



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Química Farmacéutica Biológica

Efecto relajante de *Hyptis suaveolens* en anillos aislados de tráquea
de cobayo

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA

HÉCTOR JONATHAN REYES CORTÉS

Director: Dra. María Elena Sánchez Mendoza

Asesor: Dra. Leticia Cruz Antonio

Ciudad de México 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Ma Elena, por tanta paciencia y por las facilidades para desarrollar el trabajo, le agradezco la confianza depositada en mí y por compartir su conocimiento. Usted es un ser maravilloso, gracias por todo.

A la Dra. Lety, por compartir su conocimiento y por su paciencia, así como la excelente disposición en todo momento, por ser una excelente profesora de biofarmacia y así despertar en mí el interés en la investigación.

Al Dr. Arrieta, por las facilidades para desarrollar el proyecto, de igual forma por el conocimiento brindado y las anécdotas, las cuales hacían el laboratorio más ameno.

A la M en C. Yara, gracias por los consejos, por el apoyo y por los momentos divertidos.

DEDICATORIA

A mis padres.

A mi familia, ustedes saben quienes son.

Índice

ABREVIATURAS	5
LISTA DE CUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. Introducción	9
2. Marco teórico.....	10
2.1. Aparato respiratorio.....	10
2.1.1. Tráquea, bronquios y bronquiolos	10
2.2. Inervación del músculo liso de las vías aéreas	11
2.2.1. Inervación simpática (adrenérgica).....	11
2.2.2. Inervación parasimpática (colinérgica).....	12
2.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica de las vías aéreas.....	12
2.3. Respuesta mecánica del músculo liso de las vías aéreas.....	13
2.3.1. Contracción.....	13
2.3.1.1. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gq .	14
2.3.1.2. Broncoconstricción a través de los receptores acoplados a proteína Gi...	15
2.3.2.2. Relajación por activación de la enzima guanilato ciclasa	17
2.3.2.3. Relajación por inhibición de fosfodiesterasas	17
2.3.2.4. Modulación de canales iónicos	18
2.3.2.4.1. Relajación por modulación del flujo de calcio transmembranal	18
2.3.2.4.2. Canales de K ⁺	18
2.4. Asma.....	19
2.4.1. Epidemiología.....	19
2.4.2. Etiología	20
2.5. Fármacos para el tratamiento del asma	20
2.5.1. Fármacos broncodilatadores	21
2.5.1.1. Fármacos que bloquean el efecto de mediadores contráctiles	21
2.5.1.1.1. Anti-inflamatorios	21
2.5.1.1.2. Anticolinérgicos	22
2.5.1.1.3. Antihistamínicos.....	22
2.5.1.1.4. Antileucotrienos	23
2.5.1.2. Fármacos relajantes.....	24
2.5.1.2.1. β_2 selectivos.....	24

2.5.1.2.2.	Inhibidores de las fosfodiesterasas	25
2.6.	Tratamiento con plantas medicinales	26
2.6.1.	<i>Hyptis suaveolens</i>	27
2.6.2.	Información etnomédica de <i>Hyptis suaveolens</i> en México	28
2.6.3.	Actividades farmacológicas y estudios fitoquímicos de <i>Hyptis suaveolens</i> ..	28
3.	Planteamiento del problema	30
4.	Hipótesis	31
5.	Objetivos	32
5.1.	General:	32
5.2.	Particulares:.....	32
6.	Metodología.....	33
6.1.	Fármacos y extractos.....	33
6.2.	Animales	33
6.3.	Material vegetal.....	33
6.4.	Preparación de extractos, obtención de fracciones y subfracciones de <i>Hyptis suaveolens</i>	34
6.5.	Preparación biológica	35
6.6.	Evaluación de la actividad relajante de <i>Hyptis suaveolens</i>	36
6.7.	Determinación de la participación de los receptores β_2 adrenérgicos	36
6.8.	Determinación de la participación de los receptores muscarínicos.....	36
7.	Estadística	37
8.	Resultados.....	38
8.1.	Evaluación del efecto relajante de los extractos de <i>Hyptis suaveolens</i>	38
8.2.	Evaluación del efecto relajante de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de <i>Hyptis suaveolens</i>	39
8.3.	Obtención de la subfracción más activa.	39
8.4.	Evaluación de la participación de los receptores β_2 adrenérgicos.	42
8.5.	Evaluación de la participación de los receptores muscarínicos.....	45
9.	Discusión	48
10.	Conclusiones.....	52
11.	Perspectivas.....	53
12.	Bibliografía.....	54

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilil ciclasa
AMPc	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
CaSR	Receptor sensible a Ca ²⁺
CE50	Concentración efectiva 50
CS	Corticoesteroide
DAG	1,2-diacilglicerol
E _{max}	Efecto máximo
eNANC	Sistema excitador no adrenérgico no colinérgico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GC	Guanilil ciclasa
GMPc	3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
GR	Glucocorticoides citoplasmáticos
iNANC	Sistema inhibidor no adrenérgico no colinérgico
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-trisfosfato
K _{ATP}	Canales de potasio K ⁺ dependientes de ATP
LT	Leucotrienos
MLC	Cadenas ligeras de miosina
MLCK	Cinasa de las cadenas ligeras de miosina
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
NANC	No adrenérgico no colinérgico
NO	Óxido nítrico
PC	Fosfatidilcolina
PDE	Fosfodiesterasas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC β	Fosfolipasa C β
PN	Péptido natriurético
ROC	Canales de Ca ²⁺ operados por receptor
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades respiratorias.....	27-28
Cuadro 2. Valores de efecto máximo ($Em_{\max}\%$), CE_{30} y CE_{50} de las fracciones del extracto de diclorometano.....	40
Cuadro 3. Valores de efecto máximo ($Em_{\max}\%$) y CE_{50} de la fracción F4 y subfracción F4'.....	41
Cuadro 4. Valores de efecto máximo ($Em_{\max}\%$) y CE_{50} de la subfracción F4' en ausencia y en presencia de propanolol.....	43
Cuadro 5. Valores de $Em_{\max}\%$ y CE_{50} de isoproterenol en ausencia y en presencia de propanolol.....	44
Cuadro 6. Valores CE_{50} de carbacol en presencia de la subfracción F4'.....	45
Cuadro 7. Valores de CE_{50} de carbacol a diferentes concentraciones de atropina.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto relajante de los extractos de <i>Hyptis suaveolens</i>	38
Figura 2. Efecto relajante de las fracciones del extracto de diclorometano.....	40
Figura 3. Efecto relajante de la fracción F4 y la subfracción F4'.....	41
Figura 4. Cromatografía en capa fina de la subfracción F4'.....	42
Figura 5	
A). Efecto relajante de la subfracción F4' en ausencia y presencia de propanolol (0.3 μ M).....	43
B). Evaluación de isoproterenol en ausencia y presencia de propanolol (0.3 μ M).....	43
Figura 6	
A). Curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en ausencia y en presencia de la fracción activa F4' (100 y 177 μ g/mL).....	45
B). Gráfica de Schild para la obtención del pA2.....	45
Figura 7	
A). Curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en ausencia y presencia de atropina (0.3 μ M y 3 μ M).....	46
B). Gráfica de Schild para la obtención del pA2.....	46

1. Introducción

En la actualidad, la población mexicana se encuentra más vulnerable a desarrollar alguna enfermedad respiratoria debido a múltiples factores de riesgo como son la contaminación del aire, el tabaquismo, los alérgenos y los productos químicos. Dichas enfermedades pueden ser agudas o crónicas, las primeras son afecciones de etiología infecciosa mientras que las segundas son de tipo crónico como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las alergias, la hipertensión pulmonar y el asma. El asma toma gran importancia ya que se encuentra dentro de las 10 primeras causas de atención en los servicios de salud, especialmente de urgencias y de consulta externa en nuestro país.¹ Se trata de una enfermedad en la que se presenta inflamación y estrechamiento de los bronquios, con lo que disminuye su diámetro interno y se reduce el flujo de aire que entra y sale de los pulmones.² Las terapias farmacológicas están dirigidas a contrarrestar los síntomas de inflamación y broncoconstricción que la caracteriza, sin embargo, no están exentas de provocar reacciones adversas, por lo que es necesaria la investigación de nuevas alternativas. Considerando que en la medicina tradicional se utilizan diversas plantas para el control del asma, y han resultado benéficas ya que provocan relajación del músculo liso, el presente trabajo estuvo encaminado al estudio de la actividad relajante de la planta *Hyptis suaveolens* utilizando el modelo de anillos aislados de tráquea de cobayo. Dicho estudio permitió llegar a una fracción de máxima actividad relajante y se exploró si la relajación se debe a la activación de los receptores β_2 adrenérgicos o a la inhibición de los receptores muscarínicos M_3 .

2. Marco teórico

2.1. Aparato respiratorio

El sistema respiratorio consta de tres partes: una parte conductora, una región respiratoria y un mecanismo de ventilación, las cuales en conjunto acondicionan el aire, proporcionan oxígeno y eliminan el CO₂ del torrente sanguíneo.³ La parte conductora del sistema incluye a la boca, la cavidad nasal, la faringe, los senos paranasales, nasofaringe y el árbol traqueo bronquial; el funcionamiento de esta porción sirve para calentar, humedecer y filtrar el aire inspirado.³ La parte respiratoria del sistema comprende el parénquima pulmonar, cuya función principal es el intercambio de gases ⁴ y por último el sistema de ventilación que está conformado por la caja torácica, los músculos intercostales, el diafragma y el tejido conectivo elástico del pulmón, en conjunto son los responsables del movimiento del aire dentro del tracto respiratorio. ³

2.1.1. Tráquea, bronquios y bronquiolos

La tráquea conduce el aire a la parte respiratoria del pulmón por medio de dos bifurcaciones, denominados bronquios primarios los cuales ingresan al pulmón derecho e izquierdo. Los bronquios primarios se dividen en bronquios secundarios que se dividen nuevamente en bronquios segmentarios (o terciarios) los cuales experimentan una mayor ramificación y una disminución del diámetro. Se continúa con la reducción del diámetro hasta formar bronquiolos los cuales son pequeños conductos tubulares que unen a los bronquios con los alveolos. Su función es transmitir el aire hacia los alveolos.³

La región traqueobronquial está revestida por epitelio respiratorio, similar al de la nariz y la nasofaringe, el cual consiste principalmente en células ciliadas y mucosas, que juegan un papel importante en el aclaramiento mucociliar. También están presentes células serosas, basales y las células neuroendócrinas.³

La tráquea y los bronquios están conformados por cartílago y músculo liso.⁵ Por su parte, en los bronquiolos no existen glándulas subepiteliales ni placas cartilaginosas, pero si una capa de músculo liso relativamente gruesa.⁶

2.2. Inervación del músculo liso de las vías aéreas

El control del tono bronquial resulta de la interacción de varias vías en competencia, ya que recibe inervación simpática (adrenérgica), parasimpática (colinérgica), y neuronas no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) junto con catecolaminas circulantes y factores locales.⁷

2.2.1. Inervación simpática (adrenérgica)

La mayor parte de la inervación simpática se origina a partir de fibras colinérgicas preganglionares en la región toracolumbar de la médula espinal.⁸

Aunque la inervación simpática de las vías aéreas es muy escasa, el sistema adrenérgico controla las vías aéreas produciendo dilatación del árbol bronquial de dos formas: a través de las catecolaminas circulantes que son liberadas desde la médula suprarrenal (especialmente la adrenalina) y por inervación simpática directa. Esta última inerva principalmente los vasos sanguíneos bronquiales, las glándulas submucosas, los ganglios parasimpáticos, y solo algunas inervan al músculo liso de las vías aéreas con presencia abundante del adrenergico receptor β_2 .^{7,9}

2.2.2. Inervación parasimpática (colinérgica)

La inervación parasimpática preganglionar de las vías aéreas se origina en el tronco encefálico en donde estos nervios son colinérgicos y nicotínicos; tras la estimulación, producen potenciales excitadores en las neuronas posganglionares. Las fibras posganglionares se distribuyen a la mucosa nasal a través de las ramas del nervio nasal posterior, donde finalmente inervan las glándulas serosas, mucosas, arterias y venas.⁸

El sistema nervioso parasimpático desempeña un papel esencial en la regulación del calibre de las vías aéreas, ya que constituye la principal inervación de las vías aéreas. Los nervios colinérgicos secretan acetilcolina la cual se une a los receptores muscarínicos lo que desencadena casi de manera inmediata una broncoconstricción.^{9,10}

El músculo liso de las vías respiratorias expresa abundantes receptores muscarínicos M₂ y M₃, aproximadamente en una proporción de 4:1. El receptor M₃ que está acoplado a una proteína G_q es el principal responsable de la contracción bronquial y traqueal del músculo liso, a pesar de que sus niveles de expresión sean bajos.⁹ Cabe mencionar que en las vías aéreas de los humanos la inervación colinérgica se ha identificado hasta los bronquiolos terminales.^{9,10}

2.2.3. Inervación no adrenérgica no colinérgica de las vías aéreas

El sistema no adrenérgico-no colinérgico (NANC) libera mediadores que contribuyen al tono bronquial.⁷ Este sistema es capaz de producir tanto respuestas excitadoras como inhibitoras, además de intervenir en la secreción de moco. Los

principales mediadores del sistema excitador NANC (eNANC) son la Sustancia P, la neurocinina A y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Con respecto a los mediadores del sistema inhibitor NANC (iNANC), se tiene al óxido nítrico (NO) que es el mediador predominante que contribuye a la broncodilatación ⁷ y al péptido intestinal vasoactivo (VIP); aunque la participación de este último en el ser humano es controversial, en las vías aéreas de cobayos ha quedado totalmente demostrado que el VIP regula una respuesta inhibitoria modulando la respuesta colinérgica a través de un antagonismo con la acetilcolina liberada. ⁹

2.3. Respuesta mecánica del músculo liso de las vías aéreas

La respuesta mecánica del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) está regulada por una serie de eventos moleculares que giran en torno a dos proteínas contráctiles filamentosas: la actina y la miosina. ¹²

Estos eventos ocurren cuando la miosina se activa por la fosforilación de su cadena ligera debido a la cinasa de la cadena ligera de miosina y se revierte por la desfosforilación debido a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. El alcance y la duración de la respuesta contráctil dependen del equilibrio entre la fosforilación y desfosforilación de la cadena reguladora de miosina y la actividad de la ATPasa del complejo actina-miosina. ¹²

2.3.1. Contracción

La broncoconstricción se define como el estrechamiento de las vías respiratorias que puede desencadenarse por una despolarización electromecánica o por diversos agonistas contráctiles ¹³ que se pueden liberar por la presencia de alérgenos,

infecciones respiratorias, irritantes, ejercicio, etc.¹⁴ Entre dichos agonistas contráctiles se encuentran la acetilcolina, la bradicinina, las neurocininas, la histamina, los leucotrienos y algunas prostaglandinas, que interactúan con sus correspondientes receptores que se encuentran acoplados a proteínas Gq.¹⁴

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

Un ejemplo de la contracción del músculo liso es la que se origina por la unión de la acetilcolina al receptor muscarínico (acoplado a proteína G), que produce la disociación de la proteína Gq o Gq/11 en las subunidades α y $\beta\gamma$; la subunidad α activa la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$), lo que promueve la hidrólisis del 4,5-difosfato de fosfoinositol (PIP_2)¹⁵ lo que conduce a la producción de inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP_3 se difunde a través del citosol y se une a su receptor específico ubicado en el retículo sarcoplásmico, lo que moviliza la liberación de calcio.¹⁶ El calcio intracelular se une a la calmodulina, y este complejo a su vez activa a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK), la cual fosforila a las cadenas ligeras de miosina (MLC). La fosforilación de las MLC activa a la ATPasa intrínseca, que hidroliza el ATP y proporciona la energía requerida para el movimiento de las cabezas de miosina sobre los filamentos de actina, que son fundamentales para el inicio de la contracción muscular. La fosforilación de MLC es un proceso altamente regulado, determinado por la integración de numerosos mecanismos reguladores que actúan sobre las MLCK y las fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCP).¹⁷

El otro producto de la hidrólisis es el 1,2-diacilglicerol DAG que activa varias isoformas de la familia de la proteína cinasa C (PKC). Estas cinasas regulan la contracción del músculo liso mediante la fosforilación de proteínas, incluyendo a la calponina. -En condiciones de reposo, la calponina inhibe la capacidad de la actina para activar la ATPasa de miosina, por lo tanto, mantiene el músculo relajado. Sin embargo, en el estado fosforilado, la calponina se disocia de la actina y así bloquea su efecto inhibitor sobre la ATPasa de miosina. Adicionalmente, DAG puede hidrolizarse con la enzima DAG-lipasa para producir ácido araquidónico (AA), que también puede formarse a partir de fosfatidilcolina (PC) mediante fosfolipasa A2 (PLA2). El AA tiene múltiples efectos celulares ya sea directamente o como precursor de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. ^{18,19}

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

Los receptores acoplados a la proteína Gi pueden actuar mediante las subunidades α y $\beta\gamma$. La subunidad α se une a la enzima AC e inhibe su actividad, al reducir los niveles intracelulares del segundo mensajero AMPc. ²⁰ Por otra parte, las subunidades $\beta\gamma$ activan ciertas isoformas de PLC β , una enzima que convierte el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en DAG e IP₃. El IP₃ induce la liberación de calcio de las reservas intracelulares, mientras que el DAG recluta la proteína cinasa C (PKC) a la membrana plasmática generando así la contracción. ²⁰

Adicionalmente, las subunidades $\beta\gamma$ pueden activar a la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) cuya activación se asocia con vías de señalización que regulan la supervivencia celular. ²⁰

2.3.2. Broncorrelajación

La relajación del músculo liso de las vías aéreas se consigue al reducir la concentración de Ca^{2+} intracelular o al modificar la sensibilidad de las proteínas contráctiles del mismo ^{21,22} lo cual se puede conseguir por diversas vías que incluyen: la activación del sistema de nucleótidos cíclicos AMPc (por acción de los agonistas β_2 , VIP, prostaglandinas) y GMPc (por la acción del óxido nítrico y de los nitratos), por la inhibición de la degradación de dichos nucleótidos y la por la modulación de la actividad de los canales iónicos de la membrana celular.²¹

2.3.2.1. Relajación a través de la activación de receptores acoplados a proteína Gs

Los receptores acoplados a proteínas Gs en el músculo liso de las vías respiratorias se activan mediante agentes endógenos tales como catecolaminas circulantes, prostaglandinas, adenosina y VIP. ²³

La unión del agonista induce un cambio conformacional en el receptor que permite la interacción con la proteína Gs, y posteriormente se produce una disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$. ²⁴

La subunidad α se une a la enzima adenilil ciclasa (AC) que se encuentra unida a la membrana celular y la activa. La activación de la AC cataliza la formación de ATP a AMP cíclico (cAMP), que a su vez se une a las subunidades reguladoras de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA).²³ La PKA fosforila muchas proteínas diferentes, incluida la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), modificando así

su función, y esto finalmente conduce a la relajación del músculo liso de las vías respiratorias.²⁵

2.3.2.2. Relajación por activación de la enzima guanilato ciclasa

Las guanilil ciclasas (GC) son enzimas que catalizan la conversión de GTP a GMPc y existen como enzimas solubles y en partículas asociadas a la membrana.²⁶ Estos dos tipos de enzimas se diferencian entre sí por su ubicación y por los agonistas que las activan. La forma soluble se localiza en el citosol y se activa por el óxido nítrico; mientras que la forma particulada se encuentra en la membrana, y se activa por el péptido natriurético (PN).^{26,27}

Ambos tipos de enzimas producen guanosin- 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), que a su vez activa a cinasa dependiente de GMPc (PKG), una vez activada esta enzima fosforila a varias proteínas clave, incluidas las de los canales iónicos, las bombas iónicas, los receptores y enzimas, todas involucradas en el control de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La fosforilación de estas proteínas diana reduce la concentración de Ca^{2+} y da como resultado la relajación de músculo liso.²⁷

2.3.2.3. Relajación por inhibición de fosfodiesterasas

Las enzimas fosfodiesterasas (PDE) son un subconjunto de enzimas cuya función es reducir los niveles de AMPc y GMPc intracelular. Los fármacos que inhiben a las fosfodiesterasas, generan la acumulación de AMPc / GMPc lo que activa aún más a las enzimas PKA / PKG, lo que conduce a broncodilatación.²⁸

Las PDE que hidrolizan preferentemente a los nucleótidos cíclicos intracelulares, AMPc o GMPc, se agrupan en 11 familias. En las células de las vías aéreas

humanas se ha reportado la presencia de las clases PDE1-5, de ellas la PDE3 y la PDE4 son las dos principales enzimas hidrolizadoras de AMPc. Debido a lo anterior los inhibidores de las PDE3 y PDE4 causan la relajación del MLVA. ²³

2.3.2.4. Modulación de canales iónicos

2.3.2.4.1. Relajación por modulación del flujo de calcio transmembranal

La concentración de Ca^{2+} intracelular juega un papel clave en el inicio y en el mantenimiento de la contracción del MLVA. La concentración de calcio se puede incrementar debido a su ingreso a través de los canales de Ca^{2+} que se localizan en la membrana plasmática, como son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC), y los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROC).^{29,30} Por lo tanto, el bloqueo de estos canales se ha considerado como un mecanismo de relajación. Al respecto, se ha reportado que los fármacos que bloquean dichos canales controlan la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación pulmonar, sin embargo, solo mostraron una interacción aditiva con los agonistas de los receptores β_2 , por lo tanto, no se consideran como fármacos de elección al no tener un efecto broncodilatador directo. ^{25,28}

2.3.2.4.2. Canales de K^+

En las células del músculo liso de las vías respiratorias se encuentran los canales de K^+ dependientes de voltaje y los canales de potasio K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}), los cuales juegan un papel importante en la modulación de la actividad contráctil. La activación de estos canales causa hiperpolarización celular que

bloquea la entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes del voltaje, lo que lleva a la relajación del músculo liso. En consecuencia, los moduladores de los canales de K^+ pueden ser valiosos en el tratamiento de los trastornos crónicos de las vías respiratorias. Investigaciones realizadas en este sentido, han reportado que dichos moduladores son eficaces para relajar las vías respiratorias humanas en estudios *in vitro*. Sin embargo, en el tratamiento *in vivo*, son más potentes como vasodilatadores, lo que limita la dosis que se puede administrar de forma segura.³¹

2.4. Asma

El asma es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de edema, broncoconstricción e hipersecreción de moco. Durante una crisis asmática los síntomas que se presentan son: dificultad respiratoria, tos, sibilancias y opresión en el pecho o alguna combinación de estos síntomas.¹⁴

2.4.1. Epidemiología

De acuerdo con estimaciones de la OMS, en el mundo existen 235 millones de personas asmáticas.³² Esta enfermedad afecta del 5 al 12% de la población pediátrica, mientras que, en los adultos, aunque se considera que su incidencia se ha incrementado, no se tiene un porcentaje preciso. Este padecimiento es muy importante porque repercute tanto en la productividad del individuo en el ámbito familiar, como en el grupo socioeconómico donde se desenvuelve y es causa importante de ausentismo escolar y laboral.³³

En México, el número de casos nuevos reportados ha superado los 25 mil por año y actualmente se considera que las principales causas que contribuyen a la

morbimortalidad del asma son el subdiagnóstico y el manejo inadecuado de los pacientes.³²

2.4.2. Etiología

Aunque no se conoce una etiología específica y no se sabe por qué el individuo asmático reacciona tan espectacularmente a las mismas situaciones a las que está expuesto el individuo sano, se han identificado agentes potencialmente perjudiciales, como los alérgenos, la contaminación atmosférica, la exposición laboral a antígenos potenciales, el tabaquismo pasivo y/o activo, y el uso de conservadores en los alimentos enlatados como la tartrazina y los sulfitos.³³

Asimismo, se ha considerado la implicación de un factor genético que favorece la hiperreactividad bronquial, pero no se ha concluido que la herencia desempeñe un papel definitivo. Por otro lado, se ha observado que en los niños hay un predominio del sexo masculino y en los adultos predominio del sexo femenino, y que las crisis desaparecen en la mitad de los infantes al llegar a la pubertad, lo cual sugiere la existencia de factores hormonales no identificados que son importantes en la hiperreactividad bronquial, en el desencadenamiento de las crisis de asma, en la severidad y/o persistencia de los síntomas, que varían en cada paciente y muchas veces en el mismo individuo.³³

2.5. Fármacos para el tratamiento del asma

En la farmacoterapia del asma se utilizan medicamentos destinados a disminuir la inflamación de las vías respiratorias (antiinflamatorios) y productos orientados a disminuir el broncoespasmo (broncodilatadores).³⁴

2.5.1. Fármacos broncodilatadores

2.5.1.1. Fármacos que bloquean el efecto de los mediadores contráctiles

2.5.1.1.1. Anti-inflamatorios

Los corticosteroides inhalados tales como prednisona y fluticasona son los agentes anti-inflamatorios más efectivos utilizados para tratar las enfermedades de las vías respiratorias, debido a su papel en la modificación de varias células inflamatorias y vías involucradas en el asma. Se recomiendan en todos los pacientes sintomáticos, a dosis que difieren según la gravedad de la enfermedad, como monoterapia o en combinación con agonistas β_2 de acción prolongada o antagonistas de los receptores de leucotrienos.³⁵

Entre los mecanismos que contribuyen a su efecto anti-inflamatorio en el asma están la modulación de la producción de citocinas y quimiocinas, la inhibición de la síntesis de eicosanoides, una notable inhibición de la acumulación de basófilos, eosinófilos y otros leucocitos en el tejido pulmonar y la disminución de la permeabilidad vascular.³⁴

El efecto de los corticosteroides se produce a través de la unión del corticoesteroide (CS) a los receptores de glucocorticoides citoplasmáticos (GR). El complejo CS-GR ingresa al núcleo e interactúa con secuencias de ADN específicas que responden a los esteroides al codificar factores de transcripción que promueven la liberación de compuestos anti-inflamatorios (p. ej., lipocortina) y regulan negativamente la liberación de citocinas pro-inflamatorias.³⁵

El tratamiento a largo plazo con corticoesteroides se ha asociado con algunos posibles efectos secundarios como la supresión adrenocortical, osteoporosis, fracturas óseas, adelgazamiento de la piel y púrpura trombocitopénica.³⁵

2.5.1.1.2. Anticolinérgicos

Los fármacos antimuscarínicos (anticolinérgicos) evitan la broncoconstricción secundaria a la estimulación colinérgica, ya que actúan como antagonistas competitivos de los receptores M₃ que están acoplados a la proteína Gq.⁷

En este grupo de fármacos se encuentra la atropina, el bromuro de ipratropio o tiotropio que es un anticolinérgico de acción más prolongada³⁷, sin embargo, la broncodilatación que producen estos fármacos es menos intensa que la generada por los agonistas adrenérgicos y surge con mayor lentitud, es por ello que los anticolinérgicos se utilizan como adyuvantes en el tratamiento del asma.³⁶ En el caso de ipratropio se recomienda administrarlo en combinación con salbutamol (fármaco β_2 -adrenérgico), debido a los efectos sinérgicos que se producen con la terapia combinada. Entre los efectos adversos relacionados con su uso se encuentran la xerostomía o resequedad en la boca y tos, así como la interacción con otros antimuscarínicos.³⁷

2.5.1.1.3. Antihistamínicos

En el sistema periférico, la histamina se sintetiza y se almacena en las vesículas de mastocitos y basófilos. En las reacciones alérgicas inmediatas la histamina desempeña un papel importante, ya que, tras la estimulación inmunológica de los mastocitos y basófilos, la histamina se libera de las vesículas de almacenamiento en el espacio extracelular al activar a los receptores para histamina. En el sistema

respiratorio la activación de los receptores H₁ que están acoplados a la proteína G_{q/11}, provocan broncoconstricción, secreción de moco, secreción bronquial, y edema de la mucosa. Los fármacos antagonistas de los receptores H₁ tienen eficacia clínica significativa en algunos tipos de asma alérgica,³⁸ y actualmente se dispone de antihistamínicos de segunda generación denominados antihistamínicos no sedantes como cetirizina, desloratadina, y ebastina.³⁴

Los efectos adversos más frecuentes de estos fármacos se relacionan con el sistema nervioso central y son: mareos, visión borrosa, fatiga, nerviosismo, insomnio y temblores.³⁴

2.5.1.1.4. Antileucotrienos

Los leucotrienos son potentes broncoconstrictores, que incrementan la permeabilidad vascular y estimulan la secreción de moco. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) mediante la vía 5-lipoxigenasa (5-LO). La síntesis de estos mediadores resulta de la escisión del AA en las membranas celulares, quienes ejercen sus efectos biológicos al unirse y activar receptores específicos.³⁹

Los leucotrienos (LT) se sintetizan en diversas células del organismo, como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos, macrófagos alveolares, así como en las células epiteliales y endoteliales de los vasos pulmonares.⁴⁰

Los fármacos antileucotrienos son útiles en el tratamiento del asma ya que inhiben el proceso de remodelación de la vía aérea al disminuir la infiltración eosinofílica al pulmón, reducen la liberación de citocinas relacionadas con la respuesta inmune tipo Th₂, impiden la hiperplasia de las glándulas mucosas y la hipersecreción de

moco, la hiperplasia de células musculares de la vía aérea, así como el depósito de colágeno y fibrosis en la pared bronquial (denominado remodelado bronquial).⁴⁰

Dichos fármacos se clasifican en dos grupos según su mecanismo de acción: Los que bloquean el receptor de leucotrienos y así la respuesta del órgano diana de LT (zafirlukast, pranlukast, montelukast) y los que inhiben la síntesis de LT (zileuton, ZD2138, Bay X 1005, MK-0591) que bloquean la biosíntesis de cisteinil LT y LTB₄.³⁹

Como efectos adversos de los fármacos montelukast y zarfilukast se reportan náuseas, diarrea, fiebre, cefalea, y dolor abdominal, mientras que el fármaco zileuton produce dolor torácico, cefalea, nerviosismo, dispepsia, constipación, flatulencia, mialgias, artralgias, etc.⁴¹

2.5.1.2. Fármacos relajantes

2.5.1.2.1. β_2 selectivos

Los fármacos agonistas de los adrenoreceptores β_2 se consideran medicamentos de primera línea en el tratamiento del estrechamiento de las vías respiratorias, lo que caracteriza al asma bronquial, por lo que son un pilar en el manejo del asma ya que alivian los síntomas y controlan la enfermedad.⁴² Se clasifican en productos de acción breve (salbutamol, levalbuterol, terbutalina) y acción larga (salmeterol y formoterol).³⁴ Estos fármacos producen broncorelajación directa cuando actúan sobre el adrenoreceptor β_2 que activa la adenilil ciclasa a través de la proteína Gs, lo que origina la producción de AMPc y la activación de la proteína cinasa A (PKA) que se ha descrito como el mecanismo principal que impulsa la relajación del MLVA.⁴³

No obstante, dentro de las desventajas de este tipo de fármacos es que la exposición prolongada puede desensibilizar a los receptores; provocar estimulación cardiovascular, temblor distal, hipokalemia, e hiperglicemia. ^{43,44}

También se ha informado que producen alteraciones en los tejidos y estructuras celulares de las vías aéreas, así como en varias células clave de la reacción alérgica (mastocitos, linfocitos). ⁴²

2.5.1.2.2. Inhibidores de las fosfodiesterasas

Los derivados de xantina (metilxantina, teofilina, teobromina) inhiben a las enzimas fosfodiesterasas, lo que origina la acumulación de cAMP / cGMP que activa aún más a las enzimas PKA / PKG, respectivamente, lo cual contribuye a la reducción de la contractilidad asociada a la entrada de Ca^{2+} en el músculo liso de las vías aéreas. ⁴⁵

El uso de estos fármacos se limita solo a los casos en los que se dispone de métodos para cuantificar su nivel sanguíneo, debido a que tienen un margen terapéutico estrecho y sus efectos terapéuticos y tóxicos tienen relación con la concentración sanguínea. ³⁵ Los signos tempranos de intoxicación son: náusea y vómito por estimulación del sistema nervioso central, deshidratación, dolor abdominal, agitación, taquicardia, incremento en la secreción gástrica, reflujo gastroesofágico y poliuria. A altas concentraciones ocurren: arritmias cardíacas, encefalopatía, hipertermia, convulsiones resistentes, daño cerebral y muerte. ⁴⁷

No obstante, en los últimos años se han desarrollado fármacos más selectivos, como el rolipram y roflumilast, que son inhibidores de la fosfodiesterasa 4 tienen

acciones farmacológicas específicas y disminuyen la frecuencia de los efectos adversos gastrointestinales.⁴⁶

2.6. Tratamiento con plantas medicinales

A lo largo de la historia el uso de plantas medicinales ha representado un recurso fundamental para la salud humana, principalmente en zonas rurales e indígenas, donde pueden ser el único tratamiento del que se dispone a falta de instituciones médicas o recursos monetarios para la adquisición de medicamentos, además de que han servido como base para el desarrollo de la medicina moderna.⁴⁸ En el caso del tratamiento de las enfermedades respiratorias, la planta *Ma Huang* (Ephedra) se utiliza en la medicina tradicional China desde hace más de 5000 años, y es considerada la terapia broncodilatadora más antigua. Su estudio permitió identificar al principio activo que es la efedrina, dicho compuesto actúa liberando catecolaminas endógenas que provocan una broncodilatación. La efedrina se convirtió en un tratamiento muy popular y eficaz para el asma, sobre todo porque, a diferencia de la adrenalina (hasta entonces la terapia estándar), se podía administrar por vía oral, posteriormente surgieron los fármacos β_2 -adrenérgicos que hoy en día son utilizados ampliamente.⁴⁹

En México, se tiene el registro de más de 4 000 especies de plantas medicinales que se han utilizado empíricamente por el 80% de la población indígena para tratar diversos problemas de salud, dentro de los cuales se encuentran las enfermedades respiratorias⁵⁰ como el asma bronquial, la gripe, resfriados y otros problemas pulmonares. Sin embargo, un reducido número de plantas cuentan con estudios farmacológicos que dan sustento a su uso tradicional, algunas de las cuales se

presentan en el cuadro 1, lo cual hace evidente la importancia de continuar con su estudio, tal es el caso de la planta *Hyptis suaveolens* que se emplea en la medicina tradicional del estado de Chiapas en el tratamiento del asma, pero no cuenta con estudios científicos.

2.6.1. *Hyptis suaveolens*

Hyptis suaveolens pertenece a la familia de las *Lamiaceae* y casi todas las partes de la planta se utilizan en la medicina tradicional para tratar distintas enfermedades. Alcanza aproximadamente 2 metros de altura, tiene ramas y tallos largos, blancos y pilíferos. Sus flores son moradas o blancas, sus hojas ovaladas, arrugadas y puntiagudas.⁵¹

La planta se ha utilizado como tónico, diaforético, antimicrobiano, antibacteriano, antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, con efecto insecticida, para tratar quemaduras, heridas, tos y asma.⁵¹

Planta	Nombre común	Extracto o compuesto activo identificado	Actividad reportada/Mecanismo propuesto	Referencias
<i>Agastache mexicana</i>	Toronjil morado	Aceite esencial	Bloqueante de los canales Ca ²⁺	52
<i>Argemone ochroleuca</i> Sweet	Chicalote pálida	Berberina	Antagonista receptores muscarínicos	53
<i>Argemone platyceras</i>	Chicalote	Fracción acetato de etilo	Antagonistas receptores LT D4	54
<i>Crataegus mexicana</i>	Tejocote	Extracto hexánico	Actividad β_2 -adrenérgico	55
<i>Croton reflexifolius</i>	Palo santo	Ácido polialtico	Antagonista receptores muscarínicos	56

<i>Galphimia glauca</i>	Árnica roja	Fracción acetato de etilo	Antagonistas receptores LT D4	57
<i>Gnaphalium conoideum</i>	Gordolobo	Extracto metanólico	Antagonista parcial de los canales Ca ²⁺	58
<i>Gnaphalium liebmannii</i>	Gordolobo	Extracto hexánico	Inhibición de las fosfodiesterasas	59
<i>Taxodium mucronatum</i>	Ahuehuate	Extracto hexánico	Antagonista de los canales de Ca ²⁺	60

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

2.6.2. Información etnomédica de *Hyptis suaveolens* en México

En la medicina tradicional mexicana, a mediados del siglo XVI la semilla de *Hyptis suaveolens* se utilizaba para tratar la diarrea, y para las mujeres que no podían parir, mientras que la raíz molida se administraba a quienes presentaban tos con sangre.⁶¹

Otros padecimientos gastrointestinales en los que se utiliza son: disentería, dolores estomacales y palpaciones en el abdomen debidas a alteraciones gástricas. Además, en el estado de Oaxaca a esta planta se le emplea como antiséptico. En la actualidad el uso más común de esta especie corresponde al tratamiento contra la diarrea. En el estado de Michoacán, para este fin se toma la decocción de la raíz en ayunas; mientras que en Yucatán y Veracruz se bebe la infusión de las hojas.⁶¹

Esta especie se utiliza de manera tradicional en enfermedades respiratorias en el estado de Chiapas y se ha demostrado su actividad gastroprotectora.⁶⁴

2.6.3. Actividades farmacológicas y estudios fitoquímicos de *Hyptis suaveolens*

Algunos de los usos tradicionales de *Hyptis suaveolens* cuentan con estudios científicos que corroboran su actividad, tal es el caso de la actividad antibacteriana que se probó contra varios tipos de bacterias y hongos que causan enfermedades dermatológicas.⁶² En un estudio de actividad antiinflamatoria se identificaron dos compuestos activos: suaveolol y suaveolato de metilo ⁶³. En cuanto a la actividad gastroprotectora se identificó el compuesto activo como: suaveolol.⁶⁴

En cuanto a sus estudios fitoquímicos, se ha reportado que contiene aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas, terpenos y esteroides. ⁶²

3. Planteamiento del problema

El asma es una enfermedad crónica que presenta elevados índices de morbilidad y mortalidad. Las terapias farmacológicas están dirigidas a contrarrestar los episodios de broncoconstricción y a controlar la inflamación que la caracteriza, sin embargo, dichos tratamientos no están exentos de provocar efectos colaterales indeseables, así como un alto nivel de tolerancia, como resultado de su uso prolongado. Lo cual ha aumentado la necesidad y el interés por investigar nuevas alternativas.

En la medicina tradicional mexicana se utilizan plantas para el tratamiento de las enfermedades respiratorias; una de ellas es *Hyptis suaveolens*, la cual carece de estudios científicos que corroboren su utilidad, por lo que este trabajo se centró en estudiar la actividad relajante en el músculo liso de tráquea aislada de cobayo.

4. Hipótesis

La planta *Hyptis suaveolens* se ha empleado para el tratamiento de las enfermedades respiratorias, por lo que producirá un efecto relajante sobre el músculo liso en anillos de tráquea aislada de cobayo.

5. Objetivos

5.1. General

- Determinar el efecto relajante de *Hyptis suaveolens* sobre anillos de tráquea aislada de cobayo.

5.2. Particulares

- Obtener los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *Hyptis suaveolens*.
- Identificar el extracto y la subfracción de mayor actividad relajante.
- Determinar si en el mecanismo de acción se encuentran implicados los receptores β_2 adrenérgicos y/o muscarínicos M_3 .

6. Metodología

6.1. Fármacos y extractos

La acetilcolina, carbacol, propanolol y atropina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y fueron usados sin purificación adicional. Los extractos y fracciones se prepararon en forma de suspensión utilizando agua destilada más 2 gotas de Tween 80, asimismo, se evaluó un control.

El pentobarbital sódico se compró en solución comercial de uso veterinario marca Pisa, y los demás reactivos de uso común fueron grado analítico.

6.2. Animales

Para las evaluaciones se utilizaron cobayos macho (cepa *Hartley*) de ocho semanas de edad, con un peso corporal entre 300 y 450 g mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso a alimento y agua. Los procedimientos involucrados en el cuidado y manejo de los animales se realizaron en conformidad con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Mantenimiento de los Animales NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. El estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, con número de registro CICUAL-08/4-12-2017.

6.3. Material vegetal

La planta *Hyptis suaveolens* se colectó en el municipio de Copainala en el estado de Chiapas por el botánico Francisco Hernández Najarro, durante el mes de agosto del 2018. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario CHIP que pertenece

a la Secretaría de Medio Ambiente, Vivienda e Historia Natural, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, y se puede encontrar con el número de registro: 27939.

6.4. Preparación de extractos, obtención de fracciones y subfracciones de *Hyptis suaveolens*

Se utilizaron las partes aéreas (hojas y tallos) secas y pulverizadas. Los extractos se prepararon por el método de maceración utilizando tres disolventes distintos; para ello se pesaron 4100 g del material vegetal que fueron colocados en un garrafón de vidrio pyrex, al que se le adicionó en primer lugar el disolvente de hexano (15 L) y se dejó reposar durante 3 días a temperatura ambiente; a continuación, el disolvente se filtró y se concentró a presión reducida por medio de destilación utilizando un rotavaporador. Este procedimiento se repitió dos veces más y con ello se obtuvo el extracto hexánico.

Posteriormente, siguiendo la metodología anterior al residuo vegetal se le adicionó el disolvente de diclorometano (15 L) y después metanol (15 L) para tener los extractos correspondientes. Los extractos crudos fueron evaluados a diferentes concentraciones en el modelo de anillos de tráquea de cobayo (ver numeral 6.5 *preparación biológica*) y los resultados permitieron identificar al extracto de diclorometano como el de mayor actividad relajante. Posteriormente, este extracto se sometió a una separación por cromatografía en columna, utilizando como eluyentes disolventes y mezclas de ellos en orden creciente de polaridad: F1 (Hexano/AcOEt 9:1), F2 (Hexano/AcOEt 7:3), F3 (Hexano/AcOEt 5:5), F4 (Acetato de etilo) y F5 (Metanol). Obteniendo 99, 94.5, 75, 90.5 y 79 g, de dichas fracciones

respectivamente. Las fracciones fueron evaluadas a diferentes concentraciones y los resultados indicaron que la F4 fue la más activa.

Posteriormente, dicha fracción fue separada por cromatografía en columna (80.5 g de la fracción en 130 g de sílica gel) utilizando como eluyentes mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad: F1' (Hexano/AcOEt 9:1), F2' (Hexano/AcOEt 8:2), F3' (Hexano/AcOEt 7:3), y F4' (Hexano/AcOEt 5:5). La evaluación de ellas, indicó que la subfracción F4' (1.2 g) fue la más activa.

6.5. Preparación biológica

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (95 mg/kg), administrada por vía intraperitoneal. Posteriormente, de forma inmediata se realizó la disección de la tráquea y se limpió del tejido circundante. La tráquea se mantuvo a una temperatura de 37°C aireada de manera constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂, en una solución de Krebs la cual contenía NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄·7H₂O 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, CaCl₂·2H₂O 2.2 mM y glucosa 11 mM, se ajustó el pH a 7.4. El tejido se cortó en anillos de aproximadamente 2 mm, los cuales se colocaron en cámaras de órgano aislado con un volumen de 10 mL. Cada anillo se sujetó entre dos ganchos de metal, uno estuvo fijado a la cámara y el otro a un transductor de fuerza Biopac TSD 125C que registró la tensión isométrica en un polígrafo Biopac MP150. Cada anillo se ajustó a una tensión de 2 g y se permitió reposar por 30 min, posteriormente se determinó la viabilidad del tejido aplicando una solución de 30 µM de acetilcolina (si el tejido era viable se observaba una contracción). A continuación, se realizaron lavados con solución de Krebs cada 15 minutos durante una hora, para después proceder a

realizar los experimentos correspondientes.⁶⁵ Los valores fueron digitalizados y analizados por medio de un software de adquisición de datos (Acknowledge 4.0).

6.6. Evaluación de la actividad relajante de *Hyptis suaveolens*

Para determinar la actividad relajante, el tejido se pre-contrajo con una solución de carbacol (3 μ M) hasta alcanzar una meseta (aproximadamente 15 minutos, en la cual se observó un registro constante de tensión del tejido), en la cual la contracción inducida con carbacol se consideró como el 100%. Una vez formada la meseta, se aplicaron diferentes concentraciones de los extractos (17, 31.6, 56.2, 100, 177 y 316 μ g/mL), fracciones (76, 100, 133, 177, 237 y 316 μ g/mL) o vehículo (aplicación cada 7 minutos) de acuerdo con el experimento correspondiente y se determinó si se genera o no actividad relajante con base en una disminución de la tensión del órgano registrado en la señal.

6.7. Determinación de la participación de los receptores β_2 adrenérgicos

Para determinar si la subfracción activa F4' actuaba como agonista de los receptores β_2 adrenérgicos se realizaron curvas de: concentración-respuesta relajante de la misma, en ausencia y presencia de propranolol. Para ello, el tejido se incubó con una solución de propranolol (0.3 μ M) durante 15 minutos, posteriormente se contrajo con una solución de carbacol (3 μ M) hasta alcanzar una meseta (15 minutos), y después se adicionaron concentraciones crecientes de la subfracción activa F4' (56, 76, 100, 133 y 177 μ g/mL) o de isoproterenol (3 μ M-170 μ M) que fue utilizado como fármaco de referencia (control). La contracción inducida con carbacol se consideró como el 100%.⁶⁵

6.8. Determinación de la participación de los receptores muscarínicos

Para evaluar la implicación de los receptores muscarínicos se construyeron curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol (0.02-20 μM) en ausencia y en presencia de la subfracción activa F4' (100 y 177 $\mu\text{g/mL}$) o del antagonista atropina (1 μM). El fármaco antagonista atropina (control) y la subfracción activa se incubaron por 15 minutos, antes de aplicar la primera concentración de carbacol. La contracción inducida con carbacol se consideró como el 100%.

7. Estadística

Los valores de CE_{50} (concentración efectiva 50) se calcularon a través de una regresión lineal ⁶⁶. La diferencia entre dos determinaciones se analizó con una prueba de *t* de Student y las diferencias entre varias determinaciones se realizaron utilizando un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Dunnett. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas utilizando un valor de $p < 0.05$. El potencial antagonista se calculó con la ecuación de Schild: $\text{Log}((A'/A) - 1) = \text{Log} B - \text{Log} K_b$, donde A es la CE_{50} del fármaco contráctil en ausencia del antagonista, A' es la CE_{50} del fármaco contráctil en presencia del antagonista, K_b es la constante de afinidad para el antagonista y B es la concentración (M) del antagonista. El valor de pA_2 es la abscisa al origen cuando $A'/A=2$ ⁶⁶

8. Resultados

8.1. Evaluación del efecto relajante de los extractos de *Hyptis suaveolens*.

Al evaluar los extractos de *Hyptis suaveolens* en el modelo *in vitro* de anillos aislados de tráquea de cobayo previamente contraídos con carbacol (3 μ M), se encontró que únicamente el extracto de diclorometano presentó una relajación dependiente de la concentración (Figura 1), con un valor de máxima relajación de $47.16 \pm 1.93\%$ y un valor de CE_{30} de $138.07 \mu\text{g/mL}$. Respecto a los extractos de hexano y de metanol, aunque presentaron una tendencia relajante, esta no fue significativa respecto al control, ya que únicamente alcanzaron valores de máxima relajación de $28.7 \pm 7.82\%$ y $25.15 \pm 4.17\%$ respectivamente. En todos los casos se consideró como 100% la contracción máxima inducida por carbacol.

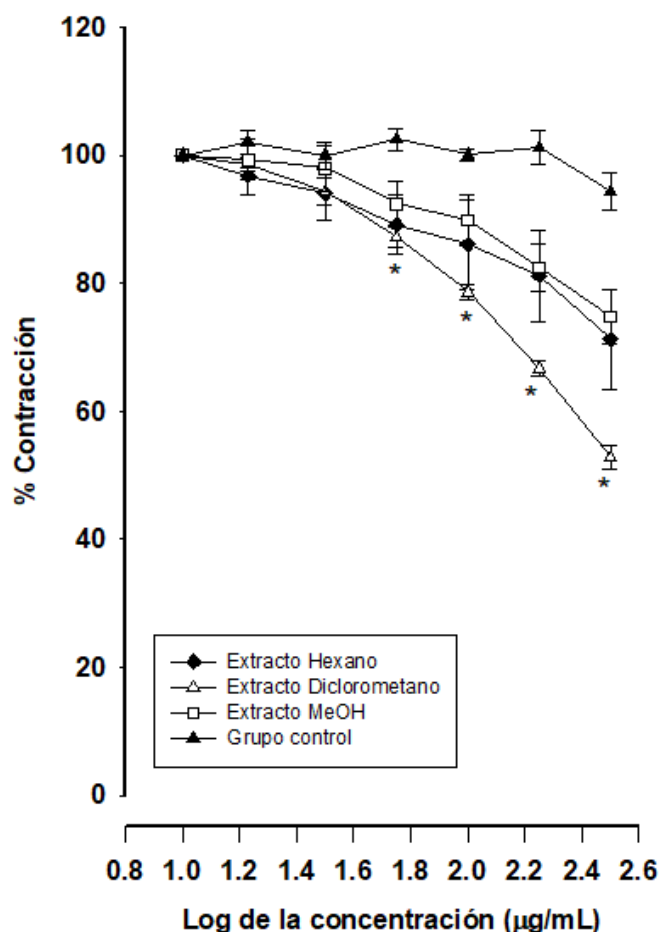


Figura 1. Efecto relajante de los extractos de *Hyptis suaveolens*. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVIA seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ respecto al control.

8.2. Evaluación del efecto relajante de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de *Hyptis suaveolens*.

El extracto de diclorometano que fue el de mayor actividad relajante, se sometió a una separación mediante cromatografía en columna del cual se obtuvieron 5 fracciones. Los resultados de las evaluaciones se presentan en la figura 2, en la que se puede observar que la fracción F1 fue inactiva, mientras que las fracciones restantes relajaron en forma dependiente de la concentración. Entre ellas sobresale la fracción de acetato de etilo (F4) ya que fue la más eficaz y potente, como se puede observar por los datos de Em_{\max} y CE_{30} que se presentan en el cuadro 2. Asimismo, con esta fracción fue posible calcular su CE_{50} , debido a que alcanzó un 96.37% de relajación (cuadro 2).

8.3. Obtención de la subfracción más activa.

Posteriormente, la fracción F4 (acetato de etilo) se separó en un segundo fraccionamiento en el cual se utilizaron mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad (F1' Hexano/AcOEt 9:1, F2' Hexano/AcOEt 8:2, F3' Hexano/AcOEt 7:3 y F4' Hexano/AcOEt). Se obtuvieron 4 subfracciones, donde la subfracción denominada F4' fue la que presentó mayor actividad relajante y al compararla con la F4 de la cual provenía, se evidencia claramente que con el fraccionamiento cromatográfico se obtuvo una subfracción con igual eficacia, pero con mayor potencia ya que el efecto de máxima relajación es del 96.37% para la fracción F4, mientras que la subfracción F4' tiene un efecto del 99.33% como se observa en la figura 3. Respecto a la eficacia, ambas relajaron casi al 100% (cuadro 3), sin embargo, lo hicieron a diferentes concentraciones, la subfracción F4' alcanzó el

máximo efecto con la concentración de 177 $\mu\text{g/mL}$, y la fracción F4 con 316 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a potencia se encontró una diferencia estadística en los valores de CE_{50} (cuadro 3).

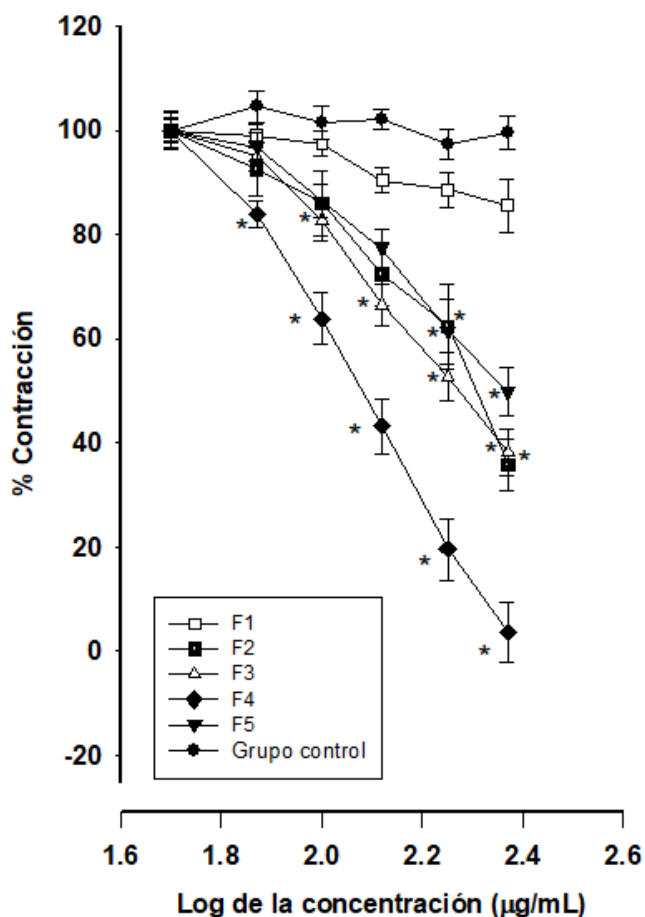


Figura 2. Efecto relajante de las fracciones del extracto de diclorometano. \square F1 (Hexano/AcOEt 9:1), \blacksquare F2 (Hexano/AcOEt 7:3), \triangle F3 (Hexano/AcOEt 5:5), \blacklozenge F4 (Acetato de etilo), \blacktriangledown F5 (Metanol), \bullet Grupo control. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos seis observaciones. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett. $*p < 0.05$ respecto al control.

Tratamiento	$\text{Emáx}\% \pm \text{EEM}$	$\text{CE}_{30} (\mu\text{g/mL}) \pm \text{EEM}$	$\text{CE}_{50} (\mu\text{g/mL}) \pm \text{EEM}$
Control	3.07 ± 3.98	-	-
F1	14.41 ± 5.13	-	-
F2	$*64.17 \pm 4.92$	$**191.66 \pm 10.53$	-
F3	$*61.9 \pm 4.44$	$**156.78 \pm 4.93$	-

F4	*96.37 ± 5.66	114.08 ± 3.44	151.47 ± 3.91
F5	*50.49 ± 4.73	**225.01 ± 16.73	-

Cuadro 2. Valores de efecto máximo (Emáx%), CE₃₀ y CE₅₀ de las fracciones del extracto de diclorometano. La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett. *p<0.05 respecto al control y **p<0.05 respecto a la CE₃₀ de la fracción F4.

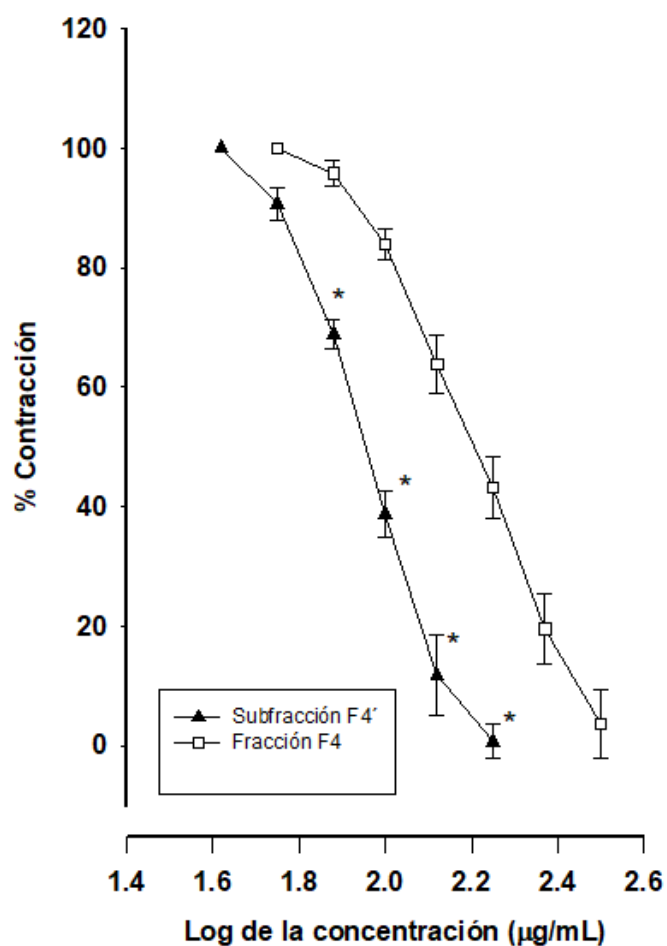


Figura 3. Efecto relajante de la fracción F4 y la subfracción F4'. Cada punto representa el promedio ± EEM de seis observaciones. La diferencia significativa se calculó con la prueba t de student, con una *p<0.05.

Fracciones	Em _{máx} % ± EEM	CE ₅₀ (µg/mL) ± EEM
F4 (Acetato de etilo)	96.37 ± 5.66	151.47 ± 3.91
F4' (Hexano/AcOEt 5:5)	99.33 ± 2.90	*91.19 ± 1.83

Cuadro 3. Valores de efecto máximo (Em_{máx}%) y CE₅₀ de la fracción F4 y subfracción F4'. La diferencia significativa fue obtenida con la prueba t de student con un valor de *p ≤ 0.001.

Al realizar una cromatografía en capa fina de la subfracción F4' se observaron 3 manchas lo cual sugiere la presencia de más de un compuesto responsable de la actividad relajante de esta subfracción (figura 4).



Figura 4. Cromatografía en capa fina de la subfracción F4'.

8.4. Evaluación de la participación de los receptores β₂ adrenérgicos.

Para aportar información sobre el mecanismo de acción por el cual actúa la subfracción F4' de *Hyptis suaveolens* se exploró si el efecto relajante se debe a la activación de receptores β₂ adrenérgicos, para ello se aplicaron concentraciones

crecientes de la subfracción F4' en ausencia y presencia de propranolol. Los resultados correspondientes se muestran en la figura 5A donde se observa que el efecto relajante de la subfracción F4' no se inhibió por propranolol, lo cual indica que la subfracción F4' no actúa mediante la activación de los receptores β adrenérgicos. De igual forma no se encontró diferencia estadística entre los valores de CE_{50} (cuadro 4).

Como fármaco de referencia se utilizó isoproterenol, que es un fármaco agonista de los receptores β adrenérgicos, y para él, la presencia de propranolol si inhibió en su totalidad su efecto relajante (figura 5B), tal como se esperaba, encontrando diferencia estadística en el efecto máximo y en la CE_{50} (cuadro 5).

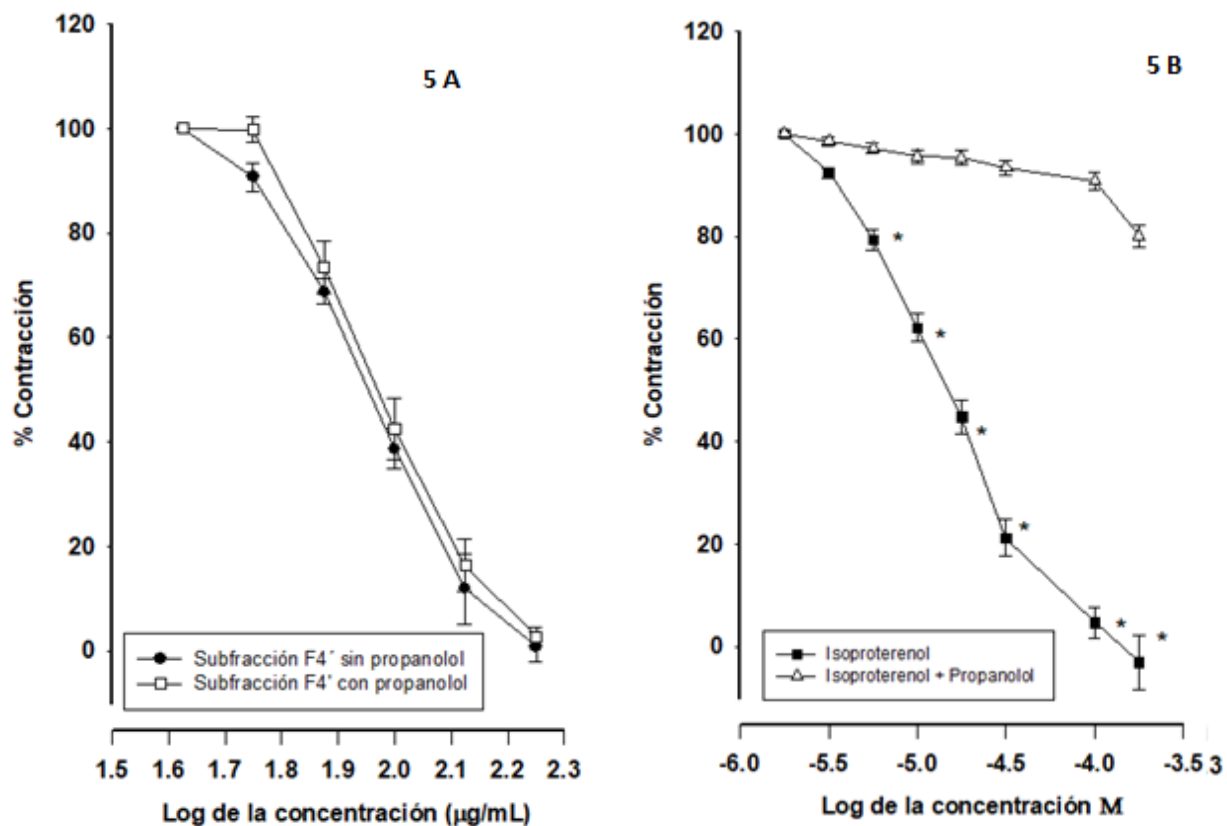


Figura 5 A). Efecto relajante de la subfracción F4' en ausencia y presencia de propranolol (0.3 µM). Figura B). Evaluación de isoproterenol en ausencia y presencia de propranolol (0.3 µM). Cada punto representa el promedio ± EEM de seis observaciones. La diferencia significativa se calculó con la prueba t de student, con una *p<0.05.

Tratamiento	Emáx%± EEM	CE ₅₀ (µg/mL) ± EEM
F4' (Hexano/AcOEt 5:5)	99.33% ± 2.90	91.19 ± 1.83
F4' (Hexano/AcOEt 5:5) + propranolol	95.68% ± 3.89	96.61 ± 2.23

Cuadro 4. Valores de efecto máximo (Emáx%) y CE₅₀ de la subfracción F4' en ausencia y en presencia de propranolol.

Tratamiento	Em _{ax} % ± EEM	CE ₅₀ (M) ± EEM
Isoproterenol	94.99% ± 3.65	1.05x10 ⁻⁰⁵ ± 4.09x10 ⁻⁰⁷
Isoproterenol + propanolol	*19.19% ± 2.23	-

Cuadro 5. Valores de Em_{ax}% y CE₅₀ de isoproterenol en ausencia y en presencia de propanolol. La diferencia significativa fue obtenida con la prueba t de student con una *p ≤ 0.001.

8.5. Evaluación de la participación de los receptores muscarínicos.

Por otro lado, para determinar la participación de los receptores muscarínicos se construyeron curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en ausencia y en presencia de la subfracción activa F4' (100 y 177 µg/mL) en experimentos independientes. Los resultados se muestran en la figura 6A donde se puede observar que la subfracción F4' produce un desplazamiento hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta de carbacol, comportándose como un antagonista de tipo competitivo de los receptores muscarínicos y presentando un valor de pA₂ de 4.53 ± 0.017 (figura 6B). Los valores de CE₅₀ se presentan en el cuadro 6.

Como fármaco de referencia se utilizó atropina que es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos, el cual de igual forma provocó un desplazamiento hacia la derecha en las curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol (figura 7A), obteniendo un valor de pA₂ de 8.64 ± 3.93 (figura 6B). Los valores de CE₅₀ se muestran en el cuadro 7.

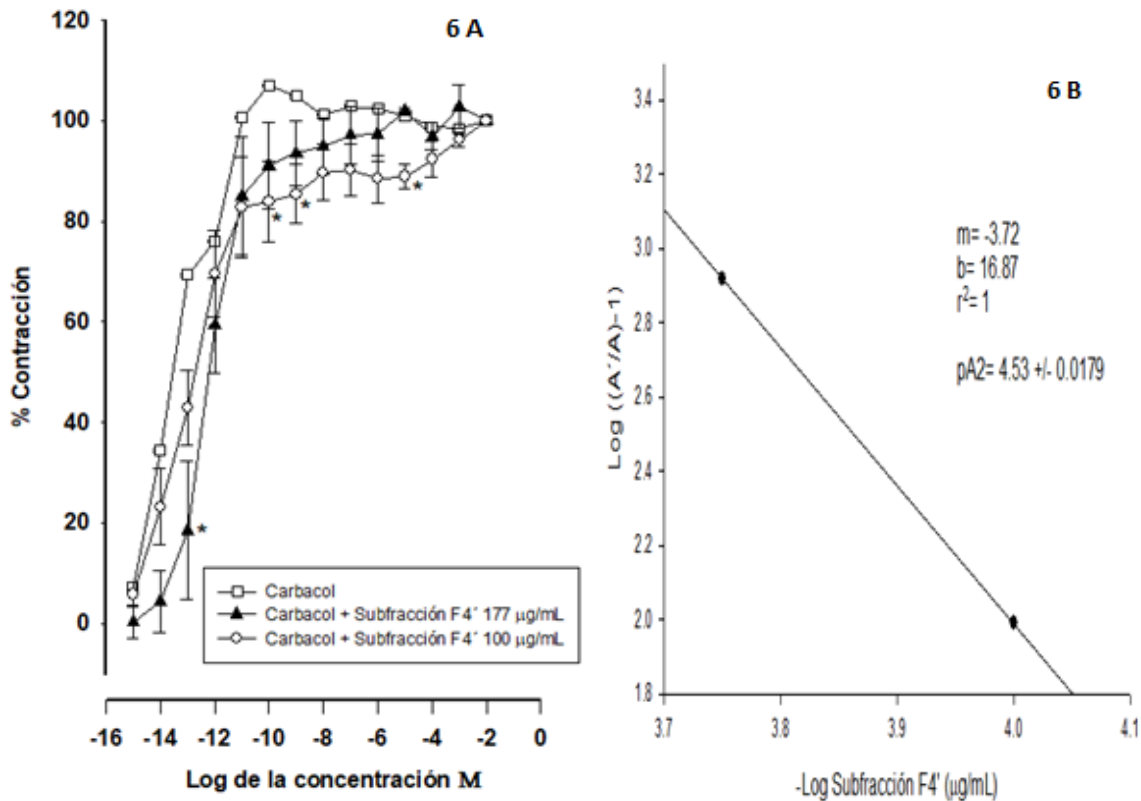


Figura 6 A) Curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en ausencia y en presencia de la fracción activa F4' (100 y 177 µg/mL). La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVIA seguida de la prueba de Dunnett. *p<0.05 respecto a la curva contracción de carbacol. figura 6 B) Gráfica de Schild para la obtención del pA₂.

Tratamiento	CE ₅₀ (M) ± EEM
Carbacol	2.27x10 ⁻¹⁵ ± 2.86x10 ⁻¹⁵
Carbacol + F4' (100 µg/mL)	*2.29x10 ⁻¹³ ± 3.53x10 ⁻¹³
Carbacol + F4' (177 µg/mL)	*1.92x10 ⁻¹² ± 2.61x10 ⁻¹²

Cuadro 6. Valores CE₅₀ de carbacol en presencia de la subfracción F4'. La diferencia significativa se calculó con la prueba de t con una *p ≤ 0.001.

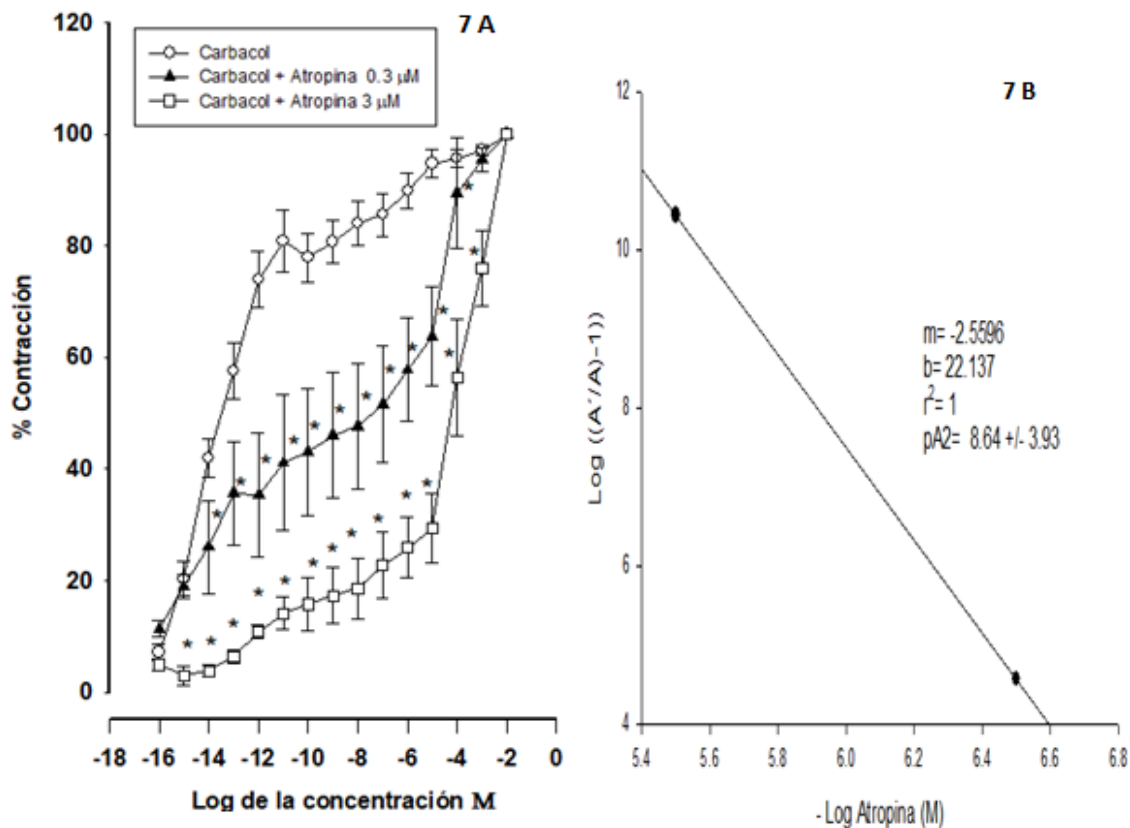


Figura 7 A) Curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en ausencia y presencia de atropina (0.3 μM y 3 μM). La diferencia significativa fue obtenida por una ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$. Figura 7 B) Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 .

Tratamiento	CE_{50} (M) \pm EEM
Carbacol	$2.79 \times 10^{-13} \pm 1.56 \times 10^{-13}$
Carbacol + Atropina 0.3 μM	* $1.050 \times 10^{-08} \pm 1.1 \times 10^{-08}$
Carbacol + Atropina 3 μM	* 0.0078 ± 0.0136

Cuadro 7. Valores de CE_{50} de carbacol a diferentes concentraciones de atropina. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de t con una * $p \leq 0.001$.

9. Discusión

El estudio biodirigido de las hojas de *Hyptis suaveolens* se inició con la preparación de los extractos, se eligieron 3 disolventes en orden creciente de polaridad: no polar (hexano), medianamente polar (diclorometano) y polar (metanol), con la finalidad de separar los constituyentes de las hojas en un espectro amplio de polaridades. La evaluación de dichos extractos se realizó utilizando el modelo *in vitro* de anillos aislados de tráquea de cobayo.

La tráquea es un órgano ideal para estudiar la regulación de las vías respiratorias debido a que recibe su inervación mediante la vía simpática, parasimpática, neuronas no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) y factores locales.^{7, 68} Las vías respiratorias del cobayo muestran muchos atributos anatómicos, fisiológicos y receptores farmacológicos de las vías respiratorias humanas, lo que hace que esta especie sea ideal para ejemplificar la condición asmática que se caracteriza por la broncoconstricción del músculo liso de las vías respiratorias.⁶⁸

Los extractos de hexano y metanol fueron inactivos, mientras que el extracto de diclorometano fue el único que presentó actividad relajante, lo que sugiere que compuestos de polaridad media son los responsables de la actividad. Posteriormente, se seleccionó al extracto de diclorometano para realizar un fraccionamiento cromatográfico. De las cinco fracciones obtenidas, cuatro de ellas produjeron un efecto relajante (F2-F5), lo cual sugiere que el extracto de diclorometano contiene más de un compuesto activo. Las fracciones F2, F3 y F4 presentaron los valores más altos de máxima relajación con respecto al extracto de diclorometano del cual provienen, lo cual, evidencia que en dicho extracto están

presentes diversos compuestos que interfieren en la acción de los compuestos activos. Al ser un estudio biodirigido se continuó con la fracción más activa (F4) para un segundo fraccionamiento. En este segundo fraccionamiento se obtuvieron 4 subfracciones de las cuales, la subfracción F4' fue la que presentó actividad relajante, y al compararla con la fracción F4, se encontró que ambas presentan la misma eficacia, pues relajan casi al 100%, pero la subfracción F4' fue más potente.

Los resultados anteriores nos indican que la planta *Hyptis suaveolens* produce un efecto relajante en el músculo liso traqueal de cobayo, lo que sirve como un sustento farmacológico al uso tradicional de esta planta en el estado de Chiapas para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Posteriormente, se realizó una cromatografía en capa fina de la subfracción F4' en la cual se observaron 3 manchas a lo largo de la placa, lo cual sugiere que esta subfracción estaría conformada por una mezcla de al menos 3 compuestos, por lo que es necesario realizar estudios posteriores con la finalidad de separar dichos compuestos y evaluarlos de manera individual para determinar su actividad relajante y así saber si la relajación de la subfracción F4' se debe a uno o más compuestos, o a la interacción entre ellos.

Considerando que existen estudios fitoquímicos^{67,68} que reportan que la planta *Hyptis suaveolens* contiene un alto porcentaje de alcaloides y flavonoides, además de taninos, terpenos, fenoles y saponinas,⁶⁷ y que algunos compuestos que se encuentran presentes en *Hyptis suaveolens* poseen actividades relajantes y antiespasmódicas en diferentes modelos *in vitro*, como es el caso de los terpenos cariofileno⁷¹, 1,8 Cineol⁷², Espatuleno⁷³, Terpinen-4-ol⁷⁴ y Borneol⁷⁵, los

resultados obtenidos en el presente trabajo sirven como base para continuar con el estudio de los constituyentes responsables de la acción relajante en músculo liso de tráquea de cobayo.

Con la finalidad de explorar el posible mecanismo de acción de la subfracción activa en primer lugar se evaluó su actividad sobre los receptores β -adrenérgicos, ya que este tipo de medicamentos son de primera elección para aliviar el broncoespasmo y el tratamiento de las exacerbaciones que se presentan en el asma. Dichos medicamentos provocan la relajación del músculo liso de las vías aéreas mediante la activación de la adenilil ciclasa a través de la proteína Gs dando como resultado la producción de AMPc y la activación de la proteína cinasa A (PKA) que lleva a la relajación.^{42,43} Las curvas concentración-respuesta de la subfracción F4' en ausencia y presencia de propranolol que es un bloqueador de los receptores β -adrenérgicos (figura 4A) no se modificaron ni presentaron una diferencia estadísticamente significativa en eficacia y potencia, lo cual nos indica que el mecanismo por el cual la subfracción F4' relaja el músculo liso no es a través de la participación de los receptores β adrenérgicos, caso contrario con el fármaco de referencia, ya que el propranolol inhibió el efecto relajante de isoproterenol (figura 4B).

El segundo mecanismo a explorar fue la implicación de los receptores muscarínicos, ya que los fármacos antimuscarínicos (anticolinérgicos) evitan la broncoconstricción actuando como antagonistas competitivos de los receptores M_3 .⁷ Para ello se realizaron en primer lugar curvas contráctiles de carbacol, se sabe que el carbacol activa a los receptores M_3 que están acoplados a una proteína Gq que activa a la

PLC, que genera IP3 y DAG, los cuales contribuyen a la contracción del músculo liso.⁷⁶ Posteriormente, se construyeron curvas carbacol en presencia de dos concentraciones de la subfracción F4' (100 y 177 µg/mL) en experimentos independientes. En la figura 5 A se observa que las curvas de carbacol en presencia de la subfracción F4' se desplazan hacia la derecha y la respuesta inhibitoria es superable, pues el efecto máximo de contracción se alcanza al incrementar las concentraciones de carbacol. Por lo tanto, dicho comportamiento sugiere que la subfracción F4' actúa como un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos, al presentar un valor de $pA_2 = 4.53$. Como fármaco de referencia se utilizó atropina que es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos y con él se obtuvo un valor de $pA_2 = 8.64$.

La potencia relativa antagonista (pA_2) es un valor que se utiliza para comparar antagonistas, el cual permite calcular el grado de antagonismo de una molécula en sus receptores, dándonos una idea de su selectividad, por lo tanto, el pA_2 es una medida de la afinidad del antagonista por los receptores, en donde un valor de pA_2 alto, indica un mayor antagonismo.^{66, 77} En el presente trabajo con la subfracción F4' se obtuvo un valor de pA_2 (figura 5 B) menor al obtenido con atropina (figura 6 B), lo cual indica que el efecto antagónico de tipo competitivo de la fracción activa es menor que el efecto antagónico de atropina.

10. Conclusiones

- Se demostró que el extracto de diclorometano de la planta *Hyptis suaveolens* presenta actividad relajante en el modelo de anillos de tráquea aislada de cobayo.
- Se obtuvo una subfracción activa F4', la cual está constituida por más de un compuesto.
- Se descartó la participación de los receptores β adrenérgicos en el efecto relajante de la subfracción activa F4'.
- La subfracción activa F4' actúa como antagonista de los receptores muscarínicos.

11. Perspectivas

- Aislar e identificar a los compuestos responsables de la actividad relajante de la subfracción activa F4' de *Hyptis suaveolens*.
- Evaluar otros posibles mecanismos de acción relajante del o de los compuestos activos.

12. Bibliografía

1. Secretaria de Salud, Sistema Nacional de Salud. Prevención y Control de las Enfermedades Respiratorias e Influenza 2013-2018. Secretaria de Salud. [Internet]. CDMX [Consultado 03-06-19]. Disponible en http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlEnfermedadesRespiratoriasInfluenza2013_2018.pdf
2. Organización Mundial de la Salud. Asma, datos y cifras. OMS [Internet], 2017. [Consultado el 03-06-19] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
3. Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second edition) 2010 USA. Chapter 6 - Respiratory System. Wanda M. Haschek Colin, G. Rousseaux Matthew A. Wallig. Academic Press. Elsevier
4. Ira FS. Fisiología Humana 13ª ed. Mc Graw Hill. México DF 2013, p 527-528.
5. Ganong, Barret KE, Barman SM, Boitano S. Fisiología Médica 23ª ed. Mc Graw Hill. México CDMX. 2010: 590.
6. Hall J E. Guyton & Hall Tratado de fisiología médica, 13ª ed. Elsevier. Barcelona, España. 2016: 473-474.
7. Brand J, Arrowsmith J. Arrowsmith E. Respiratory system: applied pharmacology. Anesthesia and intensive care medicine. 2017,18 (12): 609-613.
8. Udem B J. Autonomic Nervous System: Respiratory Control. 2009 (1): 975-981.
9. Arreola R, Morales H, Falcón R, Segura M. Aspectos generales de la inervación pulmonar. Gac Med Mex. 2013,149 (1): 502-508.
10. Rubio S, Fernández B. Anticolinérgicos, antileucotrienos, cromonas y teofilinas. Principios de farmacoterapia en las enfermedades alérgicas. Cap 6: 305-315.
11. Reinoud G, Zaagsma J, Meurs H & Halayko JJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. Respir Res. 2006, 73 (7): 1-15.

12. Pasquale C. Models to understand contractile function in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011, 24 (5): 444-451.
13. Siles Barrios D, Sánchez Mendoza ME (dir). Evaluación de la actividad relajante de *Crataegus mexicana* en anillos de tráquea aislada de caballo. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2009.
14. Alarcón J. Estado Asmático. *Rev Gastrohnutp.* 2015; 17: 17-27.
15. Mc Graw D, et al. Crosstalk between Gi and Gq/Gs pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation, *J Clin Invest.* 2007; 117(5): 1391-1398.
16. Pelaita G, et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory Medicine.* 2008, 102(8):1173-1181.
17. Deshpande D, Penn R. Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cell. Signal.* 2006, 18(12): 2105–2120.
18. Alcón S, et al. Contribution of different phospholipases and arachidonic acid metabolites in response of gallbladder smooth muscle to cholecystokinin. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 64(7): 1157-1167.
19. Webb B, et al. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130(7): 1433-1452.
20. Linder M E. Gi Family of Heterotrimeric G Proteins. *Signaling.* 2013: 373-380.
21. Perpiña TM, Lloris BA. Los broncodilatadores, esos fármacos maravillosos. La broncodilatación en la EPOC. Servicio de Neumología, Hospital Universitario la Fe, Valencia España. *Arch. Bronconeumol.* 2004, 40 (1):16-22.
22. Ouedraogo N & Roux E. Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *J Pulm Respir Med.* 2014,6(4): 1-6.
23. Billington C & Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003, 4(1): 1-23.

24. Baker K E et al. Novel drug targets for asthma and COPD: Lessons learned from in vitro and in vivo models. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014, 29 (2): 181-194.
25. Thirstrup S. Control of airway smooth muscle tone: II-Pharmacology of relaxation. *Respir Med.* 2000, 94(6): 519-528.
26. Ahmed M H, et al. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol.* 2003, 285(5): 1973-1983.
27. Carvajal JA, Germain AM, Hiudobro JP & Weiner C. Molecular Mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation. *J Cellular Physiology.* 2000, 184 (3): 409-420.
28. Zuo H, Cattani C, Musheshe N, Nikolaev O, Schmidt. Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacol Ther.* 2019, 197: 225-242.
29. Pera T & Penn B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones. *Pharmacol Ther.* 2016, 164: 82-96.
30. Cazzola M. Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Pharmacological Reviews. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012, 64(3): 450-491.
31. Siddiqui S et al. Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013, 26 (1): 134-144.
32. Secretaria de Salud. Boletín Epidemiológico, Dirección General de Epidemiología. 2019; N. °17, p 6-7.
33. Echegoyen C R. Patología y Clínica de las Enfermedades Respiratorias. Instituto Politécnico Nacional. México. 2006: 443-448
34. Bruton LL. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. Mc Graw Hill. México. 2007: 718-731.
35. Latorre M, et al. Differences in the efficacy and safety among inhaled corticosteroids long beta 2 combination in the treatment. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015, 30: 44-50.
36. Gosens R & Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *Eur. Respir. J.* 2018, 52: 1-12.

37. Katzung BG. Farmacología básica y clínica 12^a ed. Mc Graw Hill. México DF. 2013.
38. Yamauchi K & Ogasawara M. The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(7): 2-16.
39. Cingi C, Bakar N, Ipci K & Sahin E. Antileukotrienes in Upper Airway Inflammatory Diseases. *Curr Allergy Asthma Resp.* 2015, 64(15): 8-15.
40. Baños Z, Somonte Z, Moralez P. Leucotrienos y antileucotrienos en medicina basada en la evidencia *Rev Latinoam Patol Clin.* 2015, 62(3): 157-162.
41. Vázquez G, Huerta L, Pedroza M. Antileucotrienos, revisión de la literatura. *Alergía e Inmunol. Pediatr.* 2005, 14(2): 56-59.
42. Barisione G, Baroffio M, Crimi E & Brusasco V. Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals.* 2010, 3(4): 1016-1044.
43. Amrani Y & Bradding P. β 2-Adrenoceptor Function in Asthma. *ADV IMMUNOL.* 2017, 136: 1-28.
44. Battista E. Lo esencial en farmacología. 4^a ed. Elsevier. España, 2013: 45-52.
45. Nivedita S. Xanthine scaffold: scope and potential in drug development. *Heliyon.* 2018, 4(10): 2-22.
46. Cortijo J. Inhibidores de fosfodiesterasa 4: un nuevo grupo farmacológico en el tratamiento de la inflamación crónica de las vías aéreas. *Arch. Bronconeumol.* 2010, 9: 3-7.
47. Morfín MB, Castillo MB. Teofilina, una nueva mirada a un medicamento antiguo. *Rev Alerg Mex.* 2010; 57(4): 112-122.
48. Escamilla B E, Moreno C P. Plantas Medicinales de la matamba y el piñonal, Jamapa Veracruz. INECOL, México, 2015.
49. Lee MR. The history of Ephedra (ma-huang). *J R Coll Physicians Edinb.* 2011, 41(1): 78–84.
50. Sánchez A. et al. Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pac. J Trop Med.* 2014 7(3): 179-183.

51. Ahmad J, Khan I, Ahmad A & Imam K. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Methanolic root Extracts of *Hyptis suaveolens*. *Resp J Recent Sci*. 2012, 2: 41-46.
52. Navarrete A. et al. Mechanism of action of relaxant effect of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle. *Pharm. Biol.* 2016, 55(1): 96-100.
53. Sánchez M., Henkel C. & Navarrete A. Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008; (60): 229-236.
54. Fernandez J. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol.* 2005, 552(1-3): 108-115.
55. Arrieta J, et al. Relaxant Effect of the Extracts of *Crataegus Mexicana* on Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle. *J Pharmacogn.* 2010; 2(17): 40-46.
56. Sánchez M, et al. Polyalthic Acid Isolated from *Croton reflexifolius* has Relaxing Effect in Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle. *Pharm Biol.* 2008; 46,(10-11): 800-807.
57. Campos M, et al. *Galphimia glauca* organic fraction antagonizes LTD4-induced contraction in guinea pig airways. *J Ethnopharmacol.* 2001, 74(1): 7-15.
58. Campos P, et al. Effect of *Gnaphalium conoideum* HBK on guinea pig airway smooth muscle: role of L-type Ca²⁺ channels. *J Ethnopharmacol.* 2005, 97(2): 267-272.
59. Sánchez M, et al. Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 2007, 111(1): 142-147.
60. Cortés A, et al. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Taxodium mucronatum* Ten leaf extract. *Afr J Biotechnol.* 2011, 1(10): 54-64.
61. Jiménez A. Efecto del ultrasonido y la agitación mecánica en la extracción del mucilago de las semillas de *Hyptis suaveolens*.

62. Asekun O T, Ekundayo O, Adeniyo B A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia*. 1999, 70 (1): 440-442.
63. Zittlerl K E et al. Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Z Naturforsch B J Chem Sci*. 2006, 61(1): 165-171.
64. Sánchez M, et al. Gastroprotection of Suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Wistar Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. *Molecules*. 2012; 17(8): 8917-8927.
65. Sánchez M, et al. Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007 (111), 142-147.
66. Talladira R, Drug synergism and dose-effect data analysis. Chapman & Hall/CRC, 2000. USA: 21-39.
67. Ammar A. et al. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017, 6(4): 1-23.
68. Mc Govern A & Mazzone SB. Guinea Pig Models of Asthma. *Curr Protoc Pharmacol*. 2014, 67 (5).
69. Gopal R, et al. The Essential Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., *J. Essent. Oil Res*. 1993, 5 (3): 321-323.
70. Edeoga H & Uche. L C. Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *Afr. J. Biotechnol*. 2006, 5(10): 892-895.
71. Pinho S L. et al. trans-Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Causes Tracheal Smooth Muscle Relaxation through Blockade of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels. *Molecules*. 2012, 17(10): 11965-11977.
72. Pereira G. et al. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Eur J Physiol*. 2018, 470(12): 1803–1813.
73. Pérez H, Ponce M, Medina A & Joseph N. Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *J Ethnopharmacol*. 2008, 115(1): 30–35.

74. Maia-Joca P et al. Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. *Life Sci.* 2014, 115(1-2): 52-58.
75. Santos E. et al. New insights on relaxant effects of borneol monoterpene in rat aortic rings. *Fundam Clin Pharmacol.* 2019, 33(2): 148-158.
76. Meurs H, et al. Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: Novel findings for an ancient target. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013, 26(1): 145-155.
77. Pöch G, Brunner F & Kühberger E. Construction of antagonist dose-response curves for estimation of pA₂-values by Schild-plot analysis and detection of allosteric interactions. *J Pharmacol.* 1992, 106(3): 710-716.