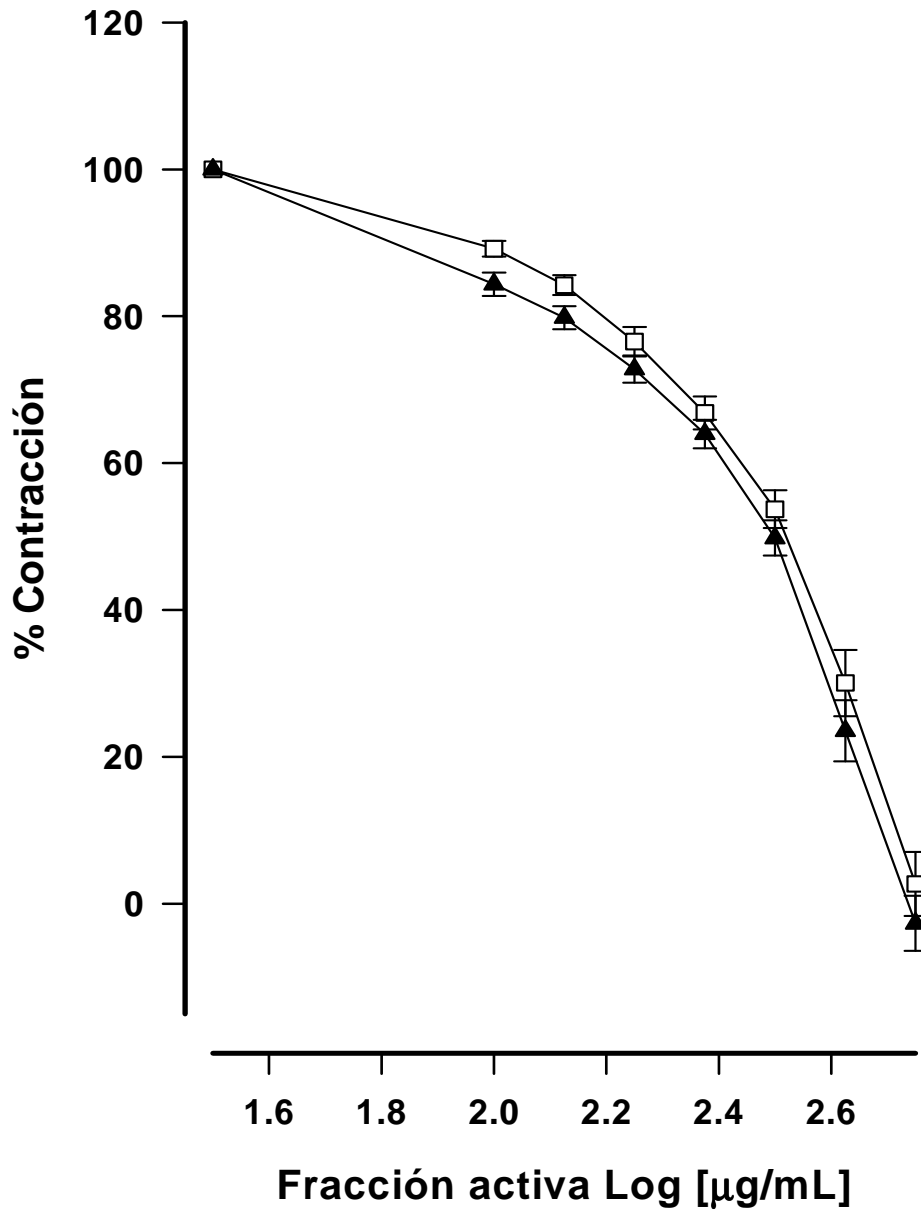


**Gráfica 6.** A) Evaluación del efecto relajante de la ●fracción activa de *Crataegus mexicana* en presencia de propranolol, y □fracción activa en ausencia de propranolol. B) Efecto relajante de ●salbutamol en ausencia de propranolol y, ▲salbutamol en presencia de propranolol. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba *t* de student, con una \* $p < 0.05$  respecto al control en cada caso.

**Cuadro 5.** Valores de % Em<sub>áx</sub> y de CE<sub>50</sub> de F3' en ausencia y presencia de propranolol. Presentados como la media ± EEM ( μg/mL).

<b>F3'</b>	<b>% Em<sub>áx</sub></b>	<b>CE<sub>50</sub> (μg/mL)</b>
<b>En ausencia de propranolol</b>	102.69 ± 3.75	278.23 ± 8.70
<b>En presencia de Propranolol</b>	*121.03 ± 3.99	*229.88 ± 9.06

La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t* con una  $p \leq 0.001$ .



**Gráfica 7.** Evaluación del efecto relajante de la fracción activa de *Crataegus mexicana* en presencia y ausencia de glibenclamida (10  $\mu\text{M}$ ). Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de seis observaciones.

## IX. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que las hojas de *Crataegus mexicana* producen un efecto relajante en el músculo liso traqueal de cobayo, lo que sustenta farmacológicamente su amplio uso en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de padecimientos respiratorios.

### 9.1. Evaluación del efecto relajante de los extractos y fracciones de *Crataegus mexicana*

Como se puede apreciar en la gráfica 1, los tres extractos preparados con las hojas de la planta relajaron las preparaciones traqueales. El extracto obtenido con hexano presentó mayor actividad respecto a los obtenidos con metanol y diclorometano. Por lo tanto, se seleccionó al extracto de hexano para ser sometido a un fraccionamiento con la finalidad de obtener al o los compuestos activos, lo que permitió identificar dos fracciones activas, una obtenida con hexano/AcOEt (9:1) y otra con hexano/AcOEt (7:3), ambas presentaron una eficacia y potencia similar (Gráfica 4) lo cual sugiere que el efecto relajante del extracto de hexano se debe a la participación de más de un compuesto. Posteriormente, ambas fracciones se sometieron a un segundo fraccionamiento. Las fracciones derivadas de F2 (hexano/AcOEt, 9:1), presentaron una relajación menor al 20%, lo que significa que al separar los compuestos presentes en la F2 (Gráfica 5), se disminuye su actividad. Lo anterior, permite suponer que los compuestos de F2, actúan de manera sinergista, hecho que les permite relajar de manera conjunta hasta un  $54.37 \pm 2.69 \%$  (Gráfica 4)

En el caso de la fracción F3 (hexano/AcOEt, 7:3), las ocho fracciones que se obtuvieron relajaron de manera dependiente de la concentración, y de ellas, la F3' resultó la de mayor actividad alcanzando un  $97.57 \pm 3.82\%$  de máxima relajación con una  $CE_{50} = 285.9279 \pm 6.2047 \mu\text{g/mL}$ , (Cuadro 4). Dichos valores indican que F3' es más potente y eficaz, que la fracción F3 ( $53.30\%$  de relajación con  $CE_{30} = 253.00 \pm 5.65$ ) y el extracto hexánico ( $52.94 \pm 2.32\%$  de relajación con  $CE_{30} = 224.94 \pm 8.85$ ) de la cuál deriva.

A través de un estudio de cromatografía de líquidos acoplado a masas (HPLC-MS), se observa una mezcla compleja, en la cual se observa la separación de 14 picos que sugieren la presencia de al menos 14 compuestos, es importante señalar que dada la complejidad de F3', se requiere de mayor trabajo de separación que permita la identificación inequívoca y correcta de los constituyentes bioactivos, que contribuyen al efecto relajante del músculo liso de tráquea de cobayo. Los resultados descritos en el presente trabajo, proporcionan un punto de partida para investigaciones adicionales de sustancias naturales relajantes que están presentes en el extracto de hojas de *Crataegus mexicana*.

## **9.2. Evaluación del efecto relajante del extracto de hexano de *Crataegus mexicana* sobre las precontracciones inducidas por carbacol, histamina y KCl**

El extracto hexánico de hojas de *Crataegus mexicana*, relajó las contracciones inducidas con tres diferentes agonistas: carbacol, histamina y KCl (Gráfica 2). Sin embargo, presentó mayor eficacia y potencia en las precontracciones inducidas con histamina ( $E_{\text{máx}} = 118.22 \pm 6.73$ ,  $CE_{50} = 144.0123 \pm 9.3252$   $\mu\text{g/mL}$ ), en comparación con las inducidas con KCl ( $E_{\text{máx}} = 88.56 \pm 4.72$ ,  $CE_{50} = 303.5053 \pm 8.1715$   $\mu\text{g/mL}$ ) y carbacol ( $E_{\text{máx}} = 52.94 \pm 2.32$ ,  $CE_{30} = 224.94 \pm 8.85$   $\mu\text{g/mL}$ ), lo cuál sugiere que el efecto relajante del extracto hexánico, puede deberse a una acción antagonista sobre los receptores colinérgicos, histaminérgicos, y/o un bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{++}$ . Esto último, considerando que la pre-contracción inducida con histamina y KCl, se debe principalmente al incremento en el flujo de calcio extracelular, a través de la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes ( $\text{Ca}^{++}_v$ ) (Campos-Bedolla *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2008).

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

### 9.3. Evaluación de la participación de receptores $\beta$ -adrenérgicos y de canales de $K^+_{ATP}$

Se ha establecido que la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incrementa los niveles de AMPc, segundo mensajero que inicia mecanismos intracelulares relacionados en los procesos de relajación del MLA (Hall, 2000), por lo que resultaba interesante determinar, si la fracción F3' de *Crataegus mexicana*, actuaba a través de la activación de dichos receptores adrenérgicos, para ello se realizaron evaluaciones de F3', en ausencia y en presencia de propranolol (antagonista de los receptores  $\beta$  adrenérgicos,  $3 \times 10^{-6}$  M), en las cuáles encontró una diferencia significativa en los valores de  $CE_{50}$  entre ambas curvas, como se puede ver en el cuadro 5. Dichos resultados, sugieren una ligera participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, en el mecanismo de acción relajante de la fracción F3'.

Como fármaco de referencia se utilizó salbutamol, y en presencia de propranolol se inhibió prácticamente y en su totalidad el efecto relajante del salbutamol (Gráfica 6B).

El paso siguiente fue explorar otras posibilidades de acción relajante. Se sabe que en el músculo liso de vías aéreas, el mecanismo de relajación involucra la apertura de canales de  $K^+_{ATP}$  (Thirstrup *et al.*, 1997). Por lo que para determinar su participación en el mecanismo de relajación de F3', se realizaron curvas concentración-respuesta relajante de F3' en ausencia y en presencia de glibenclamida (10  $\mu$ M) (Bloqueador de los canales de potasio), en las cuales no se observó modificación alguna (Gráfica 7), con ello, se descartó la participación de estos canales en su mecanismo de acción.



## X. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son:

- Se demostró que las hojas de *Crataegus mexicana* (tejocote), presentan actividad relajante, en el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.
- A través de un estudio biodirigido se obtuvo una fracción activa F3', que al ser analizada por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, muestra la separación de 14 picos, lo que indica la presencia de al menos 14 compuestos.
- El extracto hexánico relaja las precontracciones inducidas con histamina y KCl, lo que sugiere un posible efecto antagonista de los receptores a histamina, así como un bloqueo de los canales  $Ca^{++}$ , en el mecanismo de relajación de dicho extracto.
- Se observó una ligera participación de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en el mecanismo de acción de la fracción F3'.
- Se descartó la activación de canales de  $K^+_{ATP}$  en el efecto relajante de la fracción activa de *Crataegus mexicana*.

## XI. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de toxicidad.
- Separar y caracterizar el o los compuestos responsables de la actividad relajante de la fracción activa F3' de *Crataegus mexicana*.
- Evaluar otros posibles mecanismos de acción relajante del o de los compuestos activos.
- Evaluar el o los compuestos activos en un modelo de asma.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aharony, D. (1998) Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**: s214-s219.
- Amrani, Y. and Panettieri, R. (2003) Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 272-276.
- Argueta, A. y Cano, L. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I. Instituto Nacional Indigenista. pp. 399-404.
- Anderson, D. S. and Kippelen, P. (2008) Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J. Allergy. Immunol.* **122**: 225-235.
- Barnes, P. (1998) Pharmacology of airways smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**: S123-S132.
- Barnes, P. (2001) Histamine and serotonin. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**: 329-339.
- Batra, J., Chatterjee, R. and Ghosh, B. (2007) Inducible nitric oxide synthase (iNOS): Role in asthma pathogenesis. *Indian. J. Biochem. Biophys.* **44**: 303-309.
- Belmonte, K.E. (2005) Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**: 297-304.
- Belvisi, M.G., Hele, D.J. and Birrell, M.A. (2004) New advances and potential therapies for the treatment of asthma. *Bio. Drugs.* **18**: 211-223.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>, (acceso 2009).
- Bielory, L. and Lupoli, K. (1999) Herbal interventions in asthma and allergy. *J. Asthma.* **36**: 1-65.
- Billington, C. and Penn, R. (2003) Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* **4**(1): 2.
- Botanical. [http://www.botanical-online.com/medicinals\\_espino\\_tipos.htm](http://www.botanical-online.com/medicinals_espino_tipos.htm) (Acceso abril 2008).
- Bossé, Y., Stankova, J. and Rola-Pleszczynski, M. (2009) Cysteinyl-leukotrienes in asthmatic airway smooth muscle cell hyperplasia. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **102**: 16-21.

- Boskabady, M.H., Aslani, M.R. and Kiani, S. (2006) Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanisms. *Phytotherapy Res.* **20**: 28-33.
- Burnouf, C. and Pruniaux, M.P. (2002) Recent Advances in PDE4 Inhibitors as Immunoregulators and antiinflammatory Drugs. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 1255-1296.
- Campos, M.G., Toxqui, E., Tortoriello, J., Oropeza, M., Ponce, H., Vargas, M. and Montaña, L.M. (2001) *Galphimia glauca* organic fraction antagonizes LTD4 induced contraction in guinea pig airways. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 7-15.
- Campos-Bedolla, P., Montaña, L.M., Flores-Soto, E., Aguilar, A., Puebla, A.M., Lozoya, X. and Vargas, M.H. (2005) Effect of *Gnaphalium conoideum* HBK on guinea pig airway smooth muscle: role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 267-272.
- Chu, E. and Drazen, J. (2005) Asthma. One hundred years of treatment and onward. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**: 1202-1208.
- Daniele, C., Mazzanti, G., Pittler, M. and Ernst, E. (2006) Adverse-Event Profile of *Crataegus* Spp. A Systematic Review. *Drug Safety* **29**: 523-535.
- Deviller, P., Corompt, E., Bréant, D., Caron, F. and Bessard, G. (2001) Relaxation and modulation of cyclic AMP production in response to atrial natriurétic peptides in guinea pig tracheal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **430**: 325-333.
- Donohue, J.F. (2004) Therapeutic responses in asthma and COPD. *Chest.* **126**: 125S-137S.
- Ehlert, F.J. (2003) Pharmacological analysis of the contractile role of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in smooth muscle. *Recept. Channels.* **9**: 261-277.
- Fabricant, D. and Farnsworth, N. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* (Suppl 1) **109**: 69-75.
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M.R., Jankowski, C. and Campos, M.G. (2005) Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D<sub>4</sub>-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* **522**: 108-115.

- Finkbeiner, W. (1999) Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir. Physiol.* **118**: 77-83.
- Fischer, A., Folkerts, G., Geppetti, P. and Groneberg, D. (2002) Pharmacology and Therapeutic mediators of asthma: Nitric oxide. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **15**: 73-81.
- Fryer, A.D. and Jacoby, D.B. (1998) Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **158**: S154-S160.
- Gelfand, E. (2002) Role of Histamine in the pathophysiology of asthma: Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *Am. J. Med.* **113**(9A): 2S-7S.
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H. and Halayko, A.J. (2006) Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* **7**: 73.
- Govindan, S., Viswanathan, S., Vijayasekaran, V. and Alagappan, R. (1999) Apilot study on the clinical efficacy of *Solanum xanthocarpum* and *Solanum trilobatum* in bronchial asthma. *J. Ethnopharmacol.* **66**: 205-210.
- Graham, D.M. and Blaiss, M. (2000) Complementary/alternative medicine in the treatment of asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **85**: 438-449.
- Gross, N.J. (2006) Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 36-39.
- Gunen, H., Mirici, A., Meral, M. and Akgün, M. (2009) Steroids in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are nebulized and systemic forms comparable. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **15**: 133-137
- Hall, I.P. (2000) Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* **15**: 1120-1127.
- Hamad, A., Clayton, A., Islam, B. and Knox, A. (2003) Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriurético peptides and airway smooth muscle function. *Am.J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**: L973-L983.
- Huntley, A. and Ernst, E. (2000) Herbal medicines for asthma: a systematic review. *Thorax.* **55**: 925-929.
- Inagaki, N. and Nagai, H. (2001) Drugs for the treatment of allergic diseases. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**: 275-280.

- Jacoby, D. and Fryer, A. (2001) Anticholinergic therapy for airway diseases. *Life Sci.* **68**: 2565-2572.
- Janssen, L. and Killian, K. (2006) Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. *Respir. Res.* **7**: 1-12
- Kian, F. C. (2006) Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 110-117.
- Latarget, M. y Ruiz, A. (1995). Anatomía Humana Tomo II. 3ª Edición. Editorial Panamericana México. P. 1241-1243.
- Lee, A., Jacoby, D. and Fryer, A. (2001) Selective muscarinic receptor antagonists for airway diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 223-229.
- Li, M., Zhang, H. and Yang, B. (1997) Effects of Ginkgo leaf concentrated oral liquor in treating asthma. *Chung Kuo Ching His I Chieh Ho Tsa Chih.* **17**: 216-218.
- Long, S., Carey, R., Crofoot, K., Proteau, P. and Filtz, T. (2006) Effect of hawthorn (*Crataegus Oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phymed.* **13**: 643-650.
- Lozoya, X., Abigail, A. y Camacho, R. (1987) Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. méd. IMSS.* **25**: 283-291.
- Lu, X., Tang, F., Wang, Y., Zhao, T. and Bian, R. (2004) Effect of *Eucalyptus globulus* oil on lipopolysaccharide-induced chronic bronchitis and mucin hypersecretion in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **29**: 168-171.
- Manickam, A. and Halagowder, D. (2008) Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. *Vasc. Pharmacol.* **49**: 173-177.
- McGraw, D., Elwing, J., Fogel, K., Wang, W., Glinka, C., Mihlbachler, K., Rothenberg, M. and Liggett, S. (2007) Crosstalk between G<sub>i</sub> and G<sub>q</sub>/G<sub>s</sub> pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. *J. Clin. Invest.* **117**: 1391-1398.
- Michal, P., Lysíková, M. and Tuček, S. (2001) Dual effects of muscarinic M<sub>2</sub> acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **132**: 1217-1228.

- Mistry, R., Dowling, M.R. and Challiss, R. (2005) An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M<sub>2</sub> and M<sub>4</sub> muscarinic acetylcholine receptor signaling via Gi/o and Gs proteins. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 566-575.
- Mehlika, B., Nazife, Y., Fatmagül, G., Kerim, G. and Ümit, B. (2008) Antimicrobial activity of endemic *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers and observation of the inhibition effect on bacterial cells. *Cell Biochem Funct.* **26**: 844-851.
- Montgomery, D. (1991). Más sobre experimentos unifactoriales de diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial Iberoamericana. 85-118.
- Mullershausen, F., Lange, A., Mergia, E., Friebe, A. and Koesling, D. (2006) Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol. Pharmacol.* **69**: 1969-1974.
- Mustafa, S., Abdulraheem, A. and Alsughayer, A. (2008) Verapamil Induces calcium influx in the trachea. *J. Pharmacol. Sci.* **106**: 609-614.
- Nicosia, S., Capra, V. and Rovati, G.E. (2001) Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**: 3-19.
- Niembro, R. (1990) Árboles y Arbustos Útiles de México. Editorial LIMUSA, México., p 72-73.
- Page, C., Curtis, M., Sutter, M., Walker, M. y Hoffman, B. (1998) Farmacología integrada, Ediciones Harcourt. 231-236.
- Pelaia, G., Gallelli, L., Vatrella, A., Grembale, R., Maselli, R., De Sarro, G. and Marsico, S. (2002) Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Life Sci.* **70**: 977-990.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J. and Navarro, V. (2001) Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 97-101.
- Rouviere, H. y Delmas. (1999) Anatomía Humana Descriptiva Topográfica y Funcional. 10ª Edición. Editorial. Masson. Barcelona. p.27.
- Santing, R., Boer, J., Rohof, A. and Zaagsma, J. (2001) Bronchodilatory and anti-inflammatory properties inhaled selective phosphodiesterase inhibitors in a guinea pig model of allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* **429**: 335-344.

- Sánchez-Mendoza, M.E., Castillo-Henkel, C. and Navarrete, A. (2008) Relaxant action mechanism of beberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* sweet in guinea pig tracheal smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 229-2236.
- Sánchez-Mendoza, M.E., Torres, G., Arrieta, J., Aguilar, A., Castillo-Henkel, C. and Navarrete, A. (2007) Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig trachea smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* **111**: 142-147.
- Sánchez-Mendoza, M.E., Reyes-Trejo, B., de la Rosa, L., Rodriguez-Silverio., Castillo-Henkel, C. and Arrieta, J. (2008) Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has Relaxing Effect in Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle. *Pharm Biol.* **46**: 800-807.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica, Boletín epidemiológico (2007) Secretaría de Salud Num. 25 Vol. **24** Sem. 25.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica, Boletín epidemiológico (2009) Secretaría de Salud Num. 28 Vol. **26** Sem. 28.
- Spina, D. (2008) PDE4 inhibitors: current status. *Bt. J. Pharmacol.* **155**: 308-315.
- Tabach, R., Rodrigues, E. and Carlini E. (2009) Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product-CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.) *Phytother. Res.* **23**: 33-40.
- Taddei-Bringas, G., Santillana-Macedo, M., Romero-Cancio, J. y Romero-Téllez, M. (1999) Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México.* **41**: 216-220.
- Tallarida, R. (2000) Drug synergism and dose-effect data analysis. *Chapman & Hall/CRC, USA.* pp. 21-39.
- Thirstrup, S., Nielsen-Kudsk, F. and Dahl, R. (1997) In vitro studies on the interactions of  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists, methylxanthines,  $Ca^{2+}$ -channel blockers,  $K^+$ -channel openers and other airway smooth muscle relaxants in isolated guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* **326**: 191-200.
- Thirstrup, S. (2000) Control of airway smooth muscle tone. II. Pharmacology of relaxation. *Respir. Med.* **94**: 519-528.
- Walker, J., Gainetdinov, R., Feldman, D., McFawn, P., Caron, M.,



Lefkowitz, R.J., Premont, R.T. and Fisher, J.T. (2004) G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**: L312-L319.

World Health Organization Geneva, (2002), volume **2**, p71.

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

Zucker I. (1992) Arbustos y Arbolitos con Flor. Editorial BLUME, Hong Kong., p 219-221.

# ANEXO

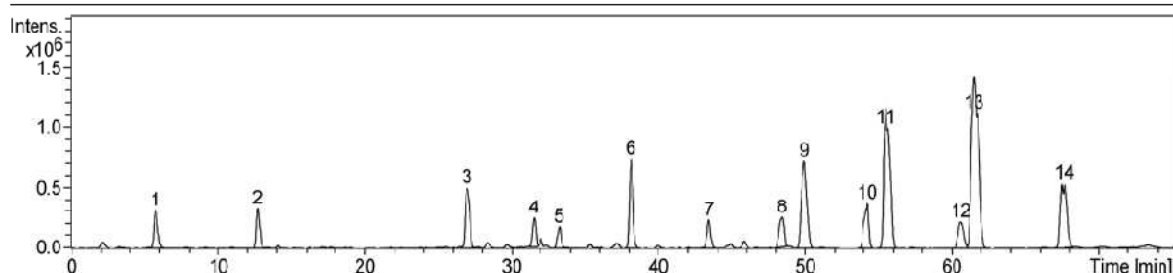
## Estudio de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) de la fracción F3' de hojas de *Crataegus mexicana*.

Con respecto a la fracción activa F3' obtenida de las hojas de tejocote (*Crataegus mexicana*) y cuyo efecto relajante en músculo liso de tráquea de cobayo fue demostrado, en un estudio de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS), se observó la separación de 14 picos, lo que indica que al menos 14 compuestos se encuentran presentes en dicha fracción (Figura 1).

### Compound Mass Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	24/06/2009 12:04:41 a.m.
Analysis Name	D:\Data\externas\ext00143.d	Operator	Carmen Márquez
Method	idesa.m	Instrument	esquire6000
Sample Name	TEJO HTF3F2		
Comment	090604-ext-01 STE-1814		

<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Sid/Normal	Scan Begin	100 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	128.5 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	64.6
Accumulation Time	200000 µs	Averages	8 Spectra	Auto MS/MS	off

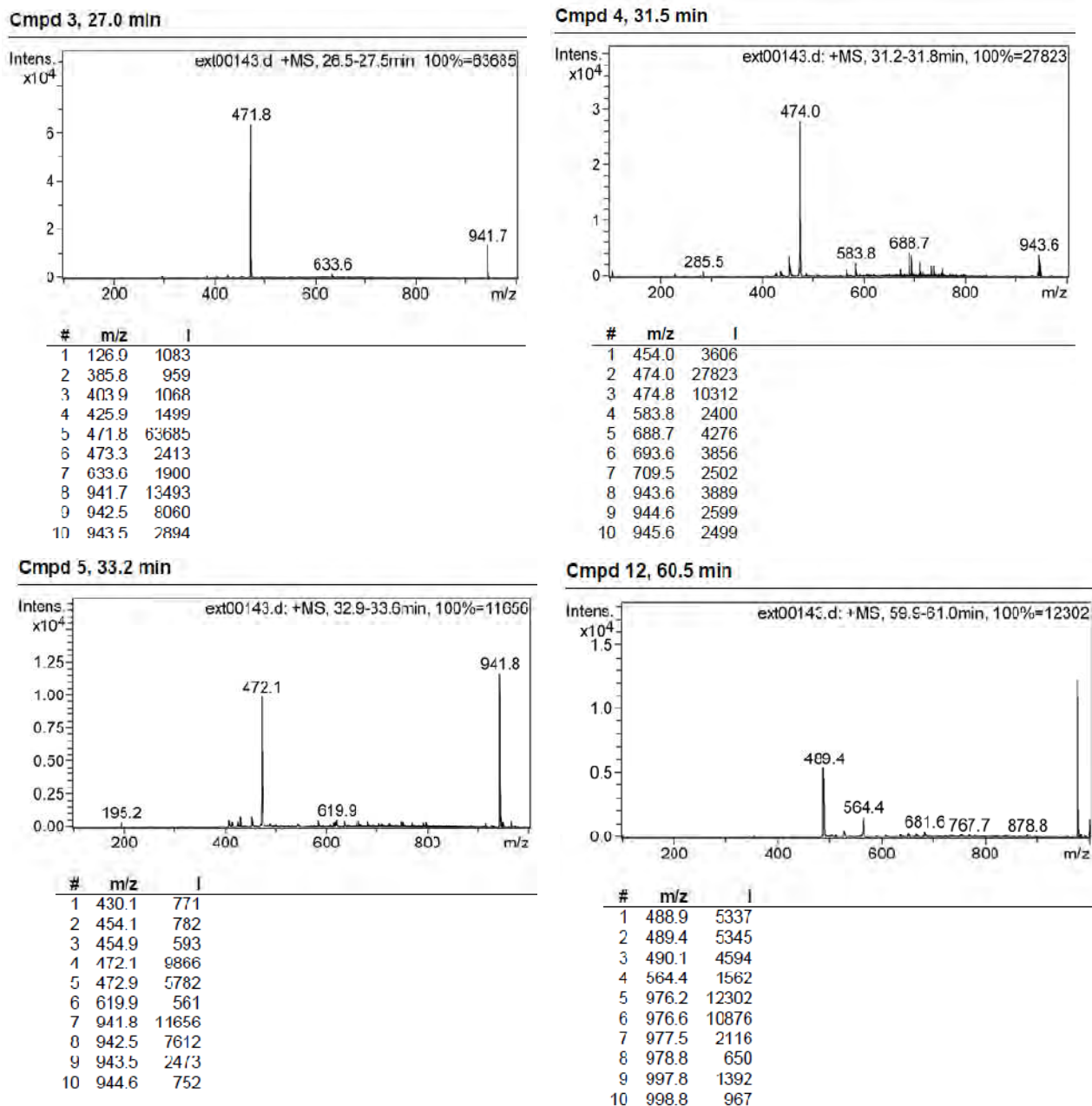


#	RT [min]	Area
1	5.8	5718659
2	12.7	4855149
3	27.0	10924649
4	31.5	3431811
5	33.2	2554459
6	38.1	12783690
7	43.4	3773426
8	48.4	5264306
9	49.9	18244474
10	54.2	7842493
11	55.4	35289986
12	60.5	5474915
13	61.4	48468598
14	67.6	16532787

**Figura 1.** Gráfica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) de la fracción con actividad relajante F3' en músculo liso de tráquea de cobayo obtenida de *Crataegus mexicana*.

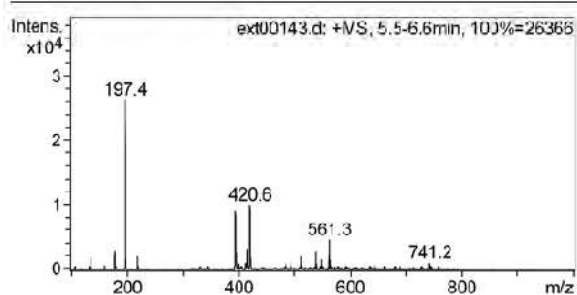
El registro de los espectros de masas de los compuestos contenidos en la fracción obtenida de *Crataegus mexicana* con actividad relajante F3' en

músculo liso de tráquea de cobayo, se detectó en algunas de ellas el ion molecular (M) y los datos de M+1 y 2M+1. Por ejemplo, para los compuestos 3, 4 y 5 del cromatograma (Figura 2) se observa el ion molecular M en m/z 472 que se asocia a la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_4$ , asimismo se observa el dato del fragmento m/z 945 (2M+1). En las figuras 3 y 4 se observan los espectros de masas de los demás compuestos en los cuales no se puede identificar el ion molecular M.



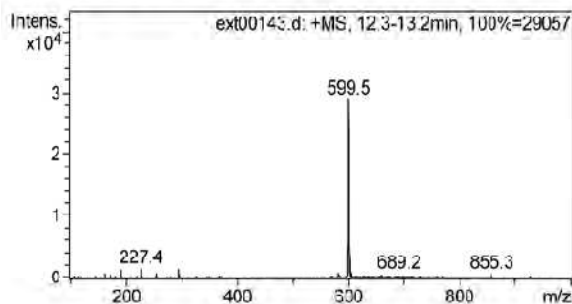
**Figura 2.** Espectros de masas donde se observan el ión molecular  $M^+$ , M+1 y 2M+1, correspondientes a m/z 472, 473 y 945 (Compuestos 3, 4 y 5); además de los fragmentos m/z 488, 489 y 977 (compuesto 12) de la fracción con actividad relajante F3' en músculo liso de tráquea de cobayo, obtenida de *Crataegus mexicana*.

**Cmpd 1, 5.8 min**



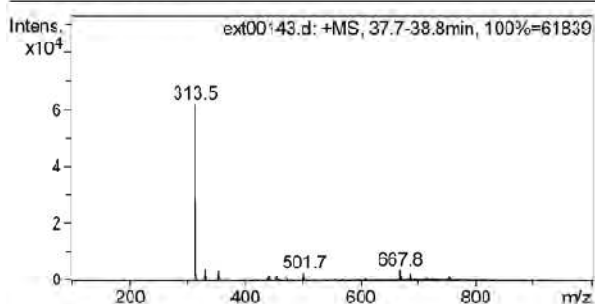
#	m/z	I
1	135.5	1646
2	179.5	2769
3	197.4	26366
4	219.3	2001
5	393.7	9089
6	415.6	3044
7	420.6	9997
8	510.4	1973
9	538.3	2661
10	561.3	4547

**Cmpd 2, 12.7 min**



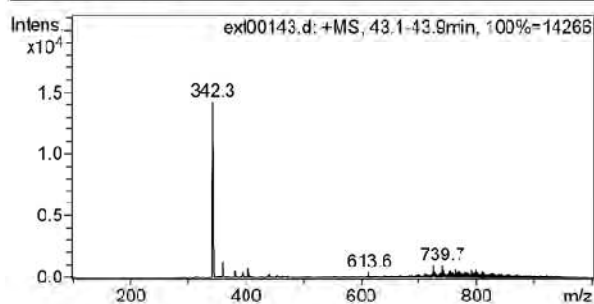
#	m/z	I
1	191.4	1422
2	227.4	1631
3	295.4	1517
4	501.0	904
5	598.9	10808
6	599.5	29057
7	600.2	8659
8	601.3	3906
9	602.5	1146
10	689.2	837

**Cmpd 6, 38.1 min**



#	m/z	I
1	313.5	61839
2	315.4	2424
3	331.5	3945
4	353.5	3550
5	471.0	2203
6	501.7	2719
7	667.8	3737
8	668.7	1711
9	683.7	2589
10	685.6	2651

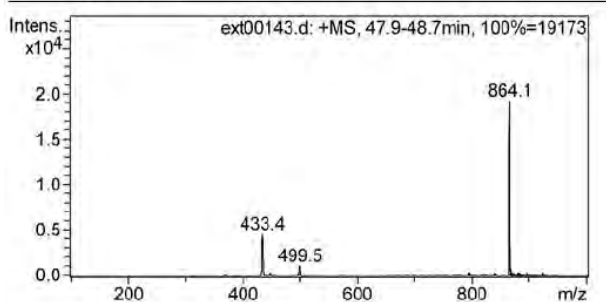
**Cmpd 7, 43.4 min**



#	m/z	I
1	342.3	14266
2	360.2	1315
3	405.1	784
4	723.9	1030
5	739.7	1035
6	741.7	651
7	753.6	586
8	761.6	698
9	789.6	637
10	797.6	672

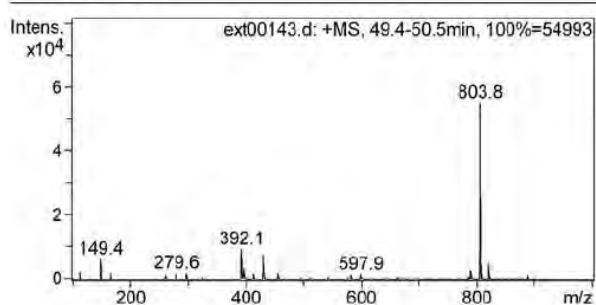
**Figura 3.** Espectros de masas de los compuestos 1, 2, 6 y 7.

**Cmpd 8, 48.4 min**



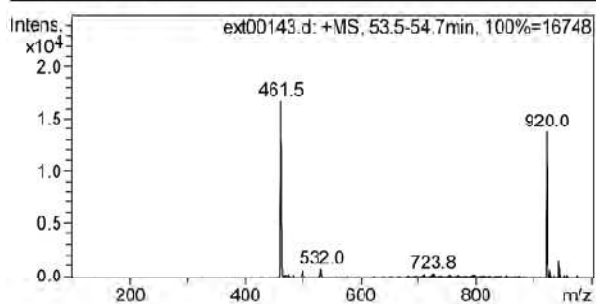
#	m/z	I
1	433.4	4541
2	434.0	4365
3	449.0	363
4	499.5	1052
5	793.7	337
6	864.1	19173
7	864.5	13882
8	865.5	2495
9	866.7	856
10	878.7	342

**Cmpd 9, 49.9 min**



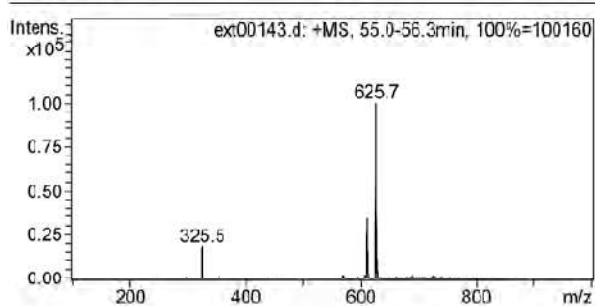
#	m/z	I
1	149.4	6256
2	392.1	9418
3	396.1	3285
4	429.9	7631
5	430.7	3928
6	787.9	3328
7	803.8	54993
8	804.2	28701
9	805.3	4714
10	819.5	5032

**Cmpd 10, 54.2 min**



#	m/z	I
1	460.7	5794
2	461.5	16748
3	532.0	804
4	920.0	13740
5	920.6	11218
6	921.6	2475
7	922.7	724
8	925.7	676
9	941.7	1530
10	942.7	976

**Cmpd 11, 55.4 min**



#	m/z	I
1	325.5	18394
2	326.3	5287
3	570.5	1902
4	605.5	2817
5	610.3	34248
6	625.7	100160
7	626.2	44624
8	627.3	14107
9	628.5	4651
10	607.6	2030

**Figura 4.** Espectros de masas de los compuestos 8, 9, 10 y 11.