



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DE ALGUNOS EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES DE MÉXICO SOBRE LA RESPUESTA
CONTRÁCTIL INDUCIDA CON MEDIADORES DE
LA INFLAMACIÓN EN PREPARACIONES CON TRÁQUEA
IN VITRO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Vianey Nava Aguilar

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIANA MECKES FISCHER
CODIRECTORA: DRA. MARTHA ELISA VÁZQUEZ MEMIJE

MÉXICO, D.F.

2007



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.



COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de junio de 2007, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias biológicas (Biología Experimental) de la alumna **VIANEY NAVA AGUILAR** con número de cuenta **94063877** con la tesis titulada “**Actividad de algunos extractos de plantas medicinales de México sobre la respuesta contráctil inducida con mediadores de la inflamación en preparaciones con tráquea *in vitro***”, realizada bajo la dirección del **DRA. MARIANA MECKES FISCHER**.

Presidente: Dr. Mahommed El-Hafidi
Vocal: Dr. Héctor Antonio Ponce Monter
Secretario: Dra. Mariana Meckes Fischer
Suplente: Dra. Adela Rodríguez Romero
Suplente: Dra. Martha Elisa Vázquez Memije

Sin dudar de su atención, me es grato enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd.Universitaria, D.F. a 26 de Septiembre de 2007

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada

AGRADECIMIENTOS

-Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme acceder a una formación académica de alta calidad

-Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado por medio de los proyectos 34761-M y 2004-01-050 y, a su vez por la beca con número de registro 172691.

-Al Fondo de Fomento a la Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento otorgado por medio del proyecto: IMSS 2002/087.

-A la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca DGEP

-A los Investigadores que conformaron el Comité Tutorial:

Dra. Mariana Meckes Fischer
Dra. Martha Elisa Vázquez Memije
Dr. Héctor Antonio Ponce Monter

Dedicatorias

A Monserrath:

*Todos los días le doy gracias a dios por enviarme este regalo tan maravilloso.
Mis logros siempre estarán dedicados a ti, pues eres la sonrisa que por las mañanas
aleja mis temores y no me deja claudicar. Tu amor es mi principio y nuestro progreso
mi único fin.*

A Emmanuel:

Por tu paciencia y amor, que me han permitido consolidar mis sueños.

A Alejandra:

Un gran ser humano que siempre ha confiado en mí.

Agradecimientos

A la Dra. Martha Elisa Vázquez, mi más sincero agradecimiento es para usted porque gracias a su amistad y apoyo fue posible la culminación de esta tesis.

A Elizabeth Barbosa Cabrera, Martha Sánchez (Bonita) y Susana Osorio Martínez: les agradezco infinitamente su amistad, ya que fueron un gran apoyo en los momentos difíciles.

A Lizbeth, Rocio y Jessica. Es fantástico saber que existen personas como ustedes, toda su ayuda y sus consejos me han permitido llegar a esta meta.

A Yazmín y Josué (mis pequeños pingos), sus travesuras le dan un toque de alegría a la vida y me recuerdan que los pequeños detalles engrandecen nuestra existencia, jajj los amo!!!.

A mis compañeras de Maestría Conny y Rosalba, ejemplo de la tenacidad que se necesita en el negocio de la ciencia.

INDICE

| | página |
|--|---------|
| INTRODUCCIÓN | I - III |
| RESUMEN | IV – V |
| ABSTRACT | VI -VII |
| I- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 1 - 2 |
| II- ANTECEDENTES | 3 -36 |
| 2.1- Fisiopatología del asma | 3 – 4 |
| 2.2- Células, Mediadores Químicos y Neuropeptidos involucrados en el desarrollo de la fisiopatología del asma | 5 – 10 |
| 2.3- Biosíntesis de leucotrienos 14 | 11 – |
| 2.4- Regulación y señalización celular de la contracción del músculo liso 22 | 15 – |
| 2.5- Fármacos utilizados en el tratamiento del asma 27 | 23 – |
| 2.6- Plantas medicinales evaluadas como antiasmáticos 29 | 28 – |
| 2.7- Efecto de los leucotrienos sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial 32 | 30 – |
| 2.8- Selección de plantas medicinales como probables "antiasmáticos" | 33 - 36 |
| III- OBJETIVOS | 37 |
| IV- HIPÓTESIS | 38 |
| V- METODOLOGÍA | 39 - 48 |
| 5.1-Material vegetal y preparación de los extractos | 39 |
| 5.2-Modelos biológicos | 40 - 48 |
| 5.2.1- Preparaciones con anillos de tráquea de cobayo | 40 |
| 5.2.2- Evaluación de los extractos seleccionados sobre las contracciones inducidas con His y AA | 41 |
| 5.2.3- Evaluación del extracto de <i>Gnaphallium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> sobre las curvas concentración-respuesta | |

| | |
|--|-------------|
| inducidas con LTD ₄ | 41 |
| 5.2.4- Análisis de Datos | 42 |
| 5.2.5- Aislamiento de la fracción celular del homogeneizado total de la tráquea de cobayo | 43 |
| 5.2.6- Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata | 44-45 |
| 5.2.7- Determinación de las actividades enzimáticas | 46– 47 |
| 5.2.8- Evaluación del LTD ₄ , el extracto de <i>Gnaphalium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> y de la combinación de ambos productos sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial | 47 - 48 |
| VI- RESULTADOS | 49– 64 |
| 6.1- Efecto de los extractos sobre la contracción inducida con los agonistas His y AA. | 49 - 52 |
| 6.2- Efecto del extracto metanólico de <i>Gnaphalium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> sobre las curvas concentración-respuesta de LTD ₄ | 53– 54 |
| 6.3- Efecto del LTD ₄ , Extracto metanólico de <i>Gnaphalium attenuatum</i> y la mezcla de ambos productos sobre la actividad de las enzimas SDH, COX y ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo | 55– 63 |
| 6.4- Evaluación del LTD ₄ y del extracto metanólico de <i>Gnaphalium attenuatum</i> sobre la síntesis de ATP de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo | 64 |
| VII- DISCUSIÓN | 65 - 71 |
| VIII- CONCLUSIONES | 72 - 73 |
| IX-ANEXO | 74 - 82 |
| Antecedentes sobre las plantas medicinales seleccionadas para el estudio | |
| <i>Achillea millefolium</i> L | 75 - 76 |
| <i>Chamaedora tepejilote</i> Liebm. Ex Mart. | 76 |
| <i>Gnaphallium spp</i> | 77 |
| <i>Hibiscus uncinellus</i> DC | 77– 78 |
| <i>Larrea tridentata</i> (DC.) Cov. | 78 - 79 |
| <i>Lippia dulcis</i> Trev. | 79 - 80 |
| <i>Oenothera rosea</i> Ait. | 80 - 81 |

| | |
|---|--------|
| <i>Rubus coriifolius</i> Focke | 81 |
| <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don | 82 |
| X- BIBLIOGRAFÍA | 83-103 |

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas como un recurso terapéutico entre los mexicanos, ha motivado al medio académico a realizar estudios experimentales que permitan corroborar las propiedades medicinales atribuidas a un número muy importante de especies de la herbolaria medicinal del país. En México, son numerosas las plantas que utiliza la población para tratar padecimientos relacionados con un proceso inflamatorio (asma, artritis, infecciones, etc.) y la etnobotánica es una herramienta valiosa para la selección de especies, cuya valoración en los modelos biológicos puede contribuir a la identificación de compuestos con actividad antiflogística. La información recopilada por la etnobotánica representa en muchos casos, un punto de partida que es crucial en el diseño y desarrollo de los estudios fitoquímicos y farmacológicos.

A nivel mundial, el asma constituye una de las enfermedades crónicas más comunes, se caracteriza por una inflamación bronquial y alteraciones en la conformación de los tejidos de las vías aéreas. La hiperreactividad bronquial que se presenta como respuesta a un estímulo físico, químico o farmacológico, desencadena un proceso que lleva a la obstrucción de las vías aéreas (síntoma reversible), la presencia de edema en la pared bronquial, producción de moco y contracción e hipertrofia del músculo liso (Laitinen y col., 1985).

La inflamación de las vías aéreas es inducida por la liberación de los mediadores químicos producidos por diversos tipos celulares (Djukanovic y col., 1990). Las células cebadas del tejido conectivo son la principal fuente de leucotrieno LTC₄, prostaglandina PGD₂, histamina y triptasa, productos éstos que estimulan la hiperreactividad bronquial en el asma crónico (Petty, 1990). Los eosinófilos tienen una participación relevante dado que sintetizan una amplia variedad de mediadores pro-inflamatorios y citotóxicos como: proteínas básicas, enzimas hidrolíticas, citocinas, mediadores lipídicos, radicales libres y neuropéptidos. Por otra parte, las células del músculo liso de vías aéreas de humano son capaces de producir leucotrienos, mediadores con una importante participación en la patogénesis de esta enfermedad (James y col., 2001).

Dependiendo del cuadro asmático a tratar, los fármacos que se emplean controlan el proceso inflamatorio o bien, la hiperreactividad bronquial. La broncoconstricción se maneja generalmente por medio de la inhalación de broncodilatadores adrenérgicos β_2 ; en casos de asma crónico, es frecuente el uso de antiinflamatorios corticoesteroides. Estos últimos, producen severos efectos secundarios, entre ellos, miopatías, osteoporosis, úlcera péptica, hipertensión y supresión de la respuesta inmune (Gleich, 1988), situación que ha obligado a la búsqueda de agentes antiasmáticos más eficaces y cuyo empleo para el control de los pacientes represente riesgos menores.

El presente estudio tiene como propósito identificar extractos de plantas medicinales con actividad relajante sobre la respuesta contráctil del músculo liso traqueal, así como estandarizar una metodología que permita identificar los

efectos que ejercen estos productos vegetales sobre la actividad de algunas enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

RESUMEN

Los leucotrienos son importantes mediadores de la broncoconstricción en el proceso asmático y se producen como resultado de estímulos varios, así como de alteraciones que ocurren a nivel inmunológico. En la actualidad, los fármacos que inhiben la acción de los cisteinil leucotrienos constituyen una nueva categoría de agentes antiasmáticos que son de interés para la clínica.

En el presente trabajo se evaluó, en una primera etapa, el efecto relajante *in vitro* de los extractos de plantas de la flora medicinal de México cuya actividad antiinflamatoria fue demostrada en un estudio anterior: *Achillea millefolium*, *Chamaedora tepejilote*, *Larrea tridentata*, *Lippia dulcis*, *Oenothera rosea*, *Rubus coriifolius* y *Sphaeralcea angustifolia*. En este estudio se incluyó *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* considerando sus antecedentes etnobotánicos como recurso para tratar el asma, así como *Hibiscus uncinellus* por las propiedades antiespasmódicas anteriormente reportadas. El modelo biológico utilizado para evaluar la actividad de los extractos vegetales fue el tejido traqueal del cobayo precontraído con los agonistas histamina y ácido araquidónico.

Con excepción de *Chamaedora tepejilote*, el resto de las especies relajaron la respuesta contrátil inducida con histamina con valores CI_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ en las preparaciones precontraídas con ácido araquidónico, los extractos de las especies *Chamaedora tepejilote* y *Lippia dulcis* no presentaron la actividad. El extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* fue el más potente con valores CI_{50} de $44.16 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$ y $27.66 \pm 0.90 \mu\text{g/ml}$ en el caso

de los tejidos precontraídos con histamina y ácido araquidónico respectivamente, resultados que llevaron a la selección de esta especie para los estudios siguientes. El extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* inhibió la respuesta contráctil inducida con LTD₄ con un valor CI₅₀ de 8.3 ± 0.71 µg/ml. Asimismo, el extracto en concentraciones de 75, 100 y 125 µg/ml produjo desplazamiento de las curvas concentración-respuesta construidas con LTD₄ mostrando un efecto antagonista. Los valores de pD₂ calculados fueron 8.12 ± 0.03 , 7.84 ± 0.05 y 7.61 ± 0.09 respectivamente.

La evaluación de los efectos del LTD₄ sobre las enzimas succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y ATPasa de la cadena respiratoria mitocondrial del músculo liso traqueal de cobayo y de hígado de rata, así como el comportamiento del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* fueron el tema que se abordó posteriormente en este trabajo. Los resultados obtenidos indican que tanto el LTD₄ como el extracto inhibieron de manera parcial la actividad de las enzimas succinato deshidrogenasa y ATPasa. Asimismo, ambos productos disminuyen la síntesis de ATP mitocondrial en ambos modelos. Lo anteriormente mencionado sugiere que tanto el ácido araquidónico y algunos de sus metabolitos como el LTD₄, inhiben la producción del ATP. Debido a que el extracto es una compleja mezcla de numerosos compuestos, su efecto inhibitorio no fue específico para todas las enzimas. Por ello, es necesario realizar su fraccionamiento químico para obtener los compuestos puros responsables de la actividad.

ABSTRACT

Leukotrienes are important broncho-constrictor mediators in asthmatic processes, which are produced as the result of diverse stimuli as well as by alterations occurring at immunological levels. Currently, the drugs that inhibit the action cysteinil leukotrienes constitute a new category of anti-asthmatic agents which could be of interest for the clinic.

As a first step in the present work, it was evaluated, *in vitro*, the relaxant effect of some extracts obtained from plants of the Mexican medicinal flora, which anti-inflammatory activity had been demonstrated in a previous study: *Achillea millefolium*, *Chamaedora tepejilote*, *Larrea tridentata*, *Lippia dulcis*, *Oenothera rosea*, *Rubus coriifolius* and *Sphaeralcea angustifolia*. Based on the ethnobotanical information on *Gnaphalium attenuatum* var. *silvicola* as a resource to treat asthma and on *Hibiscus uncinellus* for its spasmolytic properties, both species were also included in this study. The biological model used to evaluate the activity of the extracts was the guinea pig tracheal smooth muscle pre-contracted with histamine and arachidonic acid.

Except for *Chamaedora tepejilote*, the rest of the species relaxed the contractile response induced with histamine with IC₅₀ values, less than 50 µg/ml, in preparations precontracted with arachidonic acid. *Chamaedora tepejilote* and *Lippia dulcis* were inactive. The methanolic extract of *Gnaphalium attenuatum* var. *silvicola* showed to be the most potent with IC₅₀ values of 44.16 ± 0.71 µg/ml and 27.66 ± 0.090 µg/ml in tissues precontracted with histamine and arachidonic acid, this result made this species to be selected for further studies.

The extract also inhibited LTD₄ contractile response ($IC_{50} = 8.3 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$). Moreover, concentrations of 75, 100 and 125 $\mu\text{g/ml}$ extract produced a rightward shift of the concentration-response curves. Calculated pD₂ values were 8.12 ± 0.03 , 7.84 ± 0.05 , and 7.61 ± 0.09 , respectively.

The evaluation of the effect of LTD₄ and *Gnaphallium attenuatum* methanolic extract on succinate-dehydrogenase, cythochrome c oxidase and ATPase of the respiratory chain in the tracheal guinea pig smooth muscle and rat liver were the further topics afforded in this work. The obtained results show that LTD₄ and the extract partially inhibited the activity of the succinate-dehydrogenase and ATPase enzymes. Both products decreased the mitochondrial ATP synthesis which suggests that the arachidonic acid and some of its metabolites, such as LTD₄, inhibit the production of ATP. The effect of the extract was not especially effective for any particular mitochondrial complex, probably because it is a complex mixture of compounds that could mask some specific reactions. Therefore, it is necessary a chemical fractionation to isolate the active compounds that are responsible for the activity.

I-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma bronquial constituye una de las enfermedades respiratorias más frecuentes a nivel mundial, se estima que su incidencia en México es de 5 a 10%, afectando principalmente a los niños varones. El tratamiento farmacológico de este padecimiento incluye la administración de medicamentos broncodilatadores y antiinflamatorios cuyo uso prolongado provoca efectos colaterales; por ello, es necesario contar con nuevas estructuras moleculares para su aplicación en la clínica, por lo que la búsqueda de compuestos antiasmáticos en las fuentes naturales (plantas y productos marinos) representa una alternativa que es necesario explorar.

Los antecedentes farmacológicos de las plantas propuestas para su evaluación indican que la mayoría de ellas tienen un efecto antiinflamatorio sobre el modelo del edema plantar inducido con carragenina en una etapa en la que el proceso se vincula con la participación de mediadores químicos tales como la histamina y los leucotrienos (mediadores químicos con participación importante durante el proceso asmático); estas referencias sirvieron de guía para proponer a los extractos de estas especies como una opción para la búsqueda de compuestos con actividad antiasmática. La valoración de los efectos relajantes de este grupo de plantas sobre la musculatura lisa de la tráquea de cobayo precontractada con histamina o AA, llevaron a la selección de *Gnaphalium attenuatum* var. *silvícola*, el género al que pertenece esta planta es ampliamente utilizado en el tratamiento de afecciones de tipo respiratorio por lo que es una buena candidata en la búsqueda de nuevas moléculas que posean la actividad biológica anteriormente mencionada.

Por otra parte, son escasos los estudios enfocados a analizar el efecto que los extractos vegetales y otros productos como los metabolitos proinflamatorios, ejercen sobre el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial del músculo liso. Por este motivo se decidió estandarizar una técnica que nos permita la evaluación de dichos productos sobre la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial.

II-ANTECEDENTES

2.1 Fisiopatología del asma

El asma se define como un síndrome caracterizado por presentar ante diferentes estímulos, un incremento en la respuesta del árbol tráqueo bronquial. La respuesta es provocada por agentes alérgenos, infecciones, ejercicio, fármacos (aspirina y antiinflamatorios no esteroideos), irritantes y factores físicos (aire frío, humedad, contaminación atmosférica). La exposición a alguno de estos factores inicia una serie de eventos en los cuales participan mediadores químicos que provocan un episodio asmático. Síntomas como disnea, resoplidos y tos aparecen después de unos minutos de la exposición al agente, posteriormente se presenta broncoespasmo, incremento en la secreción de moco e inflamación. La reacción puede finalizar rápidamente o continuar por horas o días (Petty, 1990).

La hiperreactividad bronquial observada en el asma es resultado de un proceso inflamatorio, las vías aéreas presentan una disminución en su diámetro y el músculo liso se vuelve extremadamente sensible a los agonistas como la histamina. Durante la fase de inflamación aguda se produce un incremento de células inflamatorias, entre ellas, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T tipo "helper 2" (Th₂). Se postula que, a este nivel, la respuesta es regulada por una compleja red de interacciones entre citocinas. Ante la presencia de IgE, los linfocitos Th₂ inician la producción de citocinas inductoras de la degranulación de células cebadas y la infiltración de eosinófilos (Kips, 2003).

En la inflamación crónica se manifiestan alteraciones de tipo estructural como metaplasia epitelial y proliferación de la microvasculatura. La degradación del colágeno provoca fibrosis; asimismo, la secreción de quimiocinas, citocinas y un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, alteran la matriz extracelular del músculo liso provocando hiperplasia e hipertrofia en este tejido (Holgate y col., 2003).

La participación de un mecanismo neurológico específico en la respuesta asmática es un tópico no totalmente esclarecido. Existen diferentes elementos como la alteración de receptores muscarínicos, de terminales nerviosas colinérgicas, de la función de los receptores tipo β y anomalías en el control adrenérgico, que provocan la salida de neuropéptidos provenientes de los nervios sensores aumentando la inflamación de las vías aéreas (Barnes, 1995 a).

2.2 Células, Mediadores Químicos y Neuropeptidos involucrados en el desarrollo de la fisiopatología del asma

El asma bronquial se caracteriza por presentar hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas, resultado de la participación de diferentes grupos celulares y de la producción de mediadores químicos (Tabla 1). Células del tracto respiratorio y leucocitos residentes en estas vías producen mediadores que activan a los eosinófilos los cuales migran a través del torrente sanguíneo hacia las vías aéreas y establecen interacciones entre las moléculas de adhesión y las células endoteliales. Los eosinófilos sintetizan una amplia variedad de mediadores químicos pro inflamatorios como el LTC₄, mediadores lipídicos como el Factor Activador de Plaquetas (PAF), citocinas y mediadores citotóxicos para el epitelio respiratorio como la proteína básica principal y la proteína catiónica eosinofílica (Sampson, 2000). El PAF es un lípido quimiotáctico que producen las plaquetas, los macrófagos alveolares y los eosinófilos (Nadel, 1996), promueve la activación de células inflamatorias y su infiltración a través de la microvasculatura y además, la broncoconstricción e hiperreactividad de las vías aéreas (Page, 1988).

La histamina (His) es otro de los mediadores químicos importantes que participan en la inflamación y la broncoconstricción, actúa sobre los receptores H₁ H₂ y H₃ de la membrana celular. Algunos estudios realizados con plaquetas de conejo y de humano muestran que la adición de histamina estimula, vía los receptores H₁, la liberación de ácido araquidónico (AA) por medio de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y aumenta la secreción de serotonina inducida con forbol-12 miristato 13 acetato (PMA). La unión de la histamina a los receptores H₁ produce la activación de la PLA₂ por medio de una proteína G con la consecuente hidrólisis del araquidonato.

El proceso requiere de la presencia de Ca^{2+} . Los estudios realizados con tráquea aislada de cobayo muestran que la mepacrina, un inhibidor de cPLA₂ (Vargaftig y Hai, 1972; Blackwell y col., 1978; Franson y Weir, 1982), antagoniza las contracciones inducidas con histamina pero no las de acetilcolina (100 μM), lo que permite sugerir que los metabolitos del AA también están involucrados en la respuesta contráctil (Mitchell, 1982; 1984).

El sistema del complemento forma parte de la respuesta inmune innata, consiste en un grupo de proteínas que reconocen moléculas por medio de antígenos de superficie o de complejos inmunes. Estos, al ser reconocidos como extraños provocan la activación de una vía proteolítica conocida como complejo de ataque a la membrana. La anafilotoxina C3a es generada como un producto derivado de la activación del sistema del complemento, induce la activación de células cebadas, basófilos y eosinófilos, además de la contracción del músculo liso. En sujetos asmáticos se ha observado que los niveles de C3a en los lavados alveolares están incrementados (Nakano y col., 2003). El aumento del C3a en las vías aéreas indicaría participación activa de esta proteína en el proceso inflamatorio asmático, aunque cabe señalar que la respuesta celular encargada de la generación de C3a aún es desconocida. Las células epiteliales de las vías aéreas y los macrófagos pulmonares secretan tanto C3 como varios componentes de la vía alterna del complemento (factor B, H, I y properdin) (Strunk y col., 1988; Varsano y col., 2000). De la misma forma, las células presentadoras de antígenos y las células T activadas expresan el receptor para C3a, evidencias éstas que permiten proponer que C3a participa en la regulación de la fase inicial del asma de tipo alérgico (Werfel y col., 2000).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre producido por células epiteliales, nerviosas de vías aéreas, del endotelio vascular y células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, mastocitos) (Barnes y Belvisi, 1993). Se trata de una molécula de amplia distribución que se encarga de regular diversas funciones biológicas. A concentraciones bajas, el NO funciona como un señalizador en los procesos fisiológicos tales como la regulación del flujo sanguíneo y de la neurotransmisión no colinérgica y no adrenérgica; a concentraciones altas, el NO actúa como un agente de defensa citotóxico y citostático contra tumores y patógenos (Moncada y Higgs, 1993). En el asma, el NO ha sido identificado como uno de los principales radicales libres participantes. Evidencias experimentales sugieren que el NO participa en el sistema de señalización que se establecen entre los macrófagos y las células T (Barnes y Liew, 1995 b).

En el pulmón, la generación de calidina y bradicinina contribuye al desarrollo de la patología del asma (Baumgarten y col. 1986; Christiansen y col., 1992; Naidoo y col., 1997; Proud y Kaplan, 1988; Raidoo y col., 1997; Williams y col., 1997; Naicker y col., 1999); ambos péptidos provocan vasodilatación (Tadjkarimi y col., 1992), incremento de la permeabilidad vascular (Bell y Wainer, 1983) y broncoconstricción (Abraham y col., 1991; Scuri y col., 2000). Estudios realizados en modelos animales de experimentación y en pacientes asmáticos indican que el aumento en los niveles de calicreína y de cinina en el fluido bronco alveolar, acentúa la hiperrespuesta de la enfermedad (Featherstone y col., 1992; Scuri y col., 2000; 2001). La calicreína es un activador de la colagenasa tipo IV (Desrivieres y col., 1993) que es la enzima involucrada en la degradación de los componentes de la matriz extracelular, lo cual

podría estar relacionado con las alteraciones y cambios que se presentan en las vías aéreas en el asma crónico (Belleguic y col., 2002).

Las taquicininas como la SP y la neurocinina A son dos neuroproteínas que se encuentran presentes en neuronas y células inflamatorias de las vías aéreas. La secreción de estas sustancias puede ser provocada por éter, formalina, tolueno, histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, humo de cigarro y estimulación nerviosa de tipo eléctrico (Lundberg y col., 1984; Maggi, 1995). La SP induce la producción y secreción de TNF- α en células cebadas del peritoneo de murino (Ansel y cols., 1993), quimiotaxis de eosinófilos humanos (Wiedermann y col., 1993), secreción de histamina y serotonina por la degranulación de células cebadas (Fewtrell y col., 1982; Heaney y col., 1995; Cross y col., 1996) y la salida de la proteína catiónica eosinofílica y del anión superóxido de eosinófilos humanos (Iwamoto y col., 1993). La SP es producida por eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Weinstock y col., 1988; Killingsworth y col., 1997; Ho y col., 1997; De Giorio y col., 1998; Lambrecht y col., 1999). El efecto contráctil de la SP y la neurocinina A ha sido ampliamente estudiado; la SP es capaz de contraer bronquios y bronquiolos de humano, aunque con menor potencia que la histamina y la acetilcolina (Martling y col., 1987). La neurocinina A es un bronco-constrictor 2-3 veces más potente que los mediadores anteriormente mencionados (Advenier y col., 1987). Ambas taquicininas inducen adherencia y quimiotaxis en los neutrófilos humanos (Zimmerman y col., 1992).

Las prostaglandinas D₂, E₂, F_{2a}, tromboxano A₂ y las prostaciclina son los principales productos que la enzima ciclooxigenasa genera a partir del ácido

araquidónico. La PGF_{2a} y el tromboxano A_2 son agentes bronco-constrictores y vasodilatadores del músculo liso; la PGD_2 actúa de la misma forma y es un producto con actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos, por lo que se considera como un importante mediador en el asma de tipo alérgico. Las prostaciclina y la PGE_2 tienen actividad broncodilatadora, la inhalación de PGE_2 ayuda a prevenir ataques de asma de tipo alérgico. En pacientes con esta enfermedad, la administración de antiinflamatorios no esteroideos puede ocasionar crisis asmáticas como resultado de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (al impedirse la biosíntesis de prostaglandinas se incrementa la de los leucotrienos) (Raskovic y col., 1998).

Los leucotrienos son considerados como los principales mediadores químicos involucrados en la patología del asma. Participan en la activación de las células inflamatorias como los eosinófilos, generadores de mediadores químicos inflamatorios, citocinas y especies reactivas del oxígeno (Chavis y col., 1991; Laitinen y col., 1993; Smith y col., 1993 a, b). Asimismo, se ha observado que los leucotrienos incrementan la permeabilidad de las células endoteliales al provocar un ensachamiento en las uniones tipo gap (Joris y col., 1987) y que, en fibras nerviosas de cobayo, producen incremento de la excitabilidad (Stewart y col., 1984). Tanto LTC_4 como LTD_4 contraen el músculo liso de las vías aéreas de sujetos normales y asmáticos, la actividad de ambos leucotrienos es 1,000 veces mayor que la de histamina y 10,000 veces mayor que la metacolina (Weiss y col., 1982, 1983; Barnes y col., 1984; Kern y col., 1986).

Mediadores Químicos y Neuropeptidos

| Mediador | Bronco constricción | Secreción | Filtración micro-vascular | Químiotaxis | Hiper respuesta bronquial |
|---|------------------------|-----------|------------------------------|-------------|---------------------------------|
| His | + | + | + | + | - |
| PGD ₂ , PGF ₂ | ++ | + | ? | ? | + |
| PGE ₂ | - | + | - | + | - |
| TXA ₂ | ++ | ? | - | ± | + |
| LTB ₄ | - | - | ± | ++ | ± |
| LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ | ++ | ++ | ++ | ? | ++ |
| PAF | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| Bk | + | + | ++ | - | - |
| SP | + | ++ | ++ | + | - |
| NA | ++ | + | + | - | - |
| FC | + | + | + | ++ | - |
| Ser | ± | ? | + | - | - |
| OR | + | ? | + | ? | - |

Tabla 1- Efectos de los mediadores químicos involucrados en la fisiopatología del asma.

++= efecto pronunciado; + = efecto moderado; ± = efecto incierto; = sin efecto; ? = información no disponible (His=Histamina; PGD₂=Prostaglandina D₂; PGF₂=Prostaglandina F₂; PGE₂=Prostaglandina E₂; TXA₂=Tromboxano A₂; LTB₄=Leucotrieno B₄; LTC₄=Leucotrieno C₄; LTD₄=Leucotrieno D₄; LTE₄=Leucotrieno E₄; PAF=Factor Activador de Plaquetas; Bk=Bradicinina; SP=Sustancia P; NA=Neurocinina A; FC=Fragmentos del sistema del complemento; Ser=Serotonina; OR=Radicales libres del Oxígeno).

2.3 Biosíntesis de leucotrienos

En una gran variedad de células, la mayor parte del ácido araquidónico (AA) se encuentra esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos membranales. El incremento de AA libre para la biosíntesis de leucotrienos requiere de la participación de la enzima fosfolipasa A₂ (cPLA₂) de 85 kDa (Haeggström y Wetterholm, 2002). En los pacientes que presentan complicaciones pulmonares, pancreatitis aguda o asma, se ha observado un incremento en la producción de estas enzimas (Schroder y col., 1982; Vadas y Pruzanski, 1984). La evaluación de los efectos antagonistas de la contracción inducida con PLA₂ en tiras de pleura pulmonar indica que el mecanismo que media la respuesta contráctil del tejido involucra la liberación del AA y consecuentemente, la formación de eicosanoides (Snyder y col., 1992).

El AA activa la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Fig. 1), estos últimos son catalizados por la enzima 5-lipooxigenasa (5-LO) y generan leucotrieno B₄ (LTB₄) y leucotrienos sulfopéptidos LTC₄, LTD₄, LTE₄ y 5-HETE.

Los leucotrienos son importantes mediadores en los procesos alérgicos e inflamatorios que acompañan a varias enfermedades de la piel, padecimientos gastrointestinales, de las articulaciones como la artritis reumatoide, asma bronquial, etc. Células como los eosinófilos, basófilos y células cebadas sintetizan leucotrienos que contienen el grupo cisteinil (cys-Lts); entre ellos, el LTC₄ y el LTD₄, mientras que los neutrófilos y macrófagos generan principalmente el LTB₄ (Haeggström y Wetterholm, 2002).

Mediadores químicos derivados del ácido araquidónico

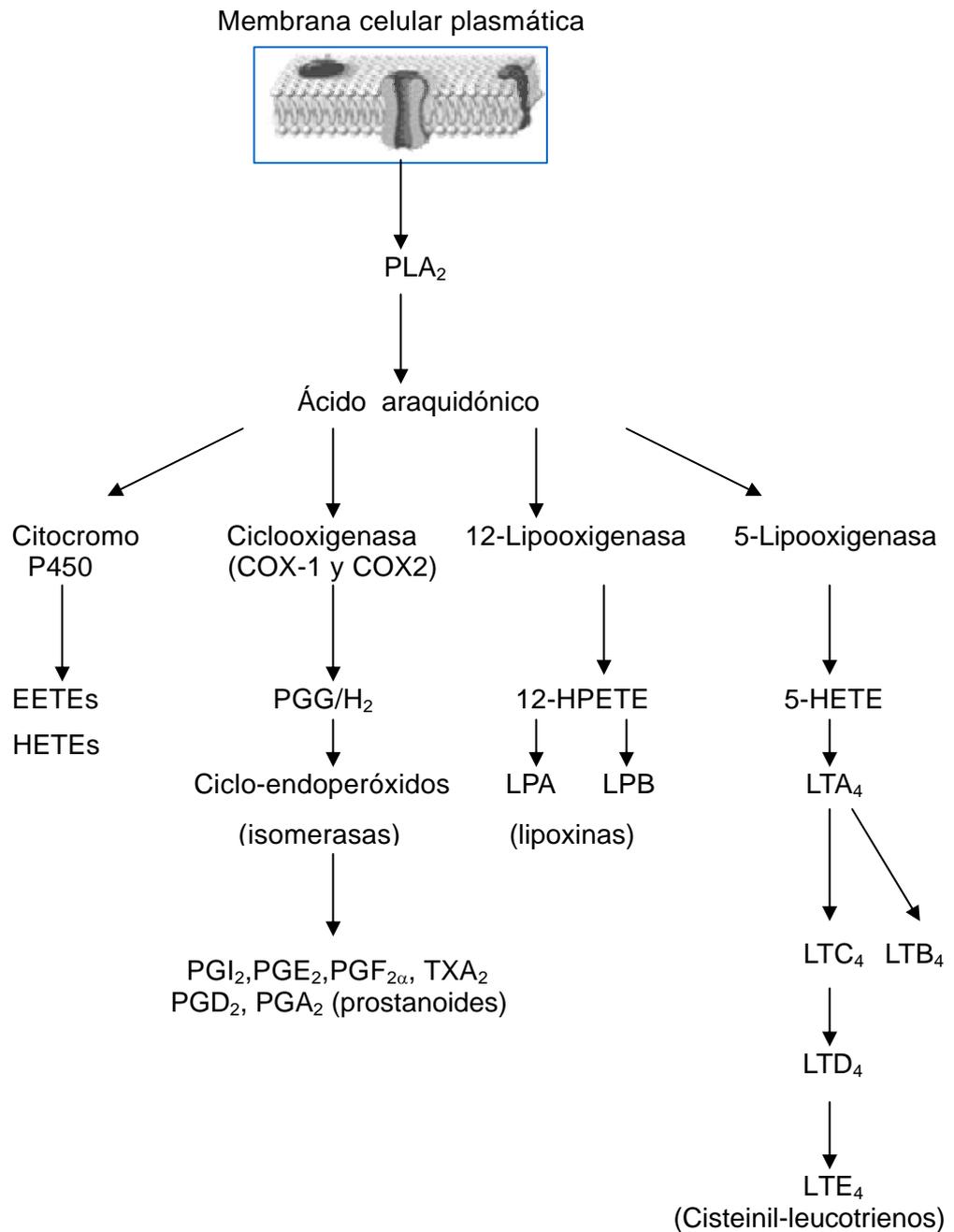


Fig. 1- La activación de la PLA₂ inicia la cascada de transformación enzimática del ácido araquidónico.

La producción de eicosanoides a partir del AA en los eosinófilos, células cebadas y leucocitos polimorfonucleares se inicia cuando la PLA₂ citoplásmica es transportada al núcleo, el retículo endoplásmico ó el aparato de Golgi activando una vía de señalización mediada por [Ca²⁺]_i. (Glover y col., 1995).

La 5-LO es transportada al núcleo (Rouzer y Kargman 1988; Kargman y col., 1992; Woods y col., 1993) y actúa en pasos secuenciales para generar 5(S)-hidroxi,6-*trans*-8,11-*cis*-ácido eicosatetraenóico (5-HPETE) y el 5(S),6(R)-oxo-7,9,11-*trans*-14-*cis*-ácido eicosatetraenóico (LTA₄) (Rouzer y col., 1988). La expresión de la proteína activadora de la 5-lipooxigenasa (FLAP) es necesaria en la activación celular de la 5-LO y sus interacciones membranales, pero no lo es para su translocación (Dixon y col., 1990, Mancini y col., 1993). Se ha postulado que FLAP presenta el AA a la 5-LO (Radmark y col., 1988), pero podría también restringir la difusión del AA a través de la membrana celular. Por otra parte, el LTA₄ es convertido a LTB₄ por la acción de la enzima LTA₄ hidrolasa (Lam y col., 1990); una vez formado el LTB₄, éste es exportado y utilizado por otras células fagocíticas por medio de receptores de alta y baja afinidad acoplados a una proteína G (Penrose y col., 1992; Yokomizo y col., 2000). Alternativamente, en eosinófilos, monocitos y células cebadas, el LTA₄ es conjugado y reducido con glutatión para formar LTC₄. Esta reacción es catalizada por la enzima LTC₄ sintasa, una proteína de 17-kDa localizada en el retículo endoplásmico y la membrana nuclear externa (Lam y col., 1994; Welsch y col., 1994; Christmas y col., 2002). El transporte del LTC₄ es mediado por la proteína 1 multidrogo-resistente (MRP1), posteriormente, es metabolizado a LTD₄, un producto que induce la formación de edema y la bronco-constricción en vías aéreas (Loe y col., 1996).

Los cisteinil leucotrienos son potentes constrictores del músculo liso, particularmente de las vías aéreas; en la micro-circulación inducen la contracción de las arteriolas e incrementan la permeabilidad de las vénulas provocando la extravasación del plasma (Lewis y col., 1990). Este tipo de leucotrienos son reconocidos por dos tipos de receptores, CysLT₁ y CysLT₂, ambos han sido clonados y caracterizados como receptores acoplados a una proteína G.

El receptor CysLT₁ se localiza principalmente en el bazo, tejido pulmonar, leucocitos de sangre periférica, células de músculo liso y macrófagos. El LTD₄ presenta mayor afinidad por este receptor, seguido por el LTC₄ y el LTE₄ en orden decreciente de potencia. El gen que codifica para este receptor se encuentra localizado en el cromosoma X (Lynch y col., 1999). El CysLT₂ se encuentra conformado por 345 aminoácidos, dicha secuencia posee 40% de similitud con el CysLT₁ (Heise y col., 2000; Takasaki y col., 2000), el LTC₄ y el LTD₄ se unen con igual afinidad a este receptor. La distribución en el organismo de este receptor es más amplia encontrándose en corazón, cerebro, leucocitos de sangre periférica, bazo, placenta, nódulos linfáticos, y en concentraciones muy bajas, en los pulmones.

2.4 Regulación y señalización celular de la contracción del músculo liso

En respuesta al estímulo producido por un agonista (hiperreactividad), la contracción exacerbada del músculo liso de las vías aéreas es una de las principales características en el asma. En estado de reposo, la concentración del Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el citosol es de 80-200 nM; cuando las células del músculo liso se contraen, ésta aumenta de 0.1 μM a 1 μM aproximadamente (Somlyo y Himpens, 1989). El calcio es fundamental como segundo mensajero en las células del músculo liso. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, su unión a la proteína calmodulina y la activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina, son los estímulos que promueven la contracción celular (Fig. 2).

Las células regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modulando el influjo de Ca^{2+} a través de canales que se encuentran localizados en la superficie de la membrana plasmática. En el músculo liso existen canales que permiten la entrada de Ca^{2+} , ya sea por un cambio en el potencial electroquímico de la membrana, o por la activación de canales de calcio como resultado de la interacción de un agonista con su receptor (Somlyo y Somlyo, 1968). La acetilcolina, histamina y serotonina activan receptores acoplados a una proteína G estimulando la activación de la fosfolipasa C. La hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato produce inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), producto que promueve la salida del Ca^{2+} de los depósitos de almacenamiento intracelular (Gunst y Tang, 2000; Hall, 2000; Pabelick y col., 2001; Stephens 2001; Janssen, 2002).

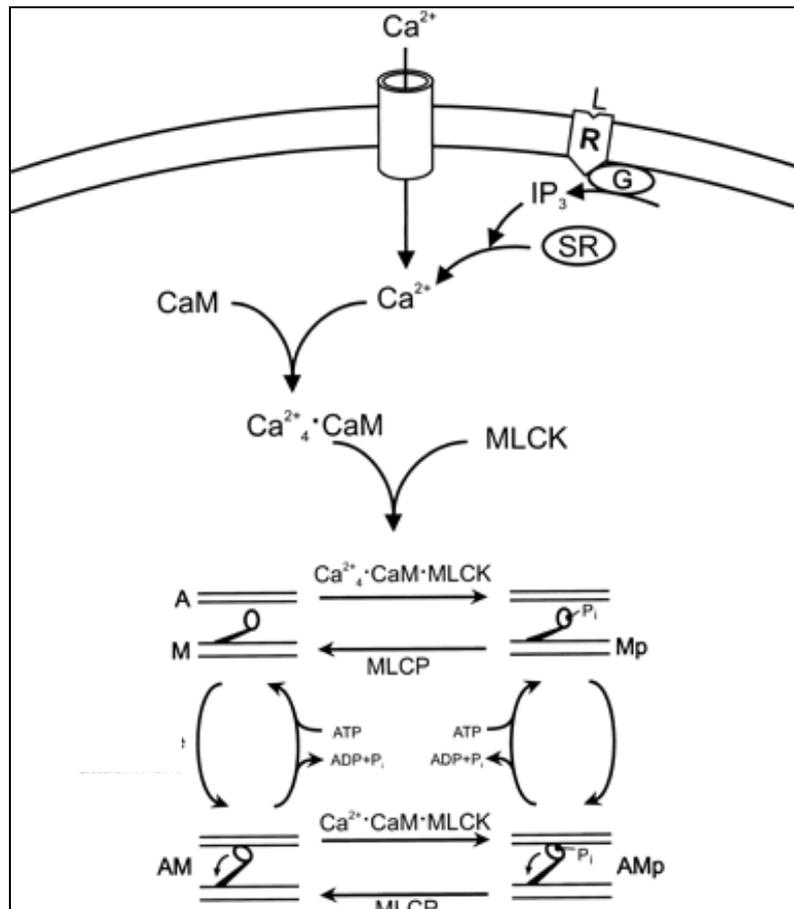


Fig. 2 – El Ca^{2+} como segundo mensajero activa el sistema de señalización encargado de iniciar la contracción del músculo liso.

G=proteína G; R= receptor; L=ligando, IP_3 = inositol 1, 4, 5-trifosfato; SR= retículo sarcoplásmico; CaM= calmodulina; MLCK= cinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP= fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; A= actina; M=miosina sin fosforilar; M_p = miosina fosforilada; AM y AM_p fuerza generada para cruzar los filamentos.

Pfizer G, (2001)

La bomba de Ca^{2+} localizada en la membrana plasmática es una Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPasa encargada de regular el transporte de iones entre el espacio intracelular y extracelular (Carafoli, 1991). La elucidación de su conformación estructural ha permitido conocer que posee un dominio de unión al ATP (Filoteo y col., 1987), un residuo aspartilo (James y col., 1987), y un sitio de unión a la calmodulina. La región COOH-terminal es el punto de unión del complejo Ca^{2+} -calmodulina y está constituido por los últimos 40 residuos de aminoácidos del dominio transmembranal (James y col., 1988). En ausencia del complejo Ca^{2+} -calmodulina, esta secuencia actúa como un dominio autoinhibitorio interactuando intramolecularmente con dos regiones que se encuentran separadas en la bomba. La primera región localizada en el asa citosólica y, la segunda, en la unidad catalítica principal entre el sitio de unión y fosforilación del ATP (Enyedi y col., 1989; Falchetto 1991; 1992). Los ácidos fosfolipídicos, principalmente el polifosfoinositido, tienen la capacidad de estimular la actividad de la bomba (Missiaen y col., 1989; Niggli y col., 1981).

Por otra parte, la mitocondria es un organelo encargado también de regular la homeostasis del Ca^{2+} citosólico. La mitocondria posee varias deshidrogenasas sensibles al catión y un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$), provoca incremento en la síntesis de ATP (Hajnoczky y col., 1995; Robb-Gaspers y col., 1998). Debido a que las fluctuaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentran en un rango submicromolar, no es totalmente claro como ello podría afectar la señalización de la síntesis de ATP. Sin embargo, existe evidencia en células del músculo liso de arteria y de otros tipos celulares que sugieren que la salida de Ca^{2+} del RS a través de RIP_3 o RyrR elevan la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en un rango de aproximadamente 100 μM (Robb-Gaspers y

col., 1998; Csordas y col., 1999; Drummond y col., 1999; 2000; Monteith y Blaustein, 1999; Gurney y col., 2000; Nasser y Simpson, 2000; Szalai y col., 2000).

Acoplamiento Electromecánico y Farmacomecánico

El proceso contráctil es regulado de acuerdo a dos mecanismos: electromecánico y farmacomecánico. El acoplamiento electromecánico opera a través de cambios en el potencial de membrana que provocan un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático (el potencial de membrana en las células del músculo liso es de -40 a -70 mV). En el espacio extracelular, potenciales electropositivos inducen la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje y el consecuente incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Somlyo y Somlyo, 1994). El concepto de acoplamiento farmacomecánico ha sufrido modificaciones en los últimos años. Durante mucho tiempo se definió como un mecanismo fisiológico encargado de regular la contracción del músculo liso por medio de la salida de Ca^{2+} del RS generada por el IP_3 . En los últimos años se ha dado importancia al estudio de la compleja transducción de señales participantes en la cascada del fosfatidilinositol y la participación de las proteínas G (Somlyo y col., 1999).

Receptores Acoplados a Proteínas G

La mayoría de los broncoconstrictores operan a través de receptores de superficie membranal, que se encuentran acoplados a proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteínas G) (Tabla 2). La interacción receptor-agonista regula el tono muscular a través de proteínas G encargadas de activar a los sistemas de señalización que median los cambios en la actividad contráctil.

BRONCOCONSTRICTORES Y SU RECEPTOR

| Mediador | Receptor | Neurotransmisor | receptor |
|--------------------------------|---|------------------|----------------------------------|
| Histamina | H1 | Acetilcolina | M ₃ (M ₂) |
| Cys-leucotrieno | Cys-LT ₁ , Cys-LT ₂ | SP | NK ₂ |
| Tromboxano | TP | Neurocinina A | NK ₂ |
| Prostaglandina D ₂ | TP(DP) | Neuropéptido Y* | Y ₂ |
| Prostaglandina F _{2α} | TP(FP) | Colecistocinina* | CCK _A |
| Isoprostanos | TP | Bombesina/GRP* | BN |
| Factor Activador de Plaquetas | PAF | | |
| Serotonina ^{&} | 5HT ₂ | | |
| Bradicinina | B ₂ | | |
| Endotelina | ET _B | | |
| Adenosina* | A _{2b} | | |
| Angiotensina | AT-1 | | |

Tabla 2 -Broncoconstrictores que operan a través de receptores de membrana acoplados a una proteína G.

*Receptor que provoca la broncoconstricción indirectamente.

[&]En músculo liso de vías aéreas de humano

Barnes P. J., 1998

Las proteínas G son estructuras heterodiméricas conformadas por las subunidades α , β y γ (Kazirol y col., 1991) que son clasificadas en cuatro diferentes grupos con base en su secuencia primaria de aminoácidos ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$). La región COOH-terminal de la subunidad α es la porción efectora que interactúa con el receptor (Watkins y col., 1985), mientras que la amino-terminal le permite anclarse a la membrana y establecer el acoplamiento con el dímero $\beta\gamma$. En estado inactivo, el guanosin di-fosfato (GDP) se encuentra unido a la subunidad α y ésta a su vez,

asociada al dímero $\beta\gamma$, constituyendo de esta manera un heterodímero inactivo acoplado al receptor. Al ser activado el receptor por su ligando se provoca un cambio conformacional en la subunidad α y el GDP es intercambiado por guanosin tri-fosfato (GTP). En el estado activo, α se disocia del dímero $\beta\gamma$ y ambas subunidades libres activan efectores intracelulares específicos. El estado activo GTP-subunidad α es transitorio debido a que el GTP es hidrolizado a GDP por una GTPasa intrínseca contenida en α , lo cual permite que α y $\beta\gamma$ puedan reasociarse (Carty y col., 1990). La estimulación de receptores acoplados a proteínas G conlleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) que convierte el fosfoinosítido 4,5-bifosfato a inositol (1,4,5) trifosfato (IP_3) y $\alpha,1,2$ sn-diacilglicerol (DAG). Tres isoformas de la PLC han sido identificadas (PLC- β , PLC- γ y PLC- δ) (Cockroft y Thomas, 1992). Una vez formado el IP_3 , éste se une a receptores específicos localizados en el RS provocando la liberación del Ca^{2+} almacenado. El IP_3 es convertido a IP_2 por la IP_3 -cinasa y posteriormente a inositol, el cual es reincorporado a los fosfoinosítidos de la membrana celular. A su vez, el IP_3 puede ser fosforilado por la IP_3 -cinasa a IP_4 , molécula encargada de operar receptores que permiten que se recarguen los almacenes de Ca^{2+} intracelulares (Berridge e Irvine, 1989).

Regulación de la fosforilación de la cadena ligera de la Miosina II en la contracción y relajación del músculo liso.

Un evento clave en la contracción del músculo liso es la fosforilación de la cadena ligera de 20 kDa de la miosina II (CLM). La miosina está formada por seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas de aproximadamente 205 kDa que forman un dímero, cada una de ellas con dos cadenas ligeras de 17 y 20 kDa (Adelstein y

Sellers, 1996; Gunst y Tang, 2000). La fosforilación de la cadena reguladora es una reacción catalizada por la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la que a su vez es activada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es superior a $1\mu\text{M}$ (Kamm y Stull, 2001).

La actina es una proteína globular (G-actina) que puede ser polimerizada en filamentos (F-actina) (Carlier, 1991). La F-actina es el principal componente del citoesqueleto y su funcionamiento es esencial en diversos procesos celulares como la movilidad, cambios morfológicos y en el proceso de contracción celular del músculo liso (Pollard y Cooper, 1986).

En células de la musculatura lisa, la contracción es el resultado de la interacción entre los filamentos gruesos de miosina y delgados de actina. La miosina posee en la región NH_2 -terminal de su cabeza una Mg^{2+} -ATPasa (sitio catalítico) y un dominio que funciona como un sitio de unión a la actina. En cada ciclo de la interacción que se establece entre ambas proteínas, una molécula de ATP es hidrolizada a ADP y Pi. Al unirse la miosina a la actina se forma el complejo actomiosina-ADP-Pi. Posteriormente, el ADP y el Pi son liberados al exterior y generan un cambio conformacional en la cabeza de la miosina lo que provoca el movimiento de los filamentos (Fig. 3) (Jontes y Milligan, 1997; Geeves y Colmes, 1999; Ishijima y col., 1998).

La relajación del músculo liso mediada por un incremento en los niveles de AMPc se asocia con una disminución de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} . La formación de AMPc permite la activación de la cinasa A (PKA) encargada de

fosforilar residuos de serina y tirosina de proteínas reguladoras, canales iónicos y de enzimas como la MLCK (Gerthoffer, 1986).

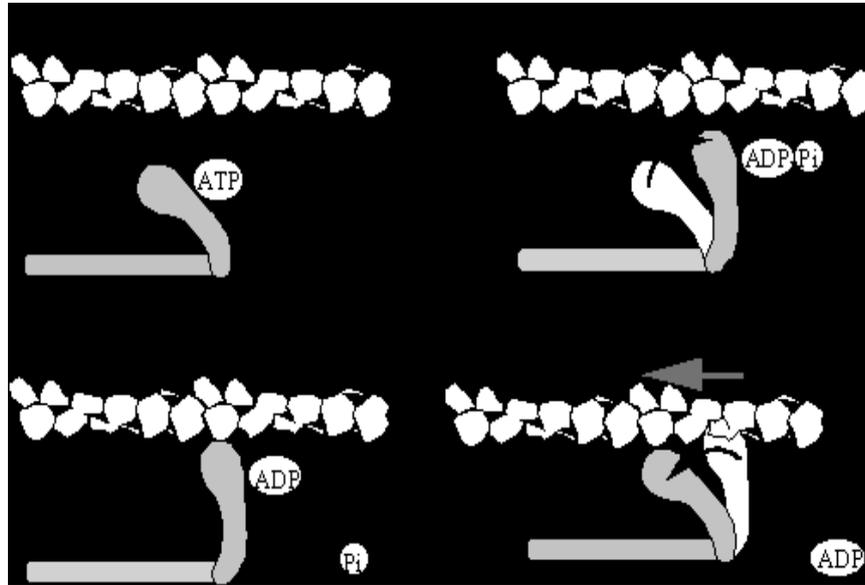


Fig. 3- El Ciclo de interacción de la Miosina con la Actina. A) El ATP se une a la región NH₂ terminal de la miosina e induce un cambio conformacional. B) El ATP es hidrolizado. C y D) La miosina se une a la actina formando el complejo actomiosina-ADP-Pi. Posteriormente, el ADP y el Pi son liberados al exterior generando un que la cabeza de la miosina se desplaze y provoqure el movimiento de los filamentos

2.5 *Fármacos utilizados en el tratamiento del asma*

Como se ha mencionado anteriormente, el asma es un síndrome que se caracteriza porque el sujeto manifiesta hiperreactividad e inflamación de las vías aéreas. Si bien, en la clínica se emplean diversos compuestos para controlar este padecimiento, ninguno de ellos puede ser considerado como el ideal por lo que continuamente se buscan opciones para el desarrollo de agentes antiasmáticos más efectivos.

Los medicamentos utilizados en la actualidad se clasifican dentro de los agentes broncodilatadores o antiinflamatorios. Entre los primeros se encuentran los agonistas adrenérgicos tipo β_2 , las metilxantinas y los anticolinérgicos; los antiflogísticos utilizados pertenecen al grupo de los corticoesteroides y productos similares al cromolín. Los estudios clínicos encaminados a valorar los beneficios que aporta el uso de broncodilatadores *versus* los antiinflamatorios, señalan a estos últimos como los fármacos de elección, reservando el empleo de los broncodilatadores para el alivio sintomático (Rall, 1996).

Broncodilatadores

Los agonistas adrenérgicos tipo β_2 son utilizados para relajar el músculo liso bronquial. El método de aplicación ideal es por inhalación, aunque es necesario un entrenamiento adecuado para su administración. Los más usuales son el Salbutamol y la Terbutalina, ambos de efectos inmediatos (minutos) y con 2 a 4 horas de duración. Actualmente existen en el mercado otros productos de acción más

prologada con un efecto de 8-10 horas de duración. Aunque la acción broncodilatadora pareciera ser el principal efecto terapéutico en pacientes con asma, las evidencias sugieren que este tipo de agonistas podría suprimir la liberación de leucotrienos e histamina en las células cebadas del tejido pulmonar, bajar la permeabilidad vascular y posiblemente inhibir la PLA₂. Los efectos adversos de los agonistas adrenérgicos-β en el tratamiento del asma son provocados por la estimulación de receptores adrenérgicos tipo β₁ en el corazón (Katzung, 2002).

Aunque el empleo de metilxantinas en el tratamiento del asma es menos habitual, algunos de estos fármacos se utilizan ocasionalmente. Las tres metilxantinas más importantes son teofilina, teobromina y cafeína; el mecanismo de acción propuesto es muy diverso, pero ninguno se ha vinculado con un efecto broncodilatador. Pruebas *in vitro* han demostrado que su utilización en altas concentraciones inhiben a la enzima fosfodiesterasa. Dado que la fosfodiesterasa hidroliza nucleótidos cíclicos, su inhibición produce un incremento de los niveles de AMPc intracelular, efecto que podría explicar la estimulación cardíaca y la relajación del músculo liso. No obstante, es poco probable que se reproduzca dicho efecto *in vivo* (Katzung, 2002).

El empleo de anti-histamínicos de primera generación es limitado debido al efecto sedante que provocan; los de segunda generación atenúan ligeramente el broncoespasmo producido por la histamina, el aire frío y el ejercicio, sugiriendo que esta línea de antihistamínicos debe ser recomendada con otros agentes en el tratamiento del asma (Larsen, 2001). La estimulación de receptores H₁ induce la

contracción del músculo liso de las vías aéreas. Los antihistamínicos H₁ (AH₁) clásicos o de primera generación (clorato de clorfeniramina) son poco selectivos, y con efectos sedantes, anticolinérgicos y antiserotoninérgicos. Los AH₁ de segunda generación (también llamados antihistamínicos no sedantes como la loratadina) son más selectivos para los receptores H₁ periféricos y no atraviesan la barrera hematoencefálica (Welch y col. 2002). Los AH₁ bloquean de forma competitiva y reversible los receptores H₁ de la histamina (Mutschler y Derendorf, 1995). Como resultado de este bloqueo se produce disminución de la permeabilidad capilar y relajación de la musculatura del tracto respiratorio. Esta acción es meramente paliativa, ya que únicamente bloquean la respuesta fisiológica de la histamina liberada tras producirse la reacción antígeno-anticuerpo.

ANTICOLINÉRGICOS

Los anticolinérgicos son antagonistas específicos de los receptores muscarínicos. Algunos de estos fármacos de tipo cuaternario (bromido de ipratropio, bromido de oxitropio) son administrados en aerosol para tratar el broncoespasmo producido en los pacientes asmáticos, su eficacia es menor a la de los agentes adrenérgicos tipo β_2 (Mutschler y Derendorf., 1995).

Antiinflamatorios

Entre los agentes antiinflamatorios utilizados para controlar el asma destacan los glucocorticoides y medicamentos similares al cromolín (cromoglicato disódico, nedocromil). Los corticoesteroides y sus derivados son capaces de suprimir la reacción inflamatoria de la pared bronquial inhibiendo la proliferación, diferenciación, migración y activación de células inflamatorias. Asimismo, impiden la síntesis de interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos y FAP, reduciendo la hiperreactividad bronquial y la formación de moco (Mutschler y Derendorf, 1995). El empleo de glucocorticoides inhalados en pacientes asmáticos es bastante frecuente y constituyen la elección terapéutica de primera línea por sus beneficios sintomáticos. Los efectos adversos suelen ser: candidiasis orofaríngea, tos irritativa, úlcera péptica, hipertensión y supresión de la respuesta inmune (Rall, 1996), estos efectos son menos frecuentes a dosis bajas. Asimismo, se ha reportado que su absorción provoca osteoporosis (Mortimer y col., 2005).

El cromoglicato de sodio es un derivado sintético de las cromonas que es capaz de inhibir la liberación de mediadores químicos de las células cebadas (Neffen, 1990). Aunque durante varios años se relacionó este efecto con la actividad antiinflamatoria, el mecanismo de acción de este agente aún no se encuentra del todo claro. El empleo del cromoglicato disminuyó en 1990 debido a la utilización de los corticosteroides inhalados (Price y Weller 1995). El nedocromil sódico posee un mecanismo de acción semejante al cromoglicato. Los estudios clínicos realizados a largo plazo no han demostrado que existan diferencias significativas entre ambos (Kelly y col., 2001).

Antagonistas de Cys-leucotrienos

Los esfuerzos de la industria farmacéutica se han enfocado en el desarrollo de agentes que modulen la síntesis o mecanismo de acción de los Cys-LTs. Recientemente, tres antagonistas selectivos del receptor CysLT₁ han sido elaborados para el tratamiento del asma: Zafirlukast, Montelukast y Pranlukast. Se trata de medicamentos indicados para casos de asma leve-moderado que no responden a otros tratamientos. No obstante, existen reportes que restringen la prescripción de los dos primeros medicamentos en pacientes con disfunción hepática (Wooltorton, 2004).

2.6 Plantas medicinales evaluadas como antiasmáticos

Las pruebas *in vitro* que permiten determinar inhibición de los productos derivados de la biosíntesis del ácido araquidónico han sido utilizadas para evaluar las propiedades antiasmáticas de los extractos vegetales y de principios activos puros (El Sayah y col. 1998; Castro y col. 2000).

En la literatura científica hay antecedentes sobre la evaluación de plantas con propiedades antiasmáticas en modelos *in vitro*. La especie *Galphimia glauca* es utilizada en América Latina como antiasmático y antialérgico. De la planta se aislaron el ácido gálico, metil galato, quercetina y ácido tetragaloilquínico, compuestos a los que se relacionó con efectos antiasmáticos (Dorsch y col., 1992). La evaluación biológica de la fracción orgánica, obtenida por partición entre acetato de etilo y agua del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta, mostró inhibición de la repuesta contráctil de la tráquea estimulada con LTD₄ en cobayos sensibilizados previamente con ovoalbúmina (Campos y col., 2001). Otras 19 especies utilizadas en la medicina tradicional de Brasil fueron valoradas *in vitro* como inhibidores de la 5-lipooxigenasa (5-LO) siendo activas *Hedichium coronarium*, *Xylopa frutescens* e *Hymenaea courbaril* (Castro y col. 2000). Asimismo, se ha descrito que el extracto hidroalcohólico de *Drymis winteri* produce inhibición de las contracciones inducidas con varios mediadores involucrados en el proceso asmático y alérgico en la tráquea del cobayo sensibilizado con ovalbúmina (El Sayah y col. 1998).

Clerodendron serratum es una especie utilizada en la medicina tradicional de la India para tratar enfermedades respiratorias, incluyendo al asma. La evaluación del extracto acuoso de esta planta demostró inhibición de la contracción inducida con histamina en la tráquea de cobayo (Vasavada y col. 1967). *Desmodium ascendens* cuenta con evidencia experimental de una posible actividad broncodilatadora, el extracto acuoso y productos obtenidos de un fraccionamiento químico fueron inhibidores de la contracción del músculo liso de las vías aéreas del cobayo, probablemente por supresión de la síntesis de leucotrienos (Addy y col. 1986, 1988, 1990).

El aceite esencial de las hojas de *Eucalyptus globulus* es usado para tratar enfermedades respiratorias como la bronquitis; las hojas secas se fuman como tabaco para tratar el asma (Szelenyi y Brune, 2002). El aceite esencial contiene el compuesto 1,8-cineol que ha demostrado en experimentos *in vitro* un efecto inhibidor de la producción de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, LTB_4 y TXB_2 en monocitos humanos (Juergens y col. 1998).

2.7 *Efecto de los leucotrienos sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial*

Las mitocondrias son los organelos de las células eucarióticas aeróbicas donde ocurren las transformaciones energéticas más importantes: la oxidación de los sustratos y la fosforilación de ADP para forma ATP. Estos dos eventos se integran en uno solo, conocido como fosforilación oxidativa. Alojados en la membrana interna mitocondrial se encuentran los cinco complejos multiprotéicos que participan en este proceso: el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), el complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), el complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa), el complejo IV (citocromo oxidasa) y el complejo V (ATP sintetasa) (González-Halphen y Vázquez-Acevedo, 2002).

La producción del ATP mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la integridad celular. La síntesis del ATP es un proceso acoplado entre la cadena respiratoria formada por los cuatro complejos protéicos y la ATP sintasa con un intermediario común que es el gradiente de protones ($\Delta\Psi_m$). Si la membrana mitocondrial interna pierde impermeabilidad a los protones, la fosforilación del ADP se verá afectada (Tuena de Gómez-Puyou, 2002). Asimismo, se ha descrito que la actividad catalítica de los complejos de la cadena respiratoria que se encuentran inmersos en la membrana requieren de un ambiente lipídico estable y que, la alteración de la estructura de los fosfolípidos en la membrana, compromete la funcionalidad de la cadena respiratoria dando origen a una deficiencia energética y eventualmente a la muerte celular (Daum, 1985).

En condiciones anaeróbicas, el ácido pirúvico procedente de la glucólisis se reduce a ácido láctico y produce un incremento en los niveles de lactato, síntesis de ATP insuficiente y acidez intracelular. La acidosis resultante interfiere con la función enzimática normal y proporciona un medio ambiente favorable para la formación de especies reactivas de oxígeno (Hogg, 1998).

Es sabido que el asma priva a los pacientes del el oxígeno. Esto produce severas alteraciones en la función mitocondrial como el desacoplamiento parcial o la inhibición de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, disminución del gradiente de H^+ , inhibición de la fosforilación oxidativa, mayor producción de radicales libres del oxígeno con el consecuente estrés oxidativo y, apoptosis entre otras (Zamzami y col. 1999). Los principales sustratos fisiológicos de los radicales libres son las cadenas de ácidos grasos insaturados, principalmente del ácido araquidónico y cardiolipina que sufren la lipoperoxidación (Janero, 1990). La peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial produce daños en la respiración celular, fosforilación oxidativa y transporte de iones (Morais, 1999).

Por otra parte, han sido descritos los efectos desacoplantes de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina y el benoxaprofeno, reportados a su vez como inhibidores de la síntesis de leucotrienos *in vitro* (Ahnfelt-Ronne y Arrigoni-Martelli 1982), y que, a concentraciones elevadas actúan como inhibidores de la fosforilación oxidativa (Kawai y col., 1985). Moreno-Sánchez y colaboradores (1999) evaluaron los efectos de siete fármacos antiinflamatorios utilizando como modelo experimental la respiración mitocondrial, la síntesis de ATP y el potencial de membrana de mitocondrias de hígado de rata. Con excepción de

nabumetona y naproxeno, los productos evaluados (diclofenaco, piroxicam, indometacina, nimeluside y meloxicam) presentaron un efecto desacoplante sobre las mitocondrias en este modelo.

2.8 Selección de plantas medicinales como “probables antiasmáticos”

Las estrategias que habitualmente se siguen para la selección de especies medicinales que se someten a evaluación experimental se basan en la información etnobotánica, en las características químicas que presentan las diferentes especies de un género o de una familia botánica y en los antecedentes respecto a los estudios farmacológicos ya reportados (Bruhn y Sandberg, 2000).

En los bancos de datos con información etnobotánica (IMSS, INI, INECOL) son muy pocas las especies medicinales que se reportan específicamente como antiasmáticas (Tabla 3); sin embargo, el análisis de la información sobre los diferentes usos que se describen para una especie en particular y los mencionados para el género botánico, así como los antecedentes sobre los constituyentes químicos descritos para el género (criterio quimiotaxonómico), permiten proponer para su evaluación a un grupo de plantas “probables antiasmáticos”.

Para el presente estudio, la selección de las plantas se basó en: a) especies que en un análisis previo mostraron importante actividad antiinflamatoria en el modelo del edema plantar inducido con carragenina (Guajardo, 2001; Nava, 2002; David 2002; Meckes y col., 2004), b) plantas mencionadas como antiasmáticas en los bancos de datos con información etnobotánica y que no hayan sido aún evaluadas en el tejido muscular liso de la tráquea *in vitro* y que no sean tóxicas, c) plantas que son utilizadas para tratar síntomas relacionados con un proceso asmático y cuyo patrón quimiotaxonómico permite proponerlas como “probables antiasmáticos”; por ejemplo, la presencia de ácido nordihidroguaiarético en el género *Larrea*, ya reportado en la literatura como inhibidor de la lipooxigenasa (Farmer y col. 1987).

| Especie | Nombres Vulgares | Usos populares | Parte | Citas |
|--|-------------------------|-----------------------|--------------|----------------------|
| Asclepias curassavica * (Asclepiadaceae) | quiebramuelas | asma, dolor, catarro | L | Argueta, 1994 |
| Borago officinalis (Boraginaceae) | Borraja | asma, | N | Argueta, 1994 |
| Gnaphalium spp (Asteraceae) | gordolobo | asma, bronquitis | F | Argueta, 1994 |
| Gossypium hirsutum * (Malvaceae) | Algodón | asma, | H | Argueta, 1994 |
| Heliotropium currasavicum (Boraginaceae) | alacrancillo | asma, tos | R | IMSSM |
| Hibiscus rosa-sinensis (Malvaceae) | tulipán | asma, tosferina | F | Argueta, 1994 |
| Piper auritum (Piperaceae) | acoyo, cordoncillo | asma | H | Argueta, 1994 |
| Piper sanctum (Piperaceae) | hoja santa, cordoncillo | asma | R | Lara y Márquez, 1999 |
| Solandra grandiflora * (Solanaceae) | Guayacán | asma | N | IMSSM |

Tabla 3- Especies de plantas medicinales que se mencionan en los bancos de datos consultados por su uso en México como antiasmáticas. Las siglas IMSSM corresponden a información recabada en el herbario perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

A= partes aéreas, C= corteza, H= hojas, I= planta completa, F= flores, L= látex, R= raíz, Re= resina, * = planta tóxica, N= parte no especificada.

Con base en lo anterior, nueve especies de plantas medicinales fueron seleccionadas para la evaluación de los efectos de sus extractos íntegros en los ensayos biológicos propuestos en el presente estudio (Tabla 4).

| Especie | Extracto | Parte de la Planta |
|---|---------------------------------|---------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> (Asteraceae) | metanólico | F |
| <i>Chamaedora tepejilote</i> (Palmae) | acuoso | A |
| <i>Gnaphalium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> (Asteraceae) | metanólico | A |
| <i>Hibiscus uncinellus</i> (Malvaceae) | metanólico | A |
| <i>Larrea tridentata</i> (Zygophyllaceae) | metanólico | A |
| <i>Lippia dulcis</i> (Verbenaceae) | etanólico | C |
| <i>Oenothera rosea</i> (Onagraceae) | metanólico | A |
| <i>Rubus coriifolius</i> (Rosaceae) | diclorometano- metanol (1:1) | A |
| <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Malvaceae) | clorofórmico | A |

Tabla 4- Especies medicinales que fueron propuestas para su evaluación como “probables antiasmáticos” en el presente estudio.

A= partes aéreas, C= corteza, F= flores.

El objetivo central del presente trabajo es el diseño de modelos *in vitro* que permitan seleccionar plantas para su evaluación posterior como antiasmáticos. En una primera etapa se realizó la valoración de la actividad inhibitoria que producen los extractos de las plantas seleccionadas sobre la respuesta contráctil inducida con histamina, AA y LTD₄ en el músculo liso de la tráquea de cobayo.

En un proceso asmático la producción de leucotrienos en las vías respiratorias ha sido un tema ampliamente estudiado, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en este tipo de tejidos y cómo este mecanismo puede ser afectado por productos como el LTD₄. Por lo que, el presente estudio evaluará el efecto *in vitro* del LTD₄ y del extracto vegetal de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre la función de la cadena respiratoria mitocondrial del músculo liso de la tráquea de cobayo.

III- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El presente estudio tuvo como propósito identificar extractos de plantas medicinales con actividad relajante sobre el músculo liso traqueal, así como implementar una metodología que permita evaluar los efectos que producen los extractos vegetales sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto relajante de los extractos de nueve especies medicinales en preparaciones con anillos de tráquea de cobayo, pre-contraídas con histamina y ácido araquidónico (AA).
- Evaluar el efecto relajante de uno de los extractos activos en preparaciones con anillos de tráquea de cobayo, en curvas concentración-respuesta construídas con leucotrieno D₄ (LTD₄)
- Evaluar en presencia y ausencia de LTD₄, los efectos del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial.

IV- HIPÓTESIS

Los extractos de las plantas seleccionadas por sus propiedades antiinflamatorias inhibirán la respuesta contráctil inducida con His y AA en los anillos de tráquea de cobayo *in vitro*, y, el extracto con mayor efecto relajante sobre la contracción provocada con ambos agonistas inhibirá las curvas concentración-respuesta construidas con LTD₄.

El LTD₄, el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum var. sylvicola* y la combinación de ambos productos, modificarán la actividad de algunas enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

V- METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal y preparación de los extractos

Los extractos utilizados en el presente estudio se obtuvieron de material vegetal colectado previamente e identificado en el Herbario IMSSM por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras (Tabla 5).

| Especie | Extracto | No registro |
|---|-----------------|--------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> (Asteraceae) | metanólico | 13044 |
| <i>Chamaedora tepejilote</i> (Palmae) | acuoso | 13080 |
| <i>Gnaphalium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> (Asteraceae) | metanólico | 15072 |
| <i>Hibiscus uncinellus</i> (Malvaceae) | metanólico | 1636 |
| <i>Larrea tridentata</i> (Zygophyllaceae) | metanólico | 14411 |
| <i>Lippia dulcis</i> (Verbenaceae) | etanólico | 14417 |
| <i>Oenothera rosea</i> (Onagraceae) | metanólico | 14412 |
| <i>Rubus coriifolius</i> (Rosaceae) | etanólico | 11874 |
| <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Malvaceae) | diclorometano | 14294 |

Tabla 5- Especies vegetales seleccionadas para su evaluación en el presente estudio. Extracto utilizado y nº de registro en el Herbario IMSSM.

La preparación de los extractos crudos se hizo vía maceración exhaustiva del material vegetal seco y molido con los disolventes orgánicos correspondientes. Los extractos se concentraron a presión reducida hasta sequedad en un rota-evaporador a 40°C. En el caso de *Chamaedora tepejilote*, el extracto acuoso fue concentrado por un proceso de liofilización.

5.2 Modelos biológicos

5.2.1- Preparaciones con anillos de tráquea de cobayo

La utilización de cobayos en el modelo experimental del asma se debe a la similitud que existe entre la broncoconstricción inducida con agentes químicos en este modelo y el asma bronquial del humano (Campos y Church, 1992).

En el estudio se utilizaron cobayos machos de la cepa Harley con un peso de 400-550 g, sin ayuno previo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y desangrado cortando la vena porta. La tráquea fue aislada y sumergida en solución Krebs-Henseleit (K-H) a 37°C y con burbujeo constante de 95%O₂-5%CO₂, posteriormente fue cortada en segmentos que contenían tres anillos de cartílago. Las preparaciones se suspendieron verticalmente por medio de dos ganchos de acero inoxidable en baños para órganos aislados incubando en 5 ml de la solución K-H a 37°C y manteniendo el burbujeo continuo con carbógeno. Uno de los extremos de la preparación se fijó a la cámara y el otro se unió a un transductor de desplazamiento FT03 acoplado al polígrafo Grass-7D, previamente calibrado a una sensibilidad de 2 mV/cm y 1 g de tensión. Los tejidos se dejaron estabilizar por un período de 60-90 min cambiando el medio cada 15 min. La composición del medio K-H fue la siguiente: NaCl 118 mM; KCl 4.4 mM; CaCl₂ 2.5 mM; NaHCO₃ 25 mM; MgSO₄ 1.2 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; glucosa 11 mM.

5.2.2- Evaluación de los extractos seleccionados sobre las contracciones inducidas con His y AA

Una vez estabilizadas las preparaciones de anillos de tráquea de cobayo en la solución K-H, se indujo la respuesta contráctil con 60 mM de KCl y se repitió la observación hasta reproducir la amplitud máxima. A continuación, se lavaron los tejidos y se indujo la contracción por separado con His (1×10^{-7} M) o AA (1×10^{-7} M) (observaciones realizadas con anterioridad permitieron establecer el rango óptimo de las concentraciones para obtener una respuesta tónica sostenida). Posteriormente se procedió a realizar la adición acumulativa de concentraciones variables de los extractos hasta inhibir la contracción sobre los tejidos. Al término de cada experimento, la concentración máxima efectiva de KCl (60 mM) fue adicionada a cada baño para comprobar la viabilidad de los tejidos. Los extractos vegetales fueron disueltos utilizando como vehículo dimetilsulfóxido y la concentración final del vehículo en el baño para órganos fue $\leq 0.15\%$.

5.2.3- Evaluación del extracto de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre las curvas concentración-respuesta inducidas con LTD₄

En otra serie de experimentos, las contracciones fueron inducidas con la adición acumulativa de LTD₄ (1×10^{-12} a 1×10^{-6} M) en presencia de 1×10^{-6} M de indometacina (curva control). Para evitar la biotransformación de LTD₄ a LTE₄ los tejidos fueron preincubados durante 30 min con 6 mM de L-cisteína. A su vez, los tejidos fueron incubados con el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* (75, 100, y 125 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min y se indujo la contracción con LTD₄ para obtener la curva dosis-respuesta. El fármaco zafirlukast (0.1 $\mu\text{g/ml}$) fue utilizado como control positivo.

5.2.4- Análisis de Datos

Los resultados se muestran como el porcentaje máximo de contracción provocado con el agonista y se obtuvo el promedio \pm error estándar. El efecto se expresó como el valor de CI_{50} (concentración de extracto que inhibió la respuesta contráctil máxima en un 50%), calculada mediante ajuste no lineal. La respuesta del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* ante el LTD_4 fue expresada como porcentaje con respecto a la respuesta máxima observada en los tejidos contraídos con 60 mM de KCl. Además, se determinó el valor pD_2 ($-\log CI_{50}$) y la respuesta máxima (E_{max}) para cada una de las concentraciones empleadas, para determinar la diferencia significativa entre los valores se utilizó la prueba T de Student ($p < 0.05$).

5.2.5- Aislamiento de la fracción celular del homogeneizado total de la tráquea de cobayo

Cobayos machos de la cepa Harley (400-550g), sin ayuno previo, fueron sacrificados por dislocación cervical y desangrados. Posteriormente, la tráquea fue extraída y colocada en un medio de aislamiento (sacarosa 250 mM, TEA 3 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4). El tejido se pesó y se cortó en trozos muy finos para preparar un homogeneizado al 10% (p/v) en un homogeneizador Potter-Elvehjem provisto con un pistón esmerilado y a una velocidad media en un motor Caframo tipo RZR1. Todas las manipulaciones se realizaron con la mayor rapidez posible y a una temperatura de 2-4° C. El homogeneizado obtenido se distribuyó en tubos de centrífuga para obtener la fracción celular enriquecida de mitocondrias de acuerdo al método de centrifugación diferencial descrito previamente por Vázquez-Memije y col., 1984 (Fig. 4). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col. (1951) en muestras por triplicado utilizando albúmina de suero de bovino, fracción V (BSA) como estándar, a una concentración de 1 mg / ml y leídas a una absorbancia de 560 nm.

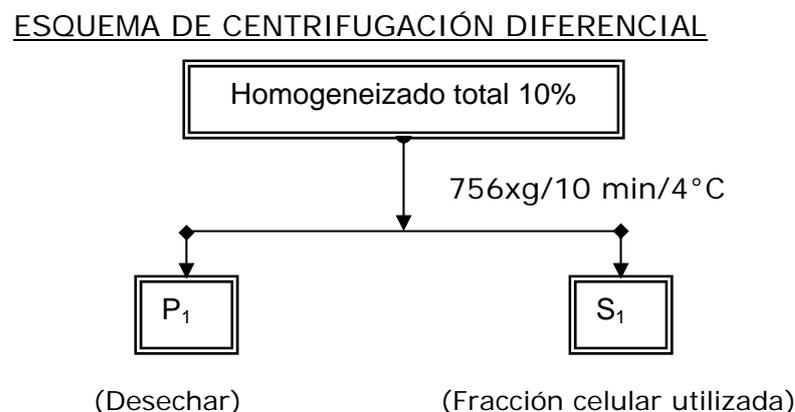


Fig 4 - Esquema de centrifugación para el aislamiento de la fracción celular de la tráquea de cobayo.

5.2.6- Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Las mitocondrias de hígado de rata son un modelo experimental ampliamente utilizado debido a la gran información y conocimiento que se tiene sobre el mismo. La funcionalidad de estas mitocondrias está bien estudiada y caracterizada, por lo que este modelo fue seleccionado como grupo control de referencia.

Ratas machos de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 400-450g con libre acceso a agua y alimento fueron sacrificadas por dislocación cervical. El hígado se extrajo colocándolo en un medio de aislamiento que contenía: sacarosa 250 mM, TEA 3 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4. El medio se pesó previamente para obtener por diferencia el peso del tejido húmedo. El tejido se cortó en trozos finos y se colocó en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem provisto de un pistón de teflón, procediendo a su homogeneización con golpes suaves a una velocidad media en un motor Caframo tipo RZR1. El homogeneizado fue ajustado a una concentración de 10% (p/v). Todas las manipulaciones se realizaron con la mayor rapidez posible y a una temperatura de 2-4°C.

El homogeneizado obtenido se distribuyó en tubos de centrífuga para obtener la fracción mitocondrial por el método de centrifugación diferencial que se resume en la Fig. 5 (Vázquez-Memije y col., 1984). La concentración de proteína, al igual que en caso anterior, se determinó por el método descrito por Lowry y col. (1951).

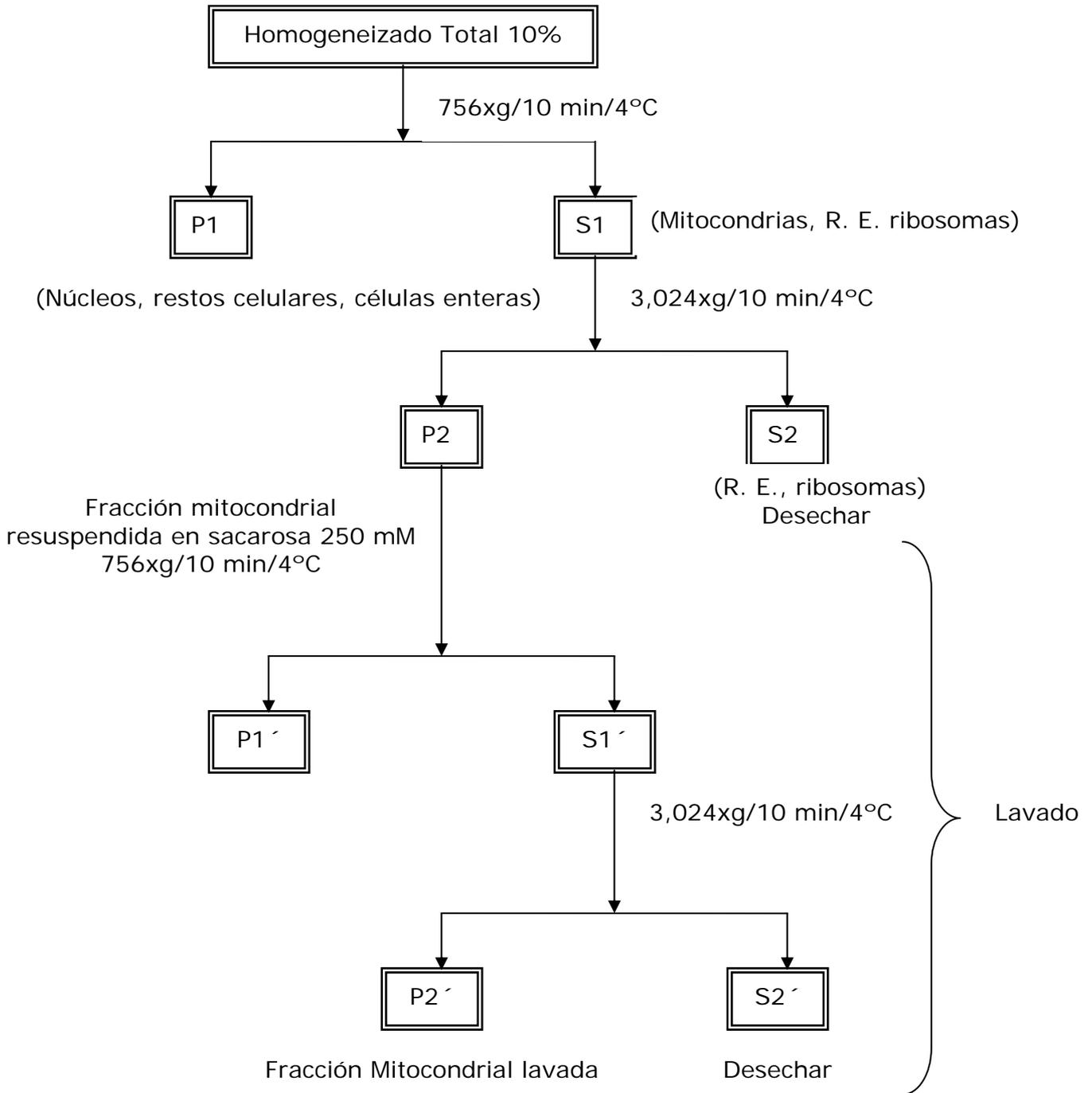


Fig 5 – Esquema que simplifica la metodología empleada para la obtención de mitocondrias de hígado de rata por centrifugación diferencial.

5.2.7- Determinación de las actividades enzimáticas

Succinato deshidrogenada (SDH/Complejo II). La actividad de esta enzima se determinó por un método espectrofotométrico siguiendo la reducción del 2,6-dicloro-fenolindofenol (DCIPP) a 600 nm utilizando un coeficiente de extinción de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el DCIPP. La mezcla de incubación contenía: KH_2PO_4 50 mM pH 7.0; Succinato 16 mM; DCPIP 0.1 mM, KCN 1.5 mM y 100-150 μg de proteína. Tiempo de incubación de 2 min, a una temperatura de 30°C . Volumen total 1.0 ml.

Citocromo c oxidasa (COX, complejo IV). La actividad de la enzima fue determinada por un método espectrofotométrico utilizando citocromo c reducido al 0.1% en fosfato de potasio 10 mM (pH 7.0). Tiempo de incubación 1-2 min, temperatura 30°C y 100-150 μg de proteína. Los cambios de absorción fueron seguidos a 550 nm. El coeficiente de extinción utilizado para el citocromo c fue $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

ATPasa-Hidrólisis de ATP (complejo V). La actividad hidrolítica de la ATPasa fue determinada por el método de Bonting modificado (Delhumeau y col., 1973; Vázquez-Memije y col., 1988) que permite medir el fosfato inorgánico producido en la reacción enzimática. El medio de incubación utilizado fue el siguiente: 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 200 mM de sacarosa, 5 mM de MgCl, 5 mM de ATP y 100-150 μg de proteína. Temperatura 37°C y tiempo de incubación 4 minutos, volumen total 0.5 ml. La reacción se inició con la adición de la proteína y se detuvo con HClO_4 a una concentración final de 6%. La mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y posteriormente fue centrifugada a 756 g durante 15 min en una centrífuga clínica.

Los tubos fueron decantados y en 0.5 ml del sobrenadante obtenido se determinó el fosfato inorgánico.

Síntesis de ATP. La síntesis de ATP acoplada a la reducción del NADP fue determinada espectrofotométricamente (340 nm) en 1 ml de mezcla de reacción que contenía: 0.15 M de sucrosa, 20 mM Tris HCl, 1 mM ADP, 20 mM Pi, 5 mM MgCl₂, 10 mM glucosa, 1 mg/ml hexocinasa, 30 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenada, 100 μM diadenosina pentafofato y 150-200 μg de proteína mitocondrial. pH 7.5, temperatura 37° C. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato (12 mM de succinato).

5.2.8 Evaluación del LTD₄, del extracto de *Gnaphalium attenuatum* var *sylvicola* y de la combinación de ambos productos sobre la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial.

Con el objetivo de determinar el efecto que ejerce el LTD₄ sobre la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de hígado de rata y del músculo liso de tráquea de cobayo, se midió su actividad en presencia de cuatro diferentes concentraciones de LTD₄ (1, 1.5, 2 y 3 nmoles). Las concentraciones utilizadas fueron establecidas con base en el trabajo de Takeuchi y col. (1991), en el cual se señala que en el modelo de mitocondrias de cerebro de rata la concentración de 3 nmoles de LTD₄ no desacopla la producción de ATP.

Para evaluar la actividad del extracto metanólico de el *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* el producto fue disuelto en dimetil sulfóxido. Las concentraciones utilizadas fueron 81, 162 y 324 μg/0.1 mg de proteína. Las concentraciones fueron establecidas con base en la Cl₅₀ que el extracto tuvo en los tejidos tratados con los

agonistas His y AA. En la valoración de la combinación de ambos productos se emplearon concentraciones que habían mostrado un efecto máximo, ya fuera aumentando o disminuyendo la actividad enzimática.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como el porcentaje obtenido con respecto al grupo control y se obtuvo el promedio \pm la desviación estándar de la media, para determinar la diferencia significativa entre los valores se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.01$).

VI- RESULTADOS

6.1- Efecto de los extractos sobre la contracción inducida con los agonistas His y AA.

En el modelo biológico con preparaciones de músculo liso de tráquea de cobayo precontraídas con los agonistas His y AA, se evaluaron los extractos de las nueve especies. La potencia del efecto inhibitorio (CI_{50}) de cada extracto se ilustra en la Tabla 6.

| Especie | Extracto evaluado | Agonista utilizado | CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|-------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>Achillea millefolium</i> | metanólico | histamina | 18.13 ± 0.55 |
| | | ácido araquidónico | 96.37 ± 3.00 |
| <i>Chamaedora tepejilote</i> | acuoso | histamina | *SE |
| | | ácido araquidónico | *SE |
| <i>Gnaphalium attenuatum</i> var. <i>sylvicola</i> | metanólico | histamina | 44.16 ± 0.71 |
| | | ácido araquidónico | 27.66 ± 0.90 |
| | | LTD4 | 8.3 ± 0.35 |
| <i>Hibiscus uncinellus</i> | metanólico | histamina | 39.87 ± 2.16 |
| | | ácido araquidónico | 47.11 ± 2.50 |
| <i>Larrea tridentata</i> | metanólico | histamina | 11.86 ± 0.30 |
| | | ácido araquidónico | 28.41 ± 2.23 |
| <i>Lippia dulcis</i> | etanólico | histamina | 36.26 ± 2.00 |
| | | ácido araquidónico | *S.E. |
| <i>Oenothera rosea</i> | metanólico | histamina | 15.75 ± 0.44 |
| | | ácido araquidónico | 46.44 ± 2.31 |
| <i>Rubus coriifolius</i> | etanólico | histamina | 22.48 ± 0.70 |
| | | ácido araquidónico | 49.11 ± 1.58 |
| <i>Sphaeralcea angustifolia</i> | diclorometano | histamina | 18.59 ± 1.14 |
| | | ácido araquidónico | 91.07 ± 4.80 |

Tabla 6.- Efectos de los extractos vegetales sobre la contracción del tejido traqueal del cobayo inducida con los agonistas His ó AA \pm E.S.M. de n=5-8 tejidos (*SE= sin efecto con una concentración >100 $\mu\text{g/ml}$).

Los resultados muestran que el extracto metanólico de *Achillea millefolium* inhibió la contracción inducida con His con un valor CI_{50} de $18.13 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$; con AA, la CI_{50} fue de $96.37 \pm 3.0 \mu\text{g/ml}$. *Chamaedora tepejilote* no presentó efecto inhibitorio sobre las contracciones inducidas con ambos agonistas. *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* relajó el músculo liso de tráquea con un valor CI_{50} de $44.16 \pm 0.71 \mu\text{g/ml}$ en los tejidos tratados con His y de $27.66 \pm 0.90 \mu\text{g/ml}$ en aquellos contraídos con AA. El extracto de *Hibiscus uncinellus* mostró efecto relajante con una potencia de $39.87 \pm 2.16 \mu\text{g/ml}$ en los tejidos precontraídos con His y de $47.11 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ en los tratados con AA. *Larrea tridentata* fue la especie más activa con valores de CI_{50} de 11.86 ± 0.30 y de 28.41 ± 2.23 en los tejidos tratados con His y AA respectivamente. *Lippia dulcis* tuvo una CI_{50} de 36.26 ± 2 con His y no inhibió los tejidos contraídos con AA. *Oenothera rosea*, especie medicinal empleada en el tratamiento de golpes y heridas, relajó el tejido contraído con His con una CI_{50} de 15.75 ± 0.44 y de 46.44 ± 2.31 para el AA. En otra serie de experimentos fue evaluado el extracto etanólico de *Rubus coriifolius*, la CI_{50} observada con His fue de $22.48 \pm 0.70 \mu\text{g/ml}$; posteriormente otro grupo de anillos de tráquea fue precontraído con AA y la CI_{50} fue de $49.11 \pm 1.58 \mu\text{g/ml}$. Finalmente, el extracto de *Sphaeralcea angustifolia* mostró una CI_{50} de 18.59 ± 1.14 con His y de 91.07 ± 4.8 con AA (Fig. 6 y 7). La selección del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* para la realización de los estudios siguientes se basó fundamentalmente en la información etnobotánica que identifica a esta planta como remedio empleado para tratar el asma y por su efecto relajante sobre la musculatura lisa de la tráquea contraída con el AA. En presencia de 6 mM de L-cisteína, el extracto inhibió la respuesta inducida con 1×10^{-6} M de LTD₄ con una potencia $CI_{50} = 8.3 \pm 0.35$.

Efecto de los extractos evaluados en tejidos pre-contraidos con His

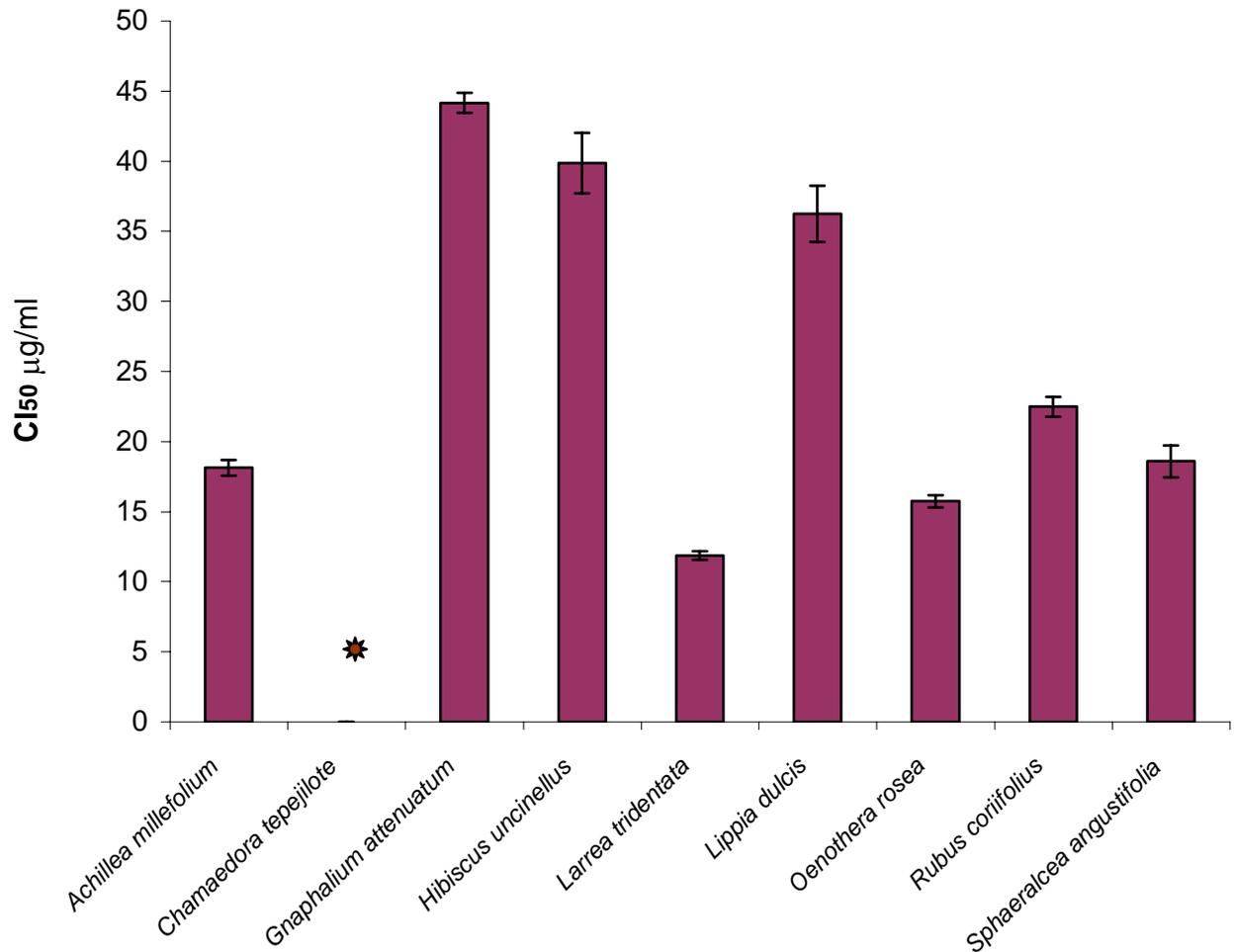


Fig 6 – Efecto inhibitor de los nueve extractos vegetales seleccionados sobre la respuesta contráctil inducida con His ($1 \times 10^{-7} M$) en el músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados para los extractos de cada especie se expresan como la CI_{50} ($\mu g/ml$). Los valores en la gráfica corresponden al promedio \pm E.S.M. de $n=5-8$ tejidos.

* = Extracto sin efecto relajante

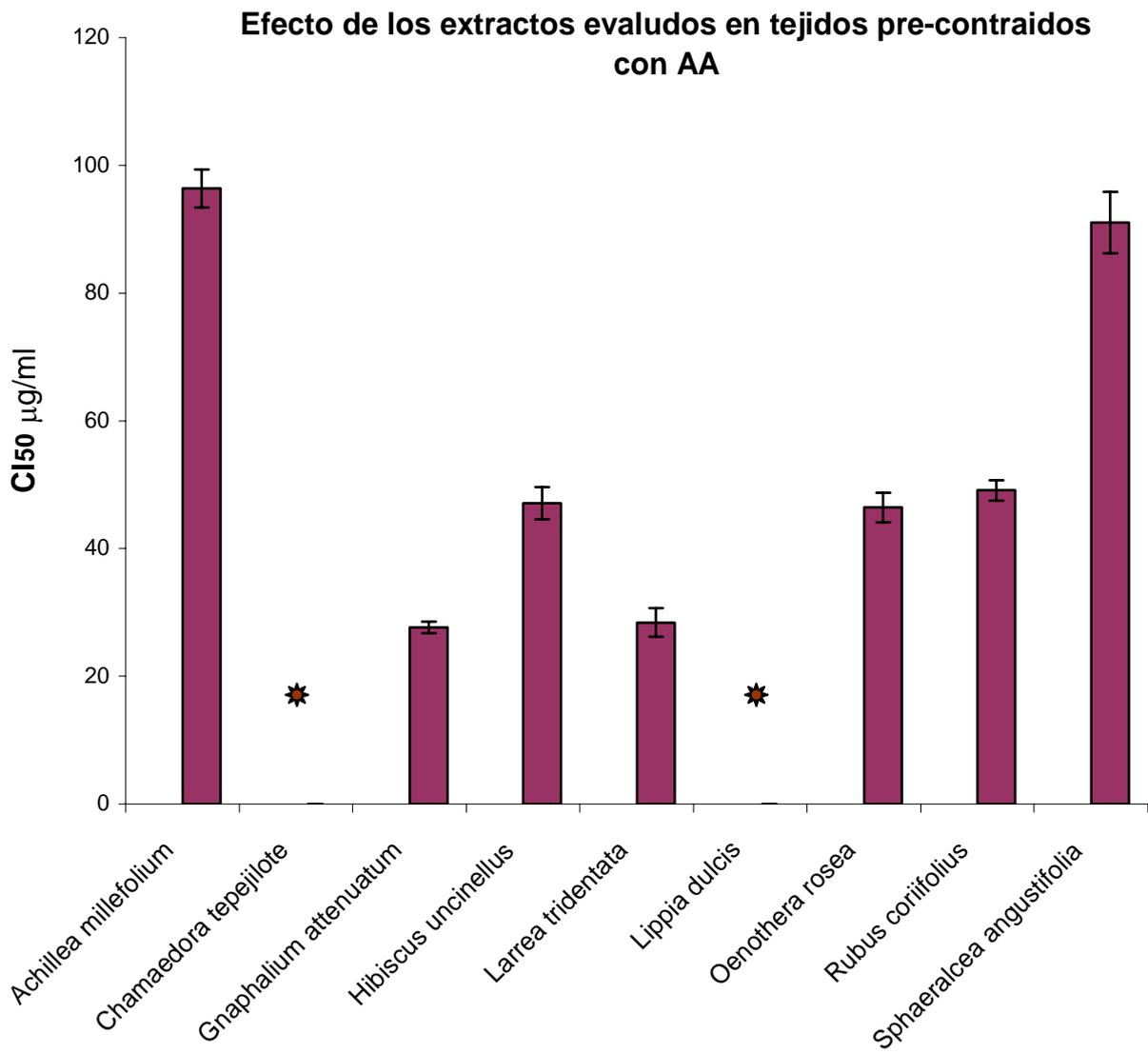


Fig 7 – Efecto inhibitor de los nueve extractos vegetales seleccionados sobre la respuesta contráctil inducida con AA ($1 \times 10^{-7} M$) en el músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados para los extractos de cada especie se expresan como la CI_{50} ($\mu g/ml$). Los valores en la gráfica corresponden al promedio \pm E.S.M. de $n=5-8$ tejidos.

* = Extracto sin efecto relajante

6.2- Efecto del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre las curvas concentración-respuesta de LTD₄

La Fig. 8 ilustra el efecto del extracto metanólico de *G. attenuatum* sobre las curvas concentración-respuesta de LTD₄ en preparaciones con músculo liso de la tráquea de cobayo. De manera concentración dependiente, el extracto inhibió la respuesta contráctil inducida con LTD₄, provocando un desplazamiento de las curvas hacia la derecha (antagonismo) y disminuyendo el E_{max} a partir de una concentración del extracto de 75 µg/ml.

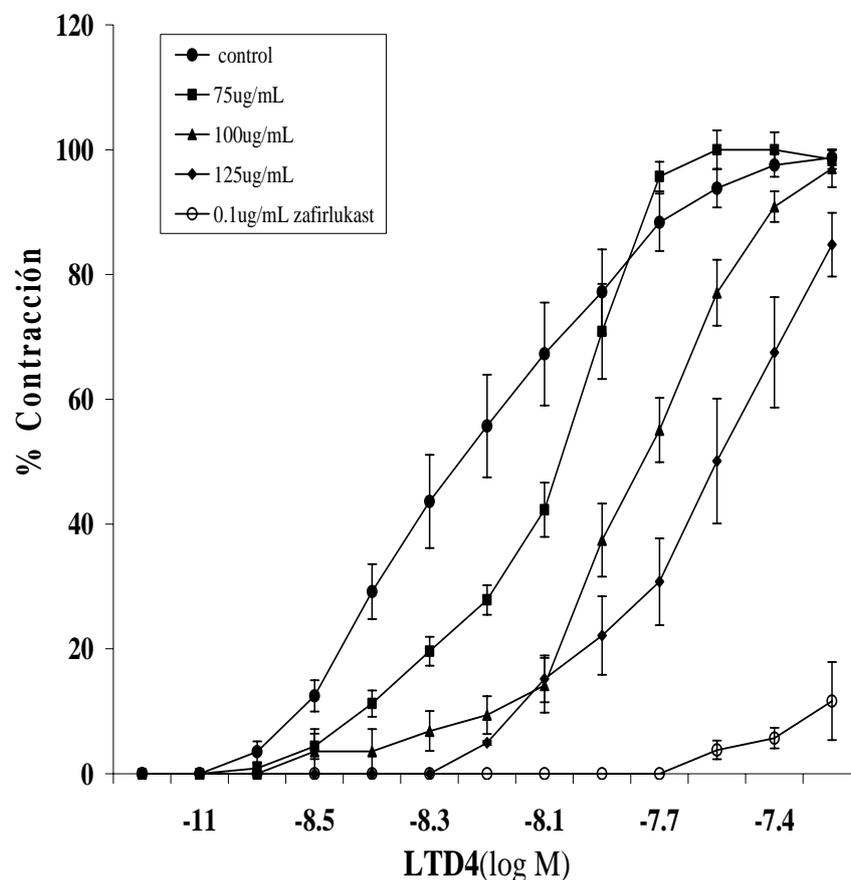


Fig 8 - Efecto del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre la curva concentración-respuesta de LTD₄ en preparaciones con músculo liso de la tráquea de cobayo. Los tejidos fueron preincubados con L-cisteína 6 mM e indometacina 1 mM. Los resultados son expresados como porcentaje con respecto a la respuesta máxima observada en los tejidos contraídos con 60 mM de KCl. Los valores representan la media ± E.S.M. de cinco experimentos. Control (●); 75 µg/ml (■); 100 µg/ml (▲) y 125 µg/ml (◇) de extracto; 0.1 µg/ml zafirlukast (○).

La tabla 7 muestra los valores pD_2 ($-\log D_{50}$) y E_{max} (%) calculados para las preparaciones control, con las diferentes concentraciones del extracto (75, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$), así como con zafirlukast, el agente antiasmático utilizado como referencia en el estudio.

| | n | pD_2 | E_{max} (%) |
|---|---|-----------------|------------------|
| Control | 8 | 8.24 ± 0.06 | 98.75 ± 1.25 |
| 75 $\mu\text{g/ml}$ | 5 | 8.12 ± 0.03 | 98.46 ± 1.53 |
| 100 $\mu\text{g/ml}$ | 6 | 7.84 ± 0.05 | 97.00 ± 2.99 |
| 125 $\mu\text{g/ml}$ | 4 | 7.61 ± 0.09 | 84.80 ± 5.10 |
| zafirlukast (0.05 $\mu\text{g/ml}$) | 4 | 6.63 ± 0.79 | 38.61 ± 2.37 |

Tabla 7.- Valores pD_2 y E_{max} (%) del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola*, calculados con base en las diferentes concentraciones de extracto empleado (75, 100 y 125 $\mu\text{g/ml}$) sobre las curvas concentración respuesta de LTD_4 . Los valores son expresados como la media \pm E.S.M.

6.3- Efecto del LTD₄, extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* y la mezcla de ambos sobre la actividad de las enzimas SDH, COX y ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo.

La actividad de la succinato deshidrogenasa de las mitocondrias de hígado no mostró cambios con respecto a sus valores basales a las concentraciones de 1 y 1.5 nmoles de LTD₄. Sin embargo, la adición de 2 y 3 nmoles inhibió la actividad en un 50 %. Con respecto al porcentaje de actividad de el músculo liso, los resultados indican una inhibición similar al caso anterior desde la primera concentración (1 nmol de LTD₄), dicho efecto fue similar con las subsecuentes concentraciones utilizadas (Fig. 9).

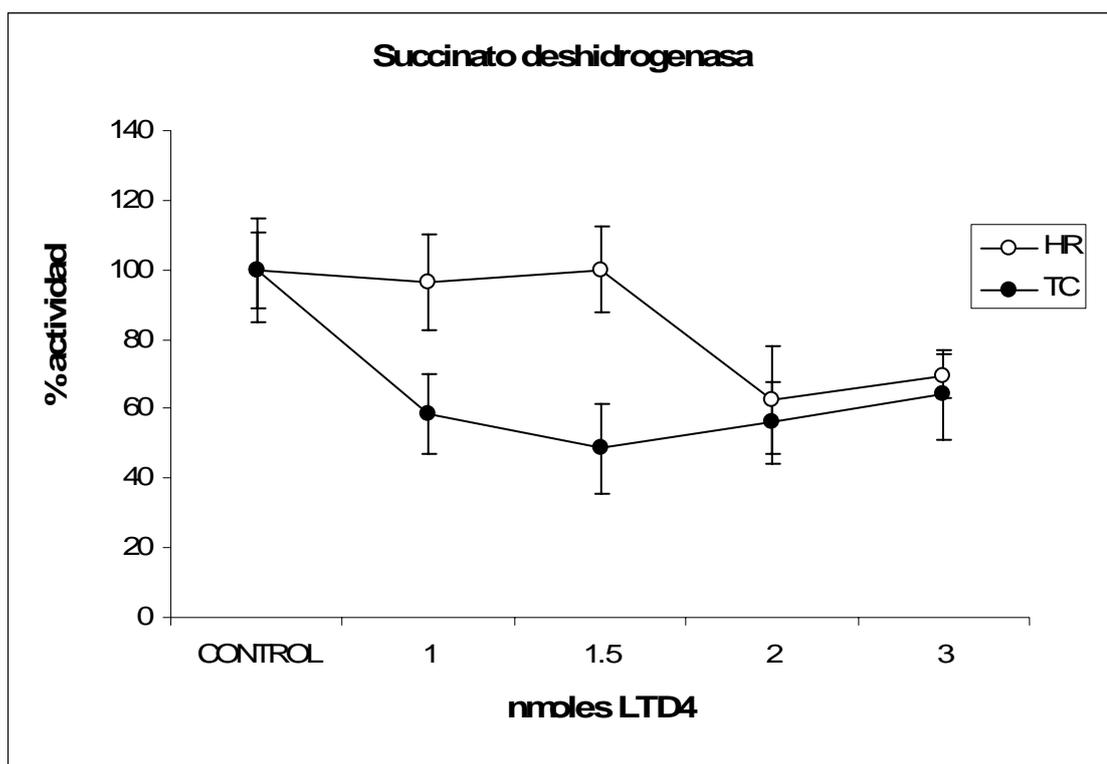


Fig 9 – Efecto de las diferentes concentraciones de LTD₄ sobre la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos ± D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). p <0.01

La evaluación del extracto de *Gnaphalium attenuatum* sobre la SDH de las mitocondrias aisladas del hígado mostró una inhibición en la actividad de 45-50% con todas las concentraciones utilizadas. La combinación LTD₄-extracto (2 nmoles y 81 µg respectivamente) presentó el mismo efecto. Por otra parte, en la fracción celular del músculo liso se observaron resultados muy parecidos. El disolvente utilizado como vehículo (8 µl DMSO), no tuvo una diferencia significativa con respecto a los grupos control (Fig. 10).

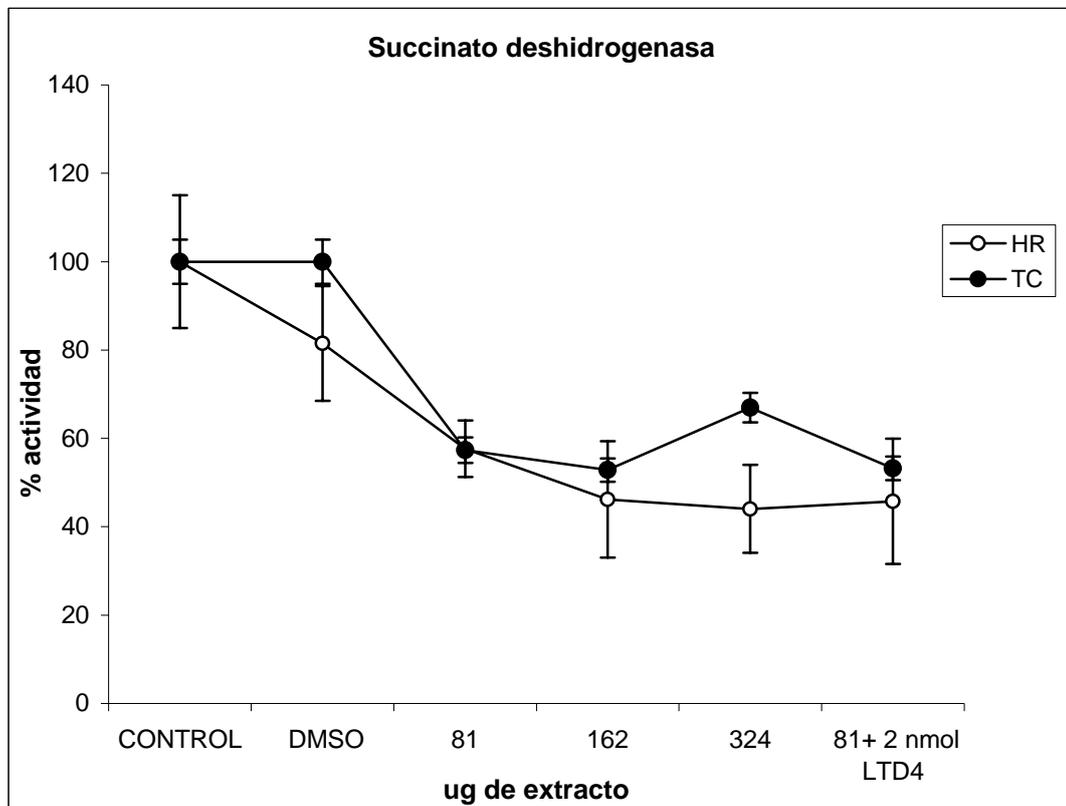


Fig 10 - Efecto de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Gnaphalium* y de la combinación LTD₄-extracto (2 nmoles + 81µg respectivamente), sobre la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos ± D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). $p < 0.01$

El análisis comparativo del LTD₄, el extracto de *Gnaphalium* y la combinación de ambos productos sobre la succinato deshidrogenada de tráquea de cobayo muestra en todos los casos una inhibición de la actividad de la enzima en un 40% y no existe diferencia significativa entre ellos (Fig. 11).

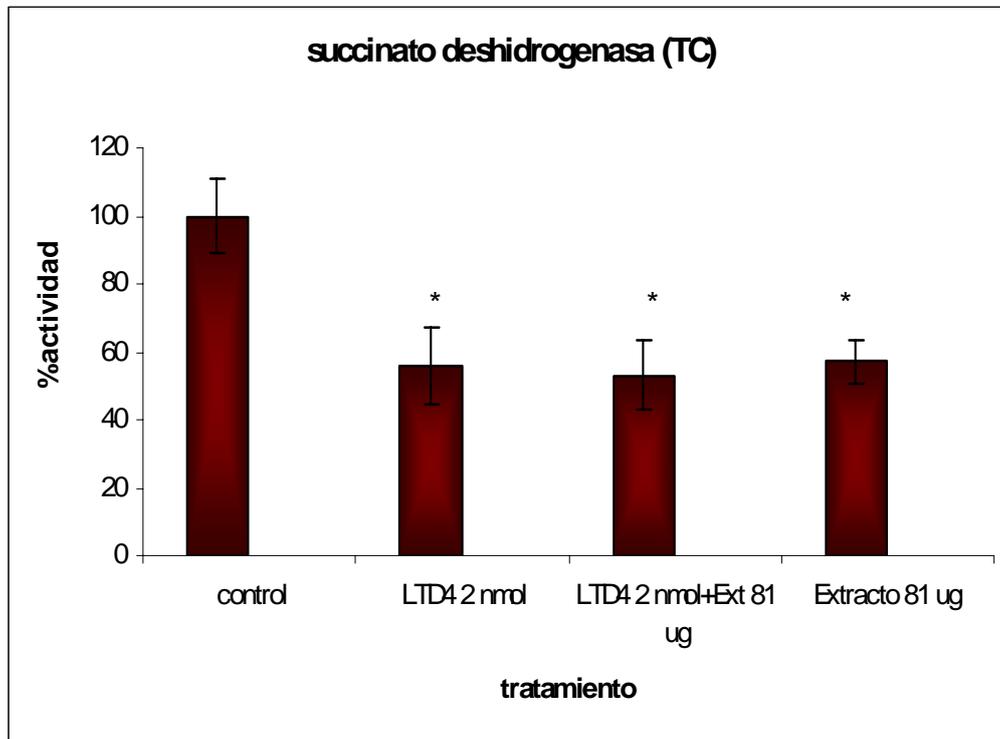


Fig 11 – Efecto del LTD₄ (2nmol), LTD₄ (2 nmol) + Extrato (81 μg) y Extracto solo (81μg) sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa de tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos ± D.S. (TC=tráquea de cobayo). *=diferencia significativa con respecto al grupo control p <0.01

Las concentraciones de LTD₄ evaluadas sobre la actividad de la citocromo c oxidasa de mitocondrias de hígado provocaron un incremento no significativo en la actividad enzimática. Al igual que en el hígado, la COX del músculo liso no presentó una gran diferencia con respecto a los controles (Fig. 12).

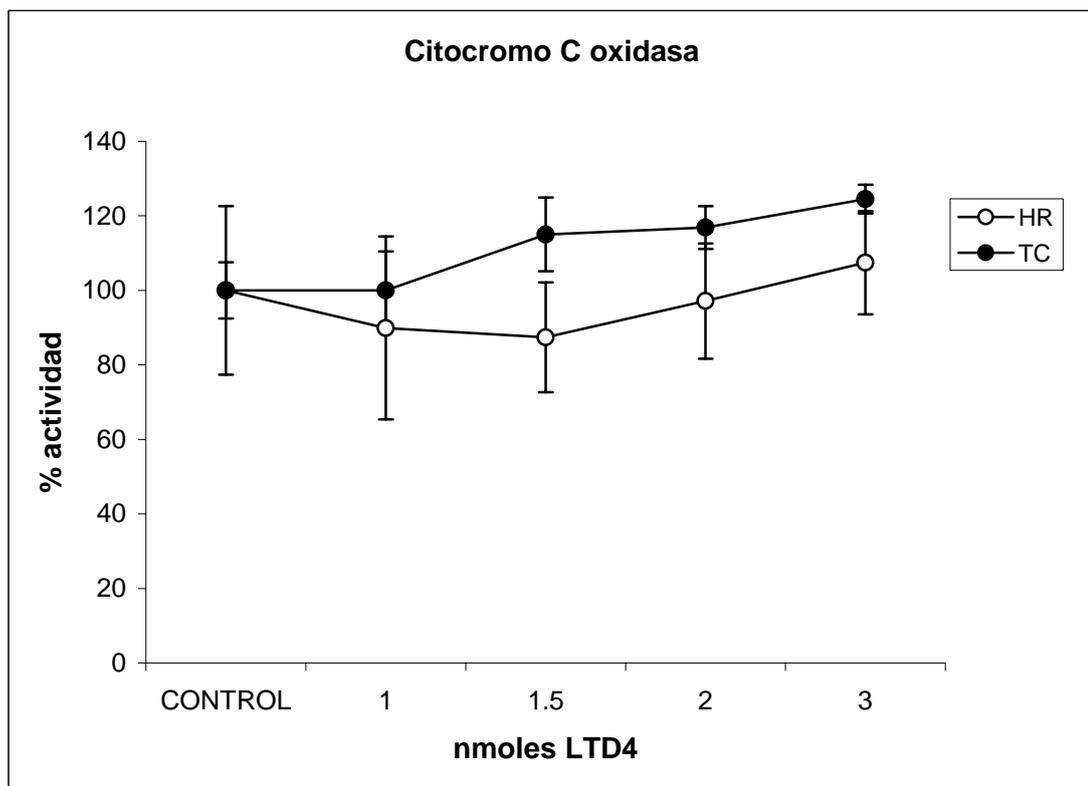


Fig 12 – Efecto de las diferentes concentraciones de LTD₄ evaluadas, sobre la actividad de la citocromo c oxidasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos \pm D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). $p < 0.01$

El extracto vegetal indujo un ligero efecto inhibitorio sobre la actividad de la citocromo c oxidasa de hígado de rata a la concentración de 324 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de proteína, el cual no fue significativo con relación al grupo control. La combinación LTD₄+extracto (3 nmoles y 324 μg respectivamente) tuvo un efecto similar al de 324 μg de extracto. En el caso de la citocromo c oxidasa de la fracción celular de tráquea, no se observaron cambios significativos con respecto a la actividad basal (Fig. 13).

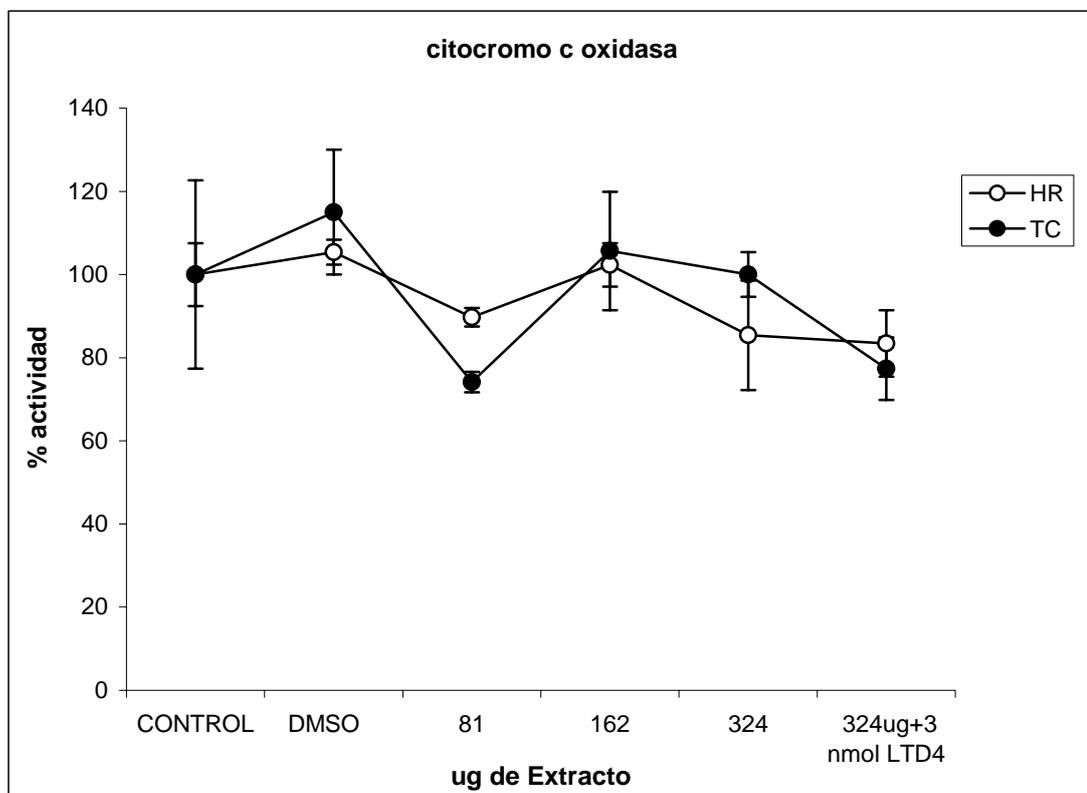


Fig 13 – Efecto de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Gnaphalium* y de la combinación LTD₄-extracto (3 nmoles + 324 μg respectivamente), sobre la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada diferente tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos \pm D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). $p < 0.01$

La citocromo c oxidasa de tráquea de cobayo no fue afectada en su actividad por el leucotrieno LTD₄ (3 nmol), el extracto metanólico de *Gnaphalium* (324 µg) tampoco ejerció algún efecto sobre su actividad, sin embargo, la combinación de ambos productos afectó ligeramente los valores basales de esta enzima (Fig. 14).

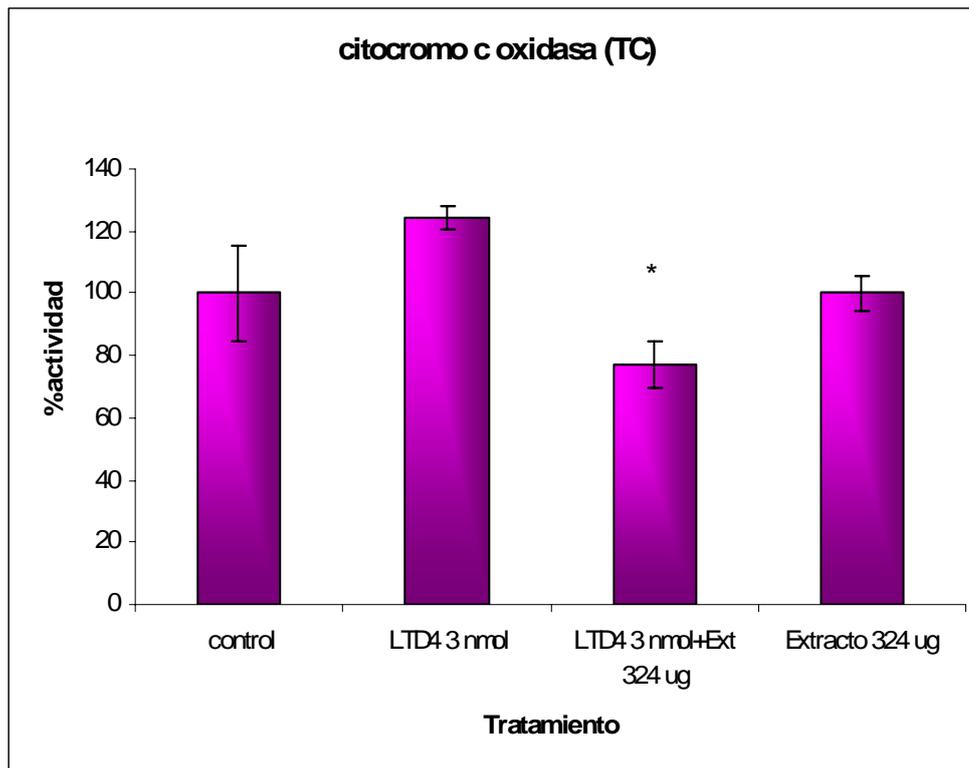


Fig 14 - Efecto del LTD₄ (3nmol), LTD₄ (3 nmol) + Extrato (324 µg) y Extracto solo (324µg) sobre la actividad de la citocromo c oxidasa de tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos ± D.S. (TC=tráquea de cobayo). *=diferencia significativa con respecto al grupo control p <0.01

Al evaluar la actividad hidrolítica de la ATPasa de mitocondrias de hígado de rata se observó que las concentraciones de LTD₄ probadas no afectan la actividad de la enzima. Por el contrario, la actividad de la ATPasa presente en el músculo liso de la tráquea de cobayo tuvo un incremento del 80% con las concentraciones de 1.5 y 2 nmoles de LTD₄. A partir de la concentración de 3 nmoles comenzó a detectarse un efecto inhibitorio (Fig. 15).

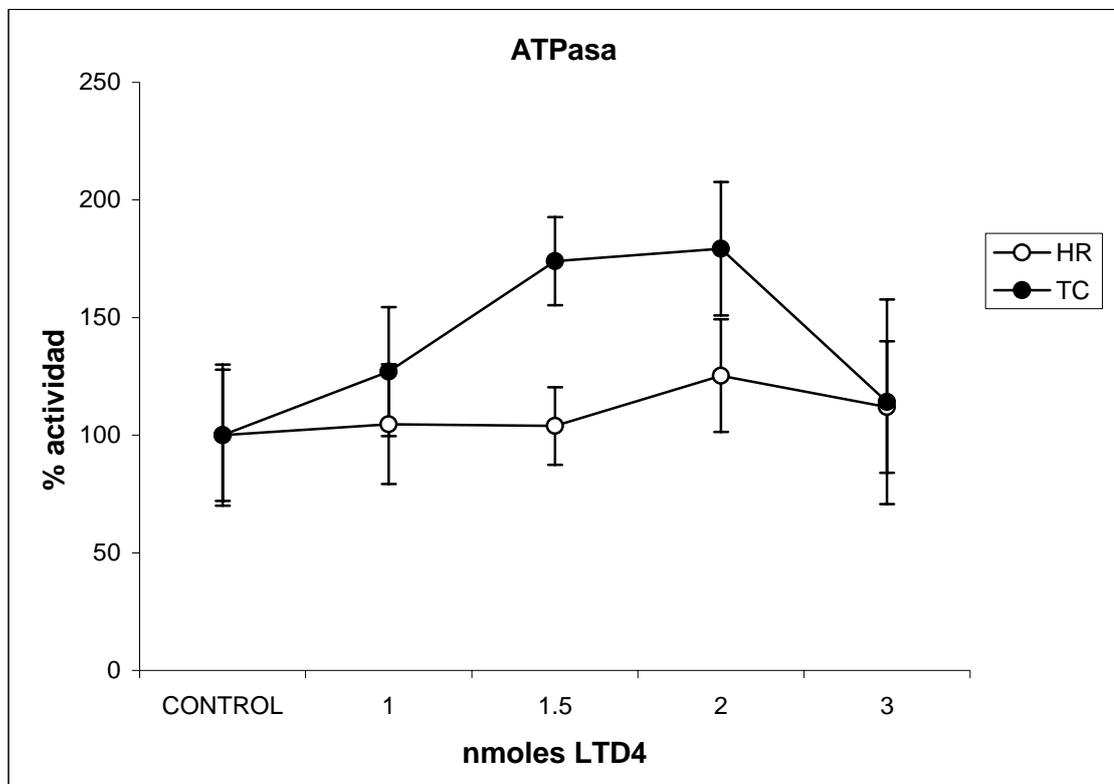


Fig 15- Efecto de las diferentes concentraciones de LTD₄ evaluadas, sobre la actividad de la ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada diferente tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos ± D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). p < 0.01

El extracto a las concentraciones de 81 y 162 μg , elevó la actividad de la ATPasa de mitocondrias de hígado en un 200%; pero a la concentración de 364 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de proteína comenzó a tener un efecto inhibitorio. La combinación de ambos productos (2 nmoles de LTD_4 y 162 μg de extracto) indujo un incremento ligeramente superior al 100% de la actividad con respecto al grupo control. Por lo que se refiere a la actividad enzimática presente en el músculo liso, la concentración de 162 μg produjo un aumento de 297%. Al igual que en el caso del hígado 324 μg del extracto redujeron la actividad enzimática. La combinación LTD_4 +extracto mantuvo valores cercanos al grupo control (Fig. 16).

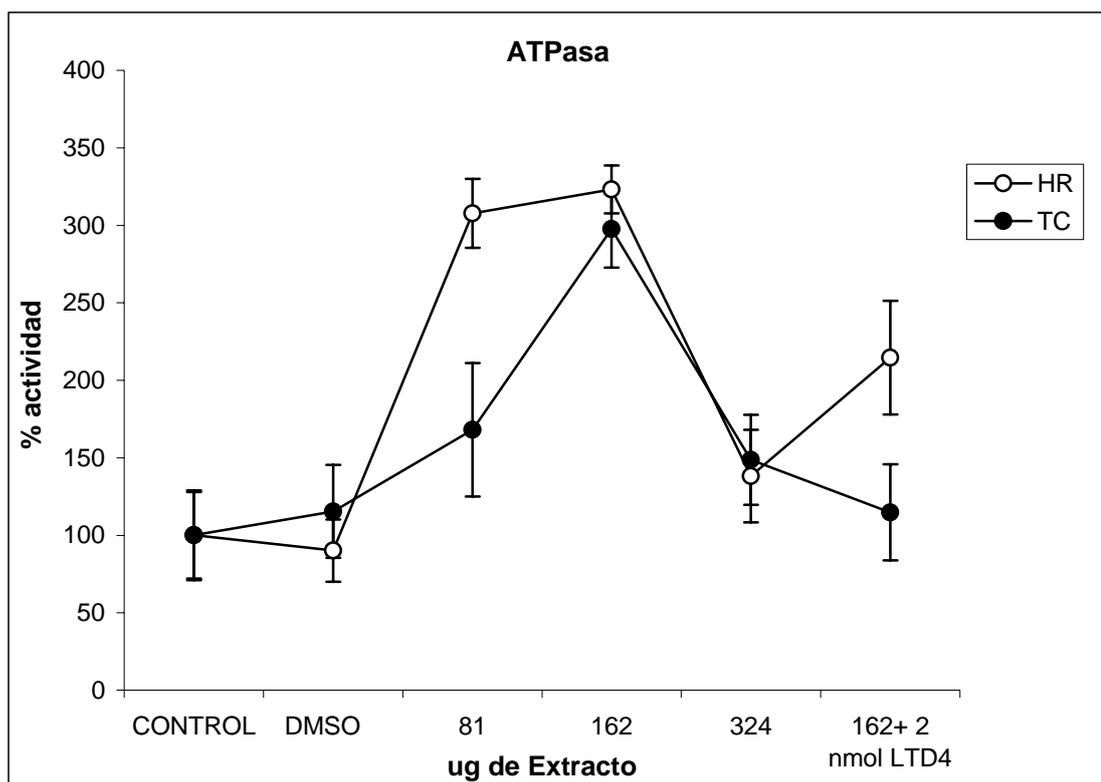


Fig 16 – Efecto de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Gnaphalium* y de la combinación LTD_4 -extracto (2 nmoles + 162 μg respectivamente), sobre la actividad de la ATPasa de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada diferente tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos \pm D.S. (HR=hígado de rata; TC=tráquea de cobayo). $p < 0.01$

La actividad hidrolítica de la ATPasa fue estimulada por el extracto metanólico de *Gnaphalium* a una concentración de 162 $\mu\text{g/ml}$. El LTD_4 no afectó de manera significativa la actividad de esta enzima. La combinación de ambos productos estabilizó la actividad de la enzima y sus valores fueron similares a los del grupo control (Fig. 17).

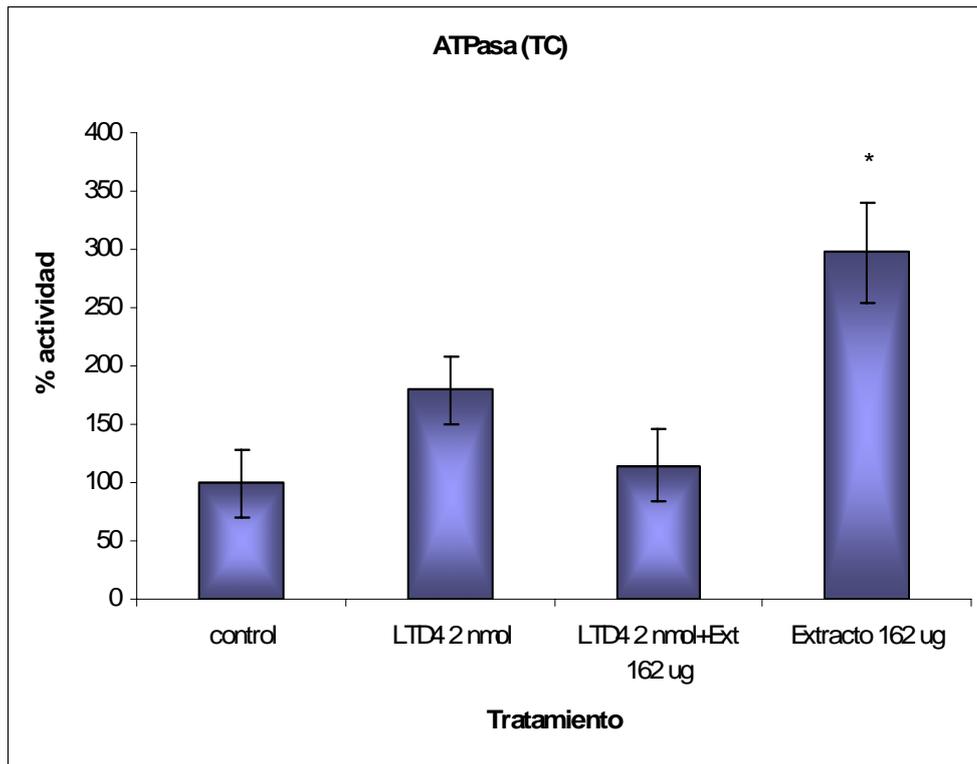


Fig 17 - Efecto del LTD_4 (2nmol), LTD_4 (2 nmol) + Extrato (162 μg) y Extracto solo (162 μg) sobre la actividad de la ATPasa de tráquea de cobayo. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad con respecto al grupo control de cada tejido. Los datos corresponden a un mínimo de 3 experimentos \pm D.S. (TC=tráquea de cobayo). *=diferencia significativa con respecto al grupo control $p < 0.01$

6.4- Evaluación del LTD₄ y del extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* sobre la síntesis de ATP de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la fracción celular del músculo liso de la tráquea de cobayo.

La producción de ATP fue determinada utilizando 12 mM de succinato como sustrato. La fracción celular de la tráquea de cobayo sintetizó 17 nmol de ATP/ min/ mg de proteína. Este valor disminuyó en un 75% cuando se adicionaron 2 nmol/ml de LTD₄. A su vez, el extracto metanólico disminuyó la síntesis de ATP en más del 80%. Las mitocondrias de hígado de rata produjeron 72 nmoles de ATP/ min / mg proteína y mostraron un comportamiento similar al de la fracción celular de tráquea ya que tanto el LTD₄ como el extracto redujeron la síntesis de ATP, aunque su efecto en este modelo fue menor con 62 y 75 % de inhibición respectivamente (tabla 8).

| Concentración | Tráquea de cobayo nmolATP/min/ mg proteína | Hígado de rata |
|---|---|----------------|
| Control | 17.02 ± 1.78 | 71.71 ± 8.75 |
| 2 nmol LTD ₄ | 4.28 ± 0.95 | 26.96 ± 6.24 |
| 162 µg extracto <i>Gnaphalium attenuatum</i> | 3.07 ± 0.52 | 17.86 ± 2.64 |

Tabla 8.- Efecto de el LTD₄ y el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylicola* en la síntesis de ATP (nmol ATP/min/mg proteína). Los valores son expresados como la media ± D.S. de tres experimentos. p <0.01

VII- DISCUSION

Como toda fuente natural, las plantas medicinales constituyen un recurso valioso que es necesario explorar con el propósito de descubrir nuevos fármacos, antiinflamatorios. Actualmente, se ha puesto especial énfasis en aquellos agentes terapéuticos que tienen la propiedad de bloquear receptores de cisteinil leucotrienos o bien, de inhibir la síntesis de estos eicosanoides. Estos antecedentes se tomaron como punto de partida para la propuesta del presente trabajo.

En la investigación de plantas medicinales buscando especies con una actividad biológica en particular, es habitual llevar a cabo un rastreo farmacológico previo de varias especies. El análisis posterior de los resultados obtenidos en el rastreo permite llevar a cabo una selección adecuada de la planta que se someterá a estudios más específicos. En los bancos de información etnobotánica sobre la flora medicinal de México, un grupo muy reducido de plantas se menciona como “antiinflamatorias”, entre ellas, *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola*. De las nueve plantas sometidas al rastreo farmacológico, la mayoría de las plantas habían sido seleccionadas con base en un estudio reportado sobre plantas de México con actividad antiinflamatoria (*Achillea millefolium*, *Chamaedora tepejilote*, *Larrea tridentata*, *Lippia dulcis*, *Oenothera rosea*, *Rubus coriifolius* y *Sphaeralcea angustifolia*) (Guajardo, 2001; David, 2002; Nava, 2002; Meckes y col., 2004; Pérez y col., 2005); en el estudio se incluyó a *Hibiscus uncinellus*, por las propiedades antiespasmódicas descritas por Tortoriello y col., 1995.

En esta primera fase del estudio se valoró la actividad de los extractos crudos de las especies seleccionadas sobre la musculatura lisa traqueal del cobayo *in vitro*. Los resultados demostraron que los extractos de 8 especies inhibían la respuesta contráctil de los anillos inducida con histamina. El extracto de *Chamaedora tepejilote* no tuvo efecto en este modelo, pero los extractos del resto de las especies presentaron actividad relajante con valores $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$. Asimismo, los extractos de *Chamaedora tepejilote* y de *Lippia dulcis* tampoco inhibieron la contracción inducida con ácido araquidónico, extractos que han demostrado en estudios anteriores poseer actividad antiedematosa en la fase del proceso de inflamación aguda que se caracteriza por la liberación de mediadores químicos como la histamina, serotonina, derivados del ácido araquidónico, etc. (David 2002; Meckes y col., 2004; Pérez y col., 2005). Del resto de las especies sometidas al ensayo, los extractos de *Gnaphalium attenuatum var sylvicola* y de *Larrea tridentata* fueron los que inhibieron con mayor potencia la contracción inducida con AA (CI_{50} de 27.66 y 28.41 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente).

Debido a que los cisteinil leucotrienos como el LTD_4 son considerados los principales mediadores químicos involucrados en la patología del asma, el empleo de fármacos capaces de modular el mecanismo de acción de estos compuestos constituye un nuevo tipo de agente terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad (Drazen, 1999; Dahlen, 2006). Los antecedentes reportados en la literatura señalan que el ácido nordihidroguayarático presente en *Larrea tridentata* posee propiedades antioxidantes (Chang, 1999), hipoglucemiantes (Reed y col., 1999; Luo y col., 1998), anticancerígenas (McDonald y col., 2001) e inhibitorias sobre la actividad de la enzima 5-lipooxigenasa (Schwalm y col., 1987). El compuesto es utilizado con

frecuencia como fármaco de referencia en la evaluación de compuestos o extractos de plantas con actividad antiinflamatoria (Della Loggia y col., 1988). Dado que *Larrea tridentata* es una especie ya reportada como antagonista de leucotrienos, se decidió en el presente trabajo seleccionar a *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* para determinar su potencial actividad antagonista sobre LTD₄ y valorar los efectos que presenta a nivel de la fosforilación oxidativa de la mitocondria.

Diferentes especies pertenecientes al género *Gnaphalium* han sido ampliamente utilizadas para tratar afecciones respiratorias, entre ellas el asma. Los resultados en este estudio demostraron que el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* inhibe las contracciones inducidas con LTD₄ en preparaciones *in vitro*, el leucotrieno ha sido descrito como un potente agente broncoconstrictor del músculo liso de las vías aéreas del humano (Dahlen y col., 1980). Algunos estudios realizados con células obtenidas del músculo liso de la tráquea de cobayo demuestran que LTD₄ incrementa [Ca²⁺]_i vía el influjo de Ca²⁺ extracelular, fenómeno que es mediado por la unión del leucotrieno a su receptor (Dumitriu y col., 1997; Dahlen, 2000). En el presente trabajo se reporta que el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* en concentraciones de 75, 100 y 125 µg/ml produjo un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de LTD₄ lo que indicaría un efecto de tipo antagonista. Concentraciones superiores a 75 µg/ml de extracto producen una disminución del efecto máximo. La actividad broncodilatadora demostrada podría explicar en parte el uso tradicional que tiene la planta para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Asimismo, aunque no existen estudios químicos que indiquen el tipo de compuestos que se encuentran presentes en esta especie, existen investigaciones fitoquímicas que reportan la presencia de flavonoides y diterpenos como los constituyentes mayoritarios para este género (Maruyama y col., 1974; Escarria y col., 1977; Torrenegra y col., 1980, 1992; Bohlmann y Ziesche, 1980; García y col., 1982; Guerreiro y col., 1982; Meragelman y col., 2003; Konopleva y col., 2006). Los flavonoides son compuestos químicos de naturaleza hidrosoluble y se sabe que existe una relación entre la estructura química de los flavonoides y el efecto relajante que presentan sobre la musculatura lisa de la tráquea de cobayo (Ko y col., 2003), por lo que el efecto antagonista del extracto metanólico de *Gnaphalium* podría también atribuirse a la presencia de este grupo de compuestos químicos.

El LTD₄ es un potente agente broncoconstrictor del músculo liso de las vías aéreas y sus efectos fisiológicos han sido ampliamente estudiados, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de las consecuencias que su presencia tiene sobre la función mitocondrial en este tipo de tejido. En el presente estudio se valoró el efecto que el LTD₄ y el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* tienen sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial del músculo liso de la tráquea de cobayo. Dado que el músculo liso traqueal no es abundante en el cobayo y contiene pocas mitocondrias, los experimentos descritos en este trabajo se realizaron con la fracción mitocondrial de 756xg, que de acuerdo con Fischer y col., 1985, mantiene la actividad de los complejos de la cadena respiratoria de manera similar a la de las mitocondrias aisladas.

En la literatura científica son pocos los reportes sobre la actividad de la fosforilación oxidativa mitocondrial en el músculo liso. Por ejemplo, Gauteon y col., (1961) indican una relación P/O extremadamente baja en preparaciones mitocondriales de útero y Stephens & Wrogemann (1970) reportan 1.4 nmoles de ADP fosforilado /min/ mg de peso húmedo en este tejido. En el presente trabajo, los valores basales de la actividad enzimática evaluada se encuentran en el rango; sin embargo, fueron menores a los obtenidos con mitocondrias aisladas de hígado de rata, preparación que fue incluida como una referencia.

El consumo de oxígeno por parte de la mitocondria es indispensable para la generación de ATP, la disminución de este elemento compromete la sobrevivencia celular. La mitocondria es considerada un probable sitio sensor de los niveles de oxígeno y se ha propuesto que, como respuesta a un estado de hipoxia, la cadena transportadora de electrones es la que regula estos niveles induciendo la salida de los radicales libres (Guzy y Schumacker, 2006).

Como fue mencionado, el proceso de contracción y relajación en el músculo liso depende de la interacción que se establece entre los filamentos de actina y miosina. En este proceso, la célula utiliza la energía que es liberada durante la hidrólisis del ATP. La fosforilación de la cadena ligera de la miosina es un factor determinante en la contracción muscular; ante un estado de hipoxia, la actividad mitocondrial se inhibe produciéndose un descenso de los niveles de ATP citosólico y consecuentemente, la disminución de la capacidad que tiene la cadena de fosforilarse (Wingard y col., 1994; Obara y col., 1997; Taggart y col., 1997).

A su vez, al evaluar los efectos que produce el LTD₄ sobre la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial, se observó una inhibición parcial de la síntesis del ATP lo que permite asumir que este mediador proinflamatorio afecta de manera indirecta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. Por otra parte, se demostró que el extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* antagoniza las contracciones inducidas con LTD₄ e inhibe parcialmente la cadena respiratoria, consecuentemente también resulta ser un inhibidor de la síntesis de ATP. La combinación extracto-LTD₄ mostró el mismo perfil descoplante sobre la función mitocondrial.

Los ácidos grasos de cadena larga presentes en la membrana como es el caso del ácido araquidónico están esterificados y, en pequeñas proporciones, se encuentran en estado libre. Según su concentración, estos compuestos se comportan como protonóforos capaces de inducir daños estructurales en la membrana mitocondrial. Se ha reportado que concentraciones micromolares del AA poseen un efecto de tipo desacoplante sobre los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial, el efecto es atribuido al eflujo de protones desde la membrana mitocondrial hacia el citosol (Andreyev y col., 1989; Wojtezak y Schonfeld, 1993).

El LTD₄ (un ácido graso derivado del AA) sobre la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP produjo mayor inhibición de la succinato deshidrogenada y estimulación de la actividad de la ATPasa en la fracción mitocondrial de la tráquea de cobayo que en las mitocondrias aisladas de hígado de rata. Probablemente, como consecuencia del número tan bajo de mitocondrias, la fracción es más sensible a la acción del leucotrieno. En el caso de las mitocondrias aisladas de hígado de rata, se ha

reportado que éstas son metabólicamente muy activas y presentan mayor resistencia. A su vez, la inhibición parcial de la cadena respiratoria observada en la fracción mitocondrial y las mitocondrias aisladas produjo una importante disminución de la síntesis de ATP.

El fraccionamiento químico del extracto para identificar los compuestos responsables de la actividad desacoplante a nivel mitocondrial que posee *Gnaphallium attenuatum* abre nuevas perspectivas en el estudio de las propiedades atribuidas a la planta y permitirá definir las potencialidades reales que tiene la especie como un agente antiasmático.

VIII- CONCLUSIONES

- 1.-De las nueve especies seleccionadas, los extractos metanólicos de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* y *Larrea tridentata* fueron los que mostraron mayor actividad relajante *in vitro* en tejidos de tráquea de cobayo precontraídos con His y AA.
- 2.-El extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* antagoniza la respuesta contráctil de LTD₄, uno de los importantes mediadores proinflamatorios en el proceso asmático.
- 3.-*Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* constituye un candidato potencial para la búsqueda de compuestos con actividad antiasmática.
- 4.-El extracto metanólico de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* y el LTD₄ inhibieron parcialmente la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y la síntesis del ATP en la fracción mitocondrial del músculo liso traqueal del cobayo.
- 5.-En comparación con las mitocondrias de hígado de rata, la actividad de la fracción mitocondrial del músculo liso traqueal del cobayo mostró mayor sensibilidad a los tratamientos realizados con LTD₄ y con el extracto de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola*

6.-El Efecto antagonista del extracto de *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* sobre el mediador proinflamatorio LTD₄, justificaria en parte, el uso popular atribuido a la planta como remedio antiasmático.

7.- Para definir las potencialidades reales que ofrece *Gnaphalium attenuatum* var. *sylvicola* como agente antiasmático, es necesario en una siguiente etapa, evaluar sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial, los efectos que producen las fracciones o compuestos responsables de la actividad antileucotrieno.

IX-ANEXO

Antecedentes sobre las especies vegetales seleccionadas para el estudio

La información etnobotánica, química y farmacológica anteriormente mencionada permitió la selección de nueve especies vegetales para su evaluación como “probables antiasmáticos”. Únicamente una de las especies cuenta con información etnobotánica sobre su utilización para tratar el asma; las plantas restantes fueron seleccionadas con base en los reportes que indican su uso popular como antiinflamatorio (un elemento importante en el asma). A continuación se presentan los antecedentes de estas especies, destacando su sinonimia científica, nombres populares, descripción botánica, información etnobotánica, así como aspectos químicos y farmacológicos.



Achillea millefolium L

Descripción botánica

Planta perteneciente a la familia Compositae, conocida popularmente con los nombres de ciento en rama, mil en rama, plumajillo, plumajo, plumilla, real de oro (Aguilar y col., 1998). Hierba perenne de 30 cm a 1 m de altura, de tallos vellosos con hojas partidas de 5 a 15 cm de largo que semejan plumas, sus flores son blancas y muy abundantes. Se encuentra distribuída en zonas templadas del país y es aromática con un olor agradable (Aguilar y col., 1998).

Información etnobotánica

La medicina tradicional indica su uso para combatir la tos, tos con flemas, tos ferina, alteraciones del ciclo menstrual y afecciones gastrointestinales (Aguilar y cols., 1994). Las hojas colocadas alrededor de la oreja se utilizan para tratar el dolor de oído (Aguilar y col., 1998). Además, se emplea para padecimientos gastrointestinales: “empacho”, dolor de estómago, diarrea con sangre, disentería, vómito, espasmos intestinales, “latido” (contracciones musculares repetidas), esterilidad, dolor de cabeza, insomnio, “bilis”. Una tintura sirve en casos de contusiones, la especie se usa también para tratar heridas, golpes, granos y llagas (Argueta y col., 1994).

Aspectos químicos

Los metabolitos aislados y caracterizados de esta especie incluyen más de 120 compuestos, entre ellos los alcaloides: achiceína, achilleína, achilletina, betaína, betonicina, colina, estaquidrina, homostaquidrina, moschatina, trigonelina; aminoácidos: ácido glutámico, alanita, histidina, leucina, lisina; alcaloides: isobutilamina, piperideidos; flavonoides: apigenina, luteolina, rutina (ramnoglucósido de quercetina), hispidulina (5,7,4'-tetrahidroxi-5'-metoxiflavona), 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona), casticita (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflav), artemetina (5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), nepetina, cirsilineol, cirsidiol, salvigenina, quercetina, 6-hidroxiluteolina-6,7,3',4'-tetrametil-éter; compuestos fenólicos simples como el ácido caféico y el ácido vainílico; los esteroides: β -sitosterol, sitosterol, 3 α -glucósido, campesterol, estigmasterol, colesterol. Así mismo, la especie contiene monoterpenos: allo-ocimeno, borneol, acetato de bornilo, canfeno, canfor, 1,8-cineol, cimeno, cuminaldehído, eugenol, limoneno, mentol, mirceno, α y β pinenos, sabineno, α -terpineno, terminen-4-ol, terpinoleno; sesquiterpenos: azuleno, cadineno, chamazuleno, ácido chamazulen-carboxílico, copaeno, farneseno, humuleno, ácido achillímico A, B y C; triterpenos α y β amirina, acetato de α amirina, taraxasterol, pseudos-taraxasterol y lactonas sesquiterpénicas: achillicina, achillina, hidroxiachillina, 8-acetoxiartabsina, 2,3-dihidrodeacetoximatricina, achillifolina, millefina, millefólido, balchanólido, acetilbalchanólido, dehidropartenólido, leucodina, matricarina, desacetil-matricarina, acrilina-8 α -acetoxi-artabsina y austriquina. (Chandler y col., 1982). Recientemente se reportó la presencia del 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (ramnocitrina) (Meckes y col., 2005)

Información farmacológica

La especie ha sido objeto de numerosas investigaciones biológicas, se ha reportado que posee actividad larvicida (Lalonde y col., 1980); antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Mycobacter phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (McCutcheon y col., 1992); repelente contra el mosquito *Aedes aegypti* (Tunón y col., 1994); antitumoral en pruebas *in vivo* con ratones P-338 con leucemia (Tozyo y col., 1994); antiespermatogénica en ratones (Montanari y col., 1998). El estudio químico farmacológico del extracto metanólico de las partes aéreas de *Achillea millefolium* administrado vía i.p. en dosis de 400 mg inhibió en un 65% el edema inducido con carragenina en la pata de la rata (Guajardo, 2001). El aceite esencial obtenido de las flores y aplicado tópicamente en ratas ejerció una acción antiinflamatoria (Goldberg y col., 1969).

Chamaedora tepejilote Liebm. Ex Mart.

Descripción botánica

Es conocida popularmente como palma camedor, palmilla, pacaya, palmillo dulce y tepejilote; especie miembro de la familia Palmae (Fichas Herbario IMSSM, García 142) (Morales y Toledo, 1987; López, 1988; Martínez, 1978). Palma de aproximadamente 3 a 5 m de altura con floración en invierno. El tallo es verde y delgado; las hojas son grandes (hasta 1 m de largo) y están divididas en hojuelas pequeñas que nacen desde el vértice central y presentan una línea de color amarillo en el envés. Las flores son amarillas o blancas en racimos que miden hasta 70 cm de largo. Sus frutos maduros son de color negro y con pedicelos rojos. Esta especie se distribuye en el país en climas cálidos entre los 420 y 540 msnm, asociada a bosque tropical perenifolio (Fichas Herbario IMSSM, García 142).

Información etnobotánica

En el estado de Veracruz esta especie es utilizada para combatir la tos seca. Mezclada con hierba dulce (*Lippia dulcis*) es preparada en infusión, que se toma como agua de tiempo. En el tratamiento de la pulmonía, los grupos totonacas y tepehuas de Mecapalapa Puebla, usan la decocción de las hojas mezcladas con canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y con la corteza de mora (*Morus Alba*) (Díaz, 1976; López, 1988).

Aspectos químicos

Compuestos triterpénicos como zeorina, lupeol, ácido oleanólico y el ácido betúlinico fueron aislados del extracto hexánico de esta especie; además de escualeno y ácido ursólico (Álvarez, 2002).

Información farmacológica

Evaluaciones farmacológicas indican que el ácido ursólico, por primera vez reportado para esta especie, inhibe el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en un 99.6% a una concentración de 100 µg/ml (Álvarez, 2002). La actividad antiinflamatoria de esta especie fue evaluada en el modelo del edema plantar inducido con carragenina, los valores reportados para el extracto acuoso indican una inhibición de 71% durante la fase temprana de este estudio (David, 2002).

Gnaphalium spp.

Descripción botánica

Genero perteneciente a la familia Compositae conocidas popularmente con los nombres de gordolobo, papa-coni, tzompotonic y tlacochich. Hierbas de 30 a 80 cm de altura, lanosas con hojas alternas, largas y angostas, inflorescencias terminales, agrupadas en cabezuelas amarillas y brillantes, involucre pluriseriado, brácteas escariosas y lustrosas; (Lara y Márquez, 1999). La planta es originaria de México, habita en clima templado entre los 2000 y 3000 msnm, se encuentra asociada a vegetación perturbada de pastizal, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino (Argueta y col., 1994).

Información etnobotánica

Las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente a este género se relacionan con la cura de padecimientos respiratorios como bronquitis, asma e irritación de la garganta (Veracruz); en el centro del país, el uso más frecuente de la planta es contra la tos. En el tratamiento de estos padecimientos se bebe la decocción de las partes aéreas. A su vez, se utiliza para lavar heridas y granos, estimular la circulación sanguínea y para tratar varices y hemorroides (Argueta y col., 1994).

Composición química

Las investigaciones fitoquímicas reportan la presencia de flavonoides y diterpenos como los constituyentes mayoritarios (Maruyama y col., 1974; Escarria y col., 1977; Torrenegra y col., 1980, 1992; Bohlmann y Ziesche, 1980; García y col., 1982; Guerreiro y col., 1982; Meragelman y col., 2003; Konopleva y col., 2006). Aunque acetilenos y carotenoides también han sido aislados (Bohlmann y Ziesche, 1980).

Información farmacológica

Estudios realizados con las flores de *Gnaphallium semiamplexicaule* reportan que el extracto acuoso no es activo en las preparaciones de músculo liso traqueal *in vitro*, pero relaja la contracción espontánea del ileon de cobayo, de la rata, del perro y del conejo. En el perro, el extracto administrado vía intavenosa no alteró de manera significativa los parámetros cardiovasculares (presión arterial, frecuencia cardíaca), frecuencia respiratoria y la glucosa sanguínea. Asimismo, no se observaron efectos de sedación en el registro encefalográfico (Meckes y Mellado, 1986).

Hibiscus uncinellus DC.

Descripción botánica

Perteneciente a la familia de las Malvaceas se le conoce como tülipan. Arbusto de 1 a 3 metros de altura con ramas trepadoras que llegan a extenderse hasta 10 metros de altura. Especie de hábito terrestre en asociación con bosques de encino, pino y otras latifoliadas, entre 1200 y 2500 msnm. Se distribuye en los estados de Jalisco, Oaxaca y Chiapas.

Información etnobotánica

Las hojas en té con flores de granadillas se usan para aliviar la tos. El té con hojas de sauco o de durazno para la tos, la tosferina y para la tuberculosis. No se tiene definida la parte que se usa en raspaduras, heridas, granos y calentura.

Información farmacológica

La actividad espasmolítica de esta especie fue evaluada por Tortoriello y col. (1995), el extracto metanólico de sus hojas presentó una inhibición de 90.2% a una dosis de 250 µg/ml sobre la contracción inducida en el ileum de cobayo. El extracto metanólico de las flores y el tallo no presentó un porcentaje de inhibición significativo.

Larrea tridentata (DC.) Cov.

Descripción botánica

Arbusto perteneciente a la familia Zygophyllaceae y conocido con los nombres de gobernadora, falsa alcaparra, hediondilla, guamis y jarilla entre otros (Avilés, 1985; Niembro, 1986). Es un arbusto muy ramificado de 1.5 a 3 m de altura. Las ramas se distinguen por llevar anillos negros en los nudos. Hojas opuestas por pares, de color verde oliva y cubiertas por una sustancia resinosa de olor penetrante. Las flores son apicales, solitarias y con 5 pétalos amarillos. Frutos globulares, cubiertos por una densa capa de vellos blancos. Toda la planta despide un olor penetrante y tiene un sabor amargo (Avilés, 1985). En México se distribuye en los estados de Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Zacatecas, Durango, Aguascalientes, Jalisco y Guanajuato. Forma parte del matorral xerófilo y crece en llanuras y lomeríos (Argueta y col., 1994).

Información Etnobotánica

La especie se emplea en el tratamiento de diversos padecimientos, destacando su uso en aquellos relacionados con el sistema renal y aparato urinario. La decocción de las ramas o de la planta entera se recomienda para tratar los cálculos renales. En los estados de Baja California Sur, Durango, Hidalgo, Guanajuato y Michoacán se toma en ayunas la infusión de las ramas tiernas, raíces, hojas o corteza para combatir el dolor de riñón y la cistitis. Otros reportes indican su uso en casos de esterilidad femenina, para controlar las reumas, tratar la anemia, el catarro, la diabetes, dolores musculares, hinchazón y el paludismo (Avilés, 1985; Ordorica, 1990; Argueta y col., 1994).

La resina extraída de las hojas de la planta se emplea en la fabricación de barnices, jabones y grasa para calzado, así como en la extracción de fenoles que se utilizan en la elaboración de pinturas, plásticos y fungicidas. El ácido nordihidroguaiarético (ANDG) uno de sus constituyentes químicos principales, es un antioxidante con actividad antibiótica en contra de las bacterias de la piel.

Antecedentes químicos

Reportes indican la presencia en el aceite esencial de terpenos, sesquiterpenos, flavonoides, saponinas y lignanos (Sakakibara y col., 1977). Los monoterpenos aislados de la planta fueron borneol, alcanfor, canfeno, limoneno, β -ocimeno y α -pineno; los sesquiterpenos: α -agarofurano, α -bergamoteno, α -calameno, copaeno, α -curcumenol, β y γ -eudesmol, farnesol, 2-rosaleno y β -santaleno. Entre los lignanos se han detectado 6,3'-di-O-dimetilisoguaiacina y didehidro-3'-dimetoxi-6-ódimetilguaiacina (Konno y col., 1989; 1990), seis lignanos furanoides: 4-epi-larreatricina, 3"-hidroxi-4-epi-larreatricina, larreatricina, 3'3"-dimetoxilarreatricina, 3,4-dihidrolarreatricina y larreatridenticina. Entre los flavonoides se reportan la 3,7-éter dimetil gosipetina; en las hojas el 8-hidroxi-6-flavonol, canferol, éter metil-3-canferol, éter dimetil-3,7-canferol, 3-ramnoglucósido de canferol, isoramnetina, quercetina, 3-éter metil quercetina, 3,7,3'-éter trimetilquercetina, 3-glucósido de quercetina y 3-ramnoglucósido de quercetina (Sakakibara y Mabry, 1975).

Información farmacológica

De *Larrea tridentata* se ha aislado un principio activo anti-VIH (Virus de Inmunodeficiencia Adquirida) (Gnabre y col., 1996). En otros estudios realizados se demostró que la planta como alimento prevenía la colelitiasis en los hamsters y que el extracto acuoso (Chang, 1999) tenía actividad antibacteriana. Así mismo, el ANDG, posee propiedades antioxidantes (Chang, 1999) y es utilizado como fármaco de referencia en estudios donde se evalúan biológicamente compuestos o extractos de plantas con actividad antiinflamatoria (Della Llogia y cols., 1988), es un agente hipoglucemiante (Luo y col. 1998; Reed y cols., 1999) inhibidor de la enzima 5-lipooxigenasa y de los cisteinil leucotrienos LTC₄ y LTD₄ (Schwalm y col., 1987), Además de anticancerígeno (McDonald y col., 2001).

Lippia dulcis Trev.

Sinonimia científica

Phyla scaberrima (Juss) Molenke; *Zapania scaberrima* Juss; *Phyla dulcis* (Trev.) Moldenke.

Descripción botánica

Hierba erecta o a veces postrada sobre el suelo de 40 a 60 cm de altura. Tiene las hojas con la parte central más ancha, se ven arrugadas y son aromáticas. Los agrupamientos de las flores blancas se encuentran en la unión del tallo con las hojas. Los frutos están encerrados en un cáliz persistente. Originaria de Cuba, se encuentra presente en climas cálido y semicálido desde el nivel del mar hasta los 1800 msnm (Argueta y col., 1994).

Información etnobotánica

Se emplea principalmente contra la tos en los estados de Morelos, Oaxaca, Puebla y Veracruz. También se indica en problemas de aborto, cólico estomacal, diarrea, dolor de estómago y frialdad. Para arrojar lombrices se recomienda tomar la infusión hecha con las hojas y bebida en ayunas (Argueta y col., 1994). Otros usos son contra la bronquitis, infecciones de los ojos y como emenagogo (Lara y Márquez, 1999).

Aspectos químicos

Las partes aéreas de la hierba dulce contienen un aceite esencial en el cual se han identificado los monoterpenos borneol, delta-cadineno, alcanfor, limoneno, linalol, mirceno, alfa y beta pineno, alfa-terpineol y terpinoleno; las hojas y flores contienen el sesquiterpenoide (+)-4-β-hidroxihernandulcina (Kaneda y col., 1992) y en las hojas los sesquiterpenos (+)-epihernandulcina y la (+)-hernandulcina (Compadre y col., 1985). En toda la planta el monoterpeno alcanfor (Compadre y col., 1986).

Información farmacológica

El sesquiterpeno hernandulcina no presentó efecto tóxico cuando fue administrado oralmente a ratones y no indujo mutación en los cultivos de *Salmonella typhimurium* TM 677 (Compadre y col., 1987). El estudio *in vitro* del extracto etanólico de *Lippia dulcis*, mostró actividad contra bacterias responsables de infecciones respiratorias y gastrointestinales (Cáceres y col., 1991; Cáceres y col., 1993). En el modelo de inflamación aguda inducida con carragenina el extracto hexánico de esta especie no presentó ningún efecto, por el contrario, el extracto etanólico inhibió de manera significativa el edema inducido (Pérez y col., 2005)

Oenothera rosea Ait.

Sinonimia científica

Hartmannia rosea G. don., *H. virgata* Spach., *Oenothera purpurea* Lam., *O. rubra* Cav., *O. virgata* Ruiz y Pavón.

Descripción botánica

Es una planta perteneciente a la familia Onagraceae conocida popularmente como hierba del golpe, amapola de campo, cáncer lisa, manuelita, zapotillo y sinvergüenza. Hierba de 15 a 45 cm de alto con hojas alternas y angostas, flores rosas y en algunas ocasiones blancas y amarillas, fruto seco sub-globoso. Especie de hábitat terrestre, en regiones de bosque de pino-encino y bosques de junípero; usualmente se encuentra entre los 2200-2700 msnm (Fichas Herbario IMSSM, Gómez 230, Santiz 583, Gallardo y Vargas 74, 67, Camacho 98, Aguilar 635, 193 y 406, Lamy 60, 126 y 213, Martínez 846, Rico 126, Zolla y Martínez Cruz 1, Ortega 60) (López, 1988).

Información etnobotánica

La especie se utiliza para tratar los golpes; en estos casos, la decocción de la planta se aplica localmente en la parte inflamada (cataplasma) y se prepara una infusión con la misma planta tomándose una taza tres veces al día (Herbario IMEPLAN, IMSS; López, 1988). Para casos de "bilis" se hace un preparado con la decocción de un rollito de hierba del golpe combinada con hojas de ruda (*Ruta chalepensis* L.), cojollo de piña, hojas de estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. Spp. Mexicana Willd. Keck.), hierba de la víbora (*Zornica* sp.) y tomates de hoja (*Physalis phyladelphica* Lam.) y este preparado se toma en ayunas o como agua de tiempo. En caso de "coraje", dolor de estómago y dolor del corazón, se toma una decocción de las hojas de la planta (López, 1988). En la región de Oxchiuc, Chiapas, las hojas y la raíz son utilizadas para combatir la diarrea (fichas Herbario IMSSM, Gómez 230, Santiz 583, Gallardo y Vargas 74,67, Camacho 98, Aguilar 635, 193 y 406, Lamy 60, 126 y 213, Martínez 846, Rico 126, Zolla y Martínez Cruz 1, Ortega 60) (López, 1988).

Información química y farmacológica

En la literatura científica no se han encontrado reportes referentes a la composición química de *O. rosea*. Evaluaciones farmacológicas del extracto metanólico, realizadas sobre el edema plantar inducido con carregenina en rata, muestran una actividad inhibitoria del 74% sobre la formación del edema (tanto en la fase temprana (0-1 hr) como en la tardía (2-7 hr)) (David, 2002). Asimismo, han sido demostradas las propiedades analgésicas (Muhlia, 2004; Juárez 2004) y anti-inflamatorias en el modelo de artritis reumatoide ACII de esta especie (Juárez, 2004)

Rubus coriifolius Focke

Descripción botánica

Rosaceae, llamada popularmente zarzamora silvestre. Entre los tzetzales es nombrada: makvm, tzajal makum, pili sat makum y makum. Enredadera con tallos de aprox. 10 metros, con ramas llenas de espinas; hojas alternas con cinco divisiones que se extienden a lo largo y ancho. Flores en racimos de color blanco o rosa, fruto constituido por esferas unidas en un receptáculo de color rojo ó negro (Alanís, 2000). En México se localiza en los estados de Michoacán, Veracruz, Morelos y Chiapas. Crece entre 1500-2400 msnm en zonas de clima templado a lluvioso (bosque pino-encino).

Información etnobotánica

Los tzetzales emplean la raíz para tratar la diarrea con sangre; la planta entera se usa contra la diarrea y la hoja para combatir la tos. Con menor frecuencia se utiliza para tratar la infección de los dientes y de la garganta, y para contrarrestar el vómito (Alanís, 2000).

Aspectos químicos

Del extracto CH₂Cl₂-MeOH de las partes aéreas de *R. coriifolius* se han aislado dos flavan-3-oles: (-) epicatequina y (+) catequina; un triterpeno pentacíclico (nigaichigósido), un esteroide (β -D-glucosido β sitosterol), un flavonoide (hiperina), dos polifenoles (ácido gálico y ácido elágico) y glucosa (Alanís, 2000).

Información farmacológica

La actividad antiprotozoaria de esta especie ha sido ampliamente demostrada. El extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) resultó activo contra *E. histolytica* y *G. lamblia* con una CI₅₀ de 72.42 mg/ml y de 78.82 mg/ml respectivamente (Calzada y col., 1998); siendo la (-)epi-catequina el principio que presentó la misma actividad del extracto, con una CI₅₀= 72.42 mg/ml para *E. histolytica* y de 77.82 mg/ml para *G. lamblia* (Alanís, 2000). Las propiedades antibacterianas y antifúngicas del extracto contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* han sido también reportadas (Meckes y col., 1995); además, la actividad antiinflamatoria en el modelo del edema plantar inducido con carragenina (Nava, 2002). En la literatura se reporta la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria del ácido nigaishigósido aislado en otras especies de *Rubus* (Choi y col., 2003).

Sphaeralcea angustifolia (Cav.) G. Don

Descripción botánica

Especie que pertenece a la familia Malvaceae, recibe los siguientes nombres populares. cordón, hierba del negro, hierba de vara de San José y tlixihit (náhuatl). Planta herbácea erecta de 50 cm a 1.5 m de altura; hojas alternas lanceoladas, angostas rugosas de 8-10 cm sus bordes ondulados a veces con lóbulos más grandes; flores sésiles violáceas de 1-2 cm acomodadas en grupos formando un racimo angosto. El fruto se encuentra incluido en el cáliz redondo dividido en 10 a 16 partes iguales. Crece en climas semiseco, seco y templado entre los 1890 y 3900 msnm (Argueta y col., 1994).

Información etnobotánica

En el Valle del Mezquital Hidalgo, se bebe una infusión preparada con la raíz para limpiar la matriz y los riñones. En el Estado de México, utilizan la raíz como emoliente (Aguilar y col., 1994). También se ha reportado el uso de la planta para el tratamiento de golpes (Durango); en este caso, a la planta machacada se le ponen unas gotas de aceite y se frota con este preparado la zona afectada. El cocimiento de la planta, junto con manzanilla (*Matricaria recutita*), salvia (*Buddleia acordioides*) y yerbabuena (especie no determinada) es utilizada para tratar la diarrea crónica (Argueta y col., 1994).

Aspectos químicos

En el extracto CH_2Cl_2 se ha encontrado la presencia de estigmasterol y β -sitosterol, α y β -amirinas, así como de las cumarinas escopoletina, esculetina y esculina (García y col., Enviado)

Información farmacológica

Evaluaciones farmacológicas realizadas con el extracto clorofórmico de *Sphaeralcea angustifolia* mostraron actividad inhibitoria del edema plantar inducido con carragenina tanto en la fase aguda como en la fase tardía (Nava, 2002). El mismo extracto presentó actividad antiartrítica en ratas pre-tratadas con adyuvante de Freund completo, el efecto fue mayor en la fase prolongada del edema y con dosis repetidas del extracto se alcanza un 78% de inhibición (Salazar, 2003). Las propiedades analgésicas de esta especie también han sido demostradas (Muhlía, 2004). Por otra parte, su extracto CH_2Cl_2 fue evaluado en dos modelos de inflamación crónica: el de artritis inducida con adyuvante de Freund en ratas y el del edema auricular en ratón provocado por aplicaciones tópicas repetidas de TPA. En el primer modelo fueron administrados durante un periodo de 8 días por vía i. p. 100 mg/kg, los cuales redujeron de manera significativa el incremento progresivo del edema plantar en rata. En el caso del modelo auricular fueron administrados 50 mg/kg vía i.p. y los resultados muestran una inhibición de la inflamación del 50.55%, cabe mencionar que la actividad farmacológica observada es atribuida a las cumarinas en especial a la escopoletina (García y col., Enviado).

X- BIBLIOGRAFÍA

- Abraham W.M., Burch R. M., Farmer S. G., Sielczak M. W., Ahmed A., Cortes A. A bradykinin antagonist modifies allergen-induced mediator release and late bronchial responses in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1991, 143: 787-796.
- Addy M., Dzandu W. Dose-response effects of *Desmodium adscendens* aqueous extract on histamine response, content and anaphylactic reactions in the guinea pig. *J Ethnopharmacol* 1986, 18: 13-20.
- Addy M., Burka J. Effect of *Desmodium adscendens* fractions on antigen and arachidonic acid-induced contractions of guinea pig airways. *Can J Physiol Pharmacol* 1988, 66: 820-825.
- Addy M., Burka F. Effect of *Desmodium adscendens* fraction 3 on contractions of respiratory smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 1990, 29: 325-335.
- Adelstein R. S., Sellers J. R. Myosin structure and function. In: Barany M, ed. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. Academic Press Inc., San Diego, CA, 1996; 2-19 pp.
- Advenier C., Naline E., Drapeau G., Regoli D. Relative potencies of neurokinins in guinea-pig trachea and human bronchus. *Eur J Pharmacol* 1987, 139:133-137.
- Aguilar A., Camacho J. R., Chino S., Jácquez P., López M. E. Herbario Medicinal del IMSS, Información Etnobotánica. México, IMSS 1994, pp 253.
- Aguilar A., Camacho J. R., Chino S., Jácquez P., López M. E. Plantas Medicinales del Herbario IMSS: Su Distribución por Enfermedades. México. Grupo Roche Syntex de México S.A de C.V. 1998, pp 74.
- Ahnfelt-Ronne I., Arrigoni-Martelli E. Multiple effects of a new anti-inflammatory agent, timegadine, on arachidonic acid release and metabolism in neutrophils and platelets. *Biochem Pharmacol* 1982, 31: 2619-2624.
- Alanís, R. A. D. (-) Epi-Catequina, Principio con Actividad Antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* Obtenido de las Partes Aéreas de *Rubus coriifolius* Focke (Rosaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas Farmacéutica (Farmacia), Facultad de Química, UNAM, 2000.
- Álvarez V. H. Estudio Químico de *Chamaedora tepejilote* con Actividad antituberculosa. Tesis Profesional, Iztacala. UNAM, 2002.

- Ansel J. C., Brown J. R., Payan D. G., Brown M. A. Substance-P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993, 150: 4478-4485.
- Argueta V., Cano A., Rodarte M. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol I-III. Instituto Nacional Indigenista. México, 1994.
- Avilés M. Medicina Tradicional de plantas empleadas por parteras del estado de Morelos. Tesis profesional. Escuela de Ciencias Biológicas de Morelos, UAEM Morelos, 1985.
- Barnes N. C., Piper P. J., Costello J. F. Comparative effects of inhaled leukotriene C₄, leukotriene D₄ and histamine in normal human subjects. *Thorax* 1984, 39: 500-504.
- Barnes P. J., Belvisi M. G. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993, 48: 1034–1043.
- Barnes P. J. Overview of neural mechanisms in asthma. *Pulm Pharmacol* 1995a, 8: 151-159.
- Barnes P. J., Liew F. Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995b, 16: 128–130.
- Barnes P. J. Pharmacology of Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158: S123-S132.
- Baumgarten C. R., Nichols R. C., Naclerio R. M., Proud D. Concentrations of glandular kallikrein in human nasal secretions during experimentally induced allergic rhinitis. *J Immunol* 1986, 137: 1323-1328.
- Bell R. D., Wainer B. S. Effects of bradykinin on renal lymph flow and composition. *Lymphology* 1983, 16: 38-42.
- Belleguic C., Corbel M., Germain N., Lena H., Boichot E., Delaval P. H., Lagente V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2002, 32: 217-223.
- Berridge M. J., Irvine R. F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989, 341: 197-205.
- Blackwell J., Flower J., Nijkamp P., Vane R. Phospholipase A2 activity of guinea-pig isolated perfused lungs: stimulation and inhibition by anti-inflammatory steroids. *Br J Pharmacol* 1978, 62: 79-80.
- Bohlmann F., Ziesche J. Neue diterpene aus *Gnaphalium* *arten*. *Phytochemistry* 1980, 19: 71-74.

- Bruhn J., Sandberg F. Screening and processing of plant materials for potential pharmaceutical needs: experience and applications in three continents. In: The Medicinal Plant Industry. Ed. R. O. B. Wijesekera, CRC Press, Inc. United States 2000, p 223-236.
- Cáceres A., Alvarez A. V., Ovando A. E., Samayoa B. E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. J Ethnopharmacol 1991, 31: 193-208.
- Cáceres A., Fletes L., Aguilar L., Ramírez O., Figueroa L., Taracena A. M., Samayoa B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. J Ethnopharmacol 1993, 38: 31-38.
- Calzada F., Alanís AD., Meckes M., Tapia-Contreras A., Cedillo-Rivera R. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of southern Mexico. Phytother Res 1998, 12: 70-72.
- Campos M. G., Church M. K. How useful are guinea pig models of asthma?. Clin Exp Allergy 1992, 22: 665-666.
- Campos M. G., Toxqui E., Tortoriello J., Oropeza M., Ponce H., Vargas M., Montaña L. *Galphimia glauca* organic fraction antagonizes LTD₄-induced contraction in guinea pig airways. J Ethnopharmacol 2001, 74: 7-15.
- Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. Physiol Rev 1991, 71: 129-153.
- Carlier M. F. Actin: protein structure and filament dynamics. J Biol Chem 1991, 266: 1-4.
- Carty D. J., Padrell E., Codina J., Birnbaumer L., Hilderbrandt J. D., Iyenger R. J. Distinct guanine nucleotide binding and release properties of three Gi proteins. J Biol Chem 1990, 265: 6268-6273.
- Castro B., Wagner H., Lombardi J. A., Braga A. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. Phytomedicine 2000, 6: 447-452.
- Cockcroft S., Thomas G. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. Biochem J 1992, 288: 1-14.
- Compadre M., Pezzuto J., Kinghorn D. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. Science 1985, 227: 417-419.

- Compadre M., Robbins F., Kinghorn D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries and constituents J. Ethnopharmacol 1986, 86: 89-106.
- Compadre M., Raouf A., Hussain R., López De Compadre L., Pezzuto M., Kinghorn D. The intensely sweet sesquiterpene hernandulcin: isolation, synthesis, characterization, and preliminary safety evaluation. J Agric Food Chem 1987, 35: 273.
- Cross L. J. M, Heaney L. G, Ennis M. Further characterisation of substance P induced histamine release from human bronchoalveolar lavage mast cells. Inflamm Res 1996, 45: S11-S12.
- Csordas G., Thomas A. P., Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. EMBO J 1999, 18: 96-108.
- Chandler F., Hooper N., Harvey J. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. Econ Bot 1982, 36: 203-223.
- Chang Huang K. The Pharmacology of Chinese Herbs. 2a Edition. CRC Press, USA 1999.
- Chavis C., Godard P., Michel F. B., Castres de Paulet A., Damon M. Sulfidopeptide leukotrienes contribute to human alveolar macrophage activation in asthma. Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids 1991, 42: 95-100.
- Christiansen S. C , Proud D., Sarnoff R. B., Juergens U., Cochrane C. G., Zuraw B. L. Elevation of tissue kallikrein and kinin in the airways of asthmatic subjects after endobronchial allergen challenge. Am Rev Respir Dis 1992, 145: 900-905.
- Christmas P., Weber B. M., McKee M., Brown D., Soberman R. J. Membrane localization and topology of leukotriene C₄ synthase. J Biol Chem 2002, 277: 28902-28908.
- Choi J., Lee K. T., Ha J., Yun S. Y., Ko C. D., Jung H. J., Park H.J. Antinociceptive and antiinflammatory effects of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. Biol Pharm Bull 2003, 26:1436-41.
- Dahlen S. E., Hedqvist P., Hammarstrom S., Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. Nature 1980, 288: 484-486.
- Dahlen S. E. Pharmacological characterization of leukotriene receptors. Am J Respir Crit Care Med 2000, 161: S41-S45.

- Dahlen S. E. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy?. Eur J Pharmacol 2006, 533: 40-56.
- Daum G. Lipids of mitochondria. Biochim Biophys Acta 1985, 822: 1-42.
- David R. Actividad Antiinflamatoria de los Extractos de Siete Plantas Medicinales y del Ácido Nordihidroguayarático, Compuesto Activo del Extracto de *Larrea tridentata* (DC.) Cav. Tesis Biología. FES-Iztacala, UNAM, 2002.
- De Giorio R., Tazzari P. L., Barbara G., Stanghellini V., Corinaldesi R. Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. J Neuroimmunol 1998, 82: 175-181.
- Delhumeau G., Trejo R., Lara L. Changes of Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ ATPase activity in rat testis throughout maturation. J Reprod Fert 1973, 33: 513.
- Della Loggia R., Ragazzi E., Tubazo., Fascina G., Vertua R. Anti-inflammatory activity of benzopyrones that are inhibitors of ciclo- and lipo-oxygenase. Pharmacol Res Comm 1988, 20 suplemento 5: 91-94.
- Desrivieres S., Lu H., Peyri N., Soria C., Legrand Y., Menashi S. Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. J Cell Physiol 1993, 157: 587-593.
- Díaz J. L. Monografías de los Usos de las Plantas Medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C. 1976, p 254.
- Dixon R. A., Diehl R. E., Opas E., Rands E., Vickers P. J., Evans J. F., Gillard J. W., Miller D. K. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. Nature 1990, 343: 282-284.
- Djukanovic R., Roche W. R., Wilson J. W., Beasley C. R. W., Twentyman O. P., Howarth P. H., Holgate S. T. Mucosal inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis 1990, 142: 434-4457.
- Dorsch W., Bittinger M., Kaas A., Muller A., Kreher B., Wagner H. Antiasthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, and related compounds prevent allergen and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. Int Arch of Allerg and Applied Immunol 1992, 97: 1-7.
- Drazen J. M. Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action Proc Assoc Am Physicians 1999, 111: 547-559.

- Drummond R. M., Tuft R. A. Release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial [Ca²⁺] in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol (Lond)* 1999, 516: 139-147.
- Drummond R. M., Mix T. CH., Tuft R. A., Walsh J. V., Fay F. S. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis during Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release in gastric myocytes from *bufo marinus*. *J Physiol (Lond)* 2000, 522: 375-390.
- Dumitriu D., Prié S., Bernier S. W. G., Guillemette G., Sirois P. Mechanism of action of leukotriene D₄ on guinea pig tracheal smooth muscle cells: Roles of Ca⁺⁺ influx and intracellular Ca⁺⁺ release. *Pharmacology* 1997, 280: 1357-1365.
- El Sayah M., Cechinel F., Yunes A., Pinheiro T., Calixto B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 1998, 344: 215-224.
- Enyedi A., Vorherr T., James P., McCormick D. J., Filoteo A. G., Carafoli E. Penniston J. T. The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J Biol Chem* 1989, 264: 12313-12321.
- Escarria S., Torrenegra R. D., Angarita B. Colombian plants of the genus *Gnaphalium*. *Phytochemistry* 1977, 16: 1618.
- Falchetto R., Vorherr T., Brunner J., Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 1991, 266: 2930-2936.
- Falchetto R., Vorherr T. Carafoli E. The calmodulin binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci* 1992, 1: 1612-1621.
- Farmer S., Hay D., Raeburn D., Fedan J. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. *Br J Pharmacol* 1987, 92: 231-236.
- Featherstone R.L., Parry J. E., Church M. K. Kallikrein-like activity in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of sensitized, challenged guinea-pigs. *Agents Actions Suppl* 1992, 38 (Pt. 3): 462-466.
- Fewtrell C. M. S., Foreman J. C., Jordan C. C., Oehme P., Renner H., Stewart J. M. The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J Physiol* 1982, 330: 393-411.

- Filoteo A. G., Gorski J. P., Penniston J. T. The ATP-binding site of the erythrocyte membrane Ca pump. *J Biol Chem* 1987, 262: 6526-6530.
- Fischer J. C., Ruitenbeek W., Berden J., Trijbels J. M., Veerkamp J., Stadhouders, Sengers R., Janssen J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chim Acta* 1985, 153: 23-36.
- Franson C., Weir L. Isolation and characterization of a membrane-associated Ca²⁺-dependent phospholipase A₂ from rabbit lung. *Lung* 1982, 160: 275.
- García E., Guerreiro E., Giordano O. Diterpenos en *Gphalium gaudichaudianum* DC. *Anales de la Asociación Química Argentina* 1982, 70: 321-325.
- García R. V. Chamorro G. Jiménez A., Meckes M. Activity of *Sphaeralcea angustifolia* in chronic inflammation experimental models. (Enviado).
- Gautheron D., Gaudemer Y., Zajdela F. Isolement de sarcosomes d'utérus de porc et leurs propriétés oxydophosphorylantes comparées a celles de sarcosomes de coeur. *Bull Soc Chim Biol* 1961, 43: 193-205.
- Geeves M. A., Holmes K. C. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 1999, 68: 687-728.
- Gerthoffer U. T. Calcium dependence of myosin phosphorylation and airway smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol* 1986, 250: C597-C604.
- Gleich G. J. Current understating of eosinophil function. *Hospital Practice* 1988,
- Glover S., de Carvalho M. S., Bayburt T., Jonas M., Chi E., Leslie C. C., Gelb M. H. Translocation of the 85-kDa phospholipase A₂ from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* 1995, 270: 15359-15367.
- Gnabre N., Brady N., Clanton J., Ito Y., Dittmer J., Bates B., Huang C. Inhibition of human immunodeficiency virus type I transcriptional replication by DNA sequence-selective plant ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 92: 11239-11243.
- Goldberg A., Mueller E., Eigen E., Desalva S. Isolation of the anti-inflammatory principles from *Achillea millefolium* (Compositae). *J Pharm Sci* 1969, 58: 938-941.
- González-Halphen D., Vázquez-Acevedo M. La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural. En: *Mitocondria, una Mirada a la Evolución de los*

- Conceptos Básicos y Modernos. Eds. Vázquez-Memije ME y Tuena de Gómez-Puyou M., Ed. Prado, México 2002, pp 65-87.
- Guajardo A. Estudio Químico y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto Metanólico de *Achillea millefolium*. Tesis Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM, 2001.
 - Guerreiro E., Kavka J., Giordano O. 5,8-Dihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry* 21, 2601-2602.
 - Gunst S. J., Tang D. D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000, 15: 600-616.
 - Gurney A. M., Drummond R. M., Fay F. S. Calcium signalling in sarcoplasmic reticulum, cytoplasm and mitochondria during activation of rabbit aorta myocytes. *Cell Calcium* 2000, 27: 339-351.
 - Guzy R. D., Schumacker P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006, 91: 807-819.
 - Haeggström Z., Wetterholm A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59: 742-753.
 - Hajnoczky G., Robb-Gaspers L. D., Seitz M. B., Thomas A. P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 1995, 82: 415-424.
 - Hall I. P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000, 15: 1120-1127.
 - Heaney L. G., Cross L. J. M., Stanford C. F., Ennis M. Substance-P induces histamine-release from human pulmonary mast-cells. *Clin Exp Allergy* 1995, 25:179-186.
 - Heise C. E., O'Dowd B. F., Figueroa D. J., Sawyer N., Nguyen T., Im D. S. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. *J Biol Chem* 2000, 275: 30531-30536.
 - Ho W-Z., Lai J-P., Zhu X-H., Uvaydova M., Douglas S. D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997, 159: 5654-5660.
 - Holgate T. S., Peters-Golden M., Panettieri R. A., Henderson W. R. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111:S18-S35.
 - Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998, 16: 241-248.

- Hymel L., Inui M., Fleischer S., Schindler H. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms Ca^{2+} -activated oligomeric Ca^{2+} channels in planar bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 441-445.
- Ishijima A., Kojima H., Funatsu T., Tokunaga M., Higuchi H., Tanaka H., Yanagida T. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* 1998. 92: 161–171.
- Iwamoto I., Nakagawa N., Yamazaki H., Kimura A., Tomioka H., Yoshida S. Mechanism for substance-P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept* 1993, 46: 228-330.
- James P., Zvaritch E., Hakhparanov M. S., Penniston J. T., Carafoli E. The aminoacid sequence of the phosphorylation domain of the erythrocyte Ca^{2+} ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149: 7-12
- James P., Maeda M., Fischer R., Verma A. K., Krebs J., Penniston J. T., Carafoli E. Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 1988, 263: 2905-2910.
- James A. J., Lackie P. M., Corbett L. Expression and regulation of leukotriene pathway enzymes in human airway smooth muscle cells (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163: A513.
- Janero DR. Malonaldehyde and thiobarbituric acid-reactive diagnostic indexes of lipid peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1990, 9: 515-540.
- Jontes J. D. Milligan R. A. Brush border myosin-I structure and ADP dependent conformational changes revealed by cryoelectron microscopy and image analysis. *J Cell Biol* 1997, 139: 683–693.
- Joris I., Majno G., Corey E. J., Lewis R. A. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. *Am J Pathol* 1987, 126: 19-24.
- Juárez C. M. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria y Analgésica de los Extractos de *Oenothera rosea* en Diferentes Modelos *in vivo*. Tesis de Licenciatura. UAM-Iztapalapa. México. 2004.
- Juergens R., Stober M., Vetter H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1, 8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *Eur J Med Res* 1998, 3: 508-510.
- Kageyama N., Miura M., Ichinose M. Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediators. *Eur Respir J* 1997, 10: 9-13.

- Kamm K. E., Stull J. T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 2001, 276: 4527-4530.
- Kaneda N., Lee I., Gupta P., Soejarto D., Kinghorn D. (+)-4 β -hidroxihernandulcina, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *J Nat Prod* 1992, 55: 1136-1141.
- Kargman S., Vickers, P. J., Evans, J. F. A23187-induced translocation of 5-lipoxygenase in osteosarcoma cells. *J Cell Biol* 1992, 119: 1701-1709.
- Katzung, Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial: El Manual Moderno S. A. de C. V., México D. F., Octava edición, 2002.
- Kawai K., Shiojiri H., Fukushima H. Nozawa Y. The inhibition of mitochondrial respiration by indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory agent possessing inhibitory effect on prostaglandin biosynthesis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985, 48: 267-274.
- Kaziro Y., Itoh H., Kozassa M., Nakafuku M., Satoh T. Structure and function of signal-transduction GTP-binding proteins. *Am Rev Biochem* 1991, 60: 349-400.
- Kelly K. D., Spooner C. H., Rowe B. H. Nedocromil sodium *versus* sodium cromoglycate in treatment of exercise-induced bronchoconstriction: a systematic review. *Eur Respir J* 2001, 17: 39-45.
- Kern R., Smith L. T., Patterson R., Krell R. D., Bernstein P. R. Characterization of the airway response to inhaled leukotriene D₄ in normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1986, 133: 1127-1132.
- Killingsworth C. R., Shore S. A., Alessandrini F., Dey R. D., Paulauskis J. D. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA- encoding tachykinins. *Am J Physiol* 1997, 273: L1073-L1081.
- Kips J. C., Anderson G. P., Fredberg J. J., Herz U., Inman M. D., Jordana M., Kemeny D. M., Lotvall J., Pauwels R. A., Plopper G. G., Schmidt D., Sterk P. J., Van Oosterhout A. J., Vargaftig B. B., Chung K. F. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003, 22: 374-382.
- Ko W. C., Liu P. Y., Chen J. L., Leu I. J., Shih C. M. Relaxant effects of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. *Planta Med* 2003, 69: 1086-1090.
- Konopleva M., Matlawska I., Malgorzata W., Ahmed A., Rybczynska M., Paszel A., Ohta S., Hirata T., Bylka W., Mabry T., Cannon J. Sylviside, a Diterpene Glucoside Derivate from *Gnaphalium sylvaticum*. *J Nat Prod* 2006, 69: 394-396.

- Konno C., Xue Z., Lu Z., Ma Y., Erdelmeier J., Che T., Cordell A., Soejarto D., Waller P., Fong S. 1-aryltetralignans from *Larrea tridentata*. J Nat Prod 1989, 52: 1113-1117.
- Konno C., Xue Z., Erdelmeier J., Meksuriyen D., Che T., Cordell A., Soejarto D., Waller P., Fong S. Furanoids lignans from *Larrea tridentata*. J Nat Prod 1990, 53:396-406.
- Lai F. A., Erickson H. P., Rousseau E., Liu Q. Y., Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature 1988, 331: 315-319.
- Laitinen A., Heino M. Damage of the airways epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. Am Rev Respir Dis 1985, 131: 599-606.
- Laitinen L. A., Laitinen A., Haahtela T., Vikka V., Spur B. W., Lee T. H. Leukotriene E₄ and granulocytic infiltration into asthmatic airway. Lancet 1993, 341: 989-990.
- Lalonde R.T., Wong C.F., Hofstead S.J., Morris C.D., Gardnet L.C. N-(2-methylpropyl)-(E,E)-2,4-decadienamide: a mosquito larvicide from *Achillea millefolium*. J Chem Ecol 1980, 6: 35-48.
- Lam B. K., Gagnon L., Austen K. F., Soberman R. J. The mechanism of leukotriene B₄ export from human polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 1990, 265: 13438-13441.
- Lam B.K., Penrose J.F., Freeman G.J., Austen K.F. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C₄ synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A₄. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1994, 91: 7663-7667.
- Lambrecht B. N., Germonpré P. R., Everaert E. G. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. Eur J Immunol 1999, 29: 3815-3825.
- Lara F., Márquez C. Plantas Medicinales de México: Composición, Usos y Actividad Biológica. México. Universidad Nacional Autónoma De México, 1999.
- Larsen J. S. Do antihistamines have role in asthma therapy. Pharmacotherapy 2001, 21 (3 Pt2): 28S-33S.
- Lewis R. A., Austen K. F., Soberman R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. N Engl J Med 1990, 323: 645-655.

- Loe D. W., Almquist K. C., Deeley R. G., Cole S. P. C. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. *J Biol Chem* 1996, 271: 9675-9683.
- López M. E. Contribución Etnobotánica en Plantas Medicinales Utilizadas por Dos Grupos Étnicos de Mecapalapa, Municipio de Pantepec, Puebla. Tesis Profesional. Iztacala. UNAM. 1988.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-275.
- Lundberg J.M., Hýkfelt T., Martling C. R., Saria A., Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res* 1984, 235: 251-261.
- Luo J., Chuang T., Cheung J., Quang J., Tsai J., Sullivan C., Hedor F., Reed J., Messaros K., King R., Carlson J., Reaven M. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperlycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Europ J Pharmacol* 1998, 346: 77-79.
- Lynch K. R., O'Neill G. P., Liu Q., Im D. S., Sawyer N., Metters K. M. Characterization of the human cysteinyl leukotriene receptor. *Nature* 1999, 399:789-793.
- Mancini J. A., Abramovitz M., Cox M. E., Wong E., Charleson S., Perrier H., Wang Z., Prasit P., Vickers P. J. 5-Lipoxygenase-activating protein is an arachidonic acid binding protein. *FEBS Lett* 1993, 318: 277-281.
- Maggi C. A. Tachycinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Progr Neurobiol* 1995, 45; 1-98.
- Mahmud T., Rafi S. S., Scott K. L., Wrigglesworth J. M., Bjarnason Y. Nonsteroidal antiinflammatory drugs on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1988-2003.
- Martínez M. A. Posible metodología a seguir en el estudio de las plantas medicinales mexicanas. En: C. Viesca (Ed.) *Estudios de Etnobotánica y Antropología Médica*. IMEPLAM I. 1978. pp 75-84.
- Martling C. R., Theodorssonorheim E., Lundberg J. M. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci* 1987, 40:1633-1643.

- Maruyama M., Hayasaka K., Sasaki S. I., Hosokawa S., Uchiyama H. A new chalcone glucoside from *Gnaphalium multiceps*. *Phytochemistry* 1974, 13: 286-288.
- McCutcheon R., Ellis M., Hancock W., Towers N. Antibiotic screening of medicinal plants of the native British Columbian native peoples. *J Ethnopharmacol* 1992, 32: 213-223.
- McDonald R. W., Bunjobpon W., Liu T., Fessler S., Pardo O. E., Freer I. K., Glaser M., Seckl M. J., Robins D. J. Synthesis and anticancer activity of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and analogues. *Anticancer Drug Des* 2001, 16: 261-270.
- Meckes M., Mellado C. V. Pharmacological screening of plants popularly used for the treatment of cough. *Fitoterapia* 1986, 5: 365-370.
- Meckes M., Villareal L., Tortoriello J., Berlin B., Berlin A. Antimicrobiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of southern Mexico. *Phytother Res* 1995, 9: 244-250.
- Meckes M., David-Rivera A.D., Nava Aguilar V., Jiménez A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw oedema. *Phytomedicine* 2004, 11: 446-451.
- Meckes M., Guajardo E., Jiménez A. Chemical composition of *Achillea millefolium* methanolic extract with anti-inflammatory activity. (Enviado).
- Mingatto F. E., Santos A. C., Uyemura S. A., Jordani M. C., Curti C. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. *Arch Biochem Biophys* 1996, 334: 303-308.
- Mitchell H. W. The effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on drug-induced contractions in isolated tracheal smooth muscle of the pig. *Br J Pharmacol* 1982, 75: 129-136.
- Mitchell H. W. Pharmacological studies into cyclo-oxygenase, lipoxygenase and phospholipase in smooth muscle contraction in the isolated trachea. *Br J Pharmacol* 1984, 82: 549-555.
- Missiaen L., Raeymaekers L., Wuytack F., Vrolix M., DeSmedt H., Casteels R. Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. *Biochem J* 1989, 263: 287-294.

- Moncada S., Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993, 329: 2002–2012.
- Montanari T., de Carvahlo E., Dolder H. Antispermatogetic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. *Contraception* 1998, 58: 309-313.
- Monteith G. R., Blaustein M. P. Heterogeneity of mitochondrial matrix free Ca^{2+} : resolution of Ca^{2+} dynamics in individual mitochondria in situ. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999, 276: C1193-C1204.
- Morales G., Toledo G. Contribución al estudio de la flora medicinal y medicina tradicional del municipio de Coxquihui, Ver. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. 1987.
- Morais S., Pereira C., Resende C. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999, 26: 3-13.
- Moreno-Sánchez R., Bravo C., Vázquez C., Ayala G., Silveira L., Martínez-Lavín M. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1999, 57; 743-752.
- Mortimer K. J., Harrison T. W., Tattersfield A. E. Effects of inhaled corticosteroids on bone. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005, 94: 15-21.
- Muhlia M. M. Valoración de los Efectos Analgésicos de algunas Plantas de México. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Izatacala. UNAM. México. 2004.
- Mutschler E., Derendorf H. Drug Actions. Basic Principles and Therapeutic Aspects. Edit. Medpharm Scientific Publishers 1995, Germany. pp 149-150.
- Nadel J. A. Genetics reveals importance of platelet activating factor in asthma and possibly other inflammatory states. *J Clin Invest* 1996, 97:2689–2690.
- Naicker S, Naidoo S, Ramsaroop M, Moodley D., Bhoola K. Tissue kallikrein and kinins in renal disease. *Immunopharmacology* 1999, 44: 183-192.
- Naidoo S., Ramsaroop R., Bhoola R., Bhoola K. D. The evaluation of tissue kallikrein in *Helicobacter pylori*-associated gastric ulcer disease. *Immunopharmacology* 1997, 36: 263-269.
- Nakano Y., Morita S., Kawamoto A., Suda T., Chida K., Nakamura H. Elevated complement C3a in plasma from patients with severe acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112:525–530.

- Nasser A., Simpson A. W. M. Elevation of mitochondrial calcium by ryanodine-sensitive calcium-induced calcium release. *J Biol Chem* 2000, 275: 23661-23665.
- Nava A. V. Actividad Antiinflamatoria de los Extractos de 7 Plantas Medicinales y de β -sitosterol, Compuesto Identificado en una de las Fracciones Activas de *Justicia spicigera*. Tesis Biología. FES-Iztacala, UNAM, 2002.
- Neffen H. E. Pharmaco-prevention of bronchial asthma using membrane stabilisers and asthma mortality. *Rev Alerg Mex* 1990, 37:155–163.
- Niembro R. A. Árboles y Arbustos Útiles de México. Ed. Limusa, México 1986, pp 116-117.
- Niggli V., Adunyah E. S., Penniston J. T., Carafoli E. Purified $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase of the erythrocyte membrane: reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J Biol Chem* 1981, 256: 395-401.
- Obara K., Bowman P. G., Ishida Y., Paul R. J. Effects of hypoxia on Ca^{2+} , pH_i and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig taenia caeci. *The Journal of Physiology* 1997, 503: 426-433.
- Ordorica ME. Contribución al Conocimiento de la Medicina del Estado de Baja California Sur. Tesis Profesional. ENCB, IPN, México, 1990.
- Pabelick C. M., Sieck G. C., Prakash Y. S. Invited Review: Significance of spatial and temporal heterogeneity of calcium transients in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001, 91: 488-496.
- Page C. P. The role of platelet-activating factor in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988, 81:44–152.
- Penrose J.F., Gagnon L., Goppelt-Struebe M., Myers P., Lam B. K., Jack R. M., Austen K. F., Soberman R. J. Purification of human leukotriene C_4 synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 11603-11606.
- Pérez S., Meckes M., Pérez C., Susunaga A., Zavala M. A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *J Ethnopharmacol* 2005, 102: 1-4.
- Petrescu I., Tarba C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1318: 385-394.
- Petty T. L. Treatment of Asthma in the 1990s. Published by Excerpta Medica 1990, Princeton NJ, U.S.A. pp 1-29.

- Pollard T. D., Cooper J. A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 1986, 55: 987-1035.
- Pfizer G. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001, 91: 497-503.
- Price J. F., Weller P. H. Comparison of fluticasone propionate and sodium cromoglycate for the treatment of childhood asthma (an open parallel group study). *Respir Med.* 1995, 89: 363-368.
- Proud D., Kaplan A. P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol* 1988, 6: 49-83.
- Radmark O., Shimizu T., Jornvall H., Samuelsson B. Leukotriene A₄ hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* 1988, 259: 12339-12345
- Raidoo D. M., Ramsaroop R., Naidoo S., Muller-Esterl W., Bhoola K. D. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* 1997, 36: 153-160.
- Rall W. Drugs used in the treatment of asthma. The methylxantines, cromolyn sodium and other agents. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics (Section IV)*. Goodman and Gilman's. Pergamon. U.S A 1996, p 618-637.
- Raskovic S., Bogic M., Peric-Popadic A., Arandjelovic S., Jovcic Z., Tomic-Spiric V. The role of prostaglandins in allergic inflammation. *Srp Arch Celok Lek* 1998, 126: 388-393.
- Reed J. Messaros K., Entes J., Claypool D., Pinkett G., Brignetti D., Luo J., Khandwala A., Reaven M. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of tipe II diabetes. *Diabetologia* 1999, 42: 102-106.
- Robb-Gaspers R., Burnett P., Hajnoczky G., Denton R. M., Thomas A. P. Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1366: 17-32.
- Rouzer C. A., Kargman, S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 1988, 263: 10980-10988.
- Sakakibara M., Mabry T. J., Bovillant M. L., Chopin J. 6,8-diC-glucosylflavones from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 1977, 16: 1113-1114.

- Salazar F. Valoración de los efectos de *Chamaedora tepejilote*, *Sphaeralcea angustifolia*, *Larrea tridentata* y *Juniperus comunis* en el Modelo de Artritis Reutmatoide ACII. Tesis Profesional. Iztacala. UNAM. 2003.
- Sampson A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. Clin Exp Allergy 2000, 30 (suppl 1): 22-27.
- Scuri M., Forteza R., Lauredo I., Sabater J. R., Botvinnikova Y., Allegra L., Abraham W. M. Inhaled porcine pancreatic elastase causes bronchoconstriction via a bradykinin-mediated mechanism. J Appl Physiol 2000, 89: 1397-1402.
- Scuri M., Abraham W. M., Botvinnikova Y., Forteza R. Hyaluronic acid blocks porcine pancreatic elastase (PPE)-induced bronchoconstriction in sheep. Am J Respir Crit Care Med 2001, 164: 1855-1859.
- Schwalm SF., Lewis AJ., Hand JM. Inhibition of leukotriene-induced contraction of guinea pig trachea by 5-lipoxygenase inhibitors. Prostaglandins 1987, 33: 113-119.
- Schroder T., Lempinen M., Kivilaakso E., Nikki P. Serum phospholipase A₂ and pulmonary changes in acute fulminate pancreatitis. Resuscitation 1982, 10: 79-85.
- Smith J. S , Imagawa T., Ma J., Fill M., Campbell K. P., Coronado R. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. J Gen Physiol 1988, 92: 1-26.
- Smith L. J., Shamsuddin M., Houston M. Effect of leukotriene D₄ and platelet activating factor on human alveolar macrophage eicosanoid and PAF synthesis. Am Rev Respir Dis 1993a, 148: 682-688.
- Smith L. J., Houston M., Anderson J., Shamsuddin M. Leukotriene D₄ increases alveolar macrophage LTB₄ synthesis in patients with asthma. Am Rev Respir Dis 1993b, 147: A311.
- Snyder D. W., Sommers C. D., Bobbitt J. L., Mihelich E. D. Evidence that phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitors can selectively block PLA₂-mediated contractions of guinea pig lung pleural strips. J Pharmacol Exp Ther 1992, 262:1147-1153.
- Somlyo A. V., Somlyo A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther 1968, 156: 129-145.
- Somlyo A. P., Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. FASEB J 1989, 3: 2266-2276.

- Somlyo A. P., Somlyo A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature 1994, 372: 231-236.
- Somlyo A. P., Wu X., Walker L. A., Somlyo A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1999,134: 201-234.
- Stephens N. L., Wrogemann K. Oxidative phosphorylation in smooth muscle. Am J Physiol 1970, 219:1796-1801.
- Stephens N. L. Airway smooth muscle. Lung 2001, 179: 333-373.
- Stewart A. G., Thompson D. C., Tennessy M. R. Involvement of capsaicin-sensitive afferent neurons in a vagal-dependent interaction between leukotriene D₄ and histamine on bronchomotor tone. Agents Actions 1984, 15: 500-508.
- Strunk R. C., Eidlen D. M., Mason R. J. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. J Clin Invest 1988, 81: 1419–1426.
- Szalai G., Csordas G., Hantash B. M., Thomas A. P., Hajnoczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. J Biol Chem 2000, 275: 15305-15313.
- Szelenyi I., Brune K. Herbal remedies for asthma treatment: between myth and reality. Drugs of Today 2002, 38: 265-303.
- Tadjkarimi S., O'Neil G. S., Luu T. N., Allen S. P., Schyns C. J., Chester A. H., Yacoub M. H. Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: implications for coronary artery bypass graft patency. Cardiovasc Res 1992, 26: 297-300.
- Taggart M. J., Menice C. B., Morgan K. G., Wray S. Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca²⁺, phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. The Journal of Physiology 1997, 499: 485-496.
- Takasaki J., Kamohara M., Matsumoto M., Saito T., Sugimoto T., Ohishi T. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT₂ receptor. Biochem Biophys Res Commun 2000, 274: 316-322.
- Takeuchi Y., Morii H., Tamura M., Hayaishi O., Watanabe Y. A possible mechanism of mitochondrial dysfunction during cerebral ischemia: Inhibition of mitochondrial respiration activity by arachidonic acid. Arch Biochem Biophys 1991, 289: 33-38.

- Meragelman T., Silva G., Mongelli E., Gil R. ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry* 2003, 62: 569-572.
- Torrenegra R., Escarria S., Raffelsberger B., Achenbach H. 5,7-Dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone from the flowers of *Gnaphalium elegans*. *Phytochemistry* 1980, 19: 2795-2796.
- Torrenegra R., Pedrozo J., Robles J., Waibel R., Achenbach H. Diterpenes from *Gnaphalium pellitum* and *Gnaphalium graveolans*. *Phytochemistry* 1992, 31: 2415-2418.
- Tortoriello J., Meckes M., Villarreal M. L., Berlin B., Berlin E. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the highland of Chiapas. *Phytomedicine* 1995, 2: 1-10.
- Tozoy T., Yoshimura y., Sakurai K., Uchida N., Takeda Y., Nakai H., Ishii H. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chem Pharm Bull* 1994, 42: 1096-1100.
- Tu Q., Velez P., Brodwick M., Fill M. Streaming potentials reveal a short ryanodine-sensitive selectivity filter in cardiac Ca²⁺ release channel. *Biophys J* 1994, 67: 2280-2285.
- Tuena de Gómez-Puyou M. Fosforilación Oxidativa. En: *Mitocondria, una Mirada a la Evolución de los Conceptos Básicos y Modernos*. Eds. Vázquez-Memije, ME y Tuena de Gómez-Puyou M. Ed. Prado, México 2002, p 89-124.
- Tunón H., Thorsell W., Bohlin. Mosquito repelling activity of compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Econ Bot* 1994, 48: 11-12.
- Vadas P., Pruzanski W. Role of extracellular phospholipase A₂ in inflammation. *Adv Inflamm Res* 1984, 7: 51-59.
- Vargaftig B., Hai D. Selective inhibition by mepacrine of the release of rabbit aorta contracting substance evoked by administration of bradykinin. *J Pharm Pharmac* 1972, 24: 159-161.
- Varsano S., Kaminsky M., Kaiser M., Rashkovsky L. Generation of complement C3 and expression of cell membrane complement inhibitory proteins by human bronchial epithelium cell line. *Thorax* 2000, 55:364–369
- Vasavada S., Banerjee S., Chakravarti R. Gama-sitosterol from *Clerodendron serratum*. *Bull Calcuta Sch Trop Med* 1967, 15: 61-63.

- Vázquez-Memije M. E., Gallardo G., Carabez A., Delhumeau G. Loose binding of testicular mitochondrial ATPase to the inner membrane. Arch Biochem Biophys 1984, 232: 44-449.
- Vázquez-Memije M. E., Izquierdo-Reyes V., Delhumeau-Ongay G. Insensitivity to uncouplers of testis mitochondrial ATPase. Arch Biochem Biophys 1988, 260: 60-74.
- Watkins P. A., Burns D. L., Kanaho Y., Liu T. Y., Hewlett E. L., Moss V. ADP-ribosylation of transduction by pertussis toxin. J Biol Chem 1985, 260: 13478-13482.
- Weinstock J. L., Blum A., Walder J., Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. J Immunol 1988, 141: 961-966.
- Weiss J. W., Drazen J. M., Coes N., McFadden E. R., Weller P. F., Corey E. J., Lewis R. A., Austen K. F. Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. Science 1982, 216: 196-198.
- Weiss J. W., Drazen J. M., McFadden E. R., Weller P. F., Corey E. J., Lewis R. A., Austen K. F. B. Airway constriction in normal human produced by inhalation of leukotriene. Potency, time course and effects of aspirin therapy. J Am Med Assoc 1983, 249: 2814-2817.
- Welch M.J., Meltzer E. O., Simons F.E. H1-antihistamines and the central nervous system. Clin Allergy Immunol 2002, 17: 337-88.
- Welsch D. J., Creely D. P., Hauser S. D., Mathis K. J., Krivi G. G., Isakson P. C. Molecular cloning and expression of human leukotriene-C4 synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91:9745-9749.
- Werfel T., Kirchhoff K., Wittmann M., Begemann G., Kapp A., Heidenreich F., Gotze O., Zwirner J. Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. J Immunol 2000,165: 6599–6605.
- Wiedermann F. J., Kahler C. M., Reinisch N., Wiedermann C. J. Induction of normal human eosinophil migration *in vitro* by substance-P. Acta Haematol 1993, 89: 213 215.
- Williams R. J., Henderson L. M., Naidoo Y., Cassim B., Elson C. J., Bhoola K. D. Immunocytochemical analysis of tissue kallikrein and the kinin moiety in rheumatoid synovial fluid neutrophils. Br J Rheumatol 1997; 36: 420-425.

- Wingard C. J., Pau R. J., Murphy R. A. Dependence of ATP consumption on cross-bridge phosphorylation in swine carotid smooth muscle. *The Journal of Physiology* 1994, 481: 111-117.
- Woods J. W., Evans J. F., Ethier D. Scott S., Vickers P. J., Hearn L., Heibein J. A., Charleson S., Singer II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* 1993, 178:1935-1946.
- Wooltorton E. Asthma drug zarfilukast (accolate) serious hepatic events. *CMAJ* 2004, 11:1668.
- Yokomizo T., Kato K., Terawaki K., Izumi T., Shimizu T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 2000, 192: 421-432.
- Zamzami N., Hirsch t., Dallaporta B., Petit P., Kroemer G. Mitochondrial complications implications in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenergetics and Biomembranes* 1999, 34: 463-471.
- Zimmerman B. J., Anderson D. C., Granger D. N. Neuropeptides promote neutrophil adherence to endothelial cell monolayers. *Am J Physiol* 1992, 263:G678-G682.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|---|
| AA | Ácido araquidónico |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ADP | Adenosín difosfato |
| AH ₁ | Antihistamínicos H ₁ |
| ANDG | Ácido nordihidroguaiarético |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| ATPasa | Adenosin trifosfato sintetasa |
| Bk | Bradicinina |
| C3a | Proteína del complemento 3a |
| [Ca ²⁺] _i | Concentración de calcio intracelular |
| [Ca ²⁺] _m | Concentración de calcio mitocondrial |
| CaM | Calmodulina |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| COX | Citocromo c Oxidasa |
| COX-1 | Ciclooxigenasa 1 |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| CysLT1 | Receptor para cisteinil leucotrienos tipo 1 |
| CysLT2 | Receptor para cisteinil leucotrienos tipo 2 |
| EETs | Ácido cis-epoxieicotrienólico |
| FC | Fragmentos del sistema del complemento |
| FLAP | Proteína activadora de la 5-lipooxigenasa |
| GDP | Difosfato de guanosina |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| INI | Instituto Nacional Indigenista |
| INECOL | Instituto de Ecología A.C. |
| IP ₂ | Inositol-bifosfato |
| IP ₃ | Inositol-trifosfato |
| IP ₄ | Inositol-tetrafosfato |
| IL-1β | Interleucina- 1β |
| K-H | Krebs-Henseleit |
| HETEs | Ácido hidroxieicotetraenólico |

| | |
|------------------|---|
| His | Histamina |
| 5-HPETE | Ácido 5-hidroieicotetraenóico |
| 15-HPETE | Ácido 15-hidroieicotetraenóico |
| LPA | Lipoxina A |
| LPB | Lipoxina B |
| LTA ₄ | Leucotrieno A ₄ |
| LTB ₄ | Leucotrieno B ₄ |
| LTC ₄ | Leucotrieno C ₄ |
| LTD ₄ | Leucotrieno D ₄ |
| LTE ₄ | Leucotrieno E ₄ |
| MLCK | Cinasa de la Cadena Ligera de la Miosina |
| msnm | metros sobre el nivel del mar |
| nmoles | nanomoles |
| OR | Radicales libres del Oxígeno |
| PAF | Factor activador de plaquetas |
| PLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PG | Prostaglandina |
| RIP ₃ | Receptor del Inositol-trifosfato |
| RS | Retículo sarcoplásmico |
| RyrR | Receptor de rianodina |
| SDH | Succinato Deshidrogenasa |
| Ser | Serotonina |
| SERCA | Sarco endoplasmic reticulum associated calcium- ATPases |
| SP | Sustancia P |
| TC | Tráquea de cobayo |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral- α |
| TXA ₂ | Tromboxano A ₂ |