



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Brickellia
cavanillesii* en la broncoconstricción alérgica, la
inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas en un
modelo de asma en cobayo (*Cavia porcellus*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Carla López Silva



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Patricia Segura Medina

Ciudad Universitaria, CDMX. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Apellido paterno	López
Apellido materno	Silva
Nombre(s)	Carla
Teléfono	5524995176
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	311038626

2. Datos del tutor

Grado	Dra.
Nombre(s)	Patricia
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Medina

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dr.
Nombre(s)	José Luis
Apellido paterno	Arreola
Apellido materno	Ramírez

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dra.
Nombre(s)	Lourdes Teresa
Apellido paterno	Agredano
Apellido materno	Moreno

5. Datos del sinodal 3

Grado	Biól.
Nombre(s)	Jesús
Apellido paterno	Alquicira
Apellido materno	Mireles

6. Datos del sinodal 4

Grado	Dra.
Nombre(s)	María Elena
Apellido paterno	Ayala
Apellido materno	Escobar

7. Datos del trabajo escrito.

Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Brickellia cavanillesii* en la broncoconstricción alérgica, la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma en cobayo (*Cavia porcellus*).

56 pp.

2019

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” ubicado en la Ciudad de México, México.

Como parte del proyecto denominado “Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Brickellia cavanillesii* en la broncoconstricción alérgica, la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas en un modelo de asma en cobayo (*Cavia porcellus*)” registrado y aprobado por el Comité de investigación y ética del INER con numero de protocolo **B20-18**.



AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad brindada de terminar mis estudios en su cobijo, brindándome una formación teórica y práctica encarnada en sus profesores de excelencia internacional. Le doy mi gratitud eterna por su apoyo académico y económico durante el transcurso de mi desarrollo profesional en la Escuela Nacional Preparatoria Plantel 9 “Pedro de Alba” y la Facultad de Ciencias.

A mi padre Héctor López y a mi madre Margarita Silva, por su paciencia, por su apoyo incondicional y económico durante todo este largo camino, este logro es fruto total de su educación y amor. A mis hermanos, Armando y Elena por ser fuertes pilares emocionales en mi trayectoria, por sus enseñanzas y por hacerme sonreír en las situaciones difíciles.

A mi tutora la Dra. Patricia Segura, por todo el apoyo brindado en el laboratorio, sus enseñanzas, consejos y su alegría, que siempre lograba contagiar en mí el ánimo de seguir adelante y nunca rendirme ante las adversidades.

Al Dr. José Luis Arreola, por fungir como un ejemplo de investigador y persona, por ser mentor y maestro, pero sobre todo por ser un amigo incondicional, por confiar en mí, alentarme y apoyarme para seguir adelante, le debo mi formación académica y personal.

A mis “hermanos” de laboratorio Ximena Cortes y Eduardo Jasso, por ser más que amigos o compañeros de trabajo, por compartir conmigo experiencias únicas tanto buenas como malas, por mostrar simpatía y apoyo, por ser ejemplares personas y sobre todo, por haber hecho tan feliz mi estadía en el laboratorio con cada una de sus sinceras palabras.

A mi amigo y maestro Jesús Alquicira, por ser mentor, amigo, compañero, ejemplo y guía, por estar presente en cada paso y no claudicar antes las dificultades, por ayudar con su consejo durante este camino.

A mis buenos amigos, Marissa, Estefania, Luis, Pamela, Carlos, Kaleb y a todos aquellos que estuvieron junto a mí en las buenas y en las malas, apoyándome incondicionalmente, tendiendo la mano y sobre todo inspirándome con el ejemplo.

A todos mis sinodales por brindarme sus valiosos consejos y a Lupita, por ayudar con los experimentos realizados y brindar apoyo durante el trayecto.

A los cobayos brindados por el INER, que dieron su vida por la ciencia, sin ellos jamás podría haber sido posible realizar esta tesis.

“Por mi raza hablará el espíritu”

**"En algún lugar algo increíble está esperando ser descubierto".
— Carl Sagan**

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Asma.....	9
1.1 Epidemiología del asma.....	12
2. Fisiopatología del Asma.....	12
2.1 Sistema respiratorio	12
2.2 Proceso de sensibilización.....	14
2.3 Mecanismos de defensa pulmonar	16
3. Tratamiento.....	16
3.1 Tratamiento no farmacológico	16
3.2 Tratamiento farmacológico	17
4. Pletismografía barométrica de libre movimiento.	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAL Y MÉTODO	25
Animales y grupos	25
Obtención del extracto	26
Suministró del extracto	27
Procedimiento de sensibilización y reto antigénico.....	27
Reactividad de las vías aéreas a la histamina y pruebas de función pulmonar .	28
Lavados bronquioalveolares y eutanasia.....	30
Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	32
Reactividad de las vías aéreas a histamina y broncoconstricción en cobayos en un modelo de asma	32
Cambios pletismográficos en primera curva de histamina.....	33
Reto antigénico.....	39
Segunda curva de histamina	40
Reactividad de las vías aéreas	45
Conteo celular.....	47
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ABREVIATURAS

Al(OH)₃	Hidróxido de aluminio	Penh	Pausa mejorada
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	PFR	Prueba de función respiratoria
ANOVA	Análisis de variancia	PIF	Pico de flujo inspiratorio
CI	Corticosteroides	rpm	Revoluciones por minuto
CPA	Células presentadoras de antígeno	SSF	Solución salina fisiológica
DP₂₀₀	Dosis provocativa 200	TB	Tiempo de frenado
EF50	Flujo espiratorio al 50%	TE	Tiempo espiratorio
f	Frecuencia respiratoria	Th1	Linfocito T cooperador 1
FBS	Suero fetal bovino (FBS)	Th2	Linfocito T cooperador 2
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico	TI	Tiempo inspiratorio
IgE	Inmunoglobulina E	TI/Ttot	Ciclo de trabajo
IL	Interleucina	TP	Tiempo de pausa
LBA	Lavado bronquioalveolar	Tr	Tiempo de relajación
OVA	Ovoalbúmina	VC	Volumen corriente
PAU	Pausa	VM	Volumen minuto
PEF	Pico de flujo espiratorio		

RESUMEN

Las plantas medicinales desempeñan un papel importante en la atención de la salud primaria para países en vías de desarrollo como México, por su fácil obtención, bajo costo, normas culturales o creencias tradicionales que “aseveran” un alivio sintomatológico. Muchos pacientes combinan la medicina tradicional con la medicina convencional, especialmente aquellos con enfermedades crónicas. Existe una creciente demanda mundial de medicina tradicional y complementaria, el estudio de sus efectos benéficos en las enfermedades, compuestos activos y seguridad toxicológica son continuamente requeridos. Siendo México uno de los países con mayor tradición en la medicina herbolaria, cuenta con aproximadamente 30,000 especies de plantas, de las cuales 3,000 son consideradas medicinales. *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray, es una planta que se comercializa ampliamente en México, para el tratamiento de diversos padecimientos como inflamación, úlceras, ansiedad, dispepsia y diabetes, entre otros. Por estas razones este estudio tuvo como principal objetivo evaluar si el efecto del extracto de *B. cavanillesii* produce una disminución de la respuesta broncoconstrictora en un modelo de asma alérgica en cobayo a partir de la pletismografía barométrica de libre movimiento, técnica que analiza la función respiratoria de animales despiertos. Se utilizaron 18 cobayos hembras (*Cavia porcellus*) divididos en 3 grupos aleatoriamente: Control, Sensibilizado y Sensibilizado+extracto. Al grupo sensibilizado+extracto se le administro el extracto etanólico de *B. cavanillesii* en sus bebederos 150 mg en 500 ml de agua, por cuatro semanas, a la segunda semana de iniciada la administración, se comenzó con el proceso de sensibilización. Los grupos, sensibilizado y sensibilizado+extracto, fueron expuestos con ovoalbúmina (OVA) e hidróxido de aluminio ($AlOH_3$) como adyuvante al día 0, tuvieron un primer refuerzo de OVA en el día 8 y un segundo refuerzo para el día 15. Los días 21 al 25 realizaron dos curvas a histamina y un reto antigénico, se realizó pletismografía barométrica para obtener los parámetros respiratorios f, VC, VM, PEF, PIF, Ti, Tr y Penh, en todos los grupos. Se hicieron lavados bronquioalveolares (LBA) de los animales sensibilizados, con los que se realizó conteo celular total y diferencial. Los resultados de las curvas de histamina y la DP_{200} demostraron la hiperreactividad en los grupos de animales asmáticos, sin embargo la respuesta del Penh en el grupo que tomo el extracto, fue menor, evidenciando su efecto en las vías respiratorias atenuando la broncoconstricción.

Adicionalmente el extracto disminuyo la inflamación expresada en el conteo total celular y la población de eosinófilos, los LBA mostraron significativamente una menor cantidad de células totales inflamatorias por ml ($p=0.0191$) en el grupo sensibilizado+extracto, en el conteo diferencial se observó una cantidad menor ($p=0.0260$) de eosinófilos. Estos resultados pueden sugerir en su conjunto, que *B. cavanillesii* posee la propiedad de broncodilatar las vías áreas en un modelo de asma experimental de cobayos.

INTRODUCCIÓN

En la historia humana una práctica habitual en diversas culturas ha sido el uso de diversas plantas con un carácter “medicinal” para el tratamiento de padecimientos crónicos, como el asma. Estos conocimientos llegan hasta nuestros días gracias a costumbres y tradiciones de nuestros ancestros, sin embargo, el uso de estos tratamientos alternativos debe ser mediado y orientado, teniendo en cuenta la investigación científica que permite establecer la efectividad y los beneficios terapéuticos, incluyendo la seguridad con las que pueden ser usados (Sánchez & Sánchez, 2012).

En todas las culturas existen evidencias del uso de plantas desde tiempos prehispánicos, con un carácter “medicinal” en distintos padecimientos y enfermedades, como el asma. Estos conocimientos llegaron hasta nosotros gracias a las costumbres y tradiciones de nuestros ancestros, el uso de estos debe ser mediado y orientado teniendo en cuenta la investigación científica que permite establecer la efectividad, beneficio terapéutico y seguridad, para que estas puedan ser usadas (Sánchez & Sánchez, 2012).

La herbolaria indígena precolombina jugó un papel importante en el campo de la medicina antigua, debido al uso de varias plantas medicinales y otros productos de origen natural con una historia de más de 350 años. Incluso hay estudios recientes de paleobotánica que han comprobado la existencia de algunos vestigios vegetales y polen petrificado en zonas arqueológicas de asentamientos humanos con 4000 años de antigüedad, que en la actualidad son perfectamente conocidas y utilizadas en la medicina tradicional.

Los aztecas son una cultura de la cual se tiene información sobre sus conocimientos y prácticas médicas. La mayor parte de conocimientos sobre herbolaria indígena azteca fueron documentados en códices. Cuando llegaron los conquistadores europeos, durante la invasión de Tenochtitlán y el establecimiento de la Nueva España muchos de estos códices originales fueron quemados, saqueados o destruidos. Parte de este conocimiento fue recopilado tiempo después por los indígenas Martín de la Cruz y Juan Badiano en el *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (libro sobre hierbas medicinales de los pueblos indígenas) nombrado también como código de la cruz-

badiano, códice badiano o códice barberini, el cual describe 227 plantas de varias familias y su uso medicinal en la cultura azteca (Museo de la medicina. UNAM, 2018).

Actualmente se reporta que distintas plantas de la familia Asteraceae tienen propiedades antibacteriales, por lo cual existe uso como antibacterianos de las vías respiratorias altas, sobre todo debido a la presencia de taninos, flavonoides, antraquinonas, fenoles, esteroides, glicósidos y alcaloides. Los esteroides presentes en estas plantas podrían ser de ayuda en el tratamiento sintomatológico de enfermedades de carácter inflamatorio, como el asma (Tomayquispe, 2014). Extractos etanólicos de algunas plantas ya han sido probados en condiciones experimentales *in vitro* y se han encontrado efectos que podrían ser benéficos para disminuir la respuesta alérgica (Wang, *et al.*, 2018).

El gran potencial de las plantas medicinales debe ser explorado, debido a que el enorme costo de los tratamientos actuales de muchas enfermedades conduce a las personas de países con bajo o mediano desarrollo al uso de terapias tradicionales de medicina alternativa. Sobre todo, en aquellas enfermedades crónicas que exigen un tratamiento continuo de medicamentos. Una investigación científica exhaustiva de las diversas plantas medicinales usadas tradicionalmente en las culturas Mesoamericanas (azteca, maya, zapoteca, etc.) y asiáticas (kazajos, han, zhuang, etc.) pueden llegar a proporcionar pistas muy valiosas para el desarrollo de medicamentos nuevos, económicos y alternativos como opciones terapéuticas para algunas enfermedades. Los tratamientos con extractos de plantas medicinales constituyen un recurso como remedios alternativos especialmente en el inicio de algunas enfermedades. Existe una falta considerable de conocimiento con respecto al potencial terapéutico, farmacológico y toxicológico de los componentes químicos que poseen muchas plantas y sus extractos, usados tradicionalmente en enfermedades (Sánchez & Sánchez, 2012; Wang, *et al.*, 2018).

Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray, es una de las plantas medicinales usadas comúnmente en México, conocida como atanasia amarga, gobernadora de Puebla, hierba amargosa, hierba del becerro, hierba del perro u orégano de cerro. Es una hierba con una altura de hasta 2 metros tiene tallos ásperos y rojizos. Las hojas son de color grisáceo, con pequeños hilitos en los bordes, tiene

un sabor muy amargo, sus flores poseen pigmentación amarilla, los frutos alcanzan una dimensión de entre 1.0-1.5 centímetros. Su distribución es en bosque tropical caducifolio de climas cálidos y semicálidos entre los 1130 y 1000 metros sobre el nivel del mar (López, 2018).

En el herbario nacional (CONABIO, 2009), se puede encontrar a *B. cavanillesii* clasificada taxonómicamente de la siguiente manera

Taxonomía:

Reino:.....Plantae

Phylum:.....Tracheophyta

Clase:.....Magnoliopsida

Orden:.....Asterales

Familia:.....Compositae o Asteraceae

Tribu:.....Eupatorieae

Género:.....Brickellia

Especie:.....*Brickellia cavanillesii*

El género *Brickellia* forma parte de la tribu Eupatorieae, encontrada en la colección del herbario nacional mexicano, sus géneros de plantas descritas son abundantes (*Barroetia*, *Ageratella*, *Bartlettina*, *Jaliscoa*, *Stevia*, etc.). Esta tribu comprende alrededor de 1200 especies ampliamente distribuidas, principalmente en América tropical, muchas de ellas tienen propiedades medicinales que se han utilizado para aliviar dolencias e infecciones, y algunas de ellas están catalogadas como especies invasoras asociadas a ecosistemas alterados (Rzedowski, & Rzedowski, 2005; García-Sánchez, *et al.*, 2011; Castelo, *et al.*, 2003-2005), sin embargo, la importancia que se le debe dar a esta tribu es mayor ya que agrupa especies importantes en la medicina tradicional en los cinco continentes: en América del Sur y Asia se utilizan para aliviar enfermedades diversas

como hipertensión, diabetes, ansiedad e infecciones microbianas y parasitarias, entre otras (García-Sánchez, *et al.*, 2011; Eshiet, *et al.*, 2014; Wang, *et al.*, 2018).

Las especies *Brickellia* son nativas de México y la porción suroeste en los Estados Unidos; son por lo regular arbustos perennes que tienen flósculos, sus frutos son una sola semilla en una vaina prominente. Estas plantas suelen consumirse tradicionalmente como una infusión de hierbas por sus sospechadas propiedades hipoglucémicas y antioxidantes. *B. cavanillesii* es una de las plantas populares que se consume en América Central y México (Schmidt & Schilling, 2000).

B. cavanillesii ha sido estudiada por diversos grupos, uno de ellos es el grupo de Navarrete, Palacios y Mata (2011) en su trabajo “*Gastroprotective Effect of B. cavanillesii (Cav) B. L. Robinson (Asteraceae) in Rats.*” Este grupo, que utilizó un extracto de las partes aéreas de la planta (10-300 mg/kg), logró tener una reducción de las lesiones gástricas inducidas por el etanol en ratas, los autores utilizaron carbenoxolona usada para el tratamiento de las úlceras del tracto digestivo como referencia y comprobaron que tanto el fármaco, como el extracto poseían un efecto gastro-protector muy similar. Señalando que dicho extracto podría tener un papel importante en la regulación de diversos procesos, como la presión sanguínea, la coagulación de la sangre, la actividad del aparato digestivo y la respuesta inflamatoria (Navarrete, *et al.*, 2011).

En 2014, el grupo de trabajo de Eshiet, Zhu, Anderson, y Smith, señalaron en su artículo “*Chemical characterization of B. cavanillesii (Asteraceae) using gas chromatographic methods*”, la importancia de conocer la actividad biológica que tiene *B. cavanillesii* y argumentan que en la actualidad, es esencial que se establezca evidencia científica con respecto a la eficacia y el potencial farmacológico de la plantas. Encontraron por cromatografía de gases un total de trece compuestos con una coincidencia de calidad del 90%, estos fueron (1) ciclohexeno, 6-etenil-6-metil-1- (1-metiletil) -3- (1-metiletilideno) -, (S) -; (2) Biciclo (2.2.1) heptan-2-ona, 1, 7, 7-trimetil- (1S, 4S) -; (3) Fenol, 2-metoxi-4- (1-propenil) -; (4) benceno, 1- (1, 5-dimetil-4-hexenil) -4-metil-; (5Naftaleno, 1, 2, 3, 5, 6, 8a-hexahidro4, 7-dimetil-1-1- (1-metiletil) -, (1S-cis) -; (6) Fenol, 2-metoxi-; (7) Benzaldehído, 3-hidroxi-4-metoxi-; (8) ácido 11, 13 - eicosadienoico, éster metílico; (9) 2-

furancarboxaldehído, 5-metil-; (10) Maltol; (11) Fenol; (12) Hidroquinona; (13) 1H-Indeno, 1-etilidenoctahidro-7a-metil-, (1E, 3a.alfa, 7a.beta) (Eshiet, *et al.*, 2014).

Resaltaron la identificación de “Brickellin” un flavonol O-metilado, señalando en la literatura. En investigaciones *in vitro* sugieren que flavonoides como este, poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, antidiabéticas, antioxidantes, anticancerígenas y cardiovasculares (Eshiet, *et al.*, 2014).

Otro claro ejemplo de la investigaciones sobre esta planta, es el estudio “*The Biologic Potential of Lyophilized Extracts of B. cavanillesii (Asteraceae): Apoptosis and Glut 2 Gene Expression*”, de Eshiet, Zhu y Smith ellos encontraron de manera *in vitro*, el efecto en la expresión génica de células hepáticas de carcinoma humano (HepG2) a partir de la implementación del extracto, así como el efecto que tenía sobre la expresión de genes asociados a la vía de apoptosis y al transportador de glucosa 2 (GLUT 2). Encontraron que dicho extracto participaba en la regulación de genes antiapoptóticos, induciendo la expresión del gen GLUT2, el cual es esencial el movimiento pasivo de glucosa a través de las membranas celulares (Eshiet, *et al.*, 2015).

Un ejemplo más es el trabajo “*Anxiolytic-like effects and toxicological studies of B. cavanillesii (Cass.) A. Gray in experimental mice models*” de Ávila-Villarreal y *et al.* (2016). Utilizaron extractos liofilizados de *B. cavanillesii* y evaluaron *in vitro* células de hígado de carcinoma humano (HepG2) con y sin suero fetal bovino (FBS), investigaron la posible actividad hipoglucémica, utilizando biomarcadores de proteínas de metabolismo y transporte de glucosa. Sus resultados sugirieron que la expresión de la proteína transportadora 2 (GLUT 2) aumentó con dicho extracto. Sin embargo, los autores señalan que serán necesarios más estudios para delinear claramente el potencial terapéutico de esta planta y sus efectos biológicos en el organismo (Ávila-Villareal, *et al.*, 2016).

El tratamiento de enfermedades con extractos herbales constituye un gran recurso, por lo que es esencial establecer evidencia científica con respecto a la eficacia y el potencial farmacológico de los componentes químicos encontrados en las plantas que los constituyen, la identificación precisa

y determinación de sus compuestos químicos ayudara a predecir sus acciones biológicas. (Eshiet, *et al.*, 2014; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Nuestro interés es saber si el extracto etanólico de *B. cavanillesii* tiene efectos sobre el proceso inflamatorio en un modelo de asma alérgica.

1. Asma

Los antiguos médicos de Grecia fueron los primeros que utilizaron la palabra asma (que deriva del verbo "aazein" y el cual significa exhalar con la boca abierta, diferenciándola de disnea ("dys" difícil, "pnoea" respiración). Aunque dicha condición antes había sido descrita por escritos egipcios y hebreos. El papiro Ebers es un tratado medico egipcio, de los pocos que existen. Fue redactado en el antiguo Egipto (1550 a. C.). Este documento tiene un pequeño apartado de enfermedades respiratorias, no se describe a detalle ninguna enfermedad específica, pero hay listas para el tratamiento con hierbas, de diversos síntomas: tos, expectoración y sibilancias. Se explica la formulación de prescripciones antiguas, algunas compuestas de higos, uvas, frutas del sicomoro, bayas de enebro, incienso, comino, vino, grasa de ganso y cerveza dulce. Un ejemplo es el extracto de beleño (*Hyoscyamus muticus*), planta venenosa del mediterráneo de la cual se obtiene la hiosciamina o escopolamina (alcaloide tropánico y el levo-isómero de la atropina, con acción parasimpaticolítica intensa que inhibe los receptores muscarínicos), la cual se colocaba sobre un ladrillo caliente y se inhalaban sus emanaciones (Murtagh, 2009).

La primera descripción clínica reconocida para un ataque asmático fue hecha por Aretaeus de Capadocia en el siglo II d.C. Sus escritos griegos, fueron descubiertos y traducidos al latín en Venecia (1552) dándose a conocer a un público más amplio. Es el primer sabio que define al asma como una enfermedad, poniendo énfasis en síntomas como son: sibilancias, tos seca improductiva e imposibilidad de dormir acostados. Aretaeus asocia el término ortopnea con asma. "Los pulmones sufren y las partes del cuerpo que ayudan a respirar se compadecen con ellos." Describió la respiración rápida, ruidosa de los asmáticos, ansiedad y miedo que esta enfermedad

provoca: "buscan ansiosamente los lugares abiertos ya que ninguna casa parece adecuada para su respiración" (Murtagh, 2009).

El asma es una enfermedad crónica de las vías aéreas producida por la interacción entre la broncoconstricción de las vías aéreas, hiperreactividad bronquial e inflamación. Se caracteriza por presentar síntomas variables y recurrentes, como lo son: tos, picazón de garganta, broncoespasmos y dificultad para respirar. Los síntomas pueden aparecer espontáneamente frecuentemente con ciertos inductores como alérgenos, ejercicio, inhalación de irritantes o durante las infecciones respiratorias (Martínez-Ramírez, *et al.*, 2006). La principal característica que interviene en el desarrollo del asma es la inflamación crónica de las vías aéreas, lo que provoca una broncoconstricción, debida en parte, a la respuesta exagerada del músculo liso de las vías aéreas, mejor conocida como hiperreactividad bronquial (Torres, *et al.*, 2005). La inflamación crónica observada en el asma involucra una serie compleja de interacciones caracterizadas por un incremento en la producción de moco entre las células y diversos mediadores que conducen a la formación de lesiones histopatológicas, obstrucción de vías aéreas, contracción del músculo liso, edema, descamación de células epiteliales e infiltrado inflamatorio (Branes, 1996).

Debido a su etiología multifactorial, las alteraciones fisiológicas respiratorias y sus diversas expresiones clínicas, no es posible hacer una definición que describa completamente esta enfermedad (Río-Navarro, *et al.*, 2009). La definición más cercana y aceptada para describir esta enfermedad, ha sido propuesta por la "Iniciativa Global para el Asma", GINA por sus siglas en inglés. La GINA define el asma como: "Una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias. Con síntomas como: sibilancias, respiración entrecortada, opresión en el pecho y tos, esta última varía en tiempo e intensidad, además de la variable de limitación de flujo aéreo. Estas reacciones son desencadenadas por ejercicio, alérgenos o la exposición a irritantes, cambios en el clima o infecciones respiratorias" (GINA, 2018).

A pesar de la naturaleza causal del asma, las razones de su severidad no se han establecido adecuadamente. Las condiciones ambientales desempeñan un papel importante, también lo hace

la susceptibilidad genética de los individuos, la combinación de los factores genéticos y ambientales hace que sea más difícil el estudio de la enfermedad, su diagnóstico y tratamiento adecuado, en consecuencia, se han descrito diferentes fenotipos y formas de asma (Tabla 1) (GINA, 2018). El tipo alérgico está mejor estudiado y documentado, debido a que los alérgenos pueden generar un patrón de respuesta inmunológica particular, especialmente en el inicio de la enfermedad (Río-Navarro, *et al.*, 2009).

Tabla 1. Fenotipos/tipos de asma más comunes.

Fenotipo de asma	Características
Asma alérgica	Este es el fenotipo de asma más fácilmente reconocido, que a menudo comienza en la niñez, se asocia con antecedentes pasados y /o familiares de enfermedades alérgicas como rinitis alérgica o alergia a alimentos o medicamentos. Presenta una inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Los pacientes con este fenotipo asmático generalmente responden bien al tratamiento con corticosteroides inhalados.
Asma no alérgica	Este fenotipo de asma no está asociado con la alergia. El perfil celular puede ser neutrófilo, eosinófilo o contener solo unas pocas células inflamatorias. Los pacientes con asma no alérgica a menudo responden con menor efectividad a los corticosteroides.
Asma tardía	Este fenotipo está caracterizado en algunos adultos, particularmente mujeres, que presentan asma por primera vez en la etapa adulta. Estos pacientes tienden a ser no alérgicos, y a menudo requieren dosis más altas de corticosteroides.
Asma con limitación de flujo aéreo	Este fenotipo se presenta en pacientes con un asma prolongado, desarrollan una limitación de flujo de aire consecuencia de la remodelación de la pared de las vías respiratorias.
Asma con obesidad	Este fenotipo se presenta en un proceso asmático asociado a la obesidad, donde predominan los eosinófilos.

(GINA, 2019)

Los estudios actuales evidencian que el asma fue una enfermedad conocida por ser “reversible”, la realidad es contraria de no ser tratada adecuadamente, pueden existir cambios estructurales irreversibles en las vías respiratorias que incluyen hiperplasia del músculo liso y glándulas, fibrosis subepitelial, neovascularización, cambios asociados al remodelamiento de las vías respiratorias,

contribuyendo a la patogénesis, severidad, progresión, falta de reversibilidad estructural con pérdida de la función pulmonar, que pueden llevar a la muerte (Andreadis *et al.*, 2003).

1.1 Epidemiología del asma

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 235 millones de personas en el mundo padecen asma. En 2015 se notificaron 383 000 muertes por asma, la mayoría de ellas en adultos mayores (OMS, 2017; OMS, 2018).

En México, para el 2018 se consideró al asma como la decimotercera causa de morbilidad. En los análisis de diversos grupos clasificados por edad, la tasa más alta identificada, corresponde al grupo de 0 a 4 años (732.6 casos por 100 000 habitantes), seguida por el grupo de 5 a 9 años (540.8 casos por 100 000 habitantes). En contraste los grupos de edad con menor tasa son el grupo de 15 a 19 años (142.1 casos por cada 100 000 habitantes) y el de 20 a 24 años (136.9 casos por cada 100 000 habitantes). Se tienen datos significativos que a partir de esta edad se incrementa la morbilidad hasta alcanzar una tasa de 215.7 casos por 100 000 habitantes en el grupo de 60 a 64 años. Mientras que en el grupo de 65 y más años, la tasa es de 119.4 casos por cada 100 000 habitantes (OMS, 2018).

En México, a pesar de que la tasa en mortalidad es baja (<1.5 por 100 000 habitantes en 2006), la morbilidad es bastante alta, lo que ocasiona una gran carga para los servicios de salud (morbilidad promedio 2003-2009 de 283.3 casos por 100 000 habitantes). Esto presenta un gran reto social y de salud pública, ya que engloba cubrir costos de medicamentos, hospitalizaciones, ausentismo escolar y laboral (García-Sancho, *et al* 2012).

2. Fisiopatología del Asma

2.1 Sistema respiratorio

El sistema respiratorio se encuentra en un continuo e íntimo contacto con el medio externo, se ha estimado que diariamente inhalamos aproximadamente de 1000 a 1500 litros de aire, exponiendo las vías respiratorias a toda clase de sustancias químicas y biológicas (Sierra-Vargas, *et al.*, 2009).

Tiene como principal objetivo la captación de aire del exterior, el intercambio gaseoso, conducción y filtración del mismo, está compuesto por pulmones y vías aéreas. Las vías respiratorias se dividen en vías aéreas superiores: fosas nasales, faringe, laringe y las vías aéreas inferiores: tráquea (a partir de la misma el sistema respiratorio se divide en dos), bronquios (primarios y secundarios), bronquiolos y alveolos (Figura 1), que en ese orden, progresivamente van disminuyendo su diámetro y su longitud (Merí, 2005).

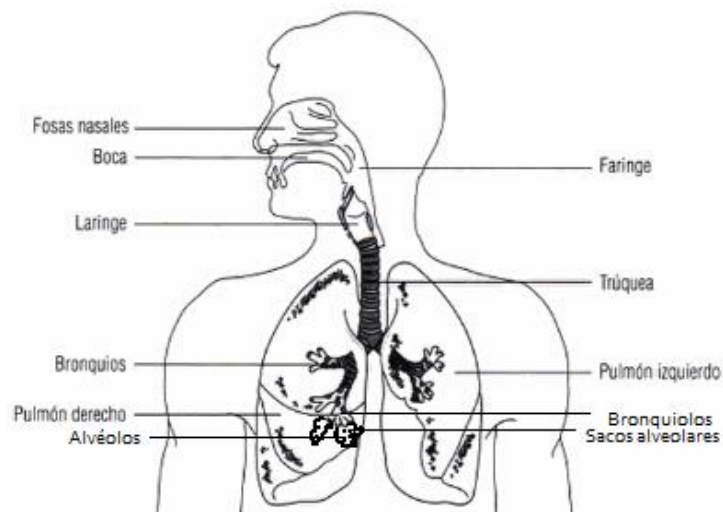


Figura 1. Diagrama de las vías respiratorias. Modificado (Merí, 2005).

Las fosas nasales, faringe, laringe, tráquea y bronquios se encargan de la conducción del aire, los bronquiolos conducen aire y también participan en el intercambio gaseoso, mientras que los alveolos solo participan en el intercambio gaseoso (Merí, 2005).

Dependiendo el tipo de asma, se pueden presentar características específicas en determinadas estructuras anatómicas. En el asma alérgica, las estructuras involucradas son los bronquios y los bronquiolos, aquí los cambios son la inflamación crónica, la hiperreactividad bronquial, hipersecreción de moco y la remodelación de vías aéreas (Kotses, 2010).

En la hiperreactividad bronquial se presenta una reacción exagerada del músculo liso en respuesta a un estímulo, que suele asociarse a la predisposición genética denominada “atopia” en la cual se

produce una mayor cantidad de inmunoglobulinas específicas, así como respuesta a varios factores ambientales, diversos tipos de antígenos en el caso del asma alérgica, los cuales suelen ser alérgenos como: la caspa de los animales (restos de piel animal), ácaros, polen, algunos medicamentos y venenos de insectos (Murdoch & Lloyd, 2010). También los contaminantes ambientales como el humo de tabaco, sustancias químicas (perfumes, pinturas, solventes, gasolina, etc.) y oxidantes, se han asociado a una disminución en la función pulmonar e incremento de hiperreactividad bronquial (HRB) (Arruda, *et al.*, 2001).

2.2 Proceso de sensibilización

En la fase inicial del desarrollo de asma (sensibilización), un antígeno entra al sistema respiratorio, donde es reconocido por células presentadoras de antígeno (CPA), que se encuentran en el tracto respiratorio. Estas células lo procesan y lo presentan a los linfocitos T cooperadores 2 (TH2) y comenzando a secretar sus citosinas características (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) (Holgate, *et al.*, 2012; Oettgen, *et al.*, 2011). La respuesta TH2 inhibe la respuesta TH1, es decir que mientras la respuesta TH2 esté activada, productos como IL-4 inhibiran a INF- γ disminuyendo significativamente la respuesta de tipo TH1, en consecuencia, cuando exista un incremento de INF- γ disminuirá IL-4 activando la respuesta TH1 (Zhao, *et al.*, 2009).

La inflamación asmática se atribuye a una sensibilidad anormal para distintos componentes que desencadenan una respuesta celular con un incremento en las citocinas tipo TH2 y disminución del tipo TH1. En algunos casos, las células TH1 (dependiendo del modelo específico de enfermedad y del estado de inflamación) pueden asistir a las TH2 en la iniciación de la respuesta inflamatoria, aunque es la producción de citocinas dependientes de TH2 la que dirige y mantiene la inflamación asmática y la consecuente patofisiología (Finotto, *et al.*, 2002).

Son muchos factores los cuales intervienen en la probabilidad de desarrollar una sensibilización clínicamente significativa, entre ellos están el genotipo del huésped, tipo de alérgeno, concentración de alérgenos en el medio ambiente y si la exposición se produce junto con agentes que pueden ayudar al proceso de sensibilización (adyuvantes). Estos agentes incluyen ciertos

ligandos de receptores Toll-like, que incluyen endotoxinas, que pueden promover respuestas celulares de tipo TH1 y en ciertas circunstancias (cuando se encuentran en concentraciones apropiadas junto con un alérgeno) puede ser capaces de propiciar el desarrollo para respuestas celulares tipo TH2 (Herrick & Bottomly, 2003).

Existen otros agentes que pueden ayudar en la formación de una sensibilización alérgica como es la quitina, encontrada en muchos organismos y los contaminantes ambientales (Saxon & Díaz-Sánchez, 2005). El patrón de contacto entre el sistema inmune con los alérgenos es otro factor importante: como lo son, la cantidad, frecuencia, tiempo de exposición al alérgeno y las características fenotípicas en las subpoblaciones en células dendríticas que participan en la respuesta (Hammad & Lambrecht, 2008).

La inflamación producida en sujetos sensibilizados después de la exposición a un antígeno (alérgeno específico) es caracterizada por dos tipos de reacciones, una aguda, conocida como reacción de fase temprana o hipersensibilidad inmediata tipo I, la cual es seguida por una reacción de fase tardía que se produce posteriormente a la exposición persistente o repetitiva a un antígeno, desarrollando inflamación crónica (Kay, 2001).

La reacción de *fase temprana* es mediada por IgE específicas las cuales están unidas a mastocitos y se desencadenan pocos minutos después de la exposición y acoplamiento, con el alérgeno. El resultado de dicha unión entre alérgeno e IgE es la degranulación de células cebadas y liberación de potentes broncoconstrictores como histamina, leucotrienos y tromboxanos, produciendo un estrechamiento y secreción mucosa de las vías respiratorias.

La reacción de *fase tardía* se desarrolla aproximadamente 4-8 horas después a la exposición del antígeno, que comienza liberando mediadores como prostaglandinas, leucotrienos y citosinas TH2, mismas que sirven como quimiotácticos para eosinófilos, que activan y mantienen la sintomatología asmática, como la hipersecreción de moco y edema pulmonar (Galli, *et al.*, 2008; Holgate, *et al.*, 2012).

2.3 Mecanismos de defensa pulmonar

El epitelio de las vías aéreas es el primer contacto para la invasión de patógenos y antígenos inhalados (como los alérgenos), esta estructura actúa como una barrera física, contribuye en gran medida defendiendo al hospedero, produciendo péptidos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas y metabolitos del ácido araquidónico que inician con el reclutamiento de fagocitos, desencadenando la cascada inflamatoria dentro de la mucosa respiratoria. Esta función se ve facilitada por la expresión de receptores tipo Toll-like (TLRs), que se encuentran en las células epiteliales del intestino, tracto urogenital y respiratorio. En el pulmón, las vías respiratorias primarias y células epiteliales alveolares de tipo II, expresan TLR4, cuya activación induce la producción de IL-8 en respuesta al estímulo por lipopolisacáridos, además expresan TLR2, TLR3, TLR5 Y TLR9, armados para participar en la respuesta inmune innata a una infección (Pazmiño, & Navarrete 2014).

3. Tratamiento

El manejo adecuado del asma requiere el desarrollo de una asociación entre la persona asmática y los proveedores de salud. Para el control del asma se establece un tratamiento de tipo farmacológico y no-farmacológico, planteándose distintos objetivos respecto al control sintomatológico del padecimiento, aunque dichos objetivos no siempre son alcanzados en todos los pacientes, entre estos se encuentran : ausencia de síntomas crónicos, disminución de la frecuencia de exacerbaciones, mínima necesidad de tratamientos de rescate, estilo de vida normal, función pulmonar normal y mínimos o ausentes efectos adversos al tratamiento (Lemanske & Busse, 2003; GINA, 2018).

3.1 Tratamiento no farmacológico

Dentro del tratamiento no farmacológico encontramos primordialmente el control ambiental. Se les informa a los pacientes la importancia de evitar la exposición a alérgenos y otras sustancias que puedan tener impacto o desarrollo en el curso de la enfermedad, como humo de tabaco o químicos

corrosivos para vías aéreas. Aunado al control ambiental, se deben realizar monitorios regulares, ejercicios de respiración, evitar medicamentos y/o alimentos que desencadenen sintomatología, tener dieta saludable, una reducción de peso en caso de ser necesario, cumplir con el esquema de vacunación, realizar actividad física, y contar revisiones clínicas constantes, Novedosamente los últimos años se han implementado en algunos pacientes terapias como la termoplástia bronquial y la inmunoterapia, alternativas aún bajo investigación, demostrando diversidad en los resultados (Lau, *et al.*, 2000; GINA, 2018; Fernández, 2010).

3.2 Tratamiento farmacológico

La eficacia de los fármacos en el tratamiento es dependiente del uso continuo y a su no interrupción. Los medicamentos utilizados en asma se dividen en tres categorías: medicamentos de rescate (beta 2 agonistas inhalados de acción corta y anticolinérgicos), medicamentos control (corticoesteroides, broncodilatadores de larga acción y antagonistas del receptor de leucotrienos), y terapias complementarias para pacientes con asma severa (Taur, D. & Patil, 2011).

Medicamentos de rescate

La terapia de rescate compuesta por medicamentos que actúan rápidamente, revirtiendo la broncoconstricción y aliviando la sintomatología, administrados a todos los pacientes con la finalidad de que sean usados solamente cuando los síntomas se ven agravados (GINA, 2018).

Broncodilatadores agonistas β 2 adrenérgicos: Son los medicamentos más comunes, debido a que actúan rápidamente y son potentes. Relajan el musculo liso, aumentan el aclaramiento mucociliar, disminuyen la permeabilidad vascular y modulan la liberación de mediadores por mastocitos. El mecanismo de acción se basa en la interacción del receptor β 2 con el agonista, que se encuentra en la membrana celular, y al acoplarse impide la entrada de calcio intracelular. Los fármacos representantes son el salbutamol y la terbutalina. Entre los efectos secundarios que se han reportado están: taquicardia, alteraciones adrenales, osteoporosis e inmunosupresión (Szefl, 1991; Bazy-Asaad, 2001).

Anticolinérgicos: Se usan comúnmente para el control de crisis. Los bromuros de ipratropio, oxitropio y de tiotropio son buenos representantes de este grupo, aunque su uso causa algunos efectos secundarios (estimulación cardíaca y sequedad de boca). Los fármacos anticolinérgicos bloquean de forma competitiva el efecto de la acetilcolina sobre los receptores del músculo liso del árbol bronquial produciendo broncodilatación. Su mecanismo de acción está relacionado con el sistema nervioso central (SNC), la broncoconstricción/broncodilatación, secreción de moco y degranulación de células cebadas. Con la liberación de acetilcolina se activa a los receptores muscarínicos M3 del músculo liso, provocando broncoconstricción e hipersecreción de moco. Los receptores M2 localizados sobre los nervios post ganglionares, restringen la liberación de acetilcolina y disfunción de los mismos, pueden causar hiperreactividad mediada por el nervio vago (inducida por exposición a aerosoles, infecciones virales y/o contaminantes). Los anticolinérgicos disponibles hoy en día pueden tener gran afinidad a ciertos receptores, pero no son selectivos, por lo que antagonizan tanto a receptores M3 como M2 (Alfageme, *et al.*, 2007; Michavilaa, *et al.*, 2007).

Medicamentos control

Estos son usados durante el tratamiento regular, para el control sintomatológico, la reducción en inflamación de las vías aéreas, el riesgo futuro de exacerbaciones y pérdida de función pulmonar (Taur & Patil, 2011).

Antiinflamatorios (corticosteroides): Son los agentes antiinflamatorios más potentes, inhiben la respuesta inflamatoria evitando la liberación de fosfolipasa A2 y citocinas inflamatorias. Su funcionamiento depende de la influencia para la transcripción genética en las moléculas que se encuentran involucradas en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. Dentro del citoplasma de las células se unen reversiblemente al receptor específico de glucocorticoides, ingresando al núcleo para unirse con el DNA. Ejemplos aplicados en la clínica son el furoato de fluticasona, furoato de mometasoa, ciclesonida o dipropionato de beclometasona. Los efectos secundarios a la administración exógena de dosis superiores a la fisiológica provocan: supresión

del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, osteoporosis e inmunosupresión (Szeftl, 1991; Bazy-Asaad, 2001; GINA 2018).

Cromonas: Son antiinflamatorios que se absorben rápidamente y son seguros. Su mecanismo de acción actúa fosforilando una proteína tipo miosina en membrana celular, responsable de la liberación de mediadores en los mastocitos, inhibe la liberación de cloro intracelular, esto es importante, ya que abren canales de calcio y favorecen la degranulación del mastocito. Aunque en largo plazo se ha demostrado que no son tan eficientes como los corticosteroides (CI) (Río-Navarro, et al., 2009).

Inhibidores de los receptores de leucotrienos: Los antileucotrienos son fármacos que se unen con gran afinidad y selectividad a los receptores de los leucotrienos, los cuales se encuentran en las células de las vías respiratorias, convirtiéndose en antagonistas e impidiendo la unión del leucotrieno a su receptor, requisito indispensable para poder ejercer su acción. Estos impiden el desarrollo de los procesos que tienen lugar en el asma (reclutamiento de eosinófilos, edema, broncoespasmo y secreción aumentada de moco) (Szeftl, 1991; Río-Navarro, et al., 2009).

También se unen a los receptores en los eosinófilos impidiendo la unión del leucotrieno a éstos y por lo tanto su emigración a través de los pequeños vasos sanguíneos o capilares y su ruptura final evitando así la liberación de las toxinas que contienen en su interior y que dañan el epitelio; de esta forma, además, bloquean la producción de nuevas cantidades de leucotrienos (Río-Navarro, et al., 2009).

Las glándulas productoras de moco también presentan receptores para estas sustancias, por lo que la unión del antileucotrieno a este receptor frenará la secreción de moco, facilitando así la función de los cilios, eliminando tanto éste moco como las proteínas (Río-Navarro, et al., 2009).

Existen tres representantes de antagonistas para receptores de leucotrienos en la industria farmacológica, montelukast, zafirlukast, pranlukast. Entre los efectos secundarios que se presentan están: síntomas similares a la gripe, nerviosismo, excitabilidad, dolor de cabeza, dolor estomacal y tos (Bisgaard, et al., 2005).

Inmunomoduladores: Son sustancias que actúan regulando el sistema inmune mediante el aumento o la disminución de la capacidad de producir anticuerpos. En esta categoría encontramos omalizumab, el cual es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra las IgE, este ha sido desarrollado para el tratamiento de enfermedades mediadas por esta inmunoglobulina. Este anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1, se une de forma específica a la inmunoglobulina IgE, bloqueando su acción e impidiendo su unión con el receptor de alta afinidad (FcεRI) en las superficies de los mastocitos y basófilos. Por lo que baja la cantidad circulante de IgE e interrumpe la cascada bioquímica desencadenante de los síntomas del asma. Otro fármaco conocido es la ciclosporina, inmunomodulador con efecto antiinflamatorio que inhibe la transcripción del RNA mensajero de citocinas, disminuye la activación de linfocitos T, la síntesis de IgE, el receptor de IL-2, la quimiotaxis de neutrófilos y la proliferación de eosinófilos.¹⁹ (Río-Navarro, *et al.*, 2009; Matta, 2009).

Metilxantinas: El fármaco teofilina es la metilxantina más usada, su mecanismo de acción se relaciona con la inhibición no selectiva de fosfodiesterasa, antagonista de receptores a adenosina, fue utilizada frecuentemente como broncodilatadora desde hace muchos años y ha sido considerada, en alguna ocasión, como medicamento de primera elección en el tratamiento y mantenimiento del asma bronquial. En la actualidad ocupa un lugar menos importante, por los escasos beneficios que proporciona, tiene menor potencia broncodilatadora, en comparación con los β adrenérgicos, además se necesitan mediciones de los niveles séricos de esta, por su estrecho margen terapéutico. Sin embargo, debido a que puede tener ciertos efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, se está reconsiderando su utilidad en el control del asma crónica moderada-grave. A pesar de que se emplea desde hace mucho tiempo en el tratamiento del asma, el mecanismo de acción es incierto, la inhibición de las fosfodiesterasas hace que se acumule AMP y GMP cíclicos y con ello se intensifique la transducción de señales a través de las vías en las que interviene en la relajación del musculo liso de las vías aéreas. Recientemente existe un renovado interés sobre la utilidad de los inhibidores de la fosfo-diesterasa en el tratamiento anti-inflamatorio en pacientes asmáticos. Otras xantinas son la teobromina y la cafeína, en cantidades moderadas, se encuentran en el café, té, mate o chocolate. La mayor

cantidad de cafeína se obtiene de la planta *Coffea arabica*, mientras que las hojas de té, de la planta *Thea sinensis*, contienen cafeína y teofilina, en las semillas de cacao *Theobroma cacao*, además de contener teobromina también contienen cafeína, aunque en menores cantidades que las semillas de la planta del café. Las plantas y sus derivados que contienen xantinas se han utilizado desde la antigüedad su uso ha sido derivado del empirismo con el cual nuestros antepasados las empleaban en forma de bebidas y alimentos, satisfaciendo aspectos alimenticios, medicinales y rituales, de ahí algunos significados de sus nombres: teofilina (hoja divina) y teobromina (alimento de los dioses) (Moratalla, 2008). Gran parte de la farmacognosia se ha nutrido de compuestos químicos derivados de las plantas; según la información del Instituto Nacional Indigenista, se tiene el conocimiento de que 3 000 especies nativas de la flora de México son utilizadas con carácter medicinal (Río-Navarro, *et al.*, 2009).

El tipo y dosis de medicamentos que necesitara un paciente para tratar el asma, dependerán de edad, síntomas, gravedad y los efectos secundarios que pueda presentar a los mismos. Debido a que el asma puede controlarse adecuadamente o agravarse con el tiempo, se registran los síntomas en fin de ajustar los medicamentos si es necesario, para dicha tarea así también como para su diagnóstico preciso se utilizan las pruebas de la función respiratoria (PFR), métodos estandarizados para corroborar el adecuado funcionamiento de los parámetros respiratorios pulmonares. Las PFR más comunes son la espirometría, los estudios de difusión y la pletismografía. En los animales de laboratorio la pletismografía barométrica de libre movimiento es la prueba por excelencia a utilizar (Halloy, *et al.*, 2004) (GINA, 2018).

4. Pletismografía barométrica de libre movimiento.

La pletismografía es una prueba de función respiratoria (PFR) bien estandarizada que mide los volúmenes pulmonares, capacidades pulmonares y resistencias de las vías aéreas. Esta prueba implica que el volumen no cambia y las mediciones se llevan a cabo por medios de presión, tomando en cuenta la Ley de Boyle ($P_1V_1=P_2V_2$), dónde: P_1 = presión inicial, V_1 = volumen inicial, P_2 = presión final, V_2 =volumen final.

La pletismografía barométrica de libre movimiento está formada de 4 componentes principales: amplificador, cámara principal, software (computador) y bomba de flujo de aire (Figura 2). Los cobayos son colocados dentro de la cámara principal, conectada a un transductor de presión diferencial, el cual mide la diferencia de presiones entre la cámara principal del pletismógrafo (donde el cobayo es colocado) y la cámara de referencia, previamente calibrada en relación a la presión atmosférica del lugar, mientras la bomba de flujo, mantiene un cantante de aire para los cobayos. Las señales obtenidas por el transductor de tipo analógico son enviadas a un amplificador y posteriormente a un software que las transforma a señales digitales para su análisis, por cada ciclo respiratorio. Obteniendo una curva de tiempo-presión de la cual se pueden obtener parámetros como: frecuencia respiratoria, tiempo inspiratorio y espiratorio.

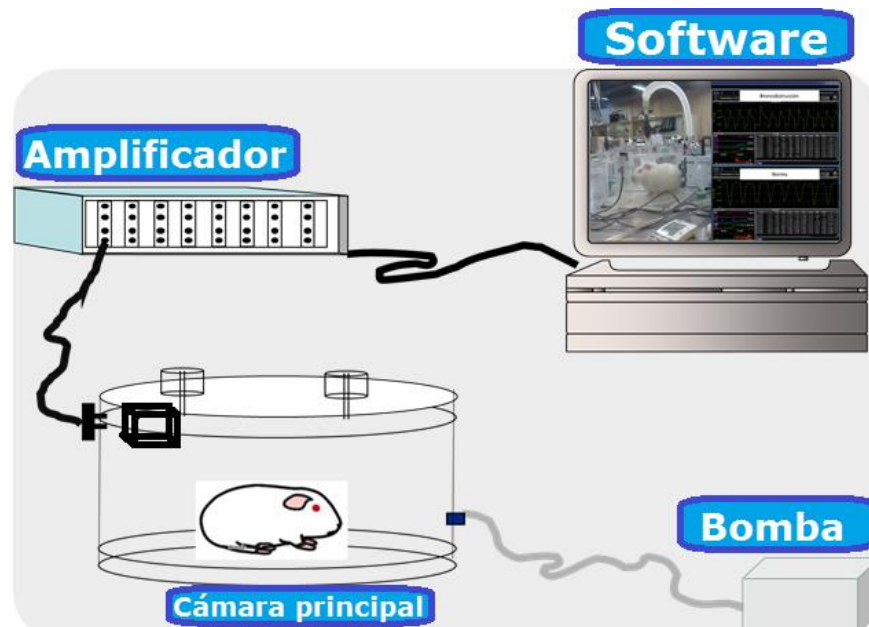


Figura 2. Principales componentes en la pletismografía barométrica de libre movimiento.

Debido a que en dicha técnica el volumen es constante, el cambio en la presión de la cámara representa la diferencia entre la expansión/contracción del tórax y el volumen corriente, cambios que son posteriormente analizados por un programa computacional para obtener distintos parámetros respiratorios como: frecuencia, volumen minuto, volumen corriente, etc. (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros pulmonares de la pletismografía barométrica de libre movimiento.

Parámetros	Abreviación	Unidades	Definición
Frecuencia respiratoria	f	rpm	Número de ciclos respiratorios por minuto.
Volumen minuto	VM	ml/min	Ventilación total por minuto.
Volumen corriente	VC	ml	Volumen de aire desplazado durante un ciclo respiratorio.
Tiempo espiratorio	TE	s	Tiempo necesario para exhalar el volumen corriente (VC)
Tiempo inspiratorio	TI	s	Tiempo necesario para inhalar el volumen corriente (VC)
Ciclo de trabajo	Ti/Ttot	Sin unidad	Es una determinante importante del grado de estrés al que estén sometidos los músculos respiratorios. Se mide con el tiempo de inspiración (Ti) con relación a la duración total de un ciclo de respiración (Ttot)
Pico de flujo espiratorio	PEF	ml/s	El valor más alto medido durante una fase espiratoria.
Pico de flujo inspiratorio	PIF	ml/s	El valor más alto medido durante una fase inspiratoria.
Tiempo de frenado	TB	%	Elongación del periodo desde el final de la inspiración hasta el inicio de la espiración
Tiempo de pausa	TP	%	Elongación del periodo desde el final de la espiración hasta el inicio de una nueva inspiración.
Tiempo de relajación	Tr	s	Tiempo necesario para lograr el 64% de cambio de presión en la cámara pletismografía.
Pausa	PAU	s	Tiempo que tarda en espirar el 36% restante de la presión espiratoria total en comparación con la cantidad inicial de tiempo que tarda en espirar el primer 64% de la presión espiratoria total. $PAU=(Te-Tr)/Tr$
Flujo espiratorio al 50%	EF50	ml/s	Flujo espiratorio a la mitad del volumen corriente.
Pausa mejorada	Penh	Sin unidad	Índice que combina las señales de presión de la caja, tanto de inspiración (PIF) como de espiración (PEF), con la comparación del tiempo de vencimiento temprano y tardío (PAU). $Penh=(PAU)(PEF/PIF)$

Modificado (Villa, 2017)

Uno de los principales parámetros derivados de la pletismografía, es la pausa mejorada (Penh), un índice sin unidades calculado por la fórmula $Penh = PAU/(PEF)(PIF)$ donde PAU=Pausa PEF=Pico de flujo espiratorio y PIF=Pico de flujo inspiratorio. El índice de Penh, se utiliza actualmente para evaluar la capacidad de respuesta de las vías respiratorias. También se ha utilizado para investigar la respuesta respiratoria a endotoxinas o sustancias tóxicas como el ozono, el fosfeno y el cadmio. Durante los procesos patológicos, los cambios en los patrones respiratorios, medidos por la pletismografía barométrica de libre movimiento, pueden evolucionar en paralelo con los cambios fisiopatológicos, como la obstrucción de las vías respiratorias, el engrosamiento de la mucosa bronquial, la hipersecreción, el edema pulmonar y los cambios en el retroceso elástico pulmonar (Vargas, *et al.*, 2010).

Aunque el Penh no conduce a la identificación de los mecanismos fisiopatológicos involucrados, muchos autores han descrito una relación cercana entre el índice y la resistencia de las vías respiratorias y sugiere que podría utilizarse como un parámetro de detección que permita el seguimiento de trastornos pulmonares en animales de laboratorio, convirtiéndole en una herramienta adecuada para medir la reactividad de las vías respiratorias, ya que también se le ha correlacionado con la resistencia pulmonar en cobayos para dos de los agonistas broncoconstrictores más utilizados, la acetilcolina y la histamina (Halloy, *et al.*, 2004; Vargas, *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Hay dos tipos de terapias para el control del asma, el farmacológico y no-farmacológico. En el primero encontramos diversos medicamentos que tienen acción sobre las vías aéreas, produciendo broncodilatación. En México muchos pacientes recurren a terapias alternativas para mejorar su sintomatología respiratoria, debido a su fácil acceso y bajo costo. La principal justificación de este trabajo es analizar en un modelo de asma alérgica experimental, si el extracto etanólico de *B. cavanillesii* posee un efecto broncodilatador, estudiado con pletismografía barométrica de libre movimiento.

HIPÓTESIS

La administración del extracto etanólico de *B. cavanillesii* durante el proceso de sensibilización a ovoalbúmina disminuirá la respuesta de broncoconstricción, la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el reto antigénico en un modelo de asma alérgica en cobayos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la administración de extracto etanólico de *B. cavanillesii* durante de sensibilización alérgica a ovoalbúmina disminuye la respuesta broncoconstrictora, la inflamación y la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el reto antigénico en un modelo de asma alérgica en cobayos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un modelo de sensibilización alérgica a ovoalbúmina en cobayos para evaluar los efectos del extracto etanólico en la respuesta antigénica.
- Determinar el grado de hiperreactividad de las vías aéreas mediante curvas de histamina, evaluando el índice de broncoconstricción (Penh) por medio de pletismografía barométrica de libre movimiento.
- Evaluar la respuesta inflamatoria de las vías aéreas, mediante conteo diferencial en lavados bronquio-alveolares.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales y grupos

Se utilizaron 18 cobayos (*Cavia porcellus*) hembra de dos semanas (peso 200-300 g), que se mantuvieron en condiciones de bioterio de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El estudio fue

aprobado por el comité institucional de ciencia y bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” con numero de protocolo **B20-18**.

Los cobayos se dividieron en 3 grupos de estudio:

- Grupo 1: Cobayos control (n= 6).
- Grupo 2: Cobayos sensibilizados (n= 6).
- Grupo 3: Cobayos sensibilizados + extracto (n= 6) (tomaron *B. cavanillesii*).

Para identificarlos, cada cobayo fue marcado con un número usando plumón indeleble, se pesaron al inicio y término del estudio.

Obtención del extracto

El extracto etanólico de *B. cavanillesii*, fue una donación del neumólogo Antonio Salas Muñoz neumólogo cirujano de tórax de la escuela de medicina Universidad Autónoma de Chihuahua, quién desarrollo la metodología de obtención descrita a continuación, a partir de la recolección, identificación y tratamiento de varios ejemplares originarios del estado de Hidalgo.

a) Extracción acuosa

Se molieron y mezclaron los tallos, hojas y flores de *B. cavanillesii*, en una proporción de volumen 1:10 planta-agua destilada para un volumen total de 1 litro. Se hirvió a ebullición durante 3 minutos, y se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura de 25° C para obtener una solución acuosa.

b) Precipitación

La solución obtenida se mezcló en una proporción 1:1 con etanol al 95%, posteriormente se dejó reposar durante 24 horas a una temperatura de 25° C, hasta obtener el precipitado.

c) Filtración del precipitado

Para obtener una solución de proteínas del extracto, se filtró el precipitado con un papel filtro Whatman No. 1 (11µm), posteriormente se resuspendió la fase sólida contenida en el papel filtro, en una solución de agua bidestilada (100 ml) y se agregó ácido clorhídrico al 38 % en una proporción de 3 ml por cada 100 ml de solución, dejándose reposar a una temperatura ambiente (25°C) durante una hora.

d) Diálisis

Se mezcló la solución obtenida en agua bidestilada en una relación de volumen 1:10 en una membrana 12-14 kDa (DiaEasy™ Dialyzer (3 ml) MWCO) entre la fase interna y la externa, se mantuvo en agitación continua a 20 rpm durante 24 horas, la fase obtenida se secó al vacío utilizando un evaporador rotatorio (Heidolph VV 2000) y se guardó a temperatura ambiente.

Suministró del extracto

El extracto fue administrado en los bebederos, los cuales contenían 150 mg del extracto y 500 ml de agua potable. Se les administró a los cobayos por un periodo de cuatro semanas, a partir de la segunda semana de iniciada la toma del extracto, se comenzó con el proceso de sensibilización.

Procedimiento de sensibilización y reto antigénico

Los animales se dividieron en tres grupos, un grupo control (sin sensibilizar), un grupo sensibilizado y un grupo sensibilizado con extracto.

Los cobayos se sensibilizaron (día 0) con la administración de una solución de 60 mg de ovoalbúmina (cat. A-5253; Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y 1 mg de Al (OH)₃ disueltos en 1 ml de solución salina (NaCl al 0.9%). Fueron inyectados vía intradérmica e intraperitoneal. Al día 8 (primer refuerzo antigénico) los animales se nebulizaron con 3 mg/ml de ovoalbúmina (OVA) en solución salina durante 5 min usando un nebulizador ultrasónico (model WH-2000, Guangdong Yuehua Medical Instrument Factory Co., Ltd., Guangdong, China, diámetro de partícula 1–5µm).

Los cobayos se nebulizaron de nuevo el día 15 (segundo refuerzo antigénico) con 1 mg/ml de OA en solución salina durante 1 min (Figura 2).

El (día 21-25) se les realizó a los cobayos dos curvas de histamina y un reto antigénico. Se registraron a partir de pletismografía los distintos parámetros respiratorios (Penh, PEF, PIF, etc.) de respuesta a las mismas. La curva inicial de histamina se realizó con la finalidad de tener una medición de la reactividad de las vías aéreas a histamina, que fue seguida de un reto antigénico con un bolo único de ovoalbúmina (400 µg-Kg-1 i.v.), se realizó una segunda medición (segunda curva de histamina) tres horas después, cuando los cobayos se han recuperado de la broncoconstricción aguda inducida por el reto antigénico (Figura 2).

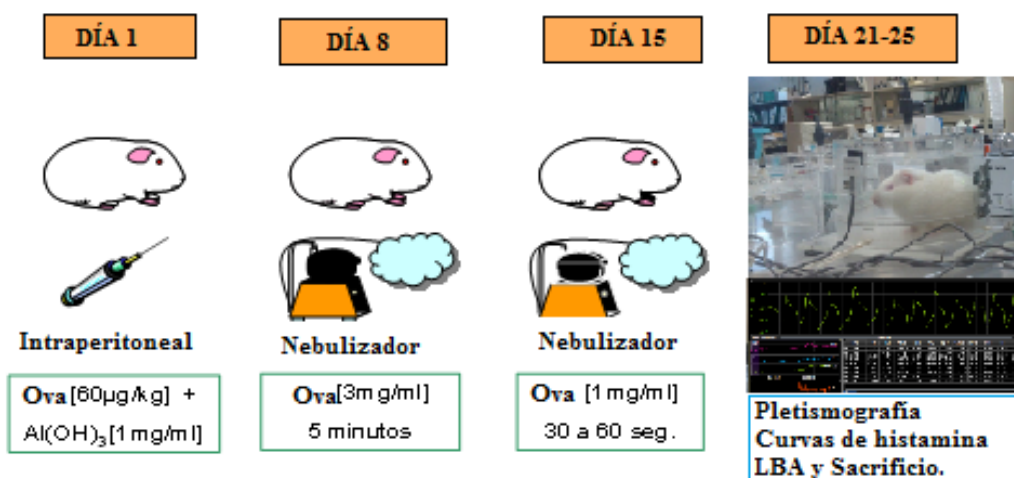


Figura 2. Método estandarizado de sensibilización a ovoalbúmina en cobayo.

Reactividad de las vías aéreas a la histamina y pruebas de función pulmonar

La reactividad de las vías aéreas se comparó en dos curvas dosis-respuesta de histamina, la primera se realizó antes de la administración de un reto a ovoalbúmina y la segunda se llevó a cabo 3 horas después de realizado el reto (Figura 3). Dichas curvas, se registraron después de obtener el nivel basal (Penh) de cada animal, se administraron dosis incrementadas no acumulativas de histamina (0.013 a 0.13 mg/ml), cada dosis fue administrada durante 1 minuto de

exposición en la cámara pletismográfica y se continuo con el registro por seis minutos hasta la siguiente dosis, repitiéndose hasta obtener la dosis provocativa 200%.

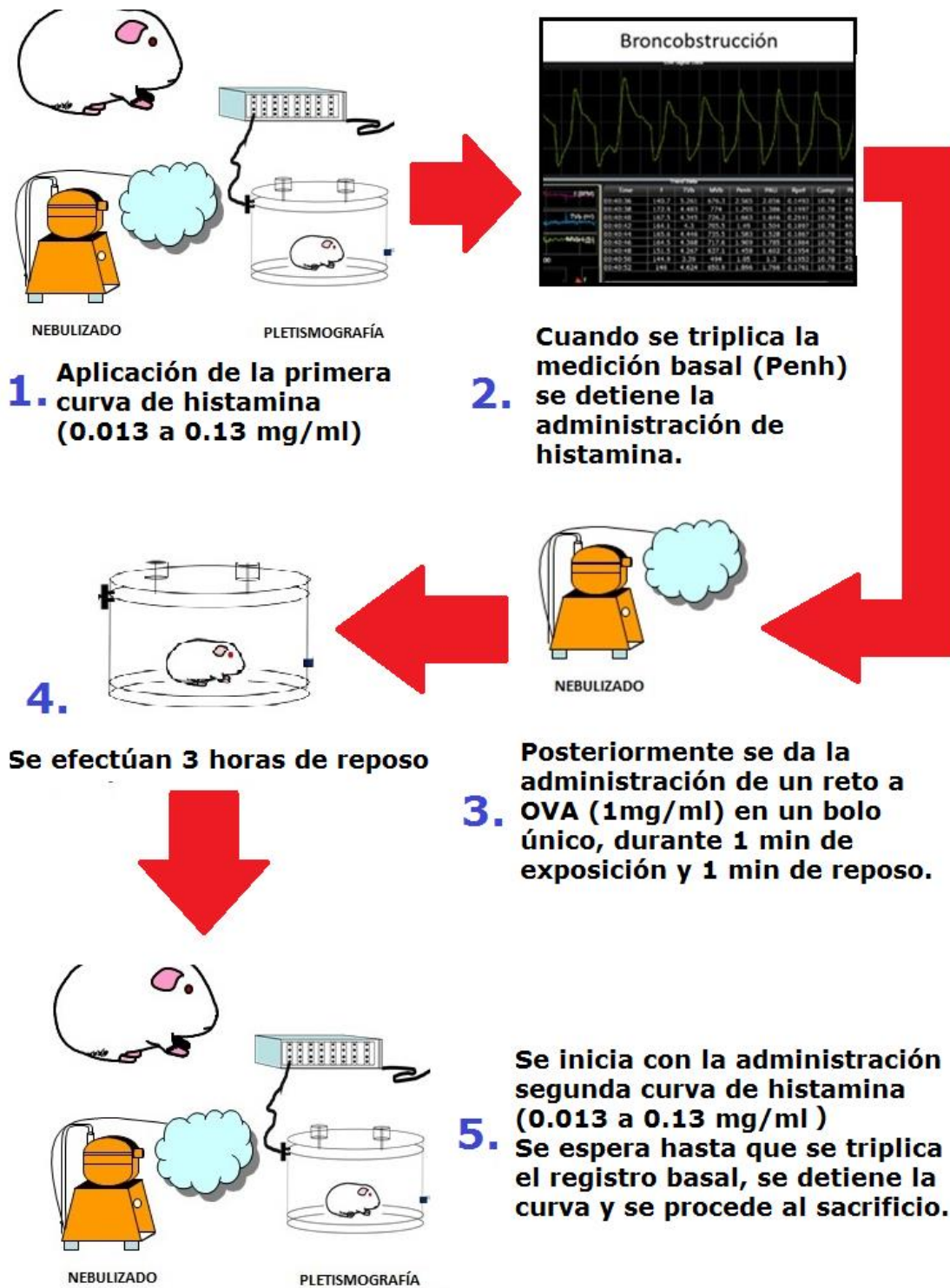


Figura 3. Procedimiento de realización de las curvas de histamina y reto a ovoalbúmina.

La dosis provocativa 200% (DP_{200}) es usada para calcular la reactividad de las vías aéreas, es expresada como la dosis de histamina requerida para obtener un 200% de incremento del Penh basal, esto puede verse claramente durante los episodios de broncoconstricción en los cobayos sensibilizados, mostrando un patrón de “picos” en lugar de “mesetas” por cada ciclo respiratorio (Figura 4). Se realizaron dos curvas de histamina una antes y otra después del reto antigénico. Para la construcción de estas curvas se consideró la respuesta máxima, es decir el máximo incremento del Penh obtenido en los siguientes 2 min. La curva se finalizaba cuando la respuesta a una dosis de histamina alcanzaba 3 veces la DP_{200} , todo el procedimiento se muestra resumido en la figura 3.

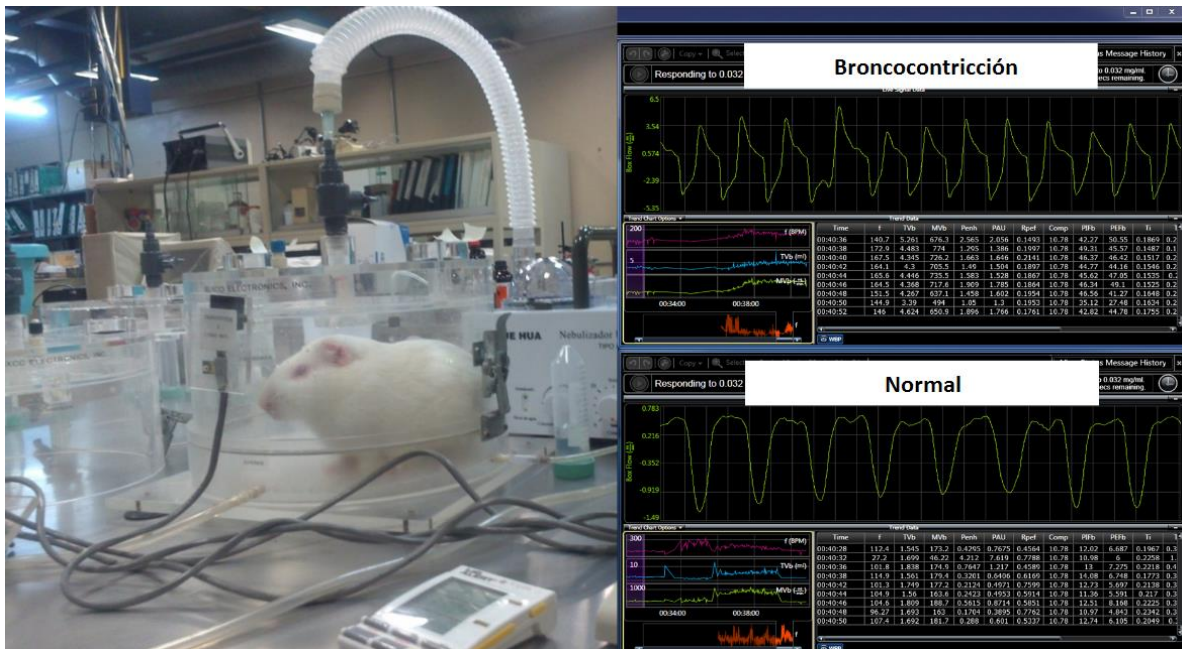


Figura 4. Comportamiento del Penh en un episodio de broncoconstricción y un registro normal.

Se evaluaron los parámetros respiratorios funcionales de todos los animales utilizando un equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Research System, Wilmington, NC, USA).

Lavados bronquioalveolares y eutanasia

Del día 21-25 seguido a la realización de las pruebas de función pulmonar, con el animal anestesiado (28 mg/kg), se procedió a hacer lavados broncoalveolares (LBA), para la realización

de los LBA se hizo una pequeña incisión en el cuello, exponiendo de este modo la tráquea, en donde se colocó una cánula para permitir la recolección eficiente del LBA. Se instiló dos veces el volumen de SSF estéril (5ml) a 37°C. Cada instilación se mantuvo un minuto dentro de los pulmones y posteriormente se recuperó lentamente. De este líquido recuperado se obtuvo la fracción celular. Posteriormente se eutanasiaron por sobredosis (3 ml) de pentobarbital sódico (PISABENTAL® México).

Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA

El conteo celular se realizó a partir de los LBA obtenidos. El número total de células en el LBA se estableció tomando 10 µl de la suspensión celular y colocando 40 µL de azul de tripano al 0.4% como colorante vital. Las muestras se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de las células en cuatro cuadrantes (esquinas de la cámara).

El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y por el factor de la cámara (10,000), obteniendo el número de células por ml de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener 1×10^6 células/ml adicionando SSF y de esta solución se tomaron 50 µL que fueron centrifugados utilizando una citocentrífuga (Wescor 7120 General hematology staining Georgia, U.S.A.), para obtener un botón celular al cual se tiñó con la técnica Giemsa.

La técnica Giemsa para frotis (células en medio líquido), se realizó con el protocolo siguiente: las laminillas fueron fijadas con metano (5-7 min) y secadas al aire. Se diluyó el colorante de Giemsa 1:20 con agua desionizada y se dejaron secar nuevamente al aire. Todas las laminillas se montaron y evaluaron.

La tinción es realizada a partir de una mezcla de azul de metileno y eosina como colorantes principales, misma que tiñe los núcleos y gránulos de color púrpura en neutrófilos y basófilos, mientras que los gránulos de eosinófilos se tiñen en una coloración naranja-rosado. Se realizó el conteo a 1000X utilizando un microscopio de campo claro (AXIO, CarlsZeiss. Lab. AI).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para el análisis de la dosis provocativa 200% fueron analizados con el programa Graph Pad Prism6. Se comparó con t-Student no pareada y se comprobó su normalidad a partir de Kolmogórov. Las gráficas muestran los promedios \pm error estándar, la significancia estadística fue asignada como $P < 0.05$ (*).

La pletismografía barométrica de libre movimiento, nos proporcionó aproximadamente 216,000 datos. Dada la gran variabilidad obtenida, se calculó la mediana de los periodos cada 5 minutos. Gracias al uso de las medianas, se permitió descartar los valores extremos, ya que dichos valores se deben al estrés generado en los cobayos los primeros minutos, estos datos fueron evaluados con el programa GraphPad Prism 6.

La normalidad de los datos obtenidos en la pletismografía, se midieron con Kolmogorov, los parámetros con distribución normal fueron evaluados a partir de la prueba estadística de ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey, mientras aquellos que no cumplieron con dicha distribución normal fueron evaluados a partir de la prueba estadística Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de comparación múltiple Dunn's. Entre el grupo sensibilizado y sensibilizado+extracto, se realizó una prueba de t-Student cuando se sospechaba la diferencia significativa entre dichos grupos. La significación fue asignada para un alpha (α) de 0.05, con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Reactividad de las vías aéreas a histamina y broncoconstricción en cobayos en un modelo de asma

Se evaluó la broncoconstricción y reactividad de las vías aéreas en todos los cobayos, a partir de los datos obtenidos por pletismografía barométrica de las curvas de histamina y reto antigénico. Se muestran gráficas de la pausa mejorada (Penh), frecuencia (f), tiempo inspiratorio (Ti), tiempo de relajación (Tr), volumen corriente (Vt), pico de flujo inspiratorio (PIF), pico de flujo espiratorio (PEF) y volumen minuto (VM), con una duración de 80 minutos para la primer curva de histamina (Fig. 5-12) y 45 minutos para la segunda (Fig. 14-21).

La diferencia de tiempo entre las curvas, se debe a la capacidad incrementada que mostraron los cobayos para responder a la histamina después de la primer curva y el reto antigénico con ovoalbúmina. Debe señalarse la muerte de dos animales del grupo sensibilizado durante la exposición y pletismografía en la segunda curva.

Se anexa a continuación una tabla (Tabla 3) con las dosis suministradas (concentración) de histamina y el tiempo en que fueron administradas a los grupos (sensibilizado y sensibilizado+extracto), para la primera curva y segunda curva.

Tabla 3. Tiempo de aplicación y concentración de histamina alcanzada en las curvas de histamina, para los grupos sensibilizado y sensibilizado extracto.

Primera curva de histamina		Segunda curva de histamina
Concentración (mg/ml)	Tiempo de administración	Tiempo de administración
0	7.5	7.2
0.013	13.5	14
0.018	23	24.5
0.032	34	32.5
0.042	46	-
0.056	54	-

Cambios pletismográficos en primera curva de histamina

Durante el desarrollo y administración de la primer curva de histamina se observó que los cobayos pertenecientes al grupo sensibilizado + extracto soportaron hasta una concentración de 0.056 mg/ml de histamina en el minuto 54, mientras el grupo sensibilizado, toleró una dosis de 0.032 mg/ml en el minuto 34. Durante la aplicación de las dosis de histamina en las dos curvas, se

evaluaron en los siguientes parámetros pletoográficos: Penh, f, Ti, Tr, Vt, PIF, PEF y VM (Fig. 5-21). La evaluación se detuvo cuando los cobayos mostraron una respuesta de broncoconstricción aguda (triplicando su medición basal de Penh) (Figura 12).

La frecuencia respiratoria (f) se incrementó significativamente tanto en el grupo de animales sensibilizados como en el que recibió el extracto respecto al control, teniendo más ciclos respiratorios por minuto que los animales controles (Figura 5).

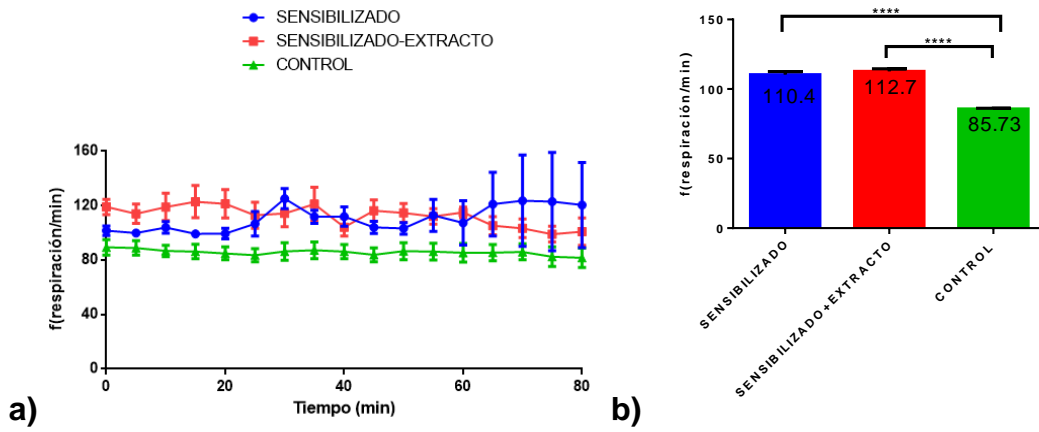


Figura 5. a) Comportamiento de la frecuencia (respiración/min) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales de la frecuencia respiratoria, (****) $p < 0.0001$ ANOVA con prueba post hoc Tukey.

Respecto al tiempo inspiratorio (Ti) observamos que la sensibilización alérgica lo disminuye y el extracto no lo modifico de ninguna manera respecto al control (Figura 6).

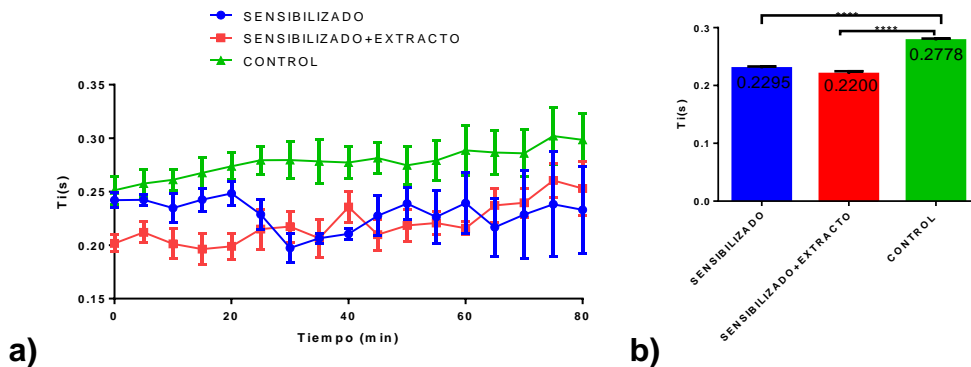


Figura 6. a) Comportamiento del tiempo inspiratorio (s) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del Ti, (****) $p < 0.0001$ con ANOVA y post hoc Tukey.

El tiempo de relajación se incrementa de manera significativa en nuestro modelo de asma el extracto tiende a mejorar el tiempo de relajación, pero no hay diferencia estadística importante (Figura 7).

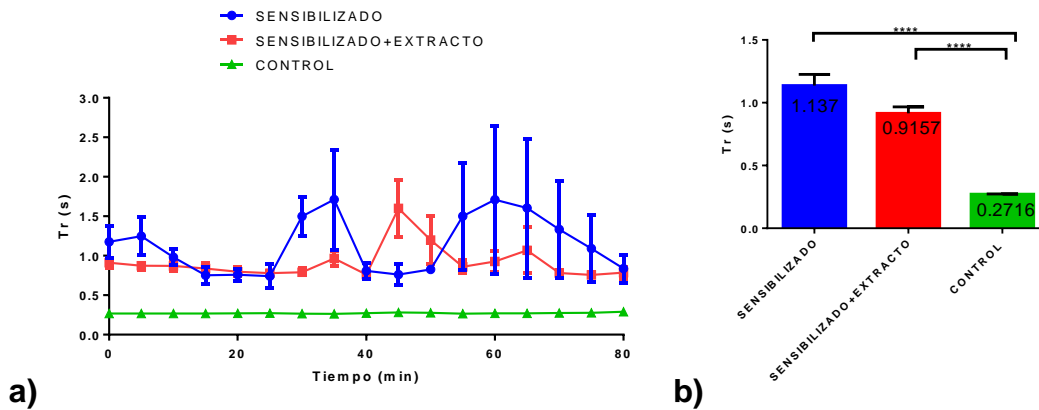


Figura 7. a) Comportamiento del tiempo de relajación (s) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del Tr, (****) $p < 0.0001$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

En el volumen corriente (VC) podemos observar que los grupos sensibilizados mostraron ser significativamente menores a los valores obtenidos por el grupo control (Figura 8).

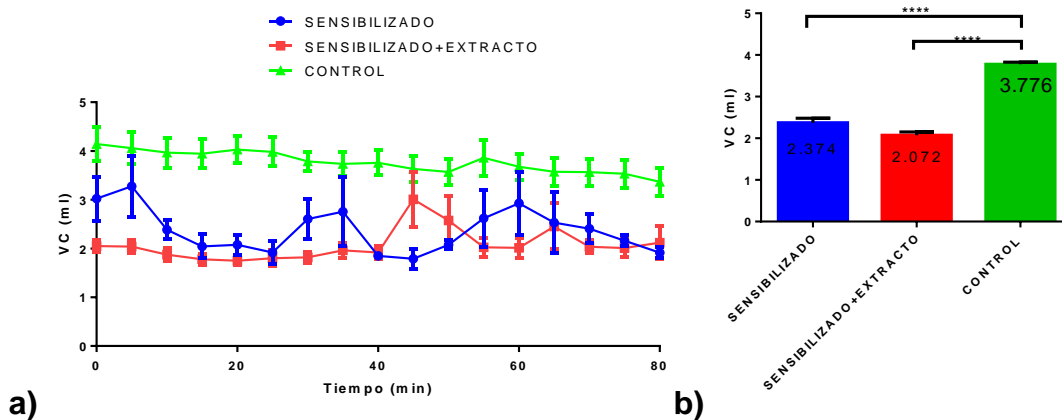


Figura 8. a) Comportamiento del volumen corriente (ml) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del VC, (****) $p < 0.0001$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

El comportamiento del volumen minuto (VM) muestra una disminución significativa del grupo sensibilizado y sensibilizado+extracto, en ambos grupos el volumen de aire desplazado durante un ciclo respiratorio es mucho menor al control (Figura 9).

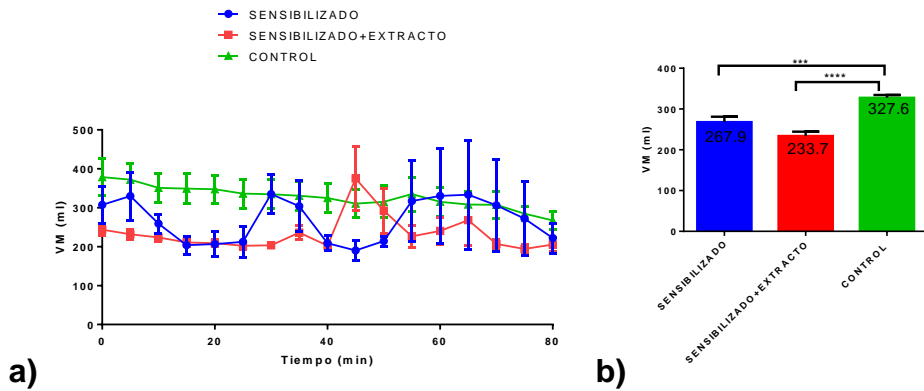


Figura 9. a) Comportamiento del volumen minuto (ml) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del VM, (****) $p < 0.0001$ (***) $p < 0.001$ con ANOVA y post hoc Tukey.

El grupo control se mantuvo significativamente más alto en el pico de flujo inspiratorio (PIF) en comparación de los grupos sensibilizados, siendo sus valores de la fase inspiratoria mucho más bajos (Figura 10).

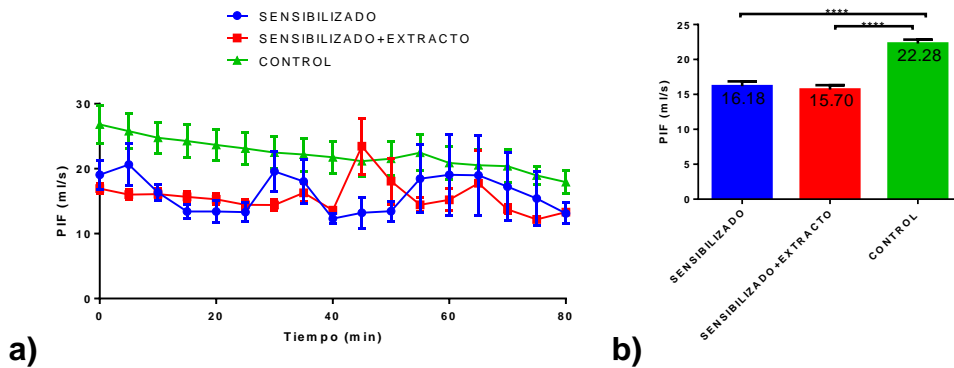


Figura 10. a) Comportamiento del pico de flujo inspiratorio (ml/s) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del PIF, (****) $p < 0.0001$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

En el caso del pico de flujo espiratorio (PEF) observamos que el grupo control mostro diferencia significativa con el grupo sensibilizado+extracto, teniendo este último un valor más bajo debido a la administración de *B. cavanillesii* (Figura 11).

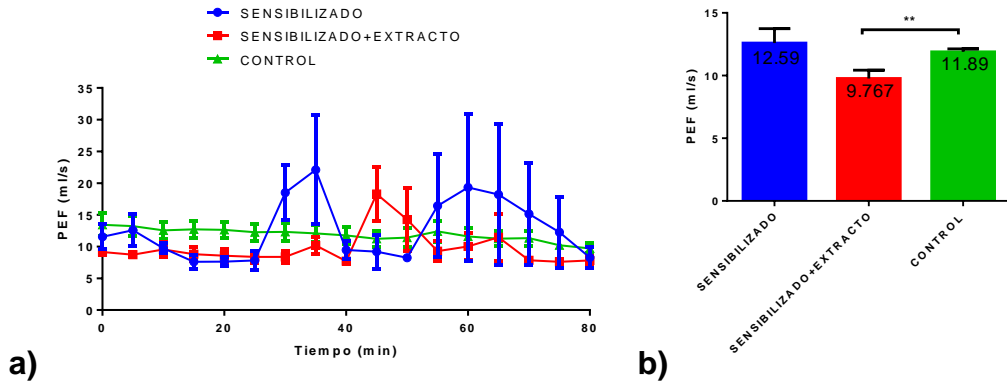


Figura 11. a) Comportamiento del pico de flujo espiratorio (ml/s) a lo largo del registro (80 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras muestran el promedio de los valores totales del PEF, (**) $p < 0.01$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

El índice de broncoconstricción (Penh) se vio significativamente incrementado en los animales sensibilizados al reto antigénico, la administración del extracto durante el proceso de sensibilización generó que disminuyera de manera significativa dicha respuesta bronco-constrictora (Figura 12).

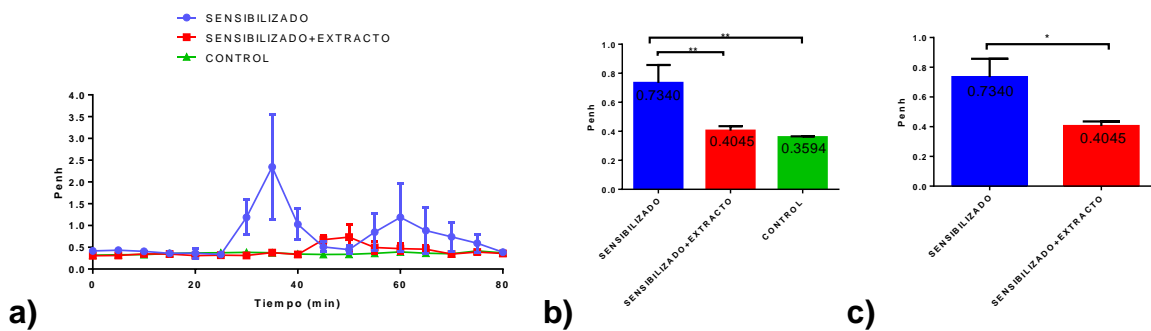


Figura 12. a) Comportamiento de la pausa mejorada (Penh) a lo largo del registro (80 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del Penh, (**) $p < 0.01$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn **c)** Prueba t-Student para el grupo sensibilizado y sensibilizado+extracto (*) $p = 0.0171$.

En resumen, podemos ver en la Tabla 6 la modificación de la respuesta pletismográfica en los animales sensibilizados con y sin extracto durante la primera curva de histamina comparado con su control:

Tabla 6. Resumen de resultados de los parámetros pletismográficos durante la primer curva.

Parámetro pletismográfico	Grupo Sensibilizado (n=6)	Grupo Sensibilizado+extracto (n=6)	Grupo Control (n=6)
F	↑↑	↑↑	↓
Ti	↓↓	↓↓	↑
Tr	↑↑	↑↑	↓
Vt/Vc	↓↓	↓↓	↑
PIF	↓↓	↓↓	↑
PEF	=	↓↓	↑
VM	↓↓	↓↓	↑
Penh	↑↑	=	↓

Incremento significativo respecto al control: ↑↑, decremento significativo respecto al control: ↓↓, tendencia al incremento: ↑, tendencia de disminución: ↓, sin cambios respecto al control: =

Reto antigénico

Inmediatamente después de terminada la pletismografía de la primer curva de histamina, los animales fueron sometidos a un reto antigénico con bolo único de ovoalbúmina (1mg/ml), se evaluó a los animales, observando que el grupo sensibilizado tuvo un incremento en el porcentaje de respuesta máxima (Penh) a comparación del grupo sensibilizado+extracto (Figura 13).

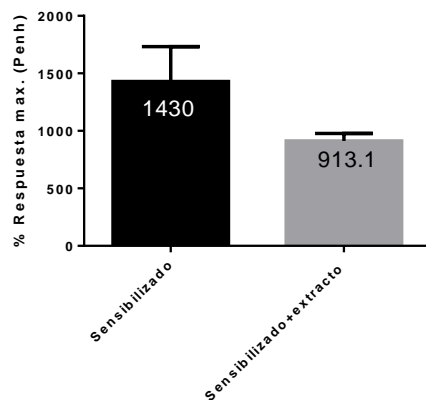


Figura 13. Promedio porcentual de las respuestas constrictivas inducidas por el reto antigénico a ovoalbúmina, en los grupos sensibilizado (n=6) y sensibilizado+extracto (n=6). Los datos corresponden a la respuesta máxima porcentual (Penh) registrada durante el reto antigénico.

Segunda curva de histamina

Después de un intervalo de descanso (3 horas) concluido el reto antigénico, se realizó la segunda curva, donde se observó una respuesta agravada a la histamina en ambos grupos, sensibilizado y sensibilizado+extracto, debido a su hiperreactividad. Los cobayos pertenecientes a estos grupos solo soportaron hasta una concentración de 0.013 mg/ml de histamina en el minuto 14, sin embargo se debe puntualizar que dos animales del grupo sensibilizado+extracto soportaron hasta una dosis de 0.032 mg/ml en el minuto 32, mientras que dos animales del grupo sensibilizado, tuvieron muchas complicaciones durante la realización de la curva y en la concentración 0.013 mg/ml murieron debido a las fuertes exacerbaciones que presentaron como consecuencia.

La frecuencia (f) de los cobayos durante la segunda curva, no presentó cambio al comportamiento anterior descrito en la primera curva, los grupos sensibilizados mostraron un incremento significativo al valor de referencia de nuestro control, teniendo un mayor número de ciclos respiratorios por minuto (Figura 14).

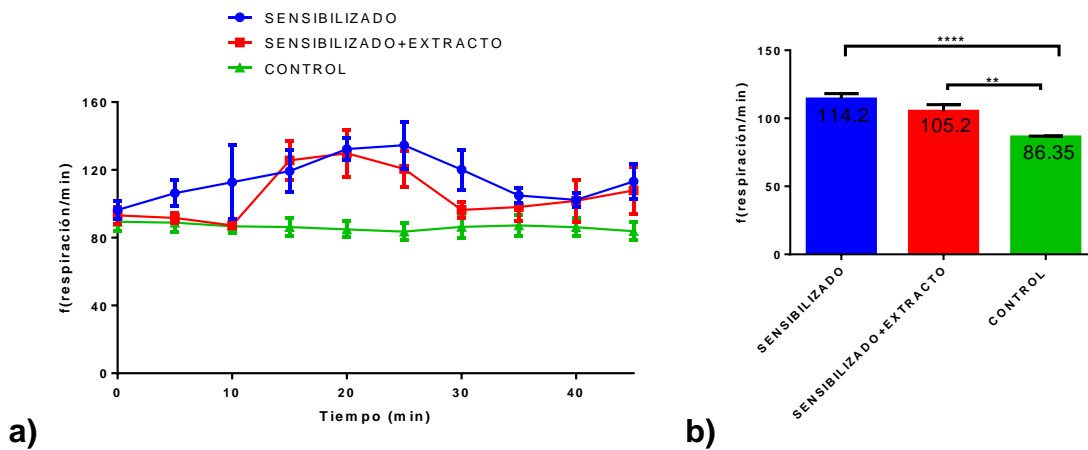


Figura 14. a) Comportamiento de la frecuencia (respiración/min) a lo largo del registro (45 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales de la frecuencia respiratoria, (****) $p < 0.0001$ (**) $p < 0.01$ con ANOVA y post hoc Tukey.

El tiempo inspiratorio (T_i) se observó una diferencia significativa del grupo control, con el grupo sensibilizado que presento valores inferiores (Figura 15 b), encontramos igualmente una diferencia significativa para t-student del grupo sensibilizado con respecto al grupo sensibilizado+extracto, el cual tiene un valor más alto (Figura 15 c) y parecido al control (Figura 15 b).

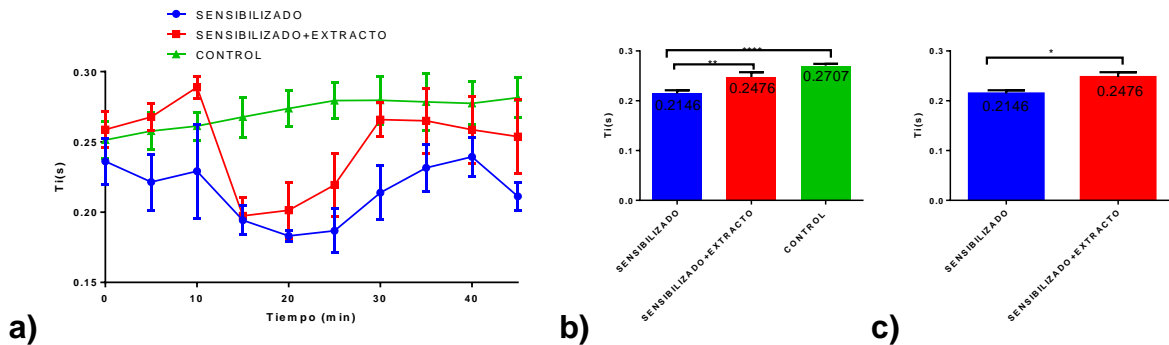


Figura 15. a) Comportamiento del tiempo inspiratorio (s) a lo largo del registro (45 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del tiempo inspiratorio, (****) $p < 0.0001$ (**) $p < 0.01$ con ANOVA y post hoc Tukey. **c)** Prueba t-Student para el grupo sensibilizado y sensibilizado+extracto (*) $p = 0.0149$.

En el tiempo de relajación (T_r) el grupo control muestra una diferencia entre los grupos sensibilizados, que mantienen valores más bajos, aunque el grupo sensibilizado+extracto tienen valores más cercanos al control no muestran una similitud significativa (Figura 16).

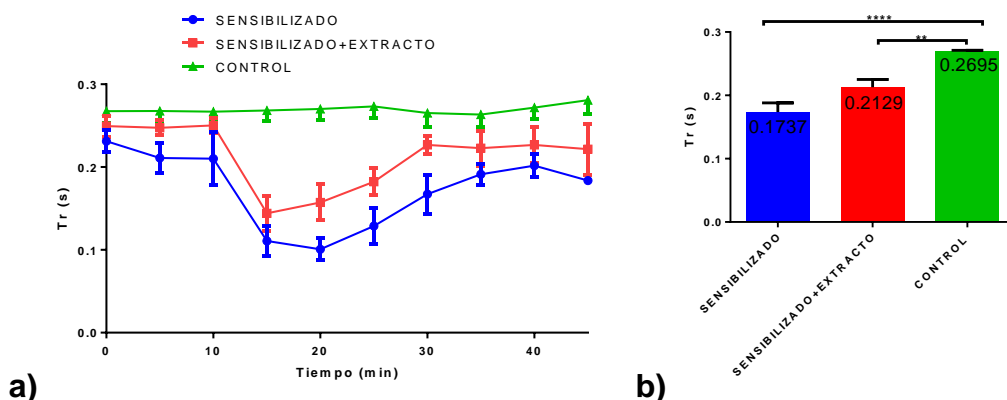


Figura 16. a) Comportamiento del tiempo de relajación (s) a lo largo del registro (45 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del T_r , (****) $p < 0.001$ (*) $p < 0.05$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

En el parámetro de volumen corriente (VC) no se encontró en los grupos sensibilizados una similitud con el control, mantuvieron valores significativamente más bajos del volumen de aire desplazado por cada ciclo respiratorio (Figura 17).

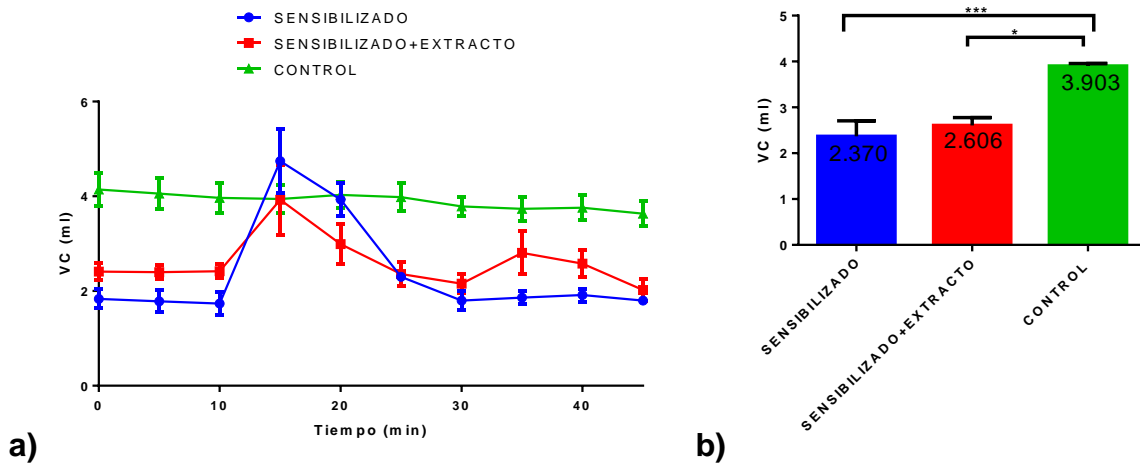


Figura 17. a) Comportamiento del volumen corriente (ml) a lo largo del registro (45 min), se muestra el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del VC, (****) $p < 0.0001$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

Para el volumen minuto (VM) aunque los grupos sensibilizados muestran valores menores que el control, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, la ventilación total por minuto es la misma (Figura 18).

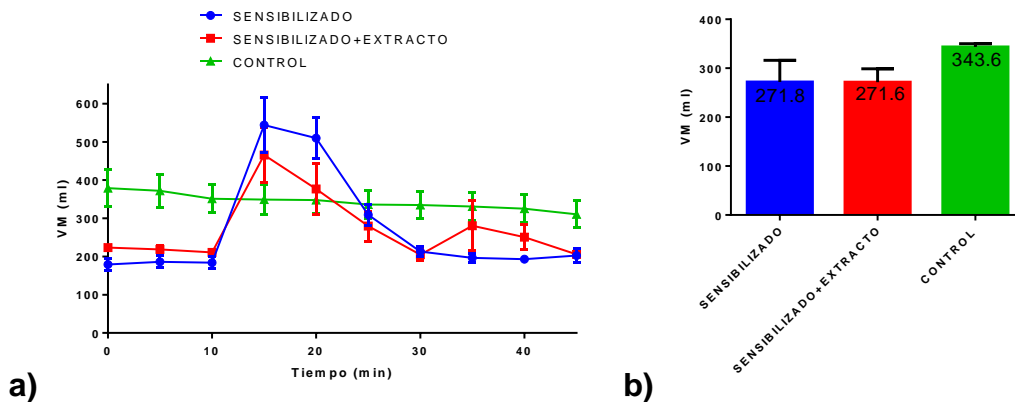


Figura 18. a) Comportamiento del volumen minuto (ml) a lo largo del registro (45 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del VM, (*) $p < 0.05$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

Se encontró diferencia significativa en el pico de flujo inspiratorio (PIF) entre el control y el grupo sensibilizado+extracto (Figura 19), el cual tiene valores menores, sin embargo el grupo sensibilizado muestra valores semejantes al sensibilizado+extracto, pero debido a la mayor dispersión sus datos, no hay diferencia significativa.

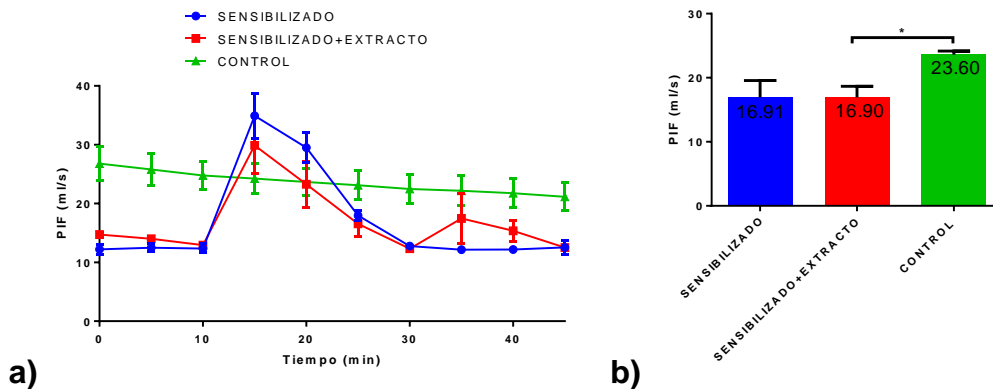


Figura 19. a) Comportamiento del Pico de flujo inspiratorio (ml/s) a lo largo del registro (45 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras muestran el promedio de los valores totales del PIF, (*) $p < 0.05$ con Kruskal-Wallis y post hoc de comparación múltiple Dunn.

No se encontraron el caso del pico de flujo espiratorio (PEF) diferencias significativas entre los grupos (Figura 20).

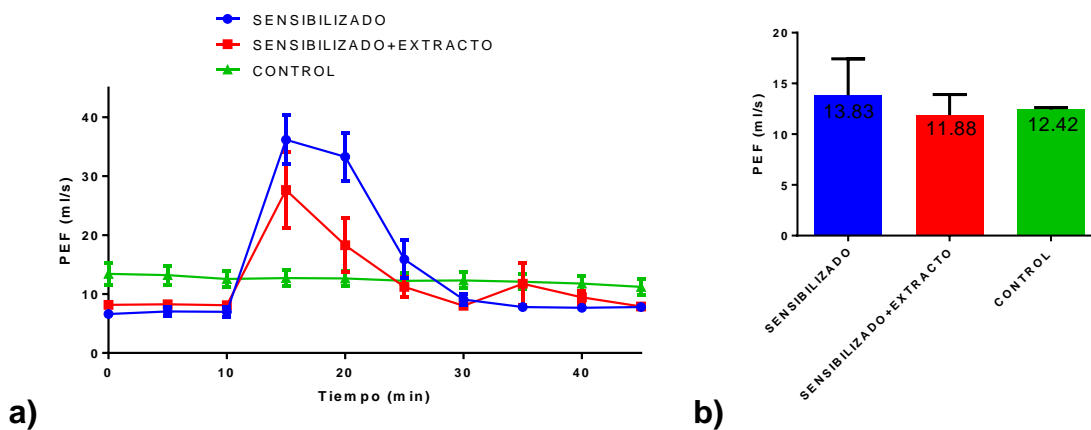
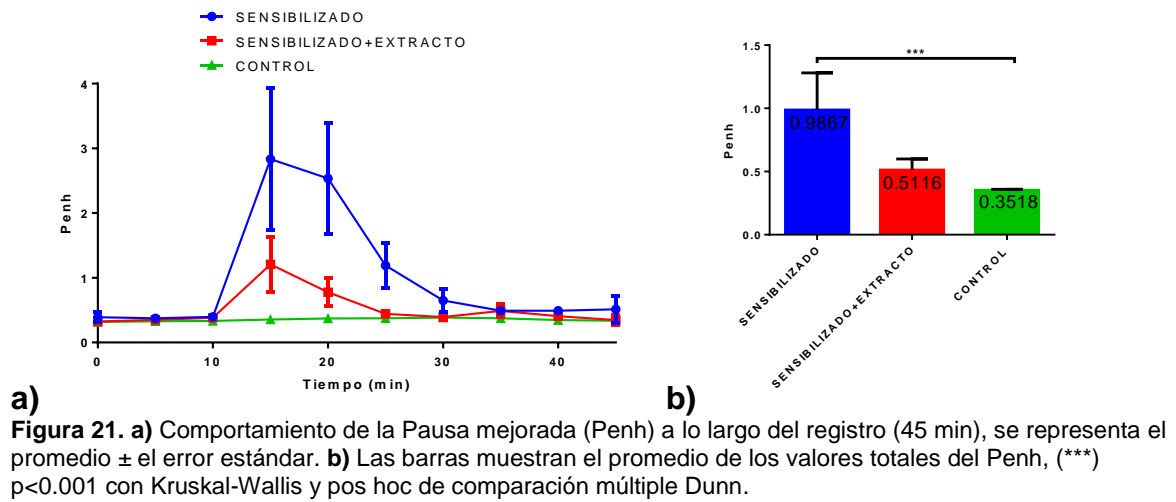


Figura 20. a) Comportamiento del pico de flujo espiratorio (ml/s) a lo largo del registro (45 min), se representa el promedio \pm el error estándar. **b)** Las barras representan el promedio de los valores totales del PEF y el error estándar.

Para la pausa mejorada (Penh) se observó una diferencia significativa entre el grupo sensibilizado y el control, mientras que los cobayos pertenecientes al grupo sensibilizado+extracto mostraron valores similares a los del grupo control, aunque no tuvieron una diferencia significativa con el grupo sensibilizado (Figura 21).



En resumen, podemos ver en la Tabla 7 la modificación de la respuesta pletismográfica en los animales sensibilizados con y sin extracto durante la primera curva de histamina comparado con su control:

Tabla 7. Resumen de resultados. Comparación de los grupos respecto al control en la medición de los parámetros pletismógrafos, durante la segunda curva de histamina.

Parámetro pletismográfico	Grupo Sensibilizado (n=4)	Grupo Sensibilizado+extracto (n=6)	Grupo Control (n=6)
F	↑↑	↑↑	↓
Ti	↓↓	=	↑
Tr	↓↓	↓↓	↑
Vt/Vc	↓↓	↓↓	↑
PIF	=	↓↓	↑
PEF	=	=	↓
VM	=	=	↑
Penh	↑↑	=	↓

Decremento significativo respecto al control: ↓↓, aumento significativo respecto al control: ↑↑, tendencia al incremento: ↑, tendencia de disminución: ↓, sin cambios significativos respecto al control: =

Reactividad de las vías aéreas

La reactividad de las vías aéreas se evaluó mediante la expresión de la dosis provocativa 200 % (DP_{200}), es decir la dosis de histamina requerida para obtener un 200 % de incremento del Penh basal. En ambos grupos la DP_{200} fue significativamente mayor en la primer curva de histamina (antes del reto a ovoalbúmina), posteriormente tiene un decremento pronunciado de su concentración durante la segunda curva (posterior al reto), evidenciando un grado de hiperreactividad de las vías aéreas en todos los cobayos (Fig. 22), aunque no se establece un valor significativo, se encontró que el grupo sensibilizado+extracto requiere mayor dosis de histamina tanto en la primera curva 0.02794 mg/Kg como en la segunda curva 0.006807 mg/Kg en comparación del grupo sensibilizado en el mismo orden de las curvas con concentraciones de 0.01575 mg/Kg y 0.003088 mg/Kg respectivamente (Fig. 22). Se debe señalar que el grupo sensibilizado perdió dos animales durante el transcurso de la segunda curva de histamina, consecuencia de las fuertes exacerbaciones que presentaron los cobayos.

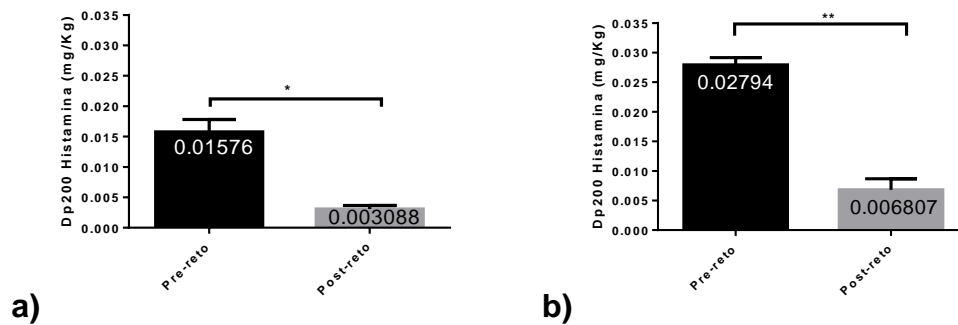


Figura 22. Reactividad de las vías aéreas a la histamina en cobayos expuestos al reto antigénico a partir de la DP_{200} **a)** Grupo sensibilizado, prueba t-student (**) $p=0.0022$ **b)** Grupo sensibilizado+extracto, prueba t-student (*) $p=0.0286$. La DP_{200} se obtuvo antes y después del reto a OVA (aproximadamente 3 horas terminada la primera curva).

Conteo celular

La inflamación pulmonar evidenciada por el número de células totales en LBA, el grupo sensibilizado en el conteo celular total mostró una mayor cantidad de células ($p < 0.05$) (Fig. 23) a comparación del grupo sensibilizado+extracto.

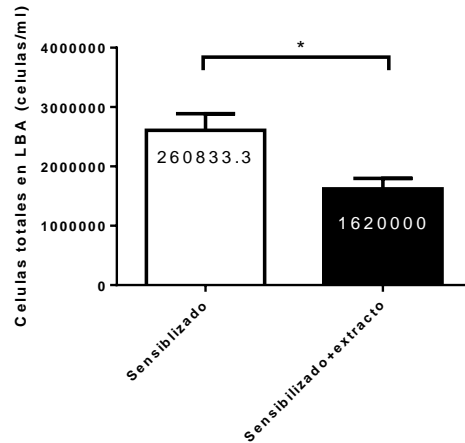


Figura 23. Conteo total de células infiltradas en LBA de cobayos para los grupos sensibilizado (n=6) y sensibilizado+extracto (n=5), con una diferencia entre grupos de (*) $p=0.0191$ para una prueba de t-Student.

En el conteo celular diferencial (Figura 24) se evaluaron una mayor cantidad de eosinófilos ($p < 0.05$) en el LBA del grupo sensibilizado, con respecto al grupo sensibilizado+extracto.

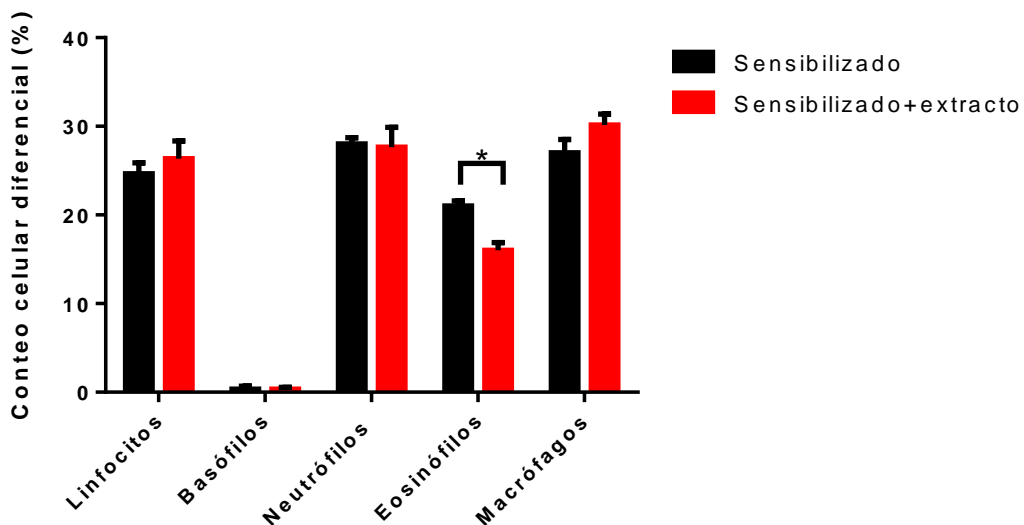


Figura 24. Conteo celular diferencial en LBA de cobayos. Las barras representan el porcentaje de cada tipo celular (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y macrófagos) encontrando (*) $p=0.0260$ para una prueba de t-Student.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la administración de extracto etanólico de *B. cavanillesii* durante de sensibilización alérgica a ovoalbúmina en la respuesta broncoconstrictora, inflamatoria y la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por el reto antigénico en un modelo de asma alérgica en cobayos. Encontramos que la respuesta a la hiperreactividad de las vías aéreas evaluada como la dosis provocativa 200 % (DP_{200}), no se modificó por la administración del extracto (Figura 22). Por otro lado, el reto a ovoalbúmina mostró que las respuestas en los cobayos durante las exacerbaciones asmáticas (% respuesta máx. (Penh)) tienen una tendencia a ser mayores en el grupo de animales que solo fueron sensibilizados en comparación de aquellos animales que tomaron el extracto de *B. cavanillesii* (Figura 13). Adicionalmente se observó que el LBA de los animales pre tratados con el extracto de *B. cavanillesii* mostraron una menor inflamación.

En la literatura el desarrollo de exacerbaciones asmáticas se caracteriza por el reclutamiento de dos subtipos celulares: el eosinofílico, el cual juega un papel importante en la respuesta tardía, asociados a un engrosamiento de la membrana basal y el incremento de linfocitos, macrófagos, mastocitos y TGF- β . En el segundo tipo encontramos la respuesta neutrofílica, la cual se asocia con casos de asma severa, sus principales mediadores inflamatorios son las metaloproteinasas y citosinas (TNF α - IL-1b, IL8 e IL6 entre otros) (Branes, *et al.*, 2009). Dentro de nuestros resultados obtenidos se encontró de manera significativa una mayor cantidad de células infiltradas en LBA/ml en el conteo celular del grupo sensibilizado ($p=0.0191$) respecto al grupo sensibilizado+extracto, (Figura 23). En el conteo diferencial de células en LBA, se observó que el grupo sensibilizado+extracto presentaba menor cantidad de eosinófilos de manera significativa ($p=0.0260$), comparado con el grupo sensibilizado, este resultado es bastante interesante debido a que el infiltrado de eosinófilos en la respuesta asmática es típica, y se ha relacionado con la persistencia inflamatoria de las vías aéreas (Barthel, *et al.*, 2008), al existir en la respuesta una menor cantidad de eosinófilos se esperaría una disminución del engrosamiento de la membrana basal y la producción de linfocitos, macrófagos, mastocitos y TGF- β , sin embargo será necesario reafirmarlo con más pruebas.

La evaluación de los parámetros respiratorios estudiados mediante pletismografía barométrica de libre movimiento, nos permitió caracterizar los patrones fisiológicos típicos en los animales sanos de tiempo (f, T_i y T_r), volumen (VC, PIF, PEF Y VM) el índice de resistencia (Penh) como una herramienta para evaluar la resistencia del pulmón (RL) y su incremento en los animales asmáticos como indicador de broncoconstricción. Se observó que en los animales sensibilizados sin extracto el Penh aumento significativamente durante la primera curva de histamina a comparación del grupo control y del grupo pre tratado con el extracto (Figura 12). Siendo el comportamiento de la segunda curva posterior al reto a ovoalbúmina, similar a la primera es decir el comportamiento del Penh se mantuvo al alza (Figura 21), los demás parámetros pletismográficos en ambas curvas fueron distintos al grupo control, ya que mostraron el patrón de un animal asmático, que a nivel alveolar se caracteriza por acortamiento de T_i , f mayor, sin variación en VM, disminución de VC, PIF e incremento PEF, representado un patrón de respiración rápida y superficial, faltándoles a estos animales una adecuada ventilación. Al analizar el grupo sensibilizado+extracto, encontramos en la primera curva que el Penh fue significativamente distinto al grupo sensibilizado (Figura 12 c), su comportamiento se mantuvo con similitud al grupo control sin tener diferencia significativa entre ambos, en la realización de la segunda curva de histamina 3 horas posterior al reto de ovoalbúmina, se encontró que el Penh mantuvo la tendencia a ser menor que el grupo sensibilizado, atenuando la respuesta broncoconstrictora, mientras que los demás parámetros no tuvieron cambios significativos y conservaron el comportamiento similar al grupo sensibilizado, este hecho debe considerarse como un incentivo, para esclarecer la actividad broncodilatadora y mecanismos involucrados, que nos lleven a una futura investigación de las propiedades químicas que le confieren su potencial uso en el tratamiento del asma.

Otros estudios previos utilizando el mismo modelo de sensibilización alérgica en cobayos han demostrado de igual forma que los extractos de plantas podrían ser útiles para el tratamiento del asma, como lo encontramos en nuestro estudio. En un estudio previo realizado por Campos MG y colaboradores observaron que la árnica roja (*Galphimia glauca*) utilizada como tratamiento de asma y alergias en medicina tradicional latinoamericana inhibió la respuesta contráctil a

ovoalbúmina en tráqueas de cobayos sensibilizados por inhibición de la respuesta a leucotrieno D(4) (Campos, *et al.*, 2001).

De igual forma Campos-Bedolla en 2004 reporta que el extracto de gordolobo (*Gnaphalium conoideum*), planta utilizada en medicina tradicional para malestares digestivos y respiratorios, disminuyó la respuesta contráctil a la histamina pero no al carbacol ni al KCl en miocitos aislados de traque de cobayo por inhibición de los canales dependientes de voltaje de calcio (L-type Ca²⁺)

CONCLUSIONES

La administración del extracto etanólico de *B. cavanillesii* durante el proceso de sensibilización a ovoalbúmina disminuyó la respuesta de broncoconstricción evaluada mediante el índice de bronco-obstrucción (Penh). Adicionalmente el extracto disminuyó la inflamación expresada en el conteo total celular y la población de eosinófilos. La hiperreactividad de las vías aéreas a la histamina tuvo la tendencia a disminuir por el extracto, sin embargo, su efecto no fue estadísticamente significativo en la administración conjunta de *B. cavanillesii* durante el proceso de sensibilización a la ovoalbúmina en nuestro modelo de asma alérgica en cobayos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfageme, I., Reyes, N., Merino, M., & Gallego, J. (2007). Fármacos anticolinérgicos. *Archivos de Bronconeumología*, 43(4): 3–10.
- Andreadis A. A., Hazen S. L., Comhair S. A., Erzurum S. C. (2003) Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radical Biology and Medicine*: 35: p. 213–225
- Arruda, L., Vailes, L., Ferriani, V., & Santos, A. (2001) Cockroach allergens and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 107: p. 419-28.
- Barthel, S., Johansson, M., McNamee, D., & Mosher, D. (2008) Roles of integrin activation in eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of leukocyte biology*; 83(1): p 1-12
- Bazy-Asaad A. (2001) Asthma bronchiale. *Current Opinion in Pediatrics Journal*; 13: p. 523-7.
- Beakes D. (1997) The use of anticholinergics in asthma. *Journal of Asthma*; 34: p. 357-68
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 11 de Febrero de 2018 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Eupatorium%20petiolare&id=7680>
- Bisgaard H., Zielen S. & Garcia-Garcia M. L. (2005) Montelukast reduces asthma exacerbations in 2 to 5 year old children with intermittent asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 171: p. 315-22
- Braman S. (2016) The global burden of asthma. *CHEST Journal*: 45-125.
- Brnaes P. (1996) Pathophysiology of asthma. *British Journal of Clinical Pharmacology*: 42(3): p. 10.
- Brnaes P., Drazén, J., Rennard, S. & Thomson, N. (2009) Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management. Elsevier.
- Campos, M., Toxqui, E., Tortoriello, J., Oropeza, M., Ponce, H., Vargas, M. & Montaña, L., (2001) Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD(4)-induced contraction in guinea pig airways. *Ethnopharmacology*; 74(1): p 7-15.

- Campos-Bedolla, P., Montaña, L., Flores-Soto, E., Aguilar, A., Puebla, A., Lozoya, X. & Vargas, M. Effect of *Gnaphalium conoideum* HBK on guinea pig airway smooth muscle: role of L-type Ca²⁺ channels. *Journal Ethnopharmacology*. 2005 Feb 28; 97(2): 267–272. Published online 2004 Dec 30. doi: 10.1016/j.jep.2004.11.005
- Castelo, E., Ricalde & Panero J. (2003-2005). Catálogo de Autoridades de Asteráceas Mexicanas y Actualización de tribus Heliantheae y Eupatorieae. University of Texas. Base de datos SNIB-CONABIO proyectos V004, AE012 y CS011. Mexico, D.F
- Choi, J., Lee, H., Hwang, Y., Lee, J., Cho, W., & Ma, J. (2017). *Eupatorium fortunei* and Its Components Increase Antiviral Immune Responses against RNA Viruses. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 511.
- Clínica Terapéutica de la Academia Nacional de Medicina. (2012) Impacto socioeconómico del manejo del asma. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*; 55 (4): p. 53-58.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. *In Capital Nat.* México. CONABIO, Mexico City.
- Enhorning G., Schaik S., Lundgren C. & Vargas, I. (1998) Whole-body plethysmography, does it measure tidal volume of small animals?. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1998, 76:945-951
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., & Mata, R. (2012) α -Glucosidase Inhibitors from *B. cavanillesii*. *Journal of Natural Products*; 75(5): p 968-974
- Eshiet, E., Zhu J., Smith, E. (2015). The Biologic Potential of Lyophilized Extracts of *B. cavanillesii* (Asteraceae): Apoptosis and Glut 2 Gene Expression. *Journal of Food Processing and Technology*: p. 7:541.
- Eshiet, E., Zhu, J., Anderson, T., & Smith, E. (2014). Chemical characterization of *B. cavanillesii* (Asteraceae) using gas chromatographic methods. *Food Science & Nutrition*; 2(2): p.105–113.
- Fernández, A. (2010) Termoplastia bronquial en el tratamiento del asma. *Archivos de bronconeumología*; 46(2): p 85-91

- Finotto S., Neurath M., Glickman J. (2002) Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T β . *Science*; 295: p. 336–338.
- Galli, S., Tsai, M., & Piliponsky, A. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445–454.
- García-Sánchez, E., Ramírez, R., & M. Martínez, (2011). "Una revisión de Eupatorium (Compositae: Eupatorieae) de Michoacán". *Phyton*; 80 : p. 4-11
- García-Sancho, C., Fernández-Plata, R., Martínez-Briseño, D., Franco-Marina, F. & Pérez-Padilla, J. (2012). Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la Ciudad de México: estudio de base poblacional. *Salud Pública de México*; 54(4): p. 425-432.
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention, (2016). Disponible en <http://ginasthma.org/>
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention, (2018). Disponible en <http://ginasthma.org/>
- Halloy, D., Kirschvink, N., Vincke, G., Hamoir, J., Delvaux, F., & Gustin, P. (2004). Whole body barometric plethysmography: a screening method to investigate airway reactivity and acute lung injuries in freely moving pigs. *The Veterinary Journal*; 168: p 276–284.
- Hammad H. & Lambrecht B. (2008) Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology*; 8: p. 193–204.
- Herrick, C. & Bottomly, K. (2003) To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nature Reviews Immunology*; 3: p. 405–412.
- Holgate, S., Chourch, M., Broide, D., & Martinez, F. (2012). Allergy. Edinburgh: Elsevier Saunders.
- Kay A. (2001) Allergy and allergic diseases. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*; 344: p. 30–37.
- Kigen, G., Kamuren, Z., Njiru, E., Wanjohi, B., & Kipkore, W. (2019). Ethnomedical Survey of the Plants Used by Traditional Healers in Narok County, Kenya. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2019, 8976937. doi:10.1155/2019/8976937

- Kotses, H. (2010) *Asthma, Health and Society*. H. K. A. Harver (Ed.). Springer US.
- Larché M., Akdis C. A. & Valenta R. (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*; 6: p. 761–771. This review discusses the history, immunological mechanisms and future prospects of improving allergen-specific immunotherapy.
- Lau S., Illi S., Sommerfeld C. & Niggemann B. (2000) Early exposure to house dust mite and cat allergens and development of allergy in childhood a cohort study. *Multicentric Allergy Study Group. Lancet*; 356(1): p. 392-7.
- Lemanske RF. & Jr, Busse WW. (2003) Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111: S502-S19.
- Liu A. & Szeffler S. (2003) Advances in childhood asthma: Hygiene hypothesis, natural history and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111: 787-92.
- López, J. (2018). Apuntes de Herbolaria. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional del Estado de México: p 185-186.
- Magaña, A., Gama, C., & Mariaca, M., (2010). "El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México". *Polibotánica*; 29 : p. 213-262.
- Martínez-Ramírez, I., Aviles-Salas, A., Nava-Reyes, H., Ramos-Godínez, M. P., Carvajal-Sandoval, G., Zamudio-Cortes, P., & Parra-Hernández, E. (2006). Alteración de la actividad inflamatoria regulada por T H1-T H2 en asma. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*; 19(2): p.136-142.
- Matta, J. (2009) Terapia inmunológica en asma. *Neumología y cirugía de tórax*; 68(2): p 169-175.
- Merí, A. (2005) *Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte*. Madrid, España: Editorial MÉDICA PANAMERICANA.
- Michavilaa, I., Núñez, N., Sánchez, M., Borrego, J. (2007) Fármacos anticolinérgicos. *Archivos de bronconeumología*; 43(4): p 3-10.
- Moratalla, R. (2008) Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*;10: p. 201-7
- Murdoch, J. & Lloyd, C. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 690(9): p. 24-39.

- Murtagh P. (2009) Asma: ayer y hoy. *Arch Argent Pediatr*;107(2): p. 146-151.
- Museo de la Medicina. UNAM (2018) Códice De la Cruz-Badiano. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Disponible en <http://pem.facmed.unam.mx/index.php/temp/27-blog/112-codice-cruz-badiano>.
- Oettgen, H., & Broide, D. H. (2011). Introduction to mechanisms of allergic. *Allergy*, 1.
- Organización mundial de la salud (OMS). (2017) 10 Datos sobre asma. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/asthma/es/>
- Pazmiño, F., & Navarrete Jiménez, M. (2014). Mecanismos inmunológicos implicados en la patología del asma alérgica. *Revista de la Facultad de Medicina*; 62(2): p. 265-277.
- Río-Navarro, B., Hidalgo-Castro E. & Sienna-Monge, J. (2009) Asma. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*; 66(1): p. 3-33.
- Royo-Márquez, M., Melgoza-Castillo, A., & Sierra-Tristán, J. (2013). Flora medicinal de Chihuahua. *Revista mexicana de ciencias forestales*; 4(18): p. 58-69.
- Rzedowski, J., & G. Rzedowski, (2005). "Tribu Eupatorieae". Flora fanerogámica del Valle de México. 2da. ed., Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, p. 781-800.
- Sánchez-Vega, I. & Sánchez-Rojas, A. (2012). La diversidad biológica en Cajamarca-Visión étnico-cultural y potencialidades. Cajamarca, Perú: Gobierno Regional Cajamarca.
- Saxon A. & Diaz-Sanchez D. (2005) Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nature Immunology*; 6: p 223–226.
- Schmidt G., & Schilling E. (2000) Phylogeny and biogeography of Eupatorium (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. *American Journal of Botany*.; 87: p. 716–726.
- Sierra-Vargas, M., Guzman-Grenfell, A., Blanco-Jimenez, S., Sepulveda-Sanchez, J., Bernabe-Cabenillas, R., Cardenas-Gonzalez, B., & Hicks, J. (2009). Airborne particulate matter PM. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(1).
- Szeftl S. J. (1991) Glucocorticoid therapy for asthma: clinical pharmacology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 88: p. 147-56.

- Taur, D. & Patil R. (2011) Some medicinal plants with antiasthmatic potential: a current status. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 1(5): p. 413-8.
- Tomayquispe E., Ortiz, A., Ore, L. (2014). FITOQUIMICA de *Aristiguietia gayana*, "ASMACHILCA". Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina, Departamento de Química.
- Torres, R., Picado, C., & De Mora, F. (2005). Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Archivos de Bronconeumonología*, 41(3), 141-152.
- Vargas, M., Sommer, B., Bazán-Perkins, B., & Montaña, M. (2010). Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Veterinary Research Communications*; 34(7): p 589–596.
- Villa, C. (2017) Estudio de la función pulmonar con pletismografía barométrica en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en cobayo (*Cavia porcellus*) (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México.
- Wang F., Zhong H., Fang S., Zheng Y., Li C., Peng G., & Shen X. (2018). Potential Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium lindleyanum*. *Planta Medica*; 84(02): p 123-128.
- Zhao, Y., Yang, J., Gao, T. D., & Guo, W. (2009). Th17 immunity in patients with allergic asthma. *International archives of allergy and immunology*; 151(4): p 297-307.