
**Universidad Autónoma del Estado de
Morelos**

FACULTAD DE FARMACIA

**“ DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN
FUNCIONAL DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE
Argemone mexicana EN TRÁQUEA AISLADA DE RATA”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A

Mota Villalobos Omara Ever

Director de Tesis:

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

ASESOR:

M. en F. Emmanuel Gaona



AGRADECIMIENTOS:

A la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por brindarme las instalaciones para poder realizar el presente proyecto.

A CONACYT a través del proyecto SEP-CONACYT ciencia básica A1-S-13540 por el financiamiento de este proyecto y por la beca otorgada con número de Registro 31008 Nivel I (estudiante de Licenciatura).

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por dirigir el presente proyecto de investigación, por sus consejos, enseñanzas, y calidez, apoyo y paciencia, que permitieron la culminación del presente proyecto.

A el M. en F. Emmanuel Gaona Tovar, por apoyarme en la parte experimental y teórica de este proyecto, por transmitirme sus conocimientos y apoyarme en todo momento.

A la M. en F. Monserrat Hernández, por ayudarme en la parte experimental del proyecto y brindarme su apoyo.

A los miembros del jurado asignado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá, Dr. Julio Almanza Pérez, M. en C. Martha Hernández Labra, Dra. Irene de la Concepción Perea Arango y Dr. Rafael Villalobos Molina. Muchas gracias por sus comentarios y revisiones que ayudaron a enriquecer este proyecto, me siento muy afortunada de tener sinodales con excelente trayectoria académica como ustedes.

DEDICATORIAS:

A mi madre, quien me ha apoyado en todo momento desde que inicie la licenciatura hasta la culminación de este proyecto, gracias por apoyarme y guiarme por el camino correcto. A mi familia en general, que nunca me deja sola, gracias por darme fortaleza, ánimos, calidez y apoyo incondicional.

A el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por ser quien me dio las bases para iniciar y culminar este proyecto, gracias por comprenderme y apoyarme en todo momento, por su calidez y nobleza que me ha brindado e inspirarme a ser cada día mejor, personas como usted en este mundo hay muy pocas, gracias por todo.

Le agradezco a mi asesor de tesis, Emmanuel Gaona Tovar por compartirme sus conocimientos y estar conmigo en cada paso del proyecto, gracias por tenerme paciencia y ayudarme en cualquier momento que lo necesitaba, ya sea experimental como en mi vida personal, tienes un gran corazón.

Gracias a Monserrat Hernández por ayudarme a terminar ensayos experimentales y apoyarme, por su paciencia, disponibilidad y nobleza.

A el equipo de trabajo del L-10 quienes hicieron agradable mi estancia, gracias por permitirme compartir un pedazo de mi vida a su lado; Julia, Paulina, Hugo, Gao, Armando, Marlen, Erandi, Monse, Martín, siéntanse orgullosos porque representan al L-10 dirigido por un gran investigador.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Anatomía de la tráquea.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2. Sección transversal de la tráquea.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3. Ilustración del proceso de contracción/relajación. Interacción de las cadenas Actina/Miosina y MCLK/MLCP del musculo liso de las vías aéreas..</i>	<i>21</i>
<i>.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 4. Ilustración de vías aéreas superiores de un paciente asmático, controlado con farmacoterapia/no controlado.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 5. Interacciones de la fisiopatología del asma.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 6. Proceso inflamatorio; mecanismo inmunologico.....</i>	<i>25</i>
<i>.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 7. Epidemiología; mortalidad del asma a nivel mundial, incidencia del asma a nivel nacional.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 8. Sección lateral y superior de la planta Argemone mexicana</i>	<i>31</i>
<i>Figura 10. Diversidad estructural de alcaloides tipo Bencilisoquinolínicos</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11. Disección de una rata macho, cepa Wistar.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 12. Proceso de estabilización y sensibilización del ensayo ex vivo.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 13. Esquema ilustrativo del ensayo ex vivo con ‘participación’ de las fosfodiesterasas</i>	<i>48</i>
<i>Figura 14. Imagen ilustrativa de un ensayo ex vivo con bloqueo de canales de Potasio, utilizando Tetraetilamonio (TEA).</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. Esquema representativo del procedimiento para determinar la participación de las enzimas Guanilato Ciclasa/Oxido Nítrico Sintasa.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Esquema del procedimiento donde participan los receptores muscarínicos.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17. Esquema ilustrativo del procedimiento donde participan los receptores β2 adrenérgicos.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 18. Esquema ilustrativo del ensayo donde participan canales de calcio activados por KCl</i>	<i>51</i>
<i>Figura 19. Esquema ilustrativo del ensayo de bloqueo de canales de calcio</i>	<i>52</i>
<i>Figura 20. Extractos diclorometánicos obtenidos</i>	<i>55</i>

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Evaluación del efecto tráquea-relajante de los extractos orgánicos de Argemone mexicana (EHAm, EDAm y EMAm) sobre la contracción inducida con carbacol en modelo ex vivo de tráquea aislada de rata</i>	<i>34</i>
<i>Gráfica 2. Efecto relajante del extracto diclorometanico sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de CE_{50} de teofilina</i>	<i>56</i>
<i>Gráfica 3. Efecto del extracto Diclorometánico en presencia de ODQ [$2.66 \mu M$] y L-NAME [$1 \mu M$] en anillos de tráquea aislada de rata.</i>	<i>58</i>
<i>Gráfica 4. Efecto del isoproterenol en la relajación por EDAm sobre anillos de tráquea aislados de rata.</i>	<i>59</i>
<i>Gráfica 5. Efecto del Tetraetilamonio sobre los anillos de tráquea aislada de rata</i>	<i>60</i>
<i>Gráfica 6. Efecto del extracto diclorometano de Argemone Mexicana, sobre la contracción inducida con carbacol en anillos de tráquea aislada de rata</i>	<i>62</i>
<i>Gráfica 7. Efecto tráquea-relajante del extracto diclorometano de Argemone Mexicana</i>	<i>64</i>
<i>Gráfica 8. Efecto de contracción por $CaCl_2$ en anillos de tráquea aislada de rata con y sin el extracto Diclorometánico de Argemone mexicana.</i>	<i>66</i>

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos Broncodilatadores utilizados para el tratamiento del asma.¡Error! Marcador no definido.

Tabla 2. Medicamentos Antiinflamatorio utilizados para el tratamiento del asma.¡Error! Marcador no definido.

*Tabla 3. Descripción taxonómica de la planta Argemone mexicana. **30***

*Tabla 4. Pesos y rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos de Argemone mexicana. **54***

LISTADO DE ABREVIATURAS:

AA: Ácido Araquidónico

ABI's: Bencilisoquinolicos

AC: Adenilato Ciclasa

ACh: Acetilcolina

AMP: Adenosina Monofosfato

AMPC: Adenosina Monofosfato Cíclico

ATP: Adenosina Trifosfato

BALT: Bronchus Associated Lymphoid Tissue

Ca²⁺: Ión Calcio

CaM: Calmodulina

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CPA: Células Presentadoras de Antígeno

CE₅₀: Concentración Efectiva 50

DAG: 1,2- Diacilglicerol

EDAm: Extracto Diclorometanico de *Argemone mexicana*

RE: Retículo Endoplásmico

GINA: Global Initiative For Asthma

CCR: Curva de Concentración-Respuesta

GCp: Guanilato Ciclasa Particulada

GCs: Guanilato Ciclasa Soluble

GDP: Guanosina Difosfato

GMP: Guanosina Monofosfato

GMPc: Guanosina Monofosfato Cíclico

GTP: Guanosina Trifosfato

IgE: Inmunoglobulina E

ILC: Interleucinas

IP₃: Inositol 1,4,5-trisfosfato

IP₃R: Receptores de IP₃

K⁺: Ión Potasio

L-NAME: Nitro-arginina-metil-éster

MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue

MLC: Myosin Light Chain

MLCP: Myosin Light Chain Phosphatase

MLCK: Myosin Light Chain Kinase

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

ODQ: 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona



OMS: Organización Mundial de la Salud

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PBM: Proteína Básica Principal

PCE: Proteína Catiónica de Eosinófilos

PDE's: Fosfodiesterasas

PFP: Factor Activador de Plaquetas

PKA: Proteína Cinasa A

PLA₂: Fosfolipasa A₂

PLC: Fosfolipasa C

PKC: Proteína Cinasa C

TEA: Tetraetilamonio

TEO: Teofilina

TGB- β : Factor de crecimiento transformador β

μ M: Micromolar

2. RESUMEN





La medicina tradicional en México ha sido un factor de identidad cultural y un recurso curativo de amplio reconocimiento social, teniendo un gran impacto desde tiempos prehispánicos en los mexicanos. Las plantas medicinales constituyen un recurso de atención a la salud, así como también apuestan al desarrollo científico interactuando con modelos terapéuticos, con el fin de establecer nuevos fármacos que se acoplen a las nuevas estrategias de salud. Las plantas del género *Argemone* conocidos como “Chicalotes”, son utilizadas para tratar diversas afecciones como infecciones, irritación en la piel, tos, bronquitis etc. La importancia de especies de este género en la medicina tradicional mexicana y la evidencia de sus propiedades biológicas en investigaciones sobre sus propiedades antiasmáticas, muestran la relevancia de realizar estudios fitoquímicos y analizar las actividades biológicas, así como sus mecanismos de acción. Con esto en mente, en este proyecto se determinó el efecto relajante del extracto diclorometánico de *Argemone mexicana* sobre la musculatura lisa de las vías aéreas, así como su mecanismo de acción funcional. La actividad farmacológica del extracto mostró mayor actividad farmacológica, con $E_{\text{máx}}$ del $102 \pm 1.86 \%$ y CE_{50} de $89.98 \pm 1.81 \mu\text{g/ml}$. Se hicieron evaluaciones farmacodinámicas para establecer el mecanismo de acción funcional en un modelo *ex vivo*, utilizando agonistas e inhibidores enzimáticos involucrados en las vías de señalización, en los procesos de contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas. Se descartó la participación de las fosfodiesterasas, así como la participación de la vía NO/GMPc. Asimismo, se demostró que el extracto produjo el efecto relajante por diferentes mecanismos: incluyendo antagonismo no competitivo sobre los receptores muscarínicos y aumento de segundo mensajero AMPc. Finalmente, la evaluación del extracto sobre las vías involucradas en el flujo de calcio, indicó el posible bloqueo de canales del ión en su efecto relajante. Probablemente existan componentes del extracto que influyen en la hiperpolarización de la membrana.

3. INTRODUCCIÓN



México cuenta con una gran biodiversidad, siendo las plantas medicinales el recurso más abundante, accesible y conocido. La medicina tradicional en México ha



sido factor de identidad cultural y recurso curativo de amplio reconocimiento social, teniendo gran impacto desde tiempos prehispánicos en los mexicanos. Las plantas medicinales constituyen un recurso de atención a la salud, así como también apuestan al desarrollo científico en la interacción con modelos terapéuticos, con el fin de establecer nuevas moléculas como potenciales fármacos para las estrategias terapéuticas de salud. Sin embargo, debido al limitado conocimiento científico en los recursos etnomédicos en el uso de las plantas medicinales, muchos de los productos naturales que aún no han sido explorados, con frecuencia son subestimados o ignorados en los servicios de salud.

Por otro lado, en la medicina tradicional mexicana se ha evidenciado que las plantas del género *Argemone* conocidos como “*Chicalotes*”, son utilizadas para tratar diversas afecciones como irritación, infecciones, gingivitis, bronquitis, tos, diabetes, purgante etc. **(Monroy-Ortiz & Castillo España, 2007) (Hernández-Martínez. et al. 2020)**, como es el caso de *Argemone mexicana*, “chicalote amarillo”, originaria de México que ha sido estudiada y documentada en la literatura científica, con diversas propiedades farmacológicas tales como antidiabética, anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, hepatoprotectora, antialérgica, antihelmíntica y afecciones cutáneas **(Nancy & Praveena, 2017)**; así como propiedades antiasmáticas y para tratar de enfermedades respiratorias **(Haiat & Bucay, 2009)**.

El asma es una de las principales enfermedades respiratorias no transmisibles. Es definida como enfermedad crónica caracterizada por provocar inflamación y estrechamiento de las vías aéreas inferiores, que conducen el aire a los pulmones **(OMS, 2020)**. Según las estimaciones más recientes de la Organización Mundial de la Salud, en 2019 hubo 461,000 muertes por asma en todo el mundo y afectó a 262 millones de personas **(OMS, 2020)**. En este contexto, es de gran interés las especies del género *Argemone* en la medicina tradicional mexicana y la evidencia de sus propiedades antiasmáticas en investigaciones actuales. Por otra parte, es importante realizar estudios fitoquímicos y analizar las actividades biológicas de los metabolitos. Por lo anterior, en este proyecto se propuso solo evaluar la planta *Argemone mexicana*, para la búsqueda de nuevas



moléculas como potenciales fármacos antiasmáticos, y también la búsqueda del mecanismo de acción de las moléculas presentes en el extracto diclorometánico, debido a que nuestro grupo de investigación ha trabajado y evidenciado la detección de la actividad biológica relajante en tráquea aislada de rata.

4. ANTECEDENTES



4.1. Sistema respiratorio

Es el sistema orgánico encargado de mantener el intercambio de gases con el medio ambiente y, por lo tanto, cumple dos objetivos fundamentales: por un lado, obtener el oxígeno del aire atmosférico que nuestros tejidos utilizan para las reacciones metabólicas; por otro, eliminar el dióxido de carbono que se genera como residuo metabólico y cuya acumulación resulta tóxica (**Parramon Paidotribo, , 2013**).

El sistema respiratorio se divide en dos zonas respiratorias, la primera es donde ocurre el intercambio de gases entre el aire y la sangre, el segundo es una zona de conducción. El intercambio de gases entre el aire y la sangre ocurre a través de las paredes de los alvéolos respiratorios, que permiten índices rápidos de difusión de gas (**Suart Ira Fox, 2017**). El sistema respiratorio comprende las vías aéreas, el tejido pulmonar alveolar, el intersticial y las venas, arterias, vasos linfáticos y nervios que intervienen en el funcionamiento del sistema (**Beltrán ,2017**).

4.1.1. Vías aéreas

Las vías aéreas se suelen dividir en dos grandes secciones: vías aéreas altas y vías aéreas bajas. Las vías respiratorias altas o superiores se encargan de filtrar partículas grandes, como el polvo y gérmenes que flotan en el aire que respiramos, además de calentar y humedecer el aire; comprenden desde la nariz hasta la laringe, incluidos los senos paranasales. Por otro lado, las vías respiratorias bajas o inferiores incluyen: la tráquea, los bronquios, bronquiolos y alvéolos, figura 1 (**Beltrán, 2017**).

4.1.2. Anatomía y Fisiología de la Tráquea

La tráquea, es un conducto fibrocartilaginoso elástico, oblicuo hacia abajo y hacia atrás, reforzado por una serie de cartílagos llamados “anillos” (15-20 anillos cartilaginosos) ya que no son un círculo completo, como se observa la figura 2, en reposo mide 11 cm de largo por 2.5 cm de diámetro. Está situada por delante del esófago y en su segmento cervical, está en contacto con el istmo tiroideo y la fascia cervical (**Person, 2002**).

La tráquea posee una estructura que guarda relación estrecha con sus funciones. Al ser cilíndrica, permite el paso del aire durante todo el ciclo respiratorio, así como la hematosis y la fonación; lo cual constituye la función aérea de la tráquea, que se encuentra bajo el control del sistema nervioso parasimpático. Posee la función de drenaje relacionada con su aparato mucociliar, que permite la eliminación de las partículas inhaladas hacia la faringe. Por último, el tejido linfóide asociado a bronquios (BALT), formado por acúmulos linfoides parietales, otorga a la tráquea una función inmunitaria celular y humoral específica (Prades & Chardon, 2000).

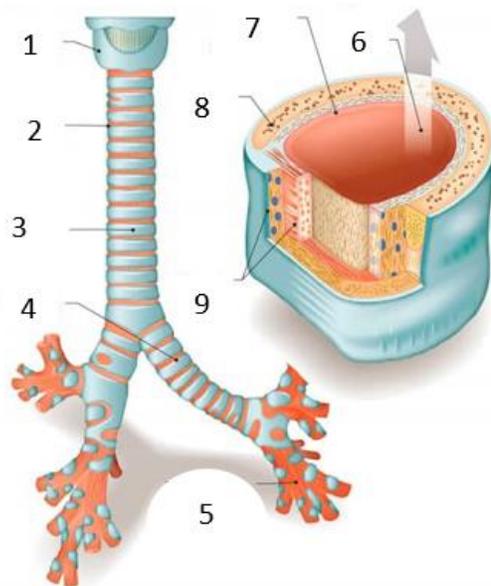


Figura 1. Anatomía de la tráquea. 1. Laringe; 2. Tráquea; 3. Anillos cartilagosos; 4. Bronquios; 5. Ramificaciones; 6. Vía aérea; 7. Revestimiento de la tráquea; 8. Cartílago 9. Capas musculares (Curiosoando, actualizado 2019)

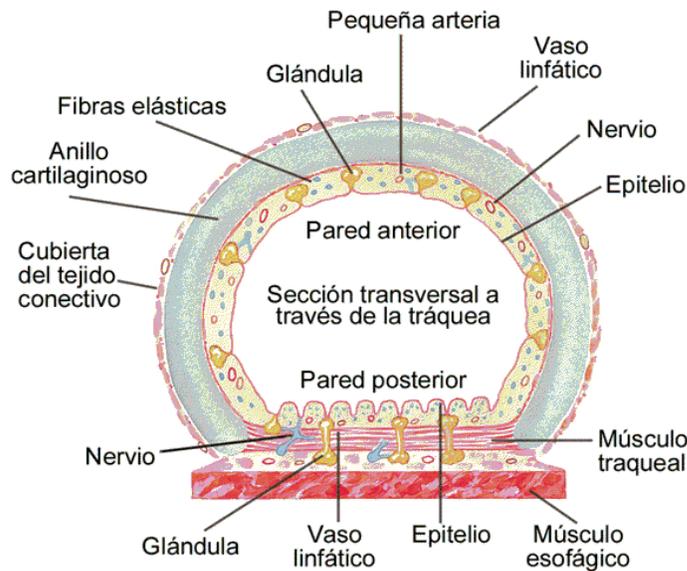


Figura 2. Sección transversal de la tráquea en la que se aprecia un anillo cartilaginoso no completo, ya que la pared posterior de la tráquea esta sobrepuesta directamente sobre el esófago otorgándole soporte (Beltrán Sáez ,2017).

4.1.3. Mecanismo de contracción y relajación de las vías aéreas.

4.1.3.1. Acción de las proteínas Actina/Miosina

En todas las células musculares la contracción depende del aumento en concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, provenientes del retículo sarcoplásmico o del medio extracelular vía canales de calcio. El Ca^{2+} se une a la calmodulina (CaM) formando un complejo $\text{Ca}^{2+}+\text{CaM}$. Este complejo activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual fosforila a la cadena ligera de miosina (MLC). La cabeza de miosina fosforilada interactúa con la actina y desplaza al filamento delgado generando, así, la contracción. Posteriormente el Ca^{2+} es retirado del citoplasma, aunado a esto la proteína fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) desfosforila a la cadena ligera de miosina (MLC), llevando al músculo liso a su estado de relajación. Figura 3 (Renna & Miatello, 2013).

4.1.3.2. Mecanismo de las vías aéreas: Contracción

La contracción del músculo liso puede iniciar por diferentes mecanismos,

incluyendo estímulos eléctricos, químicos, hormonales y mecánicos. Un mecanismo importante que controla la contracción de estas células involucra a las hormonas circulantes y los neurotransmisores, que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (Kuo & Ehrlich , 2015), como es el caso del agonista acetilcolina (ACh) con su receptor de membrana celular muscarínico M3, esta interacción induce un cambio en la conformación del receptor y promueve la asociación y activación de la proteína G_q que asocia el GTP y libera GDP en la subunidad G_α , en consecuencia la subunidad G_α -ATP activa la Fosfolipasa C (PLC) quien hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en dos mensajeros intracelulares: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). El DAG se une a la membrana y promueve la activación de la proteína cinasa C (PKC). La PKC estimula la fosfolipasa A2 (PLA2) que hidroliza fosfolípidos de membrana que contienen ácido araquidónico (AA) e inducen la formación de mediadores de la inflamación por la ciclooxigenasa a partir del ácido araquidónico (AA), actúa en la fosforilación de la calponina cuya función es fosforilar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) en la unidad catalítica inhibiendo su efecto fosfatasa y promoviendo la contracción. (Beñaldo *et al.*, 2017). Por otro lado, el IP_3 se une y abre a los Receptores-canal de IP_3 (IP_3R), provocando la liberación de Ca^{2+} del través de canales de calcio dependientes del voltaje tipo L y T que se encuentran en el retículo endoplásmico (Ávila, 2017) (Bergantiños *et al.*, 2001).

Otra vía de aumento de Ca^{2+} son los canales de calcio sensibles a voltaje, tipo L y T localizados en la membrana plasmática. La apertura de estos canales dependerá de cambios en el potencial de membrana. Específicamente, cualquier estímulo que genere una despolarización (cambios en el potencial de membrana), provoca la apertura de estos canales, facilitando así la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular al intracelular (Beñaldo *et al.*, 2017).

4.1.3.3. Mecanismo de las vías aéreas: Relajación

Los principales mecanismos que promueven la relajación de la musculatura lisa, involucran a los segundos mensajeros. Al ocuparse el receptor β_2 -adrenérgico

acoplado a proteína G, que es activado por la noradrenalina, se activa la enzima adenilato ciclasa (AC). La activación de AC, cataliza la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosina trifosfato (ATP). El AMPc es un segundo mensajero que activa la proteína cinasa A (PKA). La PKA cumple varias funciones; reduce la movilización de calcio hacia el citosol, fosforila a PLC, MLCK, inhibe la afinidad de calmodulina por el calcio y activa los canales potasio, dependientes de calcio que promueven la repolarización de la membrana y con ello, la relajación (Ávila, 2017).

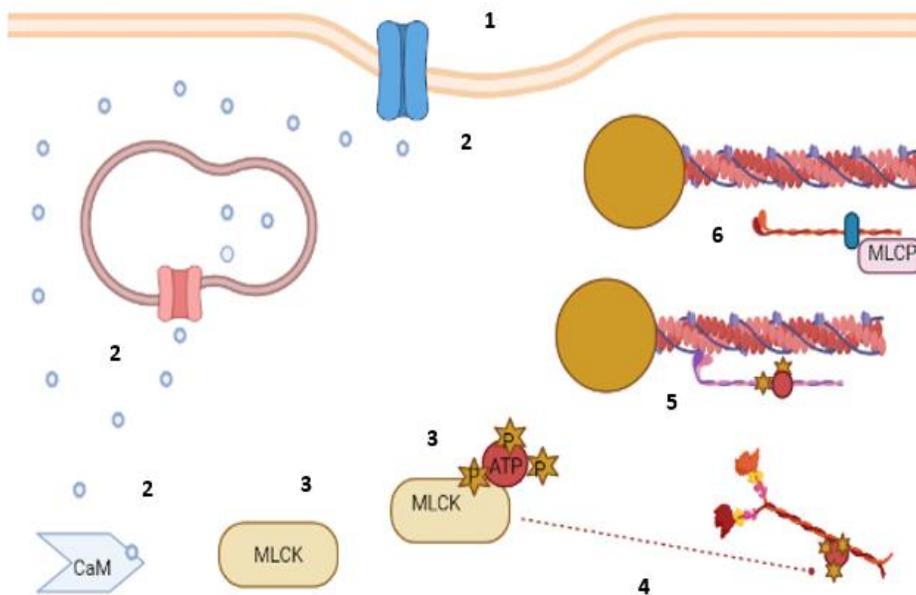


Figura 3. Ilustración del proceso de interacción de las cadenas Actina/Miosina y MCLK/MLCP del músculo liso de las vías aéreas. 1)Iniciación del estímulo. 2)El estímulo desencadena la entrada de calcio, se une a la CaM formado un complejo. 3)El complejo activa a la MCLK 4)La MCLK fosforila a la MLC. 5)La miosina fosforilada interactúa con la actina, generando así la contracción. 6)El calcio es retirado y la MLCP desfosforila a la MLC llevando al músculo a la relajación.

4.2. Asma

Se considera enfermedad respiratoria a cualquier condición que afecte el sistema respiratorio, principalmente a los pulmones, condicionan una de las primeras causas de atención médica en el mundo, siendo el asma una de las



principales. Algunas de las enfermedades respiratorias con más casos actualmente se encuentran en la siguiente lista..

- Asma
- Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)
- Tuberculosis
- Cáncer pulmonar
- Infecciones Respiratorias Agudas (IRA)
- Neumonía
- Cáncer de laringe

La palabra asma, deriva del griego “*aazein*” cuyo significado es “*exhalar con la boca abierta o jadear*”. Este cuadro clínico fue identificado en antiguos escritos egipcios y hebreos. Sin embargo, la primera descripción clínica reconocida de un ataque de asma fue hecha por Aretaeus de Capadocia en el siglo II d.C. describió al asma como una enfermedad, poniendo énfasis en las sibilancias, (sonido silbante y chillón durante la respiración), tos seca e improductiva y la imposibilidad de dormir acostado **(Murtagh, 2009)**. Posteriormente, Paulus Aegimetri (siglo VII d.C.), médico bizantino de Alejandría, supuso que “*el humor espeso y viscoso*” era el responsable de obstruir el pasaje de aire dentro de los pulmones. Hasta este punto estaban cerca de los conceptos actuales sobre el asma **(Murtagh, 2009)**. El asma es una de las principales enfermedades no transmisibles; es definida una enfermedad crónica, caracterizada en provocar inflamación y estrechamiento de las vías inferiores que conducen el aire a los pulmones **(OMS, 2020)**. Se ha evidenciado que la inflamación crónica de las vías aéreas inferiores es más común en personas que también tienen trastornos inflamatorios de las vías aéreas superiores **(Mins, 2015)**. Se caracteriza por provocar ataques recurrentes de disnea y sibilancias, durante los ataques de asma el revestimiento de los bronquios se hincha, con lo que disminuye su diámetro interno y se reduce el flujo de aire que entra y sale de los pulmones. Su gravedad es variable según el paciente y de la adherencia al tratamiento que se tenga. Como se observa en la Figura 4A, el revestimiento del

paso del aire se mantiene abierto en pacientes controlados con tratamientos antiasmáticos. Sin embargo, en la Figura 4B, cuando el paciente no está controlado el revestimiento se hincha e impide el paso del aire. La sintomatología puede manifestarse varias veces al día o a la semana, y en algunos casos empeoran durante la actividad física o por la noche **(OMS, 2020)**.

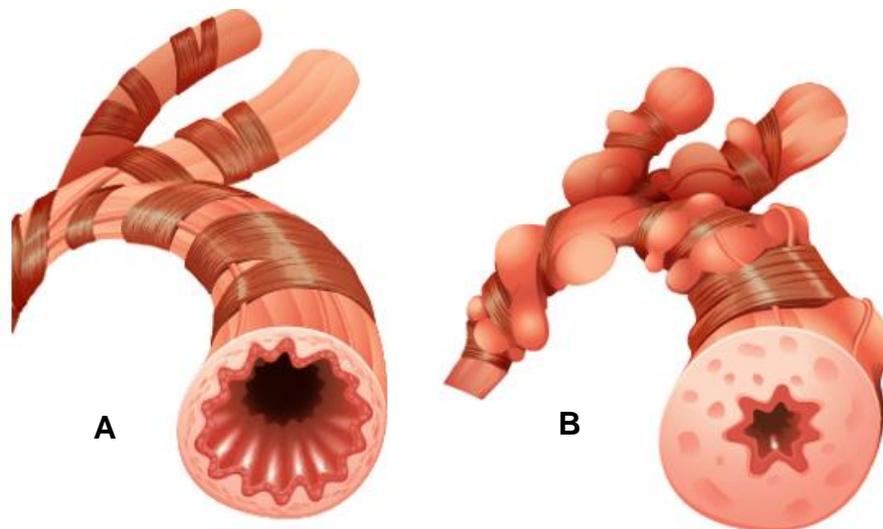


Figura 4. A) Ilustración de vías aéreas superiores de un paciente asmático, controlado con farmacoterapia. B) ilustración de las vías aéreas superiores de un paciente asmático no controlado. Guía para paciente de GINA, 2021.

4.2.1. Fisiopatología del Asma

El asma es un proceso inflamatorio crónico que condiciona la resistencia al flujo aéreo de las vías respiratorias. Intervienen varios tipos de células inflamatorias y múltiples mediadores que producen los mecanismos fisiopatológicos característicos de **inflamación, obstrucción reversible, hiperrespuesta bronquial y remodelado de la vía aérea**. figura 5 **(García *et al.*, 2016)**.



Figura 5. Interacciones de la Fisiopatología del Asma. NAEPP 2007.

4.2.1.1. Inicio de la Cascada Inmunológica: Sensibilización.

Desde el punto de vista químico el asma es un proceso inflamatorio, el cual inicia como fenómeno de sensibilización, en este proceso el alérgeno atraviesa la barrera mucosa y, posteriormente, tiene contacto directo con las células dendríticas (CD) el tejido linfóide asociado a mucosas (MHC). Las CD son células presentadoras de antígeno, a los linfocitos T vírgenes e inicia la participación activa de los linfocitos Th2. Comienza la liberación de interleucinas (ILC), como IL-5 IL-13 IL-4, para activar a los linfocitos B y se transformen en células plasmáticas que producen anticuerpos (inmunoglobulinas IgE). El aumento de IgE condiciona su depósito en células receptoras como mastocitos y basófilos (**Jaimes-García et al., 2018**).

4.2.1.2. Respuesta Mastocítica.

Posteriormente la unión del alérgeno-anticuerpo IgE, provoca la desgranulación del mastocito, liberando Histamina, Leucotrienos, Prostaglandinas D2, Quinasas y mediadores químicos como el Factor de Activación Plaquetario (PFP), que tiene efecto sobre el músculo liso bronquial, generando vasodilatación, edema y broncoespasmo (broncoconstricción). Además, estas partículas estimulan las glándulas que rodean el bronquio que produce moco, contribuyendo a tapar el lumen bronquial (**Durán, 2015**).

4.2.2. Epidemiología.

La prevalencia del asma aumenta paulatinamente a pesar de los avances logrados en su tratamiento. Entre los factores que influyen en el aumento de la prevalencia del asma son: obesidad, sedentarismo, exposición continua a alérgenos entre otros **(Solís, 2010)**. La OMS estimó que, en 2019, el asma afectó a 262 millones de personas y causó 461,000 muertes **(OMS, 2020)**. Por otro lado, la GINA reporta 358 millones de individuos afectados. La prevalencia global del asma varía del 1 al 22% de la población en diferentes países, los datos no son suficientes para determinar las causas probables de las variaciones descritas en la prevalencia dentro y entre las poblaciones. Sin embargo, la sintomatología ha disminuido en Europa occidental, pero aumentado en regiones donde la prevalencia era baja. La sintomatología del asma en África, América Latina, Europa del Este y Asia continúa aumentando **(GINA, 2020)**.

Por otro lado, en México la incidencia anual de asma es de 2.78 por 1,000 habitantes **(Solís, 2010)**; mientras que la mortalidad estimada es de 0.5 casos por cada 100,000 muertes de los 5 a los 34 años (mortalidad general), y de 14.5 decesos al año por cada 100,000 casos de asma. Figura 7. Esto nos sitúa en el octavo lugar en mortalidad a nivel mundial, donde China tiene el primer lugar con 36.7 muertes por cada 100,000 casos de asma **(Piedras & Huerta, 2011)**.

Existen diferentes factores que afectan la incidencia del asma, como es el caso de la época del año, siendo que en México aumenta en los meses entre octubre a enero; por otro lado, hay menor incidencia en la adultez temprana y aumenta ligeramente en etapas subsecuentes **(Solís, 2010)**. Considerando las cifras oficiales de asma en México figura 7B, la incidencia fue mucho mayor en Tabasco y Yucatán **(Vargas Becerra, 2009)**. El asma no tiene cura, pero es controlada con medicación. El adecuado tratamiento permite buena calidad de vida. Las recomendaciones de la GINA sugieren un ciclo cuyo objetivo es prevenir las exacerbaciones y controlar los síntomas del paciente **(GINA, 2020)**.

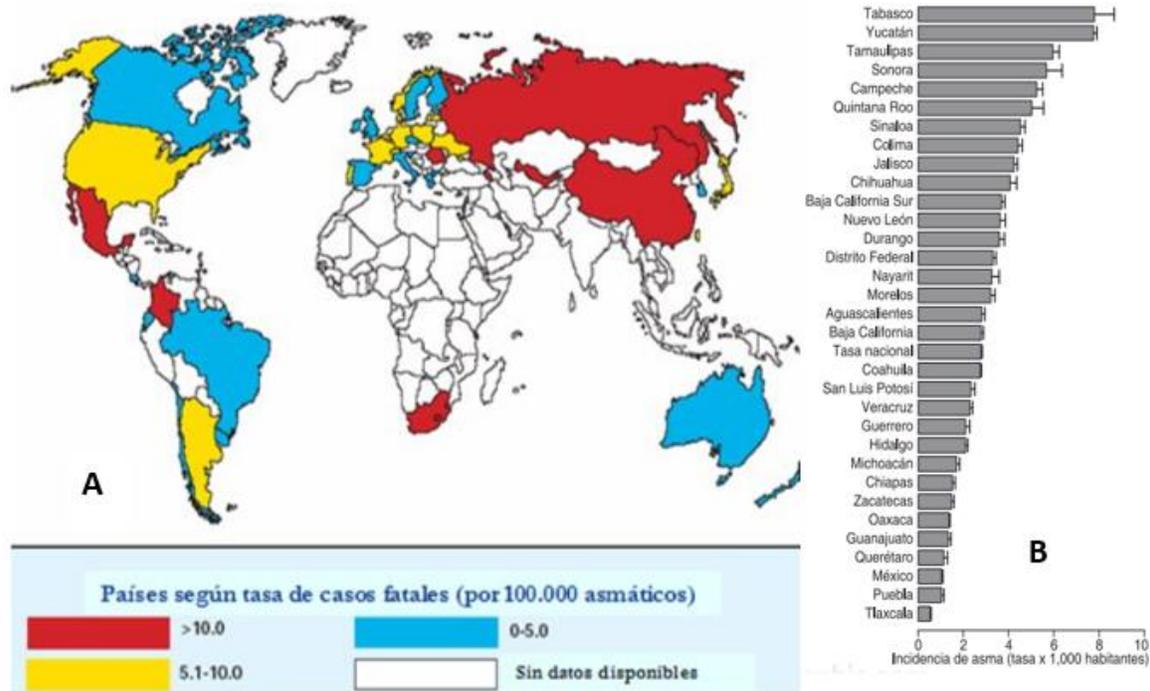


Figura 7. A) Esquema de la mortalidad del asma a nivel mundial, (Asociación Mundial Contra el Asma, Tomado de López, 2007) B) Se muestra la Incidencia de asma en los diferentes estados de la República Mexicana. (Tomado de Dirección General de Epidemiología, Datos del 2007)

4.2.3. Tratamiento Farmacoterapéutico.

El tratamiento farmacológico tiene como objetivo mejorar los síntomas del paciente y evitar las crisis asmáticas, se debe ajustar periódicamente de forma escalonada en función de la gravedad (**Larenas-Linneman et. al, 2021**). Algunos medicamentos utilizados para tratar el asma se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Medicamentos Broncodilatadores utilizados para el tratamiento del asma. Tomado y modificado de: Larenas-Linneman et al. MIA 2021, Manejo Integral del asma. Lineamientos para México

Broncodilatadores	Mecanismo de Acción	Fármacos	Reacciones Adversas
Selectivos β 2 adrenérgicos	Activan receptores β 2-adrenérgicos en el músculo liso bronquial causando relajación muscular y, con ello, broncodilatación	Acción Corta: Salbutamol, Terbutalina Acción Larga: Salmeterol, Formoterol	Temblor taquicardia sinusal y nerviosismo.
Antimuscarínicos	Provoca broncodilatación antagonizar la unión de acetilcolina con sus receptores muscarínicos.	Bromuro de ipratropio	Mareos, náuseas, acidez estomacal, constipación, sequedad en la boca, dificultad para orinar, orinar con frecuencia.
Metilxantinas	Relajan el músculo liso bronquial, al inhibir las fosfodiesterasas.	Teofilina Aminofilina	Taquicardia y arritmia, palpitaciones, hipotensión, náuseas, vómitos, diarrea, debilidad del tono muscular en el esfínter esofágico inferior, hipocalcemia.

Tabla 2. Medicamentos Antiinflamatorio utilizados para el tratamiento del Asma. Tomado y modificado de: Larenas-Linneman et al. MIA 2021, Manejo Integral del Asma. Lineamientos para México.

Antiinflamatorios	Mecanismo de Acción	Fármacos	Reacciones Adversas
Corticoesteroides	Se fijan a los elementos de respuesta a los glucocorticoides situados encima del ADN, estimulando la transcripción de algunos genes mientras que inhibe la de otro	Beclometasona, Bunesónida y Fluticasona	Presión arterial alta, malestar estomacal, cambios de humor, la memoria y el comportamiento y otros efectos psicológicos,
Cromonas	Inhiben la acción de los leucotrienos LTC ₄ y D ₄ sobre su receptor provocado un leve efecto antiinflamatorio.	Cromolin	Mal sabor de boca. Sequedad e irritación de la garganta, congestión nasal, lagrimeo, náuseas o vómito cefalea dificultad para tragar, edema de los labios, erupción cutánea prurito
Antagonistas del receptor de leucotrienos	Antagonizan la acción de los leucotrienos LTC ₄ y D ₄ sobre su receptor y con ello tienen un leve efecto antiinflamatorio	Motelukast, Pranlukast y Zarfilukast	Cefalea e infección de las vías aéreas superiores

4.3. *Argemone mexicana* L.

A pesar de que existen medicamentos contra el asma, debido a el limitado acceso a sistemas de salud pública, la medicina tradicional tiene un gran impacto en las comunidades de bajos recursos, siendo *A. mexicana* una planta comúnmente utilizada. Es una herbácea anual o perene de vida corta, pertenece a la familia de las Papaverácea, es una especie endémica de México mejor conocida como “chicalote amarilla”. Esta especie crece como maleza en las zonas de clima cálido, (Monry-Ortiz & Castillo-España, 2007)

4.3.1. Información Taxonómica.

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Papaverales</i>
Familia	<i>Papaveraceae</i>
Género	<i>Argemone</i>
Especie	<i>A. mexicana</i> L.

Tabla 3. Descripción taxonómica de la planta *Argemone mexicana*. Tomado de Enciclovida 2021.

4.3.2. Descripción.

A. mexicana se caracteriza por florecer en los meses de marzo-abril, sus tallos son verde-azulados de 0.3 - 1.0 metros de altura, frecuentemente con numerosas espinas firmes y punzantes (**Laines, 2019**).

Sus hojas son verde claro, con líneas azul-brillante sobre las venas principales, la mayoría de las hojas de la parte media y superior son pinnatífidas, sésiles y abrazadas al tallo con margen dentado, terminando cada diente en una delgada espina, el envés se encuentra moderadamente espinoso y con mayor cantidad de espinas que el haz sobre las venas principales, figura 8A (**Laines, 2019**).

Sus flores son grandes y solitarias de 4-7 cm de diámetro, estrechamente sostenidas por 1 o 2 brácteas; botones subesféricos o variadamente oblongos, moderadamente espinoso (figura 9A). Sus sépalos terminan en forma de punta espinosa, son de 5 a 10 mm de largo. Los pétalos son obovados amarillo brillante-pálido de 2-3 cm. *A. mexicana* contiene de 30-50 estambres con filamentos amarillo-limón y anteras amarillas. Su ovario está cubierto de espinas. Su estilo es muy corto-no visible, el estigma es lobulado púrpura-rojo de 1.5-4.0 mm de ancho

por 1-2 mm de alto (figura 9B). *A. mexicana* tiene 4-5 lóbulos, apretados entre sí. El fruto es una cápsula con espinas de semillas redondas y negras. Su látex es amarillo brillante, figura 8B (Martínez, 1982).



Figura 8. A) Sección lateral de la planta *A. mexicana*, se aprecian tallo, hojas y flor. B) Sección superior de la planta *A. mexicana*, se aprecian bráctea, pétalos, sépalos, filamentos, anteras, estigma y estilo (Galería, CONACYT. 2021).

4.3.3. Nombres Comunes.

Los nombres comunes de *A. mexicana* son; cardosanto, amapola montes, amapola amarilla, amapolita, chicalote (Laines, 2019), carbasanta, hierba espumosa, hierba santa macho, reina y san Carlos (CONABIO, 2021).

4.3.4. Estatus y Distribución.

La planta crece en climas tropicales y subtropicales, está bien adaptada para crecer en suelo pobre en nitrógeno y es tolerante a la sequía y a la salinidad, brindándole pocas restricciones ambientales para propagarse, se le puede



encontrar como flora arvense y vegetación secundaria en áreas de cultivo abandonadas, pastizales y orillas de carretera **(Laines, 2019)**. *A. mexicana* es nativa de la región del Caribe (Indias Occidentales, Centroamérica, Florida y Yucatán). En México es posible encontrarla en casi todos los Estados de la República **(Martínez, 1982)** principalmente en: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán **(Villaseñor & Espinosa, 1998)**.

4.3.5. Conocimientos etnomédicos.

La importancia de esta planta surge por su uso en la medicina tradicional de México *A. mexicana* se ha utilizado a lo largo de la historia por diversas culturas, para aliviar las cataratas, la fiebre, la sarna, como purgante y en ciertas enfermedades cutáneas **(Laines, 2019)**.

4.3.6. Composición fitoquímica.

Los componentes químicos identificados en *A. mexicana* pertenecen a la clase de alcaloides, terpenoides, flavonoides, fenólicos, compuestos alifáticos de cadena larga y compuestos aromáticos **(Brahmachari, Gorai & Roy, 2013)**. En *A. mexicana* destaca por sus alcaloides de tipo bencilisoquinolínicos, los alcaloides mayoritarios son la berberina (protoberberina) y la sanguinarina (benzofenantridina). La berberina está en todos los tejidos de la planta incluyendo las semillas inmaduras, mientras que la sanguinarina se encuentra en raíz y semillas maduras. (Figura 9 y 10) **(Laines, 2019)**.

4.3.7. Toxicidad.

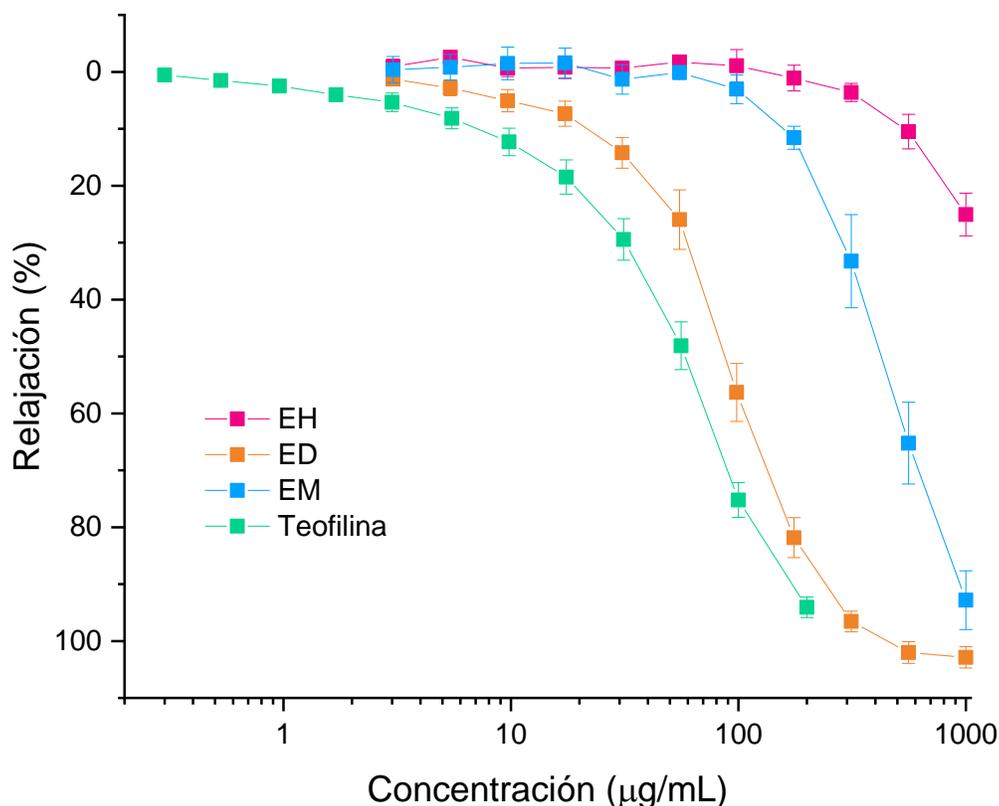
La planta es naturalmente tóxica, no obstante, cardo santo es una planta que, si se utiliza de forma adecuada, resulta muy benéfica. Hasta el momento se ha documentado la toxicidad de esta planta asociada al hígado, induciendo un proceso inflamatorio agudo (hepatitis) y ascitis epidémica **(Meléndez, 2013)**.

4.3.8. Actividad biológica.

Existen diversos estudios científicos que evidencian su actividad antidiabética, anticancerígena, anti-VIH, actividades relacionadas con el sistema nervioso central, acción de recuperación de heridas, actividad antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antipirética, hepatoprotectora, antifertilidad, antialérgica, nematocida, , antihelmíntica, larvicida y efecto alelopático (Nancy & Praveena, 2017)

4.3.9. Actividad tráquea-relajante.

Estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, evidenciaron el efecto tráqueo-relajante de *A. mexicana* sobre ratas macho cepa Wistar. Con base a lo descrito por Rodríguez en 2020, el extracto diclorometánico tuvo mayor efecto traqueorrelajante con Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) del $102 \pm 1.86 \%$ y Concentración Efectiva 50 (CE_{50}) de $89.98 \pm 1.81 \mu\text{g/mL}$, mostrando mayor potencia con respecto a los otros extractos, (metanólico y hexánico) teniendo como control positivo a teofilina y contrayendo con carbacol. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica.



Gráfica 1. Evaluación del efecto tráquea-relajante de los extractos orgánicos de *Argemone mexicana* (EHAm, EDAm y EMAm) sobre la contracción inducida con carbacol en modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata, usando la actividad de Teofilina como control positivo. E_{máx} del 102 ± 1.86 % y una CE₅₀ de 89.98 ± 1.81 µg/mL

4.3.10. Moléculas responsables del efecto tráquea- relajante; Investigaciones fitoquímicas.

Como se mencionó, existen alcaloides bencilsioquinolínicos en el género *Argemone* y se han detectado los grupos protoberberina, benzofenantridina y protropina (figura 9) (Escobar, 2018). De acuerdo con la bibliografía, varios estudios fitoquímicos de distintas partes de la planta de *A. mexicana* muestran alcaloides de estos grupos, sintetizando simultáneamente berberina y sanguinarina se acumulan en partes aéreas y subterráneas.

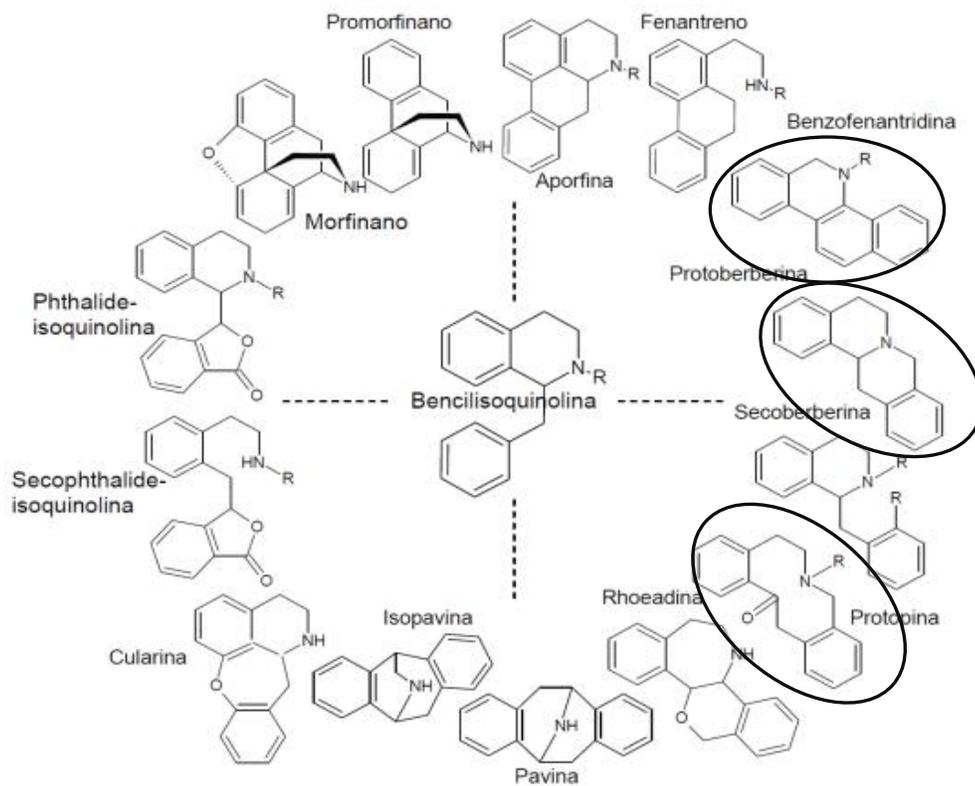


Figura 9. Diversidad estructural de alcaloides tipo Bencilisoquinolínicos ABI'S. Tomado y modificado de De La Cruz Chacón *et al.*, 2012. Los grupos encontrados en plantas del género *Argemone* se encuentran indicados en un círculo

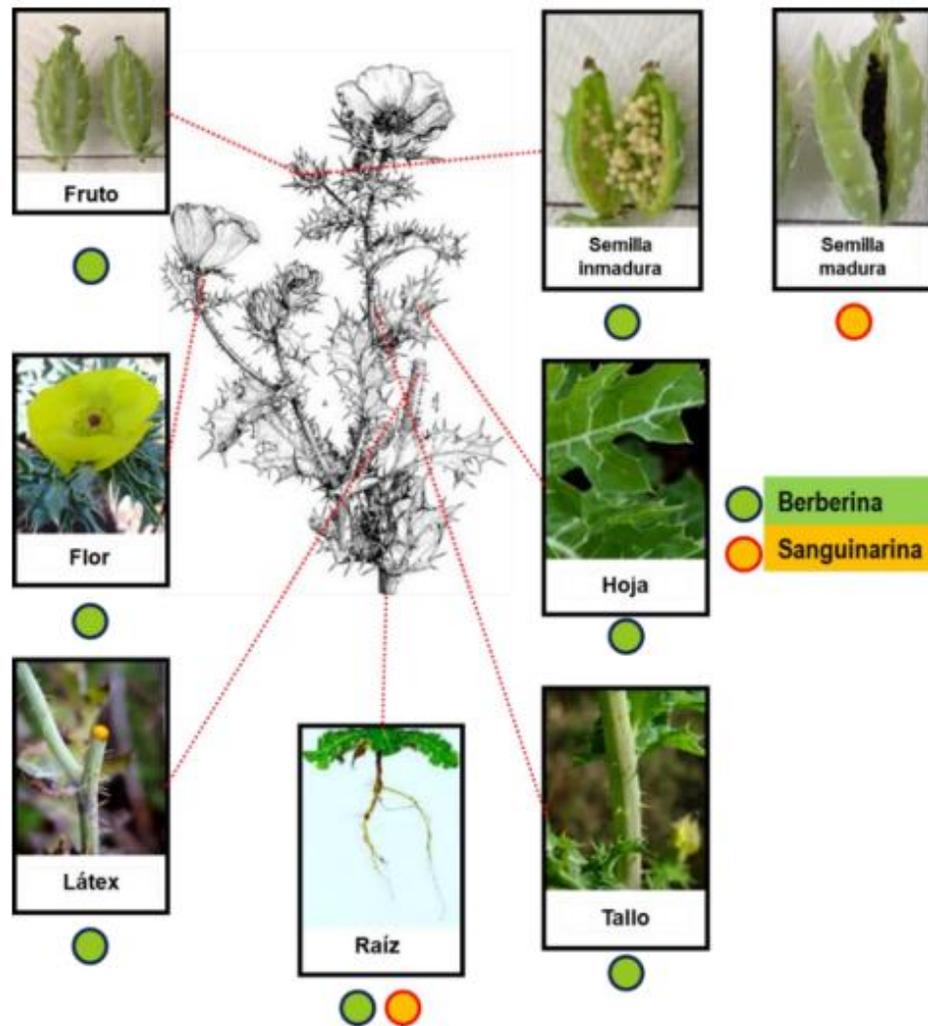


Figura 10. Imagen ilustrativa los alcaloides en *Argemone mexicana*. Distribución en las distintas partes de la planta; la berberina se encuentra en todos los tejidos, la sanguinarina en raíz y semillas maduras. (Tomado de Laines, 2019)

Según lo descrito por Sánchez-Mendoza et al. 2018, aislaron el alcaloide berberina como principio activo tráquea-relajante del extracto diclorometánico en *Argemone orchroleuca*, especie con gran similitud quimio-taxonomica con *Argemone mexicana* (Escobar Zurisadai, 2018). En este estudio, la concentración de berberina relajó de forma dependiente la contracción inducida por carbacol, los resultados sugieren que el efecto tráquea-relajante de berberina sobre el músculo traqueal, se debe a un débil efecto antagonista sobre los receptores muscarínicos y



la activación de la vía de adenilato ciclasa/AMPc (AC/AMPc) (**Sánchez-Mendoza et al., 2008**).

5. JUSTIFICACIÓN





El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes y graves en el mundo, afecta a millones de personas y la prevalencia va en aumento a pesar de los avances en el tratamiento durante las últimas décadas. Debido a los altos costos en la polifarmacia que se emplea para tratarlas, y el limitado acceso a los sistemas de salud pública en las comunidades de bajos recursos es necesario buscar alternativas terapéuticas desde un punto de vista científico que permita garantizar la eficacia y seguridad de su uso. Las plantas son un importante reservorio de compuestos bioactivos con una amplia diversidad estructural y con mecanismos de acción novedosos. En experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha evidenciado el efecto tráquea-relajante de *A. mexicana*, es por ello que se buscan evidencias científicas de las diferentes vías de señalización implicadas en este efecto farmacológico. Con esto en mente, este trabajo se enfocó en determinar el mecanismo de acción funcional del extracto diclorometánico de *A. mexicana* como potencial broncodilatador, para el tratamiento del asma.

6. HIPÓTESIS





El extracto diclorometánico de *Argemone mexicana*, mostrará efecto relajante de la musculatura lisa de tráquea aislada de rata a por el bloqueo de canales de calcio.

7. OBJETIVOS



7.1. Objetivo general.

Determinar el mecanismo de acción funcional del extracto diclorometánico de *A. mexicana* sobre la musculatura lisa de tráquea aislada de rata Wistar.

7.2. Objetivos específicos.

- Recolectar muestras de *Argemone mexicana*
- Obtener del extracto diclorometánico de *Argemone mexicana*
- Evaluar el efecto relajante sobre la musculatura lisa de tráqueas de ratas Wistar en un modelo *ex vivo*.
- Determinar el mecanismo de acción funcional del extracto diclorometánico de *Argemone mexicana* en tráquea de ratas Wistar en un modelo *ex vivo*.

8. METODOLOGÍA



8.1. Colección del Material Vegetal.

La planta *Argemone mexicana* se colectó en el municipio de Tetecala, perteneciente al estado de Morelos, la colecta fue por el M. en F. Emmanuel Gaona Tovar y la identificó la Dra. Irene Perea Arango. (Número de váucher en trámite) Después de limpiar el material vegetal, se sometió a secado a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez completado el secado, se procedió a moler el material vegetal (Flor, tallo, raíces, hojas) en un molino eléctrico modelo 100Y.

8.2. Obtención del Extracto de interés.

Para obtener el extracto diclorometánico se tomaron 344 g del material vegetal seco y molido, se sometieron a un proceso de maceración con disolventes orgánicos en orden de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol), por triplicado y durante 72 horas. Posteriormente se filtró el disolvente antes de ser concentrado para separar el material vegetal, se eliminó el disolvente hasta sequedad a presión reducida en un rota-evaporador con ayuda de una bomba de alto vacío (Buchi R-200).

8.3. Animales.

Para la evaluación farmacológica se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso, en condiciones de bioterio, alimentadas con Nutricubos Purina ® y agua limpia. La manipulación de los animales se hizo de acuerdo con la Regulación Federal para el Manejo y Experimentación de Animales (NOM-062-ZOO-1999).

8.4. Reactivos.

Los reactivos empleados fueron los siguientes: cloruro de carbacol, teofilina, tetraetilamonio (TEA) Nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), Isoproterenol, Solución Ringer-Krebs, Solución Ringer-Krebs 80 Mm y el extracto diclorometánico de la planta *A. mexicana*.

8.5. Obtención de tráquea.

ra evitar el daño del tejido. La tráquea se limpió de tejido adyacente, mucosidad y sangre. Una vez que se obtuvo la tráquea, esta se fraccionó en anillos de 3 a 5 mm (*figura 11*).

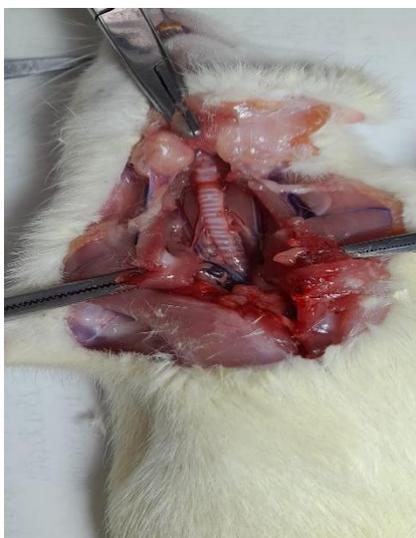


Figura 11. Disección de una rata macho, cepa Wistar, se aprecia los anillos de tráquea, sin limpieza de tejido adyacente. Imagen propia.

8.6. Evaluación Farmacológica: Modelo *ex vivo*.

Cada anillo de tráquea se colocó en una de cámara de incubación con ayuda de dos ganchos, sosteniéndose de un extremo de la cámara y, en el otro extremo, al transductor de fuerza Grass modelo FT 03, acoplado a un sistema BIOPAC® UIM 100C que transforma la información de la fuerza de contracción y relajación que ejerce el tejido. Una vez colocados los tejidos en las cámaras de incubación, se agregó 10 mL de solución de Ringer-Krebs que contiene [mM] NaCl [118], glucosa [11.4], NaHCO₃ [25], KCl [4.7], MgSO₄ [1.2], KH₂PO₄ [1.2], EDTA [0.026], CaCl₂ [2.5], acompañado de constante burbujeo con O₂/CO₂ (95:5) a 37° C y un pH de 7.4 para mantener las condiciones fisiológicas adecuadas. Antes de iniciar los ensayos, el tejido se estabilizó con tensión basal de 2.5 g durante 30 min, ajustando al valor inicial cada vez que se requiriera. Posteriormente el tejido se sometió a sensibilización induciendo contracciones con carbacol [1µM]; una vez alcanzada meseta, el tejido fue lavado con solución Ringer-Krebs normal para regresar a su estado basal, este procedimiento se ejecutó por duplicado. Finalmente, se hizo una tercera contracción, y posteriormente, se inició la evaluación del mecanismo de acción del extracto diclometánico, con la media de 5 anillos con el fin de determinar la CE₅₀ (Concentración Efectiva 50) y la E_{max}. (Efecto Máximo) (figura 12).

Las curvas de concentración-respuesta se construyeron mediante el programa AcqKnowledge (BIOPAC, INC., USA).

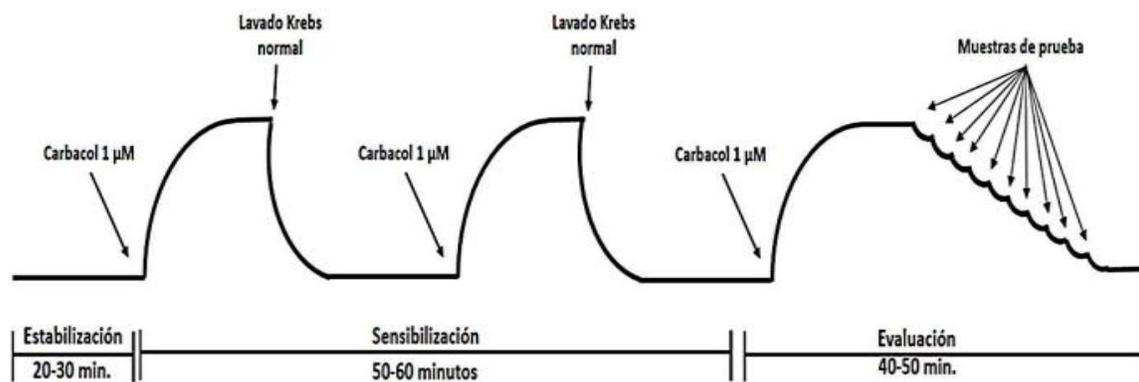


Figura 12. Proceso de estabilización y sensibilización del ensayo *ex vivo*

8.7. Determinación del mecanismo de acción funcional.

Con la finalidad de conocer la vía de señalización por la cual el EDAM ejerce su efecto relajante sobre las vías aéreas, se exploraron diferentes mecanismos involucrados en el proceso contráctil. La evaluación fue de acuerdo con el punto 7.6. con ligeras modificaciones en la evaluación, empleando los inhibidores o activadores correspondientes. Cada una de las evaluaciones se explican detalladamente a continuación:

8.7.1. Participación de las Fosfodiesterasas.

Para explicar la relajación observada para el EDAM y sí actúa inhibiendo las fosfodiesterasas (PDE's) en el tejido, después de estabilizar y sensibilizar, se incubó con teofilina a la CE_{50} [157.16 µM] (Inhibidor no selectivo). Después de 15 minutos, el tejido se contrajo con carbacol [1 µM] y alcanzada la meseta, se adicionaron diluciones del extracto EDAM de manera acumulativa (figura 13)

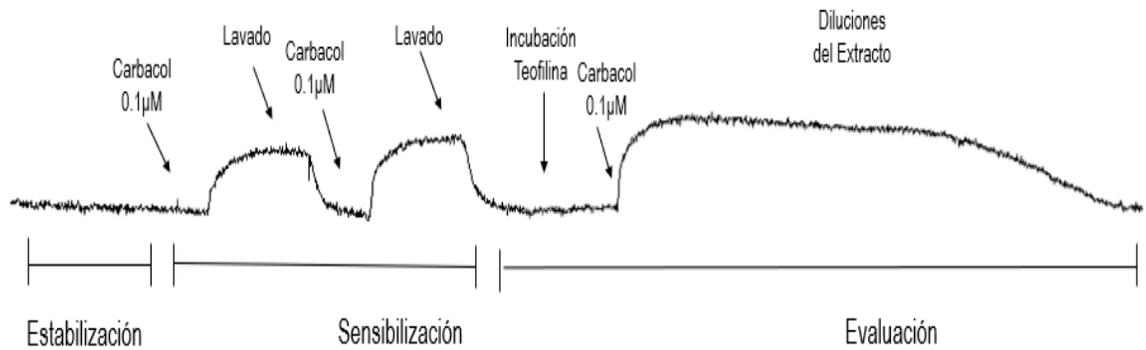


Figura 13. Esquema ilustrativo del ensayo *ex vivo* con 'participación' de las fosfodiesterasas

8.7.2. Participación de Canales de Potasio.

Este experimento se hizo para conocer si al bloquear estos canales las células del músculo liso tráqueal se despolarizan, causando la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente. Luego de estabilizar y sensibilizar los anillos, se incubó por 15 minutos con TEA, (Tetraetilamonio) y se provocó la contracción con carbacol [1 μ M], se agregaron las diluciones del extracto de forma acumulativa (figura 14) se analizó la CRR con y sin el bloqueador.

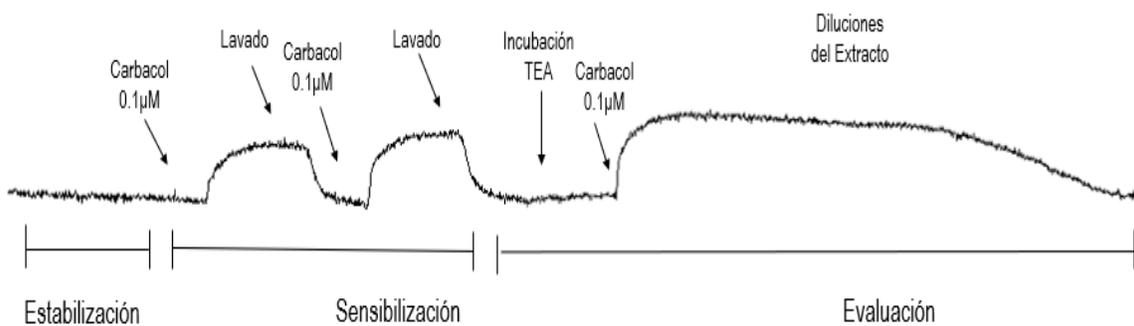


Figura 14. Imagen ilustrativa de un ensayo *ex vivo* con bloqueo de canales de Potasio, utilizando

8.7.3. Participación de la vía NO/GMPc.

Para establecer la participación de la vía óxido nítrico sintasa/GMPc en la relajación provocada por el extracto a estudiar, se hicieron los experimentos funcionales siguientes: después de las etapas de estabilizar y sensibilizar los anillos se preincubó la CE₅₀ del inhibidor correspondiente para cada enzima. Para la óxido nítrico sintasa, se preincubó con L-Nitro-Arginina-Metil-Ester (L-NAME) [2.66 µM]. Por otro lado, inhibir la guanilato ciclasa se preincubó con 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ) [1 µM] y, transcurridos 15 minutos, se contrajo el tejido con carbacol [1 µM], una vez alcanzada la meseta se agregó las diluciones del extracto de manera acumulativa (figura 15) para comparar la CCR del extracto con y sin los diferentes inhibidores.

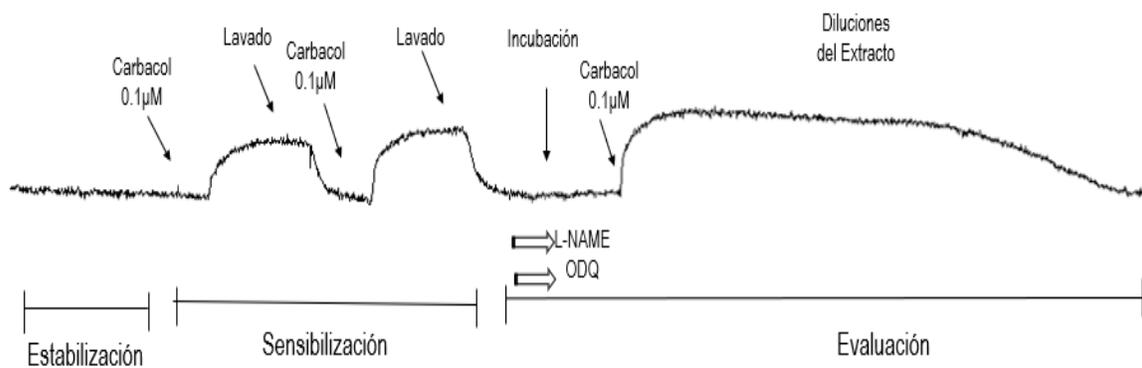


Figura 15. Esquema representativo del procedimiento para determinar la participación de las enzimas Guanilato Ciclasa/Oxido Nítrico Sintasa.

8.7.4. Participación de los Receptores Muscarínicos

Para observar si el efecto relajante del EDAm pudiera ser por antagonismo competitivo o no competitivo, causando relajación del músculo liso de las vías aéreas al impedir la unión de acetilcolina con los receptores muscarínicos, localizados en la musculatura lisa de tráquea aislada de rata, se hizo el siguiente

procedimiento: después del proceso de estabilizar y sensibilizar los anillos, se agregó carbacol [0.16 - 54.7 μM] de forma acumulativa a la cámara de incubación para construir una curva concentración-respuesta-control. Una vez terminada, se incubó durante 15 minutos la CE_{50} del extracto [486.51 \pm 9.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y después de ese tiempo, se agregó carbacol de forma acumulativa [0.16- 54.7 μM] para construir la CCR (figura 16).

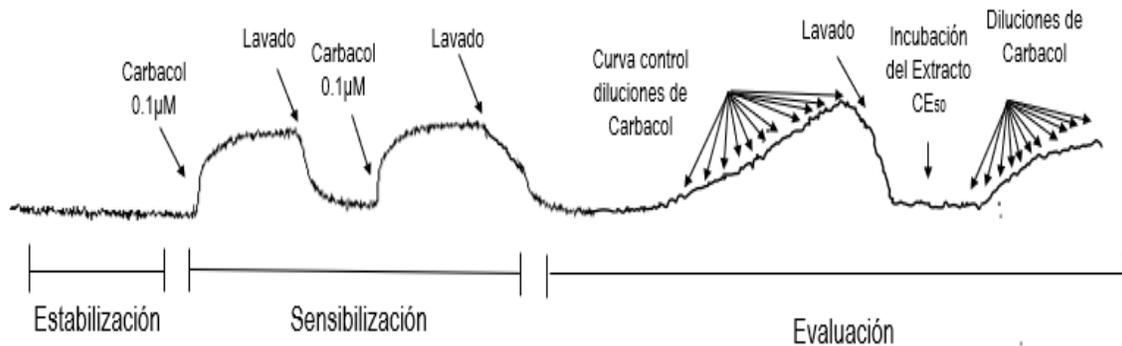
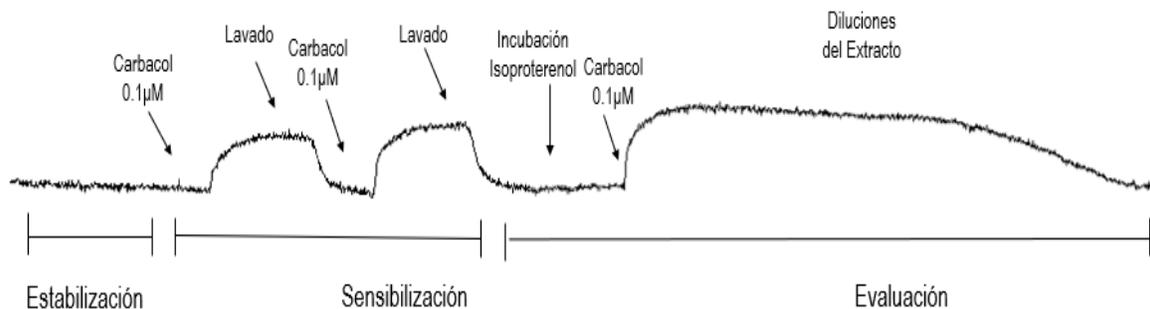


Figura 16. Esquema del procedimiento donde participan los receptores muscarínicos.

8.7.5. Participación de los receptores β_2 adrenérgicos

Este experimento se ejecutó para observar si el EDAm pudiera estar actuando sobre los receptores β_2 -adrenérgicos. Después de estabilizar y sensibilizarlos anillos se preincubó con isoproterenol (agonista β_2 -adrenérgicos) [10 μM] durante 15 minutos, después se contrajo el tejido con carbacol y se



agregaron las diluciones del extracto en forma acumulativa para la construir la CCR (figura 17). Se comparó el efecto contráctil con y sin isoproterenol.

Figura 17. Esquema ilustrativo del procedimiento donde participan los receptores β_2 adrenérgicos.

8.7.6. Participación de canales de Calcio activados por KCl.

Para demostrar si el EDAm influye en la hiperpolarización de la membrana y la movilización de Ca^{2+} para ejercer su efecto tráquea-relajante, después de estabilizar y sensibilizar, los anillos de tráquea fueron incubados con KCl [80 mM] que induce contracción. Al alcanzar la contracción estable en 15 minutos, se agregó de forma acumulativa las diluciones del extracto (figura 18).

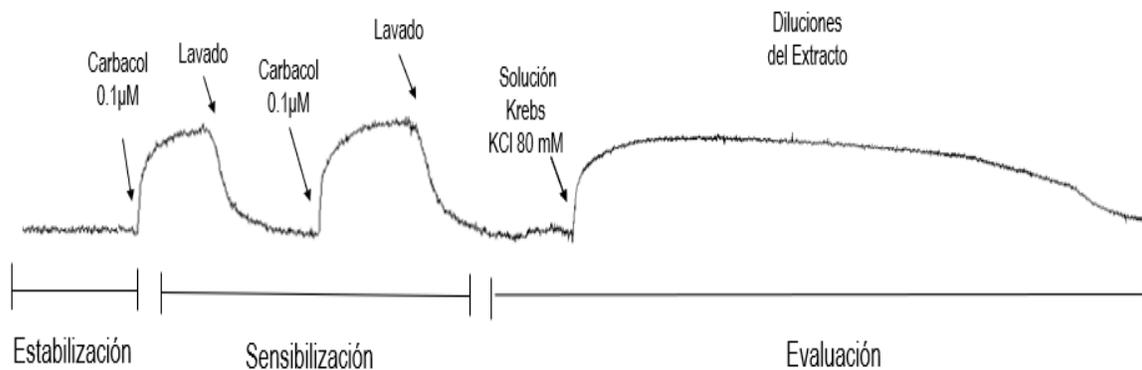


Figura 18. Esquema ilustrativo del ensayo donde participan canales de calcio activados por KCl

8.7.7. Participación de los canales de calcio.

Finalmente, para corroborar si el EDAm ejercía su efecto relajante por bloqueo del flujo de calcio, después de estabilizar y sensibilizar los anillos de tráquea con solución Krebs 80 mM libre de Ca^{2+} después se construyó la curva control agregando CaCl_2 [80 μM a 27 mM] de forma acumulativa a la cámara de incubación. Después se preincubó la CE_{50} del EDAm, y nuevamente se agregó el CaCl_2 [80 μM a 27 mM] de forma acumulativa para comparar el efecto contráctil inducido por CaCl_2 sin y con extracto.

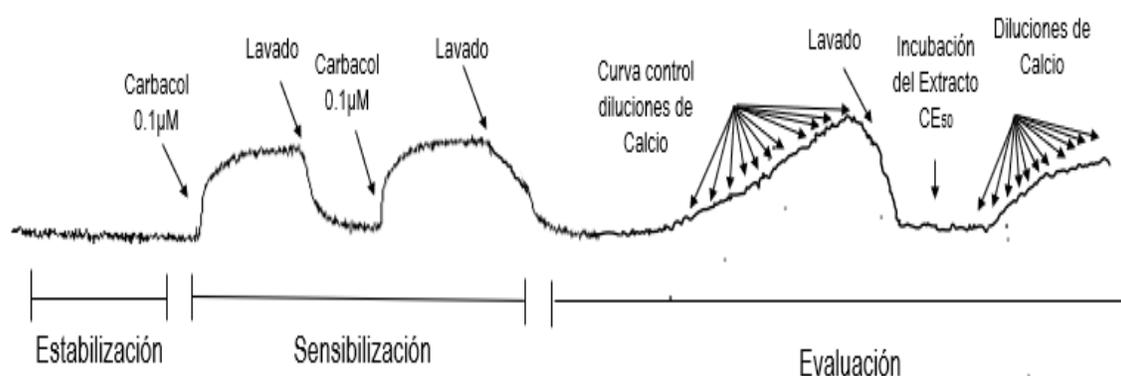


Figura 19. Esquema ilustrativo del ensayo de bloqueo de canales de calcio

8.7.8. Análisis estadístico.

Los resultados del efecto relajante y del mecanismo de acción del mecanismo de acción se expresaron como la media de 5 animales \pm el error estándar. Las curvas concentración-respuesta se construyeron con el programa Origin 8.0. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar diferencias entre grupos, seguida de una prueba *post hoc* de Bonferroni. Considerando una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$. Todos los análisis se hicieron con el programa de GraphPad Prism 5.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



9.1. Obtención de los extractos y rendimiento.

Se obtuvieron 3 tipos de extractos: hexánico, diclorometánico y metanólico, a partir de 344 g por maceración exhaustiva. En la Tabla 4 se muestran los pesos y rendimientos de los extractos obtenidos en cada maceración, como se observa, el primer extracto de cada disolvente tuvo mayor rendimiento. El extracto hexánico tuvo el mejor rendimiento, seguido del extracto metanólico y por último el diclorometánico. De las tres maceraciones del extracto diclorometánico, se empleó el primero, el cual tiene un mejor rendimiento.

Disolvente	Peso Muestra (g)	Rendimiento (%)
Hexano	7.8205	2.2728
Hexano	3.5088	1.0197
Hexano	1.1026	0.3204
Diclorometano	4.0948	1.1900
Diclorometano	2.5722	0.7475
Diclorometano	0.5648	0.1641
Metanol	7.1746	2.0851
Metanol	4.833	1.4047
Metanol	5.8937	1.7128

Tabla 4. Extractos orgánicos obtenidos de *Argemone mexicana*. Se muestra el peso expresado en gramos de cada uno de los extractos, así como el rendimiento obtenido con respecto al peso total de la planta en conjunto (344 g)

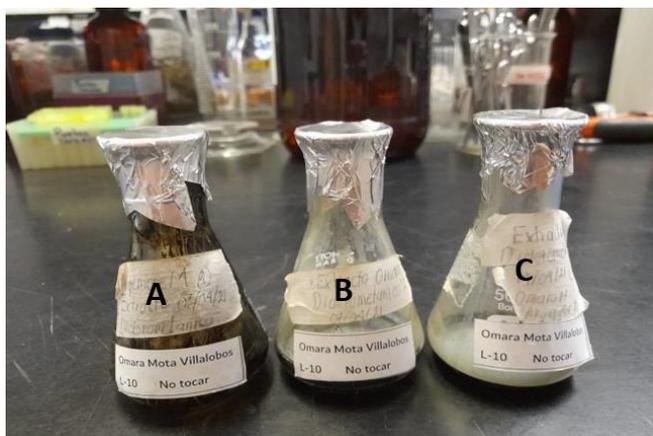


Figura 20. Extractos diclorometánicos obtenidos, se utilizó el extracto con mayor rendimiento (Extracto A).

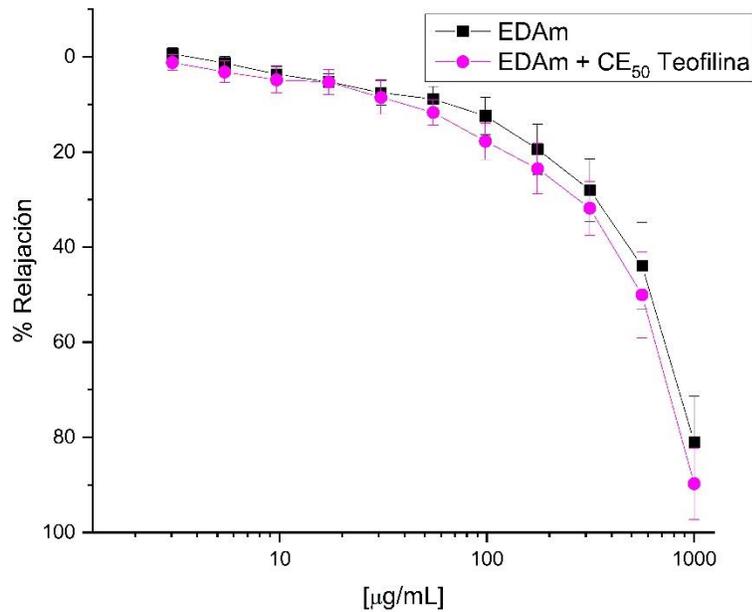
9.2. Determinación del mecanismo de acción funcional del extracto diclorometánico en un modelo *ex vivo*.

Como se mencionó, nuestro equipo de investigación ha evidenciado el efecto tráquea-relajante del extracto diclorometánico, con un $E_{m\acute{a}x}$ del $102 \pm 1.86 \%$ y CE_{50} de $89.98 \pm 1.81 \mu\text{g/mL}$. para continuar se evaluó diferentes vías de señalización implicadas en el efecto tráquea-relajante, se analizan los diferentes mecanismos involucrados.

9.2.1. Participación de Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas integran una familia de enzimas, que degradan nucleótidos cíclicos intracelulares (AMPc y GMPc). Catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, de manera específica las PDE's de nucleótidos hidrolizan el enlace fosfato en 3'-ribosa de los nucleótidos 3',5'-cíclicos monofosfato a los correspondientes derivados inactivos 5'-nucleosido monofosfato (**Reyes-Irisarri, 2007**). En la actualidad se conocen 11 isoenzimas, sin embargo, las PDE's III y IV tienen una función importante en las vías respiratorias (**Thirstrup, 2000**). La PDE IV degrada AMPc y se cree que inhibir las isoenzimas de la PDE con inhibidores selectivos o con fármacos no selectivos, como la teofilina, mantiene la concentración

intracelular de AMPc, lo que produce relajación del músculo liso de las vías respiratorias (Thirstrup, 2000).



Gráfica 2. Efecto relajante del extracto diclorometánico sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de CE₅₀ de teofilina [157.16 µM]. Emax 89.76 ± 7.46% ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *pos hoc* Bonferroni. P<0.05. n=5.

En la gráfica 2 se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa del efecto relajante por el EDAm en la curva control, con respecto a la curva donde se preincubó con teofilina, inhibidor de fosfodiesterasas, lo cual indica que el EDAm no posee compuestos químicos que inhiban estas enzimas o están involucrados en la conversión de AMPc a su forma inactiva 5'AMP.

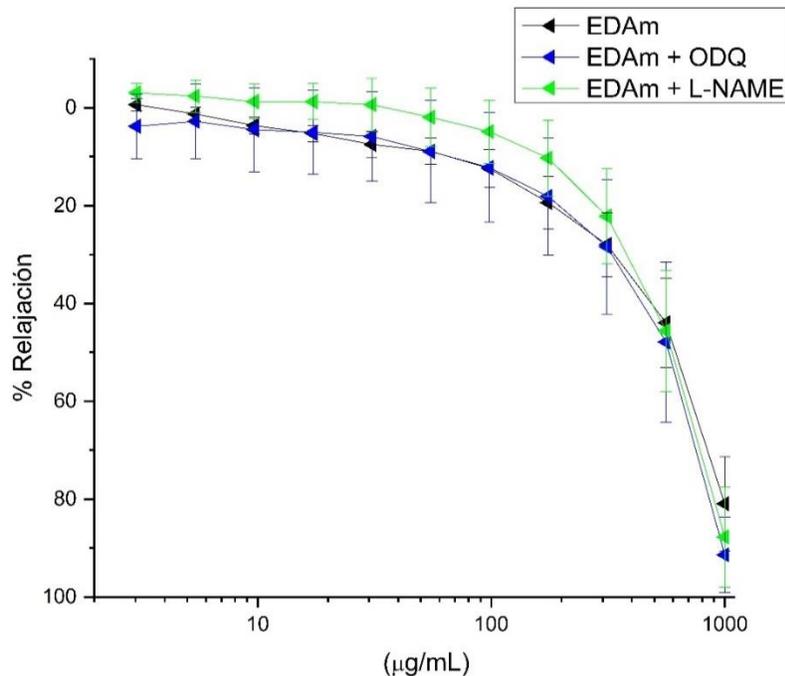
9.2.2. Participación de la vía NO/GMPc

La vía de señalización NO/GMPc media numerosos procesos fisiológicos, entre ellos la actividad relajante del músculo liso. La guanilato ciclasa, convierte guanosina-trifosfato (GTP) en 3', 5'-guanosina-monofosfato cíclico (GMPc). En las células hay dos formas: soluble y particulada: la guanilato ciclasa particulada (GCp) unida a la membrana, y la guanilato ciclasa soluble (GCs) activada por la unión del Óxido Nítrico (NO) (**Rivero-Vilches, 2001**). El NO se forma durante la conversión enzimática de L-arginina en L-citrulina catalizada por la Óxido Nítrico Sintasa (NOS)

La activación de cualquiera de las formas de guanilato ciclasa (GCp, GCs) aumenta la concentración intracelular de GMPc. Y este aumento activa la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), que tiene acciones intracelulares comparables a las de la PKA, incluida la estimulación de la recaptación de Ca^{2+} y se asocia con la relajación del músculo liso de las vías respiratorias (**Thirstrup, 2000**).

Con este fin, para este experimento usamos 2 inhibidores de la vía: L-Nitro-Arginina-Metil-Ester (L-NAME) y 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1- (ODQ). El L-NAME es análogo de la L-arginina e inhibe las NOS que producen NO. Por otro lado, ODQ solo inhibe la guanilato ciclasa soluble (**Martínez-Quiroz, 2005**).

Como se puede observar en la gráfica 3 al incubarse con ODQ o L-NAME no hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto a la curva control. Este patrón sugiere que el extracto no posee algún metabolito que active la GCs, o promueva la producción de NO y por lo tanto el proceso de relajación mediado por el extracto no implica este mecanismo.



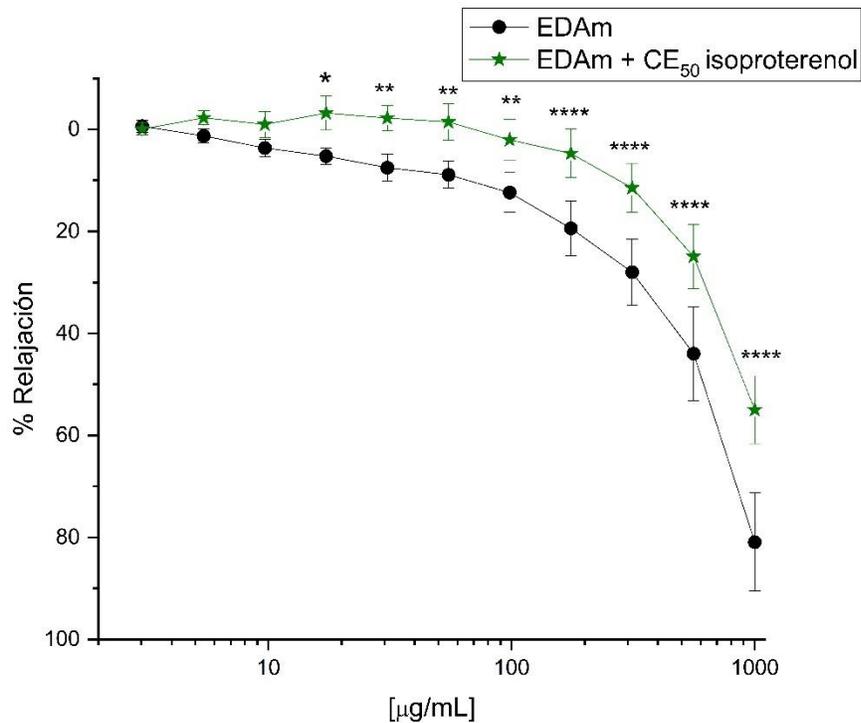
Grafica 3. Efecto del extracto Diclorometánico en presencia de ODQ [2.66 µM] y L-NAME [10µM] en anillos de tráquea aislada de rata. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *post hoc* Bonferroni.

$P < 0.05$. $n = 5$. $E_{max} \text{ OQD } 91.4 \pm 7.73\%$ $E_{max} \text{ L-NAME } 87.76 \pm 10.2\%$

9.2.3. Participación de receptores β_2 -Adrenérgicos.

La unión de agonistas β_2 -adrenérgicos activa la proteína G asociada al receptor. El GTP se une a la subunidad α (Alfa) de la proteína G heterotrimérica, lo que disocia las subunidades. La subunidad α se une y activa la Adenilato Ciclasa (AC) que cataliza la conversión de ATP intracelular en AMP al AMPc que a su vez activa la PKA dependiente de AMPc. La PKA fosforila muchas proteínas clave, incluida la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), modificando así su función y conduce a la relajación del músculo liso de las vías respiratorias (Thirstrup, 2000). Como se observa en la gráfica 4, hubo un discreto desplazamiento de la curva hacia la derecha, significativamente diferente a la curva control, lo que indica la posible interacción con el receptor β_2 -adrenérgico en el mecanismo relajante

del extracto provocando la activación de la AC y convirtiendo ATP a AMPc, con potencial aumento en la producción de AMPc, para así producir el efecto relajante.



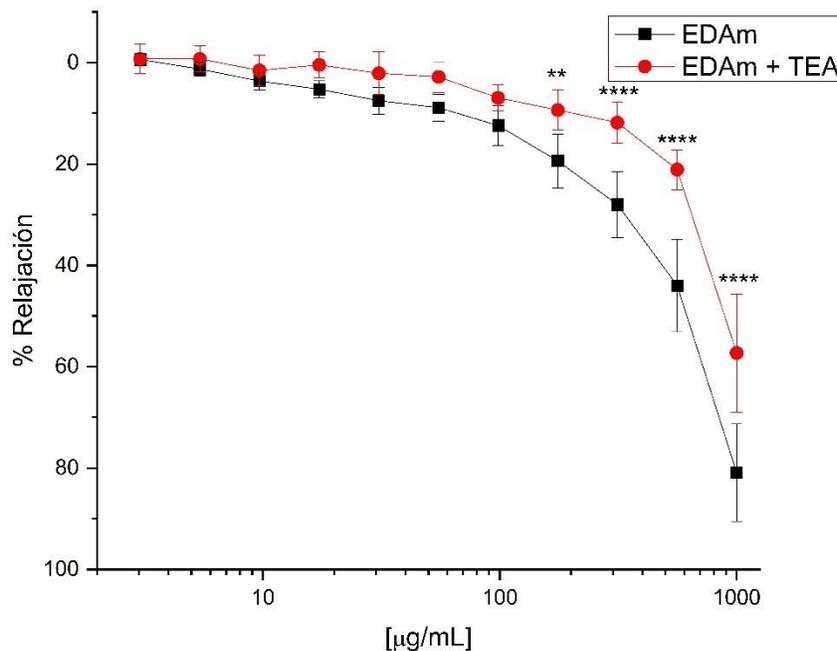
Gráfica 4. Efecto del isoproterenol [10 µM] en la relajación por EDAm sobre anillos de tráquea aislados de rata. E_{max} . 54.99 ± 6.64 %. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *pos hoc* Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$. n=5

9.2.4. Participación de canales de Potasio.

El potencial de reposo del músculo de vías aéreas depende de la activación de los canales de K^+ . Estos canales están abiertos con el potencial habitual e inducen continuo eflujo de K^+ de la célula, lo que establece el potencial de membrana entre -40 y -50 mV. Si se bloquean estos canales la célula se despolariza, lo que abre canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente, entra Ca^{2+} a la célula y se produce contracción. Esta acción ocurre ante agentes exógenos o en ciertas enfermedades de las vías respiratorias, como el asma. Por el contrario, si se abren

más canales de K^+ hay hiperpolarización, y cierre de los canales de Ca^{2+} generando relajación del músculo liso, siendo este el proceso habitual (Aiello, 2013).

Esta evaluación fue para observar si el EDAm actúa sobre canales de K^+ presentes en los anillos de tráquea, usando el inhibidor Tetraetilamonio (TEA). Como se muestra en la gráfica 5, hubo discreto desplazamiento hacia la derecha, significativo en la curva de EDAm + TEA, y sugiere que el EDAm promueve la apertura de los canales K^+ y se cierran los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes e impidan el paso de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula, disminuyendo la contracción del músculo liso de los anillos de tráquea.

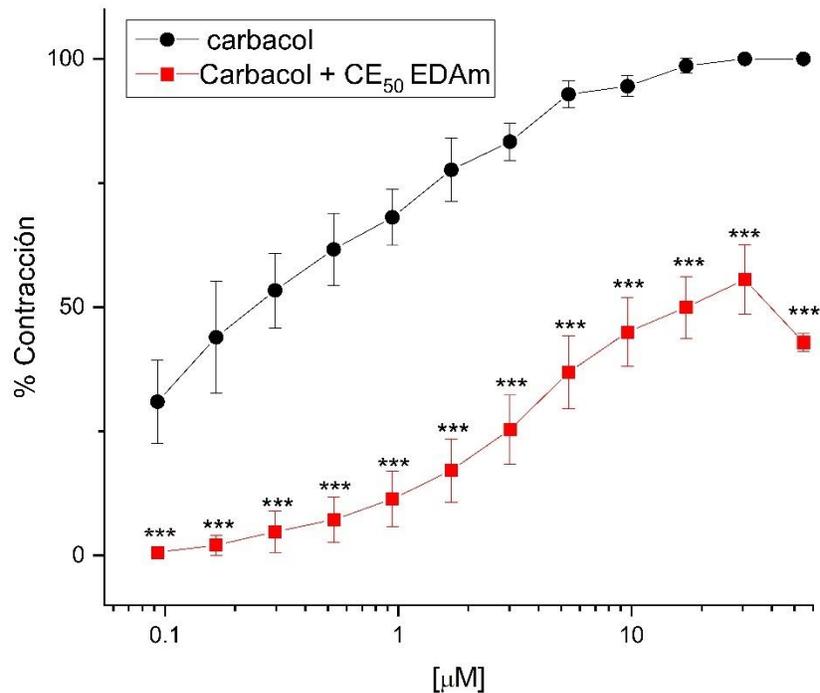


Gráfica 5. Efecto del Tetraetilamonio sobre los anillos de tráquea aislada de rata TEA [632μM] E_{max} . 57.33 ± 11.68 %. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *pos hoc* Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$. $n = 5$.

9.2.5. Participación de los receptores muscarínicos

De acuerdo con el apartado 3.1.3.2. el agonismo de acetilcolina (ACh) con su receptor de superficie celular de tipo muscarínico M3 de membrana celular, activa la PLC que hidroliza al PIP₂ en dos mensajeros intracelulares: IP₃ y DAG. El IP₃ se une a los IP3R provocando la liberación de Ca²⁺ del RE, facilitando el flujo de Ca²⁺ que aumenta la concentración de calcio citosólico. Por otro lado, el DAG mantiene en la membrana, y junto con el aumento de Ca²⁺ activa a la PKC que fosforila proteínas específicas (**Bergatiños, 2001**). Las vías de activación mediadas por Ca²⁺ y por proteína cinasa (PKC) actúan de modo sinérgico, produciendo activación celular y consecuente la contracción (**Beñaldo et al., 2017**).

En la gráfica 6, se observa la contracción inducida por carbacol expresan un efecto que se opone parcialmente a la contracción inducida por carbacol, agonista del AChR; mientras que el extracto, desplazo la curva a la derecha y disminuyo el efecto máximo, esto sugiere que el extracto actúa como antagonista no competitivo de los receptores muscarínicos a ACh, es decir que el extracto, se une en un sitio alostérico del receptor M₃ que interfiere con la unión del agonista al receptor, o interfiere en la señalización para generar la contracción muscular inducida por ACh. Puede que este patrón (antagonista no competitivo) sea mediado por una acción funcional, es decir, algunos componentes del extracto actúen sobre otros blancos como canales de Ca²⁺, apertura de canales de K⁺ y/o producción o acumulación de segundos mensajeros como AMPc etc.



Gráfica 6. Efecto del extracto diclorometano de *Argemone Mexicana*, sobre la contracción inducida con carbacol en anillos de tráquea aislada de rata comparado con curva control de carbacol E_{max} . 42.896 ± 1.77 %. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *pos hoc* Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. $n=5$.

9.2.6. Participación de los canales de Calcio activados por KCl.

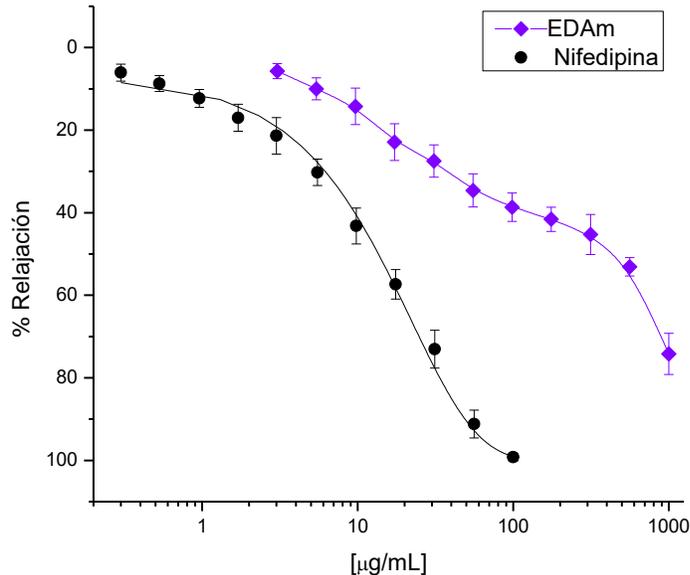
Los canales de calcio son proteínas de membrana que constituyen la vía más importante para el ingreso de Ca^{2+} a la célula. Existen diferentes canales de Ca^{2+} , sin embargo, en la musculatura lisa de las vías aéreas se ha descrito los canales de calcio de larga conductancia, dependiente de voltaje tipo L, (Perpiñá-Tordera & Lloris-Bayo, 2004).



La apertura o cierre de canales de calcio esta mediado por diferentes vías de señalización, una de ellas relacionada al potencial de membrana. Para fines de este ensayo, al aumentar a concentración extracelular de K^+ con una solución KCl [80 mM] los canales de K^+ se cierran lo que despolariza a la membrana y se abren los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, siendo el Ca^{2+} incorporado al interior de la célula y genera contracción muscular. Por el contrario, la hiperpolarización de la membrana causa el cierre de los canales Ca^{2+} dependientes de voltaje y provoca una disminución de Ca^{2+} en el interior de la célula, relajando el músculo liso **(Aiello, 2013)**.

En este sentido, para averiguar si el extracto bloquea canales de Ca^{2+} de larga conductancia dependiente de voltaje (tipo L) ya sea de manera directa o indirecta, se sometió al tejido con una solución despolarizante de KCl [80 mM] lo cual provoco la despolarización de la membrana y el ingreso de Ca^{2+} contrayendo el músculo liso.

Como se observa en la *gráfica 7*, el extracto tuvo actividad relajante, pese a que se despolarizó la membrana por alto K^+ lo indica que el EDAm influye en la hiperpolarización o en el bloqueo de los canales de Ca^{2+} para ejercer su efecto traquéa-relajante, sin embargo, es menos potente que el efecto de nifedipina bloqueador de canales de calcio tipo L. Sugerimos que el mecanismo del extracto se relaciona directamente con el influjo de Ca^{2+} al medio intracelular, por lo que es indispensable corroborar y complementar dicho supuesto.



Gráfica 7. Efecto tráquea-relajante del extracto diclorometano de flor, *Argemone Mexicana* inducida por KCl 80 Mm comparado con curva control de Nifedipina. E_{max}. 74.18 ± 5 %.

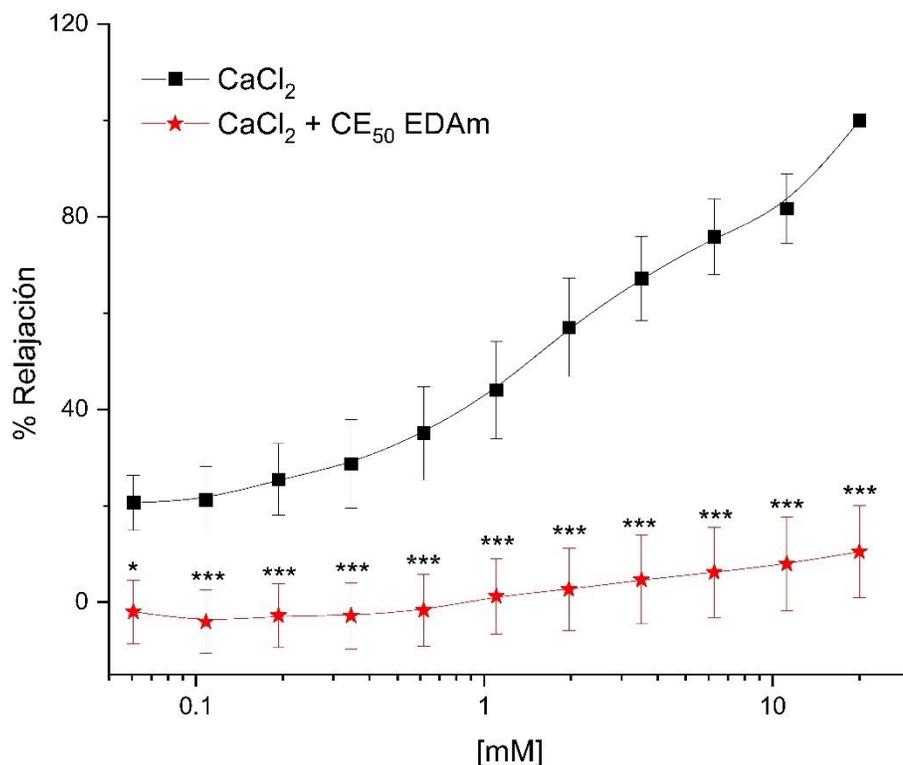
9.2.7. Participación de los canales de Calcio.

De acuerdo con el apartado anterior, el Ca²⁺ citoplasmático es indispensable para la contracción y su vía de entrada es por los canales de Ca²⁺ voltaje-dependiente en la membrana extracelular y del RE. De igual manera un mecanismo que promueven la apertura/cierre de canales de Ca²⁺ es por un cambio del potencial de membrana y por apertura/bloqueo directo de los canales de calcio tipo L.

Con la finalidad de corroborar si EDAm actúa en los canales de calcio, en este experimento, depletamos todo el calcio intracelular, así como el del retículo sarcoplásmico con solución fisiológica Ringer-Krebs [80 mM], libre de Ca²⁺ y una vez que el tejido se estabilizó, se incubó con el EDAm, y posteriormente, se agregaron las diluciones de CaCl₂. Los resultados se muestran en la gráfica 7, donde al incubarse con la CE₅₀ del EDAm la curva no alcanzó el 100% de la contracción en comparación de la curva control, confirmando que los compuestos

del EDAm bloquean los canales de calcio, y provocan disminución del ingreso de Ca^{2+} por bloqueo de los canales en la membrana celular o de los almacenes intracelulares, impidiendo el flujo o movimiento de Ca^{2+} extracelular e intracelular, por lo que se evitó la contracción en músculo liso de tráquea.

De manera adicional y de acorde con los antecedentes sugerimos que compuestos de *A. mexicana* responsables de la actividad tráquea-relajante sean alcaloides como berberina y sanguinarina, que ya han sido descritos en partes aéreas y subterráneas de esta especie (Díaz-Martínez, 2016; Guizar, 2012; Laines, 2019). Se ha demostrado que la berberina es responsable de la relajación en tráquea y sugiere que esta es una molécula responsable del efecto relajante de la planta, sin embargo, es indispensable un análisis fitoquímico exhaustivo para corroborar esta idea.





Grafica 8. Efecto de contracción por CaCl_2 en anillos de tráquea aislada de rata con y sin el extracto Diclorometánico de *Argemone mexicana*. E_{max} . $10.5126 \pm 9.56 \%$. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba *post hoc* Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. $n=5$.

10. CONCLUSIÓN





Este proyecto permitió corroborar el uso medicinal que se le atribuye a esta especie, y establecer su potencial como fuente para la obtención de moléculas bioactivas con potencial broncodilatador que podrían ser utilizadas para el tratamiento del asma. El efecto farmacológico del extracto diclorometánico es mediado por un bloqueo del flujo de calcio, antagonismo no competitivo sobre los receptores muscarínicos y aumento de segundos mensajeros como AMPc. Por lo que se acepta la hipótesis planteada.

11. PERSPECTIVAS



- 
- Hacer el estudio fitoquímico biodirigido para determinar el (los) componente (s) responsable (s) de la actividad relajante en la musculatura lisa traqueal.
 - Determinar la toxicidad del extracto diclorometánico de *Argemone mexicana*.
 - Determinar el efecto antiasmático en un modelo de hiperreactividad bronquial.
 - Determinar el mecanismo de acción molecular y funcional de los compuestos aislados del extracto diclorometánico.
 - Fomentar mayor interés en el estudio de otras especies del género *Argemone* como recursos de gran potencial medicinal.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aiello EA. (2013). Canales de potasio (K⁺) y calcio (Ca²⁺) en musculo liso vascular. En: Hipertensión Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Terapéutica. Eds.: Hernán Gómez Llambí y Daniel Piskorz. Editorial Intermédica, Buenos Aires Argentina. Pp. 87- 92.
- Ávila, J. (2017). Comunicación funcional entre canales de Ca²⁺ tipo I y canales de Ca²⁺ activados por reservorios, su regulación del tono vascular. Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/63846/TESIS%20Javier%20C3%81vila%20Medina.pdf>
- Beltrán Sáez Mengual O. (2017) Síndrome de Colapso Traqueal en el Perro: Factores Predisponentes, Parámetros Clínicos-Radiográficos y Respuesta a la Terapia Inhalada (Tesis de Doctorado) Universidad de Murcia.
- Beñaldo F., Felipe A., Ferrada D, Javiera C., Castillo G., Sebastián, & Ebensperger D., Germán. (2017). Mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar neonatal. Una perspectiva molecular. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 33(4), 308-315. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482017000400308>
- Chan Escobar Zurisadai (2018) Análisis quimétrico de la diversidad de alcaloides en tres especies del genero Argemone L. (Tesis de maestría) Centro de Investigación Científica de Yucatán Posgrado en Ciencias Biológicas.
- De La Cruz Chacón, Iván , & González-Esquinca, Alma Rosa, & Riley-Saldaña, Christian Anabí (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolinicos. *Universitas Scientiarum*, 17 (2),189-202. ISSN: 0122-7483. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49924592005>
- Diaz Martinez Heydee Lisbet (2016) Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de Argemone mexicana (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Mayor de San marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica E.A.P. de Farmacia y Bioquímica.

- Durán A., M. (2015). Fisiopatología del asma: Una mirada actual. *Revista Colombiana de Neumología*, 27(3), . doi:10.30789/rcneumologia.v27.n3.2015.79.
- Eriksen Person M. (2002) *Anatomía Humana*, primera edición, México D.F. López Jover Ely (2007) asma bronquial I: epidemiología, patogenia, definición *Medwave* Ene;7(1):e1901 doi: 10.5867/medwave.2007.01.1901.
- Guízar González. Cecilia (2012) Estudios sobre la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en suspensiones celulares de argemone mexicana bajo condiciones de inducción. (Tesis de Doctorado) Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Ciencias Biológicas.
- Goutam Brahmachari, Dilip Gorai, Rajiv Roy (2013) *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. Laboratory of Natural Products & Organic Synthesis, Department of Chemistry, Visva-Bharati University, West Bengal, India DOI: 10.1590/S0102-695X201300500002
- Global Initiative For Asthma. (updated 2021) Online Appendix, Global strategy for asthma management and prevention.
- Gyton & Hall (2011) *Tratado de fisiología Médica* Elsevier, Barcelona, España. Decimosegunda Edición.
- Hernández-Martínez, A.L., Cervantes-Jauregui J. A., Cruz-Cruz D., Villegas-Gómez C. (2020) "Chicalote" *Argemone ochroleuca* Sweet; La Gran Fábrica de Alcaloides División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Universidad de Guanajuato. <http://quimica.ugto.mx/index.php/nyt/article/view/368>
- Illanes Julio, Leitchle, Jorge, Leyton, Victor, Tapia, Luis Felipe, Fertilio, Bárbara, & Castro, Mario. (2014). Descripción Histológica de los Diferentes Segmentos del Aparato Respiratorio de Avestruz (*Struthio camelus* var. *Domesticus*). *International Journal of Morphology*, 32(4), 1325-1336. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000400033>

- Izaguirre, V., & Zavaleta, A. I. (1998). Canales de calcio voltajes dependientes. *Ciencia E Investigación*, 1(1), 49–61. <https://doi.org/10.15381/ci.v1i1.4979>
- J.M. Prades, S. Chardon, (2000) Anatomía y fisiología de la tráquea, EMC - Otorrinolaringología, Volume 29, Issue 1, Pages 1-12, ISSN 1632-3475, [https://doi.org/10.1016/S1632-3475\(00\)71972-2](https://doi.org/10.1016/S1632-3475(00)71972-2)
- J. Jaimes-García,a, R.P. Gallardo-Díaz,a H. L. Ocaña-Servín,a A. García-Rilloa, (2018) La crisis asmática: fisiopatología *Revista de Medicina e Investigación UAEMéx* / ISSN: 2594-0600 / Vol. 6 Núm. 1. / pp. 39-45.
- Kuo IY, Ehrlich BE. (2015) Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Feb;7(2):a006023. DOI: 10.1101/cshperspect.a00602
- .Laines Hidalgo Jose Iganacio (2019) Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L. (Título de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucantan A.C.
- Larenas-Linneman D, SalasHernández J, Del Río-Navarro BE, Luna-Pech JA, NavarreteRodríguez EM, Gochicoa L, et al. MIA 2021, Manejo Integral del Asma. Lineamientos para México. *Rev Alerg Mex*. 2021;68 Supl 1:s1-s122.
- Lozano Jiménez , Y. Y., & Sánchez Mora, R. M. (2020). Canales de calcio como blanco de interés farmacológico. *Nova*, 18(34), 57–76. <https://doi.org/10.22490/24629448.3926>
- Martínez-Quiroz Z.I., López-Muñoz J. Guevara-López .U.M. (2005) Participación local de la víaL-arginina-óxido nítrico-GMPc en el efectoantinociceptivo inducido por parecoxib. Volumen 73, No. 2.
- Melendez, Carlos. (2013). Risks of herbalism: a case report of Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) induced liver toxicity. *Medwave*. 13. e5763-e5763. 10.5867/medwave.2013.07.5763.
- Mims J. W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *International forum of allergy & rhinology*, 5 Suppl 1, S2–S6. <https://doi.org/10.1002/alr.2160>.
- Murtagh P. Asthma: past and present *Arch Argent Pediatr* 2009; 107(2): 146-151. https://www.researchgate.net/publication/24436871_Asthma_past_and_present

- Monroy-Ortiz C. & Castillo España P. (2007) Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. España 2a. Ed. México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Universidad Autónoma del Estado de Morelos pag. 198-199
- Nancy, A., & Praveena, A. (2017). Argemone mexicana: A Boon to Medicinal and Pharmacological Approaches in Current Scenario. Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry, 10.2174/1871525715666170830130155. Advance online publication. <https://doi.org/10.2174/1871525715666170830130155>
- Organización Mundial de la Salud, 2020. Datos y cifras del ASMA. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
- Parramón Paidotribo S.L. (2013) El gran libro del cuerpo humano, sexta edición, Editorial Parramón.
- Perpiñá Tordera, M., & Lloris Bayo, A. (2004). Los broncodilatadores, esos fármacos maravillosos [Bronchodilators, those marvelous drugs]. Archivos de bronconeumología, 40 Suppl 1, 16–22.
- Piedras MMP, Huerta LJ. (2011) Mortalidad por asma. Alerg Asma Inmunol Pediatr. ;20(3):107-119.
- Picó Bergantiños, María Victoria, Ruiz González, Marlen, Picó Bergantiños, Thais, & García Pérez, Miguel. (2001). El papel del músculo liso bronquial y los nervios en la fisiopatología del asma bronquial. Revista Cubana de Medicina General Integral, 17(1), 81-90.
- Renna, Nicolas Federico; Miatello, Roberto Miguel;(2013) Hipertensión arterial: Epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. Fisiología del músculo liso vascular; Inter-Médica; 1; 1; 2013; 172-175.
- Reyes-Irisarri, Elisabet (2007) Fosfodiesterasas del AMPc y del GMPc en el cerebro: Expresión en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos. Universidad de Barcelona Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España) <http://hdl.handle.net/10261/91733>

- Rivero-Vilches, S. de Frutos, M. Rodríguez-Puyol, D. Rodríguez-Puyol y M. Saura (2001) Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPcF. Departamento de Fisiología. Universidad de Alcalá. Unidad de Nefrología. Hospital Universitario NEFROLOGÍA. Vol. XXI. Número 3.
- Río-Navarro, Blanca Estela del, Hidalgo-Castro, Emilia María, & Sienra-Monge, Juan José Luis. (2009). Asma. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 66(1), 3-33. Recuperado en 30 de junio de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462009000100002&lng=es&tlng=es.
- Roldán Bretón, Nuria Renata; Jiménez Vargas, Mariela; Salinas Miralles, Eva (2015) Asma alérgica: mecanismos inmunológicos, fisiopatología y tratamientos actuales Investigación y Ciencia, vol. 23, núm. 65, pp. 66-72 Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, México.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C., & Navarrete, A. (2008). Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of Argemone ochroleuca Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. The Journal of pharmacy and pharmacology, 60(2), 229–236. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.2.0012>.
- Solís Iniesta Patricia. (2010) Epidemiología del asma en México (Tesis de Postgrado) Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM. facultad de medicina división de estudios de postgrado e investigación secretaria de salud. instituto nacional de pediatría http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/bitstream/20.500.12103/126/1/Tesis2010_44.pdf
- Suart Ira Fox (2017) fisiología humana 14ª Edición, Editorial McGraw Hill,
- Thirstrup S. (2000). Control of airway smooth muscle tone: II-pharmacology of relaxation. Respiratory medicine, 94(6), 519–528. <https://doi.org/10.1053/rmed.1999.0738>.
- Urbano F. L. (2008). Review of the NAEPP 2007 Expert Panel Report (EPR-3) on Asthma Diagnosis and Treatment Guidelines. Journal of managed care pharmacy : JMCP, 14(1), 41–49. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2008.14.1.41>.

- 
- Vargas Becerra M. H. (2009). Epidemiología del asma [Epidemiology of asthma]. Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993), 56 Suppl 1, S3–S9.

ANEXOS

Solución Ringer Krebs 10X

Reactivos	Gramos
NaCl	69.2
KCl	3.5
KH ₂ PO ₄	1.6
MgSO ₄	2.9
CaCl ₂	3.9

Aforar a 1 L con agua destilada

Solución Ringer Krebs 1X

Tomar 100 mL de solución Ringer Krebs 10X y agregar:

Reactivos	Gramos
Dextrosa	2.1
Bicarbonato de sodio	2.1
EDTA	0.01

Aforar a 1 L con agua destilada

Solución KCl 80 mM

Reactivo	Gramos
NaCl	2.5
Glucosa	2.1
NaHCO ₃	2.1
KCl	5.97
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.29
KH ₂ PO ₄	0.16
EDTA	0.01
CaCl ₂	0.37

Aforar a 1 L con agua destilada

Fecha: 25 de octubre de 2022
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/123/2022

DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “**Determinación del mecanismo de acción funcional del extracto diclorometánico de *Argemone mexicana* en tráquea aislada de rata**” presentado por el/la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Omara Ever Mota Villalobos, (20171007916)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dr. Julio Almanza Pérez

M. en C. Martha Hernández Labra

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dr. Rafael Villalobos Molina



ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”

M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ
SECRETARIA DE DOCENCIA

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2022-10-25 23:45:12 | Firmante

hViOoC3tgOFQNg+IOeiMcmd5gbwZXVQQUy/lozIWjT3MnBmUJXuOGN/RaOg5pUuAIPVgCszKMG1DxxI7cMNw1hakdII0I4CV5W+vJVPEErVxeBovfEFzmMwZv753gZIZ6mw7g5gBW+1n7qE+lb9NRyjrEt925ZqRNeCncYL78CZv78vIEglR5fmHABquhawKf+FYE8/go9WrGxo+B+XGPeWtgitQ65KRa5NDIDG633iJ2JBlyzSdAHux0gVhDuA+XQZL0d3o93wkSE4SAjchVW8QypqITvCSv0XUIQangu2cN098NvgWOG+J3Jqx/Q1Jn4SS4clXqkKEoBj43pvhFg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UixIFmPNG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vWyjcPhwQVtsEsgJHGpuQoSphOsygg8a>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-10-27 17:56:26 | Firmante

Jvi6EpalUjfuZkD93sZm9Rc5b3b5Yp5imi0y1ebpawX0Pvu4oRODqhsyIA0OuyPH1P8Rf5gZPrx1Ga1NtCDeVJKWpU1cxhXRQQA9EsA7VnuOu0dy+L1ojBQZDF1dxuR1k6m7LS+kLpk9FUTmo7dpj3en59upCPldmfzk9+6cv0ly5sBraohzYW4PI+UUcizuL24uHNU4hGxwzlf5VWVFx501YXIYki6iEKH+CnRFFIHzeUnLr41KHI9o9Sf7Iy2Fi6SMwqUz8+AoiPSvjG8u3vgRxxRUU4me+kDimCWooHOSAV53U0o4M2g7QoznMVGYCIR8CCOTKLJL3MhiUhpnw==

MARTHA HERNANDEZ LABRA | Fecha:2022-10-27 20:29:00 | Firmante

pEhSEHn9YWTa2D+SmaOaleJQEGKfpRG+btc8zuqlf+PaYML6Gg5dls+XyyVDhF51foxN++nUP89HQ4ryjD4qA+T7OHeLSb70Gt9AjSLXMzFg/oo1IqMHjszrHgDVW5cAmUGgZ1pR6Dg4a0h+MoLembhR3GcPi8CwTaam5dPxtFH99d0/YatVLLI8k7Q3rAAWbogTQM17+hB8TI+CV/sjbHs055JVhK4dU+PYFuoex8OKI/n3IVmPewG+7X3zhGw4xpFXaGq4XZGOv+NBUil/RU+k2PWgka8lCHT6n1zWBtM+tTrcmBG75d1OOFTnFvBf58SEsYHVDQ6clDFP0Lpf1A==

RAFAEL VILLALOBOS MOLINA | Fecha:2022-10-28 09:26:36 | Firmante

K2IhdHkwlq/pkDLcYyWm5Pd7ppqPV9BgmUOEYv8QhNQDyvU0hfziQGMDivbmpagRHugDXRrSvSvMkymVqX3+sabgcXgLaesZF1/12DL763/uHGrANs0lrPTI468HayC1lySc3Li+i9QbkkQy5zVWPnOPtJoelTZpCrV54CIK1Pi7anWLL7hTvi01kvkR+1W1X0aReclcPbJnvHS1HUnR9K5vcJhatXoW1f+2HShtqJ01SY+9f/Khb8wG2gelQoemAJu/dqmdTH7Kc6gHFPASUpQRgXEUb8c8URTLivVqxBEhJElIQMRoNpFsxSkvq/Pyu+vMRjMcFvOsdViwpAwg==

JULIO CESAR ALMANZA PEREZ | Fecha:2022-10-28 12:01:46 | Firmante

QYtZfbU73piJ611A9Ke6INAlukiUG6odhQyoXbNj15Is6lr0lbQZ3k4Pd5tU98RmYzfeKWdrMRARd4USQwpKzA7ic3rNCKxPblmGVn0Qj/+KTVXm2KICPirENd6H5n3DXCM5FAwhrlcGGC9vM/IWO4vV3tdFTKNL6WaeeWQY1zIQKnERpSAiJyxr62CnXIHr2o6DV1RzVBnHY1otTbmkdzkEwcmZ+RPCGz1+3q6zCf4KVZA81cSxnUa498DBn+9qTtEKEJu1xr4oDiAaMvC+/L+mY7glGR2TEE4IM/i05N3PbbDwxUQlxOVXGlq7E05YK4GF2Xy8dnS+PODUc0g==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-10-28 12:16:34 | Firmante

ZEMwJrvhAkA5s1de+53HBA9fkuZSf2/mHdJ9ixll1YcJAAu6F2/yrGnPh1CncXIPVkgGe1OJ3dhGF1zVdK880/VcNgioOHKNStaShRH+jOyzywQFexzMHTM/rWgedRCqIhEkpFog8lpG/wyxdDcYe/vktN45+dvSBss0lDkdefdKYllxR1g0GuMYr1v9Y6oswdkSBKs7CkMGaphl4mVm8TsJ0itMrvOCcnVf7G+LWn70K8qbO9oTjMpD5MkFFv0N3IKbbPkjJMXK6jqq5ZitUfpxksthCstoEJPxBgKBCrHWVvMwGmOsEUumCJcs33YkaAbCEZfpCS+VAZ6DeA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ahbld4cPi

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0vJuSyvGxELbWgC6i6jwU7LAgWln8Qst>

