



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

**“Estudio fitoquímico biodirigido y evaluación
del mecanismo de acción relajante en
tráquea aislada de rata del extracto etanólico
derivado de *Tagetes lucida* (pericón)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
FARMACIA

PRESENTA: BRYAN ALEXIS HUERTA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. SAMUEL ENOCH ESTRADA
SOTO

ASESORA: M. en F. MONSERRAT HERNÁNDEZ MORALES

Cuernavaca, Morelos, mayo de 2023



“Trabajar duro es importante, pero hay algo que importa más, creer en ti mismo.”

-H.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a la Facultad de Farmacia por brindar instalaciones y docentes de calidad para formar profesionales de la salud y en lo personal, poder realizar este proyecto.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por darme la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación y abrirme las puertas del Laboratorio 10 de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, también por transmitir sus conocimientos, establecer ideas y por dirigir el presente proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A la M. en F. Monserrat Hernández Morales, por todo el apoyo y paciencia que me brindó al momento de instruirme en la parte tanto experimental como teórica de este proyecto.

A los miembros del jurado asignado; Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Dr. Jorge Armando Moreno Escobar, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto y Dr. Luis Arias Durán.

Dedicatorias

A mis padres Socorro y Alberto, que me han apoyado y cuidado a lo largo de mi vida, a mis abuelos Fausto, Ángeles, Adrián y Catalina que siempre han creído en mí, a mi tía Liz por siempre estar al pendiente y ser un pilar importante en mi vida. A mi tío Gustavo por su apoyo. Gracias a Benji por acompañarme en mis veladas de estudio.

Agradezco al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por todos los consejos, por motivarme a crecer profesionalmente, por transmitir sus conocimientos y por ser un amigo para mí.

Gracias a la M. en F. Monse, por haberme asesorado a lo largo de mi estadía en el Laboratorio 10, por todos los regaños y enseñanzas, por acompañarme en las horas extra de trabajo, pero principalmente por la bonita amistad que formamos. A Martín por haber formado un excelente equipo de trabajo y brindarme siempre su confianza y gran amistad.

A Marian Rodríguez por apoyarme en todo momento, por todo su tiempo y cariño que me demuestra día con día.

A todos mis compañeros del laboratorio por ser tan buenas personas conmigo, integrarme en sus actividades y en sus pláticas, por ayudarme a resolver las dudas que se me presentaron, gracias; Diana, Hugo, Gao, Armando, Luis, Wilson.

A todos mis compañeros de clase: Yadira, Brandon, Hugo, Rodrigo, Cristian, David y Sebastian.

INDICE

I. ABREVIATURAS	7
II. FIGURAS	9
III. TABLAS	10
IV. GRÁFICAS	10
V. ABSTRACT	11
VI. RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Fisiología respiratoria	16
2.1.1. Estructuras anatómicas que conforman el aparato respiratorio	16
2.1.1.1. Vía aérea alta	17
2.1.1.2. Vía aérea baja	18
2.1.1.3. Pulmones	20
2.1.1.4. Músculo liso	21
2.1.1.5. Mecanismo de contracción del músculo liso	22
2.1.1.6. Regulación de la contracción por iones de calcio	22
2.1.1.7. Mecanismos de defensa	23
2.1.1.8. Enfermedades respiratorias	24
2.2 Asma	24
2.2.1 Fisiopatología del asma	25
2.2.2 Respuesta fisiopatológica	25
2.2.3 Síntomas	26
2.2.4 Diagnóstico funcional	26
2.2.5 Tratamiento farmacológico del asma	27
2.2.5.1 Tratamiento no farmacológico del asma	28
2.2.5.2. Medicina tradicional	30
2.3. Uso de plantas medicinales y Fitoterapia	30
2.4. <i>Tagetes lucida</i>	31
2.4.1 Clasificación Taxonómica y Generalidades de la planta	31
2.4.1.1. Composición Química	33

3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. Objetivo general	35
6. Objetivos particulares	35
7. METODOLOGÍA	36
7.1. Reactivos	36
7.1.1. Animales	36
7.2. Identificación y recolección del material vegetal	36
7.3. Obtención del extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i>	37
7.4. Cromatografía en columna abierta	37
7.5. Cromatografía en capa fina (CCF)	37
7.6. Determinación del mecanismo de acción del extracto etanólico derivado de <i>Tagetes lucida</i>	38
7.6.1. Participación de receptores β2 adrenérgicos	38
7.6.2. Participación de receptores Muscarínicos	39
7.6.3. Participación de canales de Calcio activados con KCl	40
7.6.4. Participación de canales de Calcio	41
7.6.5. Participación de canales de Potasio	41
7.6.6. Participación de Fosfodiesterasas	42
7.6.7. Participación de la vía NO/GMPc	43
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
8.1. Obtención del extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i>	44
8.2. Cromatografía en columna abierta (CC)	44
8.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	46
8.3. Efecto relajante del extracto etanólico de <i>T. lucida</i>	49
8.4. Determinación del mecanismo de acción funcional del extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i>	50
8.4.1. Participación de receptores β2 adrenérgicos en el mecanismo de acción relajante	50
8.4.2. Participación de receptores Muscarínicos	51
8.4.3. Participación de canales de Calcio activados con KCl	53
8.4.4. Participación de canales de Calcio	55

8.4.5. Participación de canales de Potasio	56
8.4.6. Participación de Fosfodiesterasas	57
8.4.7. Participación de la vía NO/GMPc	59
9. CONCLUSIONES.....	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. REFERENCIAS	63

I. ABREVIATURAS

AMP	Adenosín monofosfato
AMP _c	Adenosin Monofosfato cíclico
ANOVA	Analysis of Variance (por sus siglas en inglés)
ASM	Airway Smooth Muscle (por sus siglas en inglés)
ATPasa	Adenosín trifosfatasa
ATP	Adenosín trifosfato
BKCa ²⁺	Canal de alta conductancia de potasio activado a calcio
Ca ²⁺	Iones Calcio
CC	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CE ₅₀	Concentración efectiva media
EEtOHT	Extracto etanólico de la planta <i>Tagetes lucida</i>
E _{max}	Efecto máximo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FeCl ₃	Cloruro férrico
FP	Función pulmonar
GC	Guanilato ciclasa
GC/MS	Cromatografía de gases acoplado a masas (por sus siglas en inglés)
GCp	Guanilato Ciclasas Particuladas
GCs	Guanilato Ciclasas Solubles
GMP _c	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G de clase A
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HRB	Hiperrespuesta bronquial
HTA	Humo del tabaco ambiental
IgE	Inmunoglobulina E

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
K ⁺	Iones Potasio
kDa	Kilodalton
L-NAME	L-Nitro-Arginina-Metil-Ester
mAChR	Receptores muscarínicos de acetilcolina
ML	Músculo liso
MLA	músculo liso de las vías aéreas
mM	Milimolar
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLC	Cadena ligera de miosina
μM	Micromolar
mV	milivoltios
NOS	Sintasas del óxido nítrico
ODQ	1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PDE4	Fosfodiesterasa específica de AMPc tipo 4
PDE	Fosfodiesterasa
pH	Potencial de hidrogeno
RS	Retículo sarcoplásmico
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Recursos Naturales

II. FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la vía aérea alta	18
Figura 2. Anatomía de la tráquea.....	19
Figura 3. Anatomía de la vía aérea baja	20
Figura 4. Contracción del músculo liso	21
Figura 5. Regulación de la contracción y relajación por iones de calcio	23
Figura 6. Respuesta fisiopatológica del asma	26
Figura 7. <i>Tagetes lucida</i> en floración.....	32
Figura 8. Proceso de estabilización-sensibilización del ensayo <i>ex vivo</i>	38
Figura 9. Procedimiento para el análisis de la participación de receptores β_2 adrenérgicos.....	39
Figura 10. Procedimiento para el análisis de la participación de receptores muscarínicos.....	40
Figura 11. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de calcio activados por KCl.....	40
Figura 12. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de Calcio.	41
Figura 13. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de Potasio.....	42
Figura 14. Procedimiento para el análisis de la participación de Fosfodiesterasas.	42
Figura 15. Procedimiento para el análisis de la participación de la vía ON/GMPc.	43
Figura 16. Columna cromatográfica del extracto etanólico de la planta <i>Tagetes lucida</i> (EEtOHTI).	44
Figura 17. Punto de fusión de un compuesto de tipo cumarina.....	45
Figura 18. Compuestos obtenidos a través de fraccionamiento cromatográfico. ..	46
Figura 19. Identificación de similitud cromatográfica por cromatografía en capa fina (CCF) de los compuestos obtenidos, observados en U.V a longitud de onda corta (180-280 nm) (A) y larga (315-400 nm) (B).	47
Figura 20. Placas cromatográficas del EEtOHTI reveladas con vainillina.....	48

Figura 21. Placas cromatográficas del EEtOHTI reveladas con cloruro férrico.49

III. TABLAS

Tabla 1. Compuestos identificados en la planta <i>T. lucida</i>	33
Tabla 2. Rendimiento del extracto etanólico de la planta <i>T. lucida</i>	44
Tabla 3. Punto de fusión de las fracciones obtenidas.	45

IV. GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Tagetes lucida</i>	49
Gráfica 2. Efecto del isoproterenol [10 µM] en el proceso de relajación del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> en un modelo <i>ex vivo</i> de tráquea aislada de rata..	51
Gráfica 3. Efecto de la CE ₅₀ del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> , sobre la contracción inducida con carbacol en modelo <i>ex vivo</i> de tráquea aislada de rata vs curva control de carbacol..	53
Gráfica 4. Efecto tráqueo-relajante del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> , inducido por KCl 80 Mm vs curva control de Nifedipina.....	54
Gráfica 5. Efecto de contracción inducido por diluciones seriadas de CaCl ₂ , en ausencia y presencia del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> , en modelo <i>ex vivo</i> de tráquea aislada de rata..	56
Gráfica 6. Efecto de los inhibidores Glibenclamida y 2-Aminopiridina.....	57
Gráfica 7. Efecto de relajación de la CE ₅₀ de teofilina [157.16 µM] en presencia del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> en modelo <i>ex vivo</i> de tráquea aislado de rata..	59
Gráfica 8. Efecto relajante del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> vs efecto relajante del extracto etanólico de <i>T. lucida</i> en presencia de inhibidores para cada enzima; ODQ [2.66 µM] y L-NAME [1 µM].....	61

V. ABSTRACT

There are different chronic diseases that affect the world population, as is the case of asthma that affects the population indistinctly, which is characterized by a chronic inflammation of the airways generating its obstruction and hyperreactivity. Currently, the existing therapy can be pharmacological and non-pharmacological. An alternative treatment is the use of traditional medicine, associated with medicinal plants in Mexico, such as the *Tagetes lucida*, a plant that is used to relieve asthma and other conditions, used in infusion and decoction of the leaves and flowers, and is known as pericon or yerbanís. This species belongs to the Asteraceae, a cosmopolitan family of great biological richness and diversity. The therapeutic activity of this plant is mainly due to the presence of coumarins, as well as flavonoids and other molecules.

In the present work, the mechanism of functional action of the ethanolic extract obtained from *Tagetes lucida* in an isolated tracheal organ model was determined, and the possible compounds responsible for the tracheo-relaxant activity were isolated and purified.

An exhaustive maceration in triplicated with ethanol (96%) of the *T. lucida* plant was performed. It was brought to dryness using a high vacuum rotary evaporator. The ethanolic extract was used for pharmacodynamic evaluations using an *ex vivo* model of isolated rat trachea.

For this purpose, the use of enzyme agonists and inhibitors involved in the signaling pathways in airway smooth muscle relaxation processes; theophylline, isoproterenol, KCl, ODQ, L-NAME, carbachol and calcium dilutions were used to induce contraction in order to observe and determine if the extract can perform a tracheo-relaxant effect. The results obtained from determination of mechanism of action of the tracheo-relaxant effect were expressed as the mean of 5 animals \pm the standard error of the mean. The concentration-response curves were made in the Origin pro 8.0 program. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 5 program, establishing a significant difference of the means of $p < 0.05$ by two-way ANOVA analysis followed by Benferroni test. In addition, the ethanolic extract of

the *T. lucida* plant was subjected to chromatographic fractionation (isocratic elution) in order to ascertain the phytochemical profile and identify the metabolites present in the extract, using a hexane/ethyl acetate mixture in a 90:10 ratio.

The relaxant effect of the ethanolic extract was significant and concentration-dependent. The tracheo-relaxant mechanism of action of the ethanolic extract of *T. lucida* was related to a blockade of calcium channels, preventing the passage of ions and consequently, the contractile process. The bio-guided phytochemical study of the extract allowed obtaining the possible compounds responsible for the activity, whose structural elucidation allowed determining that they are coumarin-type compounds.

VI. RESUMEN

Existen diferentes enfermedades crónicas que afectan a la población mundial, como es el caso del asma, que afecta de manera indistinta a la población, la cual se caracteriza por una inflamación crónica de las vías respiratorias, generando su obstrucción e hiperreactividad. En la actualidad la terapia existente puede ser farmacológica y no farmacológica. Una alternativa es el uso de la medicina tradicional, asociado a plantas medicinales, en México se conocen gran diversidad de plantas medicinales como es el caso de la especie *Tagetes lucida*, comúnmente conocida como pericón o yerbanís, la cual ha sido utilizada para aliviar diversas afecciones como el asma, empleada en forma de infusión y decocción de las hojas y las flores. Esta especie pertenece a las Asteráceas, una familia cosmopolita de gran riqueza y diversidad biológica. La actividad terapéutica que presenta esta planta es debido a la presencia de cumarinas principalmente, además de flavonoides y otras moléculas.

En el presente trabajo se determinó el mecanismo de acción funcional del extracto etanólico derivado de *Tagetes lucida*, en un modelo de órgano aislado de tráquea, asimismo se aislaron y purificaron los posibles compuestos responsables de la actividad tráqueo-relajante.

La obtención del extracto fue a partir de la maceración exhaustiva con etanol (96%) de la planta *T. lucida*. El extracto etanólico se utilizó para realizar evaluaciones farmacodinámicas utilizando un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata. Para ello, se hizo uso de agonistas e inhibidores enzimáticos involucrados en las vías de señalización en los procesos de contracción/relajación del músculo liso de las vías aéreas; teofilina, isoproterenol, KCl, ODQ, L-NAME, carbacol y diluciones de calcio para inducir contracción y así poder observar y determinar si el extracto es capaz de realizar un efecto tráqueo-relajante. El extracto etanólico de la planta *T. lucida* se sometió a un fraccionamiento cromatográfico (elución isocrática) para poder conocer el perfil fitoquímico e identificar los metabolitos presentes en el extracto, utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 90:10.

El efecto relajante del extracto etanólico fue significativo y dependiente de la concentración. El mecanismo de acción tráqueo-relajante del extracto etanólico de la planta *T. lucida* se relacionó con un bloqueo de canales de calcio, impidiendo el paso de los iones y por consecuencia, el proceso contráctil. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto permitió la obtención de los posibles compuestos responsables de la actividad los cuáles son de tipo cumarina.

1. INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad caracterizada por una inflamación crónica de las vías respiratorias que puede producir una obstrucción de estas, incrementando la reactividad de la vía aérea y episodios frecuentes de sibilancias, dificultad respiratoria, tiraje intercostal, tos y opresión torácica. Afecta de manera indistinta a la población, sin embargo, se presenta con mayor prevalencia en niños con historia familiar de alergia, los síntomas y exacerbaciones son generados por infecciones virales, alérgenos, contaminación del ambiente entre otros factores (Río-Navarro et al., 2009).

El tratamiento puede ser iniciado según la evaluación inicial de la gravedad de la enfermedad, y tiene como objetivo reducir la frecuencia y gravedad de los síntomas (Sameer, K. M., & William, W. B. 2006).

- El uso de broncodilatadores inhalables como el salbutamol es muy común en el tratamiento de rescate. En el asma persistente, siendo leve, moderada o grave, es recomendable el uso de un glucocorticoide inhalado diariamente como tratamiento inicial o basal (Río-Navarro *et al.*, 2009).
- Evitar el tabaco, realizar actividad física, vacunación, además de prevenir contacto con diferentes alérgenos, son algunas de las recomendaciones que se les da a los pacientes (Meléndez Núñez *et al.*, 2010).

Existen otras alternativas al tratamiento actual, como la medicina tradicional, que es el conjunto de prácticas, creencias y conocimientos basados en el uso de recursos naturales que buscan mantener la salud individual y comunitaria. La medicina tradicional se relaciona a plantas medicinales, como su recurso más abundante, accesible y conocido (Pereyra-Elías & Fuentes Delgado 2012).

Un ejemplo asociado a plantas medicinales en México es la infusión y decocción de las hojas y las flores de la planta *Tagetes lucida*, conocida como pericón o yerbanís, perteneciente a la familia de las Asteráceas. Es utilizada para aliviar el reumatismo, asma, curar la diarrea, la disentería amebiana, giardiasis, las ascaridiasis y otras infecciones (Gutiérrez Gaitén *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1. Fisiología respiratoria

La fisiología del aparato respiratorio ha sido descrita como un proceso altamente complejo, metódico y establecido genéticamente. Existen distintos factores tanto maternos como ambientales que ayudarán a la determinación epigenética de un gran número de características anatomofuncionales del aparato respiratorio en el futuro de las personas desde la etapa infantil (Asenjo, C. A. & Pinto, R.A. 2017).

La respiración comienza con la inspiración, que permite la entrada de aire al pulmón. La caja torácica aumenta su volumen, con lo que el aire es aspirado y llega sucesivamente a los alvéolos pulmonares. Al finalizar la contracción de los músculos, la elasticidad de los alvéolos les hace volver a su volumen inicial, esto se debe a que se produce una presión que expulsa el aire del aparato respiratorio (Melo, A. 2011).

2.1.1. Estructuras anatómicas que conforman el aparato respiratorio

El aparato respiratorio se divide por diferentes estructuras, que en conjunto cumplen con la funcionalidad de este. Está dividido principalmente por la vía aérea alta y la vía aérea baja.

El ser humano en reposo respira de 12 a 15 veces por minuto. Inspirando y espirando cerca de 500mL de aire en cada respiración, el aire se mezcla con el gas que se encuentra presente en los alvéolos y por difusión simple, el oxígeno entra en la sangre de los capilares pulmonares mientras que el dióxido de carbono ingresa a los alveolos. Es así como 250mL de oxígeno ingresan al organismo cada minuto y por esta razón, se excretan 200mL de dióxido de carbono (B., & Barrett, K. E. 2010).

2.1.1.1. Vía aérea alta

Nariz: Estructura más fija del tracto respiratorio. Las cavidades nasales están constituidas por dos cámaras paralelas que se separan por un cartílago septal o pared medial. Cada una comprende de narina o también conocida como vestíbulo nasal, coana que es el orificio posterior que continúa con la nasofaringe, piso y techo. El tabique nasal se compone por el hueso vómer, lámina perpendicular del etmoides y el cartílago septal. Las paredes laterales son irregulares y están formadas por componentes adicionales del hueso etmoides (cornetes nasal superior y medio). El cornete inferior es un hueso separado que está articulado con el hueso maxilar (Llobell F. et al., 2017).

Boca: La boca se integra entre los labios por anterior, y posterior a los pliegues palatoglosos. El techo está conformado por el paladar duro y blando. En el interior se localiza la lengua que se caracteriza por ser el órgano muscular más grande dentro de la boca, de los que dos de tres anteriores forman su piso, y los dientes que también son de gran importancia. Debido al tamaño considerable de la lengua, movilidad, inserción en mandíbula, hioides y epiglotis, tiene un papel esencial para mantener una vía aérea permeable (David, J. Stone & Thomas, J. 2000).

Faringe: Es un tubo con una medida entre 12 y 15 cm de longitud, con una extensión desde la base del cráneo hasta la cervical 6 (C6) que corresponde al nivel del cartílago cricoides, después se encuentra con el esófago. Se compone de tres músculos constrictores que son el superior, medio e inferior, las cuales se superponen como capas y estas al contraerse permiten el paso del bolo alimenticio al esófago. Conjuntamente, la parte baja del constrictor inferior se incorpora en el cartílago cricoides y origina el músculo cricofaríngeo, que opera como esfínter a la entrada del esófago. Como se observa en la figura 1, la faringe se integra anteriormente con la nariz, boca y laringe, dividiéndola en los segmentos llamados nasofaringe, orofaringe y laringofaringe (Sologuren, N. 2009).

Laringe: Se ubica a nivel vertebral de C4 y C6, teniendo una estructura túbulo-cartilaginosa, está cubierta por una membrana mucosa con epitelio escamoso estratificado no queratinizado. (Asenjo, C. A. & Pinto, R.A. 2017)

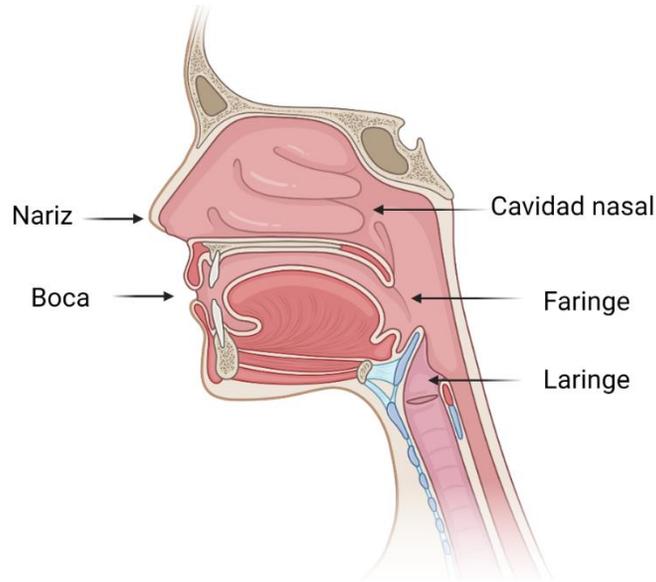


Figura 1. Anatomía de la vía aérea alta.

Imagen creada a partir de BioRender

2.1.1.2. Vía aérea baja

Tráquea: Es la porción cervicotorácica entre la laringe y los bronquios. Se identifica como un conducto fibromusculocartilaginoso, que sirve como paso para el aire inspirado y espirado. Además, está conformado de 15 a 20 anillos cartilagosos incompletos, denominado así, por su forma de "U". Se extiende de la laringe, por delante del esófago, llegando hasta la carina donde se divide en dos bronquios principales o fuente derecho e izquierdo, originándose la vía aérea de conducción (figura 2). Debido a su estructura fibromusculocartilaginosa, resiste el colapso que se genera durante la respiración y adapta el diámetro que tiene gracias al músculo traqueal. Incluso desempeña funciones inmunitarias mediante su aparato mucociliar, dando paso al drenaje y eliminación de las partículas que son inhaladas hacia la faringe, también por medio de las acumulaciones linfoides

parietales que forman el tejido linfoide que está asociado a los bronquios (Gavid M *et al.*, 2021).

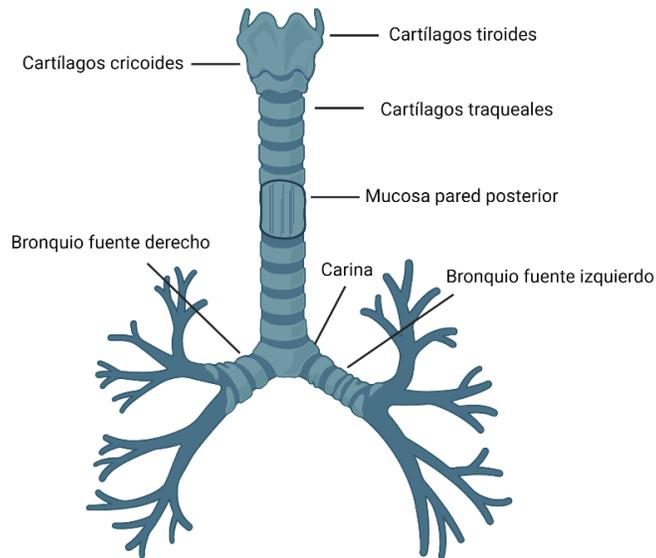


Figura 2. Anatomía de la tráquea (Atlas de anatomía humana 6a edición. Frank H. Netter, MD.)

Bronquios y bronquiolos: Su función principal es conducir el aire a través del pulmón a los alveolos. La estructura está descrita como conductos tubulares formados por anillos fibrocartilaginosos, los cuales se dividen en bronquios lobares, segmentarios y subsegmentarios. Otra característica que resalta es que solamente los bronquios poseen cartílago, mientras que los bronquiolos mantienen abiertos su lumen con base a fibras elásticas y musculares, teniendo un diámetro de 0.3 a 0.5 mm y estos dan fin al espacio muerto anatómico, debido a que en los bronquiolos respiratorios existe intercambio gaseoso (Asenjo, C. A. & Pinto, R.A. 2017).

Alveolos: Se pueden encontrar desde la pared de los bronquiólos respiratorios y los conductos hasta los sacos alveolares. Los conductos alveolares se conectan a los bronquiólos respiratorios, tienen una diferencia entre sí debido a que forman largos espacios donde desembocan los alveolos entre una pared de una o dos células planas que se sostienen sobre algunas fibras musculares lisas, formando

una estructura llamada espolón. El ser humano tiene alrededor de trescientos millones por pulmón, con un diámetro variable de 250 μm . En los alvéolos se produce el intercambio gaseoso y la pared alveolar abarca el 99% de la superficie interna del pulmón (Brusco, H. A., Costa, J. J. L., & Loidl, C. F. 2014).

2.1.1.3. Pulmones

La forma de los pulmones es cónica (figura 3), sus vértices llegan a los huesos supraclaviculares y conectan con el plexo branquial y tronco arterial. Se puede apreciar de tres perspectivas distintas, convexa costal, cóncava diafragmática y mediastínica. Los pulmones están cubiertos por pleura visceral, que se introduce de igual manera en las fisuras y demarca los lóbulos. Tienen elasticidad para retraerse hasta en un tercio en su volumen, el soporte fibroso que está formado por elastina y colágeno permite la distensibilidad y estabilidad de los pulmones (Sánchez, T. & Concha, I. 2018).

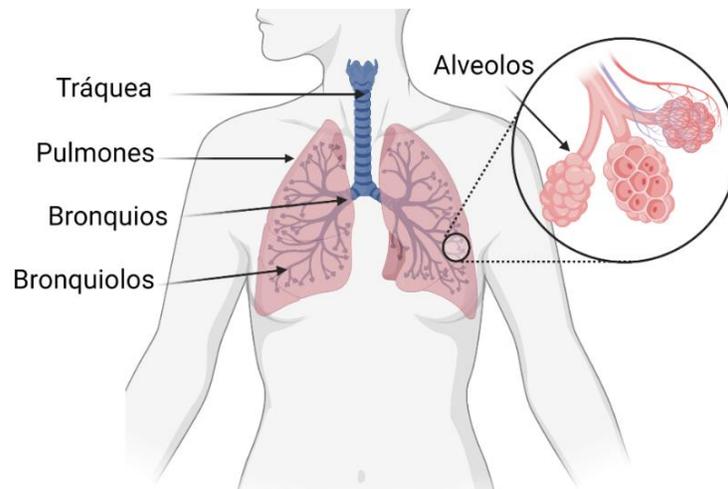


Figura 3. Anatomía de la vía aérea baja.

Imagen creada a partir de BioRender

2.1.1.4. Músculo liso

Desde un punto de vista anatómico, el músculo liso (ML) se caracteriza por carecer de estriaciones visibles a comparación del músculo estriado y cardiaco (Barrett K.E. et al 2016).

El músculo liso conforma las paredes de casi todos los huecos del cuerpo humano, a excepción del corazón. Como tal, la función y control de la contracción varía dependiendo del órgano y la función (McDonough K.H. 2013).

En el pulmón, el músculo liso está ubicado a lo largo de todas las vías aéreas, desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales. Su nivel del tono va a determinar el calibre de las vías aéreas y, la resistencia al paso de aire a lo largo de ellas. En la tráquea y bronquios principales, el ML cierra la parte posterior de los cartílagos en forma de "U". En los bronquios de pequeño y mediano calibre, el ML no se dispone de forma del todo circular, está dispuesto a lo largo de la vía aérea como dos espirales opuestas (figura 4). Esto hace que cuando se genera una contracción del músculo liso, no solo se reduce el calibre de la vía aérea, sino que también su longitud es reducida (Villa Asensi, J. R. 2004).

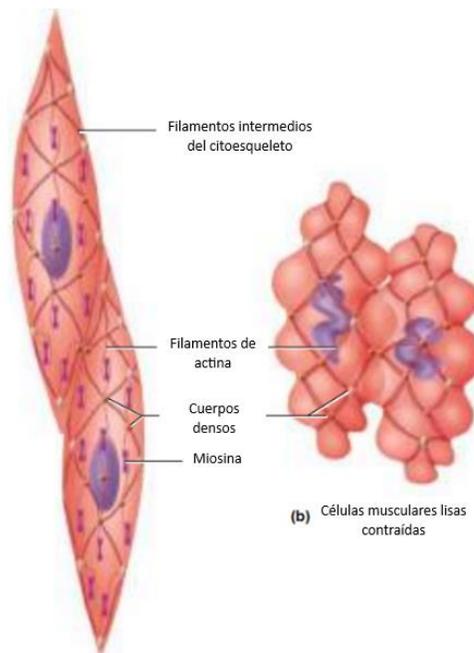


Figura 4. Contracción del músculo liso (Saladin, K. S. 2017).

2.1.1.5. Mecanismo de contracción del músculo liso

El proceso contráctil de las células del músculo liso se regula principalmente por la activación del receptor y mecánica (estiramiento) de las proteínas contráctiles actina y miosina. Un cambio en el potencial de la membrana que se provoca por la descarga de potenciales de acción o la activación de canales iónicos dependientes de estiramiento en la membrana plasmática también puede ser factor para la contracción. Para que se genere la contracción, la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLC) debe fosforilar la cadena ligera de 20 kDa de la miosina que permitirá la interacción molecular de la actina con la miosina. La energía que se libera del adenosín trifosfato (ATP) por la actividad de miosina, ATPasa genera el ciclo de los puentes cruzados de miosina con actina para generar la contracción. Es por eso, por lo que la actividad contráctil del ML se determina principalmente por el estado de fosforilación de la MLC. En algunas células del ML, la fosforilación de la MLC se mantiene en un nivel bajo, en ausencia de estímulos externos (sin receptor o activación mecánica), se conoce como tono muscular liso y su intensidad puede variar (Webb, R. C. 2003).

2.1.1.6. Regulación de la contracción por iones de calcio

La concentración de Ca^{2+} intracelular incrementa cuando el Ca^{2+} ingresa a la célula a través de los canales de calcio en la membrana celular o el retículo sarcoplásmico (RS), mediante diversas vías de señalización. El Ca^{2+} se une a la calmodulina, la cual es una proteína reguladora que se encuentra en gran cantidad en el músculo liso, formando un complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa la miosina cinasa de cadena ligera (MLCK). La MLCK se encarga de fosforilar la cadena ligera de miosina (MLC) para generar la contracción del músculo liso. El proceso se invierte cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye por su bombeo al exterior de la célula, dando como resultado que la miosina fosfatasa elimina el fosfato de la MLC para poder generar la relajación (figura 5) (Hall, J. E. 2010).

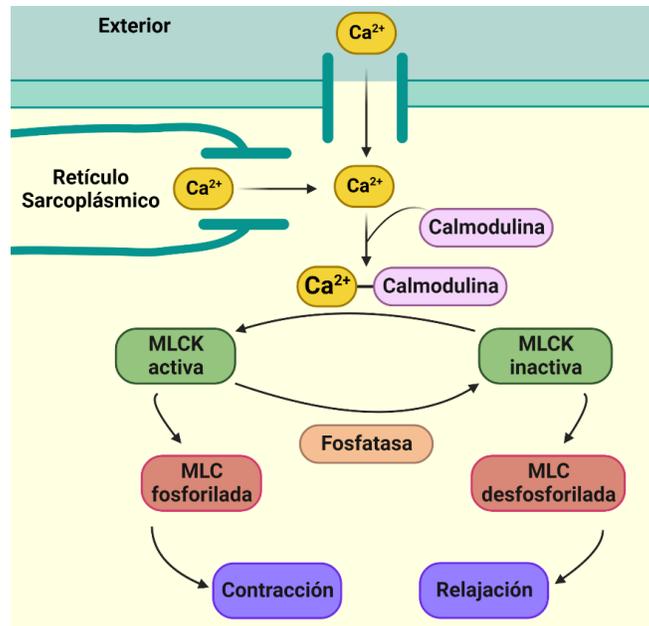


Figura 5. Regulación de la contracción y relajación por iones de calcio.

Imagen creada a partir de BioRender.

2.1.1.7. Mecanismos de defensa

Debido a la exposición frecuente a microorganismos como virus, bacterias, esporas de hongos y a partículas de polvo, también gases como humo, tabaco, etc, estos son inhalados hacia las vías respiratorias. Dependiendo el tamaño de las partículas, se van depositando en diferentes niveles de la vía aérea, lo que contribuye a la defensa contra agentes externos.

Como primer punto, en la nariz se realiza el acondicionamiento del aire inspirado humidificándolo y calentándolo, también se realiza la filtración de las partículas, esto gracias a los vellos nasales y a la acción del mucus. El mucus es producido por las células caliciformes, actúa atrapando las partículas y transportándolas desde la vía aérea baja hasta la faringe para su correcta eliminación mediante el reflejo de la tos y deglución de secreciones. Es por esto, que el transporte mucociliar y los reflejos de la vía aérea como lo son la tos, los

estornudos, los laringo y broncoespasmos, son de gran importancia para la defensa pulmonar. Existen más participantes al momento de la remoción de partículas de la vía aérea como los macrófagos alveolares y enzimas que cumplen la función de eliminar las partículas que logran llegar más distal al acino alveolar (Sánchez, T. & Concha, I. 2018).

2.1.1.8. Enfermedades respiratorias

Las enfermedades respiratorias están asociadas a un número importante de morbi-mortalidad en las personas y constituyen un problema sociosanitario de primer orden, debido a la alta prevalencia y coste. Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) pronostican que la frecuencia de muchas enfermedades respiratorias, en lugar de disminuir como otras enfermedades, tendrán un incremento en un futuro inmediato. Por ejemplo, la prevalencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y del asma bronquial está en un aumento a nivel mundial, el cáncer de pulmón que produce más muertes en los hombres, pero tendrá aumento en su incidencia sobre las mujeres en un lapso de 15 a 20 años, las infecciones respiratorias como neumonías bacterianas y tuberculosis, tendrán mayor impacto, y por último, otras enfermedades respiratorias, prácticamente desconocidas hasta hace pocos años, como el síndrome de apnea del sueño (Navarro, P. C *et al.*, 2005).

2.2 Asma

El asma se define como una enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas, su origen es multifactorial y entre las manifestaciones clínicas que presentan los individuos susceptibles son: episodios frecuentes de sibilancias, falta de aire al momento de respirar, además de sensación de opresión torácica y tos. Esto está asociado habitualmente a la obstrucción de las vías respiratorias (Moral, L *et al.*, 2020).

2.2.1 Fisiopatología del asma

El asma se caracteriza por una respuesta exagerada a estímulos endógenos y exógenos como la hiperrespuesta de la vía aérea, que puede provocar uno o más de los síntomas respiratorios clave como lo es la tos, sibilancias, disnea opresión del pecho etc. La fisiopatología del asma engloba tres características fundamentales las cuales son: Inflamación, remodelación e hiperrespuesta de las vías aéreas. En consecuencia, se produce una obstrucción de la vía aérea, con una variable en el tiempo, parcialmente reversible, que se autolimita a manejo con broncodilatadores y corticoides inhalados. Todas las variantes del asma están relacionadas a la inflamación de la vía aérea, que es uno de los mecanismos centrales, sin tomar en cuenta al asma paucigranulocítica, en la que una alteración a nivel de las células del músculo liso bronquial desempeña el papel central (Larenas-Linneman D *et al.*, 2021).

2.2.2 Respuesta fisiopatológica

A un lado de la respuesta inflamatoria, el asma se presenta con frecuentes cambios estructurales de remodelación como el engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de las glándulas mucosas e hipersecreción de moco, además de la proliferación vascular y vasodilatación, que son el resultado de la inflamación (figura 6) aunque también no siempre obedecen a este mecanismo. Por ejemplo, la obstrucción bronquial se da por los cambios producidos como la contracción del músculo liso bronquial, edema, hipersecreción de moco y cambios estructurales, al igual que el origen de la mayoría de los síntomas asmáticos.

La hiperrespuesta bronquial (HRB) y variabilidad generan un estrechamiento de las vías respiratorias, esto en respuesta a unos estímulos que son inocuos en el resto de la población, que conducen a una limitación variable del flujo aéreo y a la aparición de síntomas intermitentes. La HRB está vinculada con la inflamación y la reparación de las vías respiratorias (Rodríguez M *et al.*, 2017).

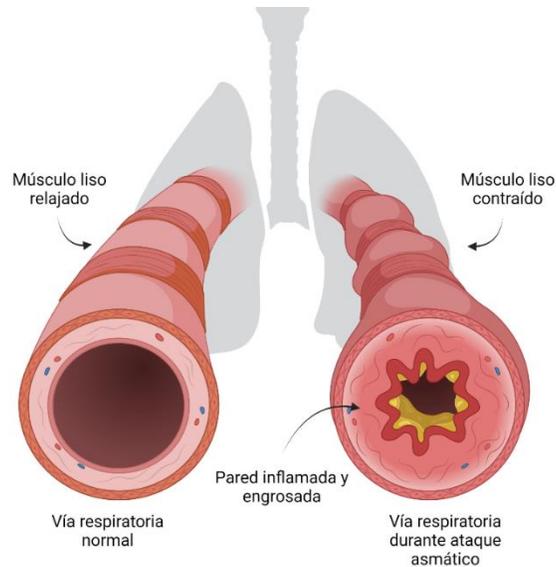


Figura 6. Respuesta fisiopatológica del asma.

Imagen creada a partir de BioRender.

2.2.3 Síntomas

El diagnóstico se da a partir de los datos clínicos, no obstante, ningún signo o síntoma clínico es patognomónico, sin embargo, los síntomas más comunes presentados son tos y sibilancias en el pecho, son poco sensibles. Esto aparece frecuentemente con un patrón recurrente característico, que está relacionado con la exposición a desencadenantes reconocibles y mejoran o son reversibles con el tratamiento broncodilatador, aunque la falta de respuesta no deja por un lado el diagnóstico. Existe diferencia entre otros pacientes, donde los síntomas son continuos o persistentes (García Merino, Á., & Mora Gandarillas, I. 2013).

2.2.4 Diagnóstico funcional

Es de gran importancia valorar la función pulmonar (FP) para confirmar la limitación variable del flujo aéreo espiratorio. La espirometría es auxiliar en la confirmación del diagnóstico, descartar otras enfermedades, conocer el nivel de gravedad, y el grado de control de asma, así como también la evolución de la FP.

La espirometría frecuentemente es normal fuera de la crisis, lo cual no descarta el diagnóstico del asma, se debe constatar el patrón obstructivo con una prueba de broncodilatación positiva (demostrando la reversibilidad de la obstrucción bronquial). Como pruebas complementarias, existen test que valoran la hiperrespuesta bronquial, empleando agentes directos como metacolina, o indirectos como manitol, también se puede medir el esfuerzo físico o suero hipertónico.

La prueba de esfuerzo que se relaciona con el grado de inflamación bronquial es muy específica pero muy poco sensible. Suele ser el primer signo en el paciente asmático (hiperreactividad bronquial) y el último en desaparecer al momento del tratamiento antiinflamatorio. La variabilidad aumentada del flujo espiratorio máximo en un tiempo de dos semanas es útil en el diagnóstico, seguimiento y autocontrol de algunos pacientes. Otro factor importante es la inflamación bronquial que se determina por el esputo inducido y la fracción exhalada de óxido nítrico. En el esputo inducido se mide el grado de eosinofilia y es auxiliar en el diagnóstico (Asensi Monzó MT *et al.*, 2018).

2.2.5 Tratamiento farmacológico del asma

Si la sintomatología es recurrente, limitantes de la actividad y esto obliga a hacer uso regular de beta bloqueadores 2, se debe emplear una terapia combinada que consta de un broncodilatador, con un corticoide inhalado. Los corticoides inhalados, son el pilar del tratamiento del asma persistente, sin embargo, estos suelen presentar diversos efectos adversos, en su mayoría en niños. Una forma de prevención de efectos secundarios en niños es reducir al mínimo la dosis eficaz, por otra parte, hacer uso de dispositivos espaciadores o inhaladores de polvo seco, y tomar en cuenta el tratamiento no farmacológico como medida preventiva, también puede reducir los efectos adversos.

Existen otros medicamentos empleados en la terapia para asma, sin embargo, presentan diversas desventajas, como los antileucotrienos los cuales presentan

actividad protectora contra la broncoconstricción, pero que tienen poca eficacia y se deben administrar con corticoides inhalados en bajas dosis para poder mantener un buen control de pacientes con asma moderada a severa (Mendoza Amatller *et al.*, 2007).

Los glucocorticoides están entre los medicamentos con mayor eficacia para tratar el asma, a pesar de ello, los efectos adversos severos que se le atribuyen generan una necesidad de optimización terapéutica. Por otra parte, la histamina se relaciona con el desarrollo del asma, pero existe una falta de efectividad de los antihistamínicos para el control de sus síntomas que hace que este tratamiento no se pueda aplicar. Los antihistamínicos potencian la respuesta de los glucocorticoides *in vitro* y la coadministración de un antihistamínico con un glucocorticoide tienen efectos sinérgicos (Zappia, C.D *et al.*, 2019).

Los agonistas beta 2 adrenérgicos de acción prolongada, se utilizan para el control a largo plazo, debido a que previenen los síntomas nocturnos y el asma inducido por el ejercicio. No se recomiendan solos y estos se deben asociar con un antiinflamatorio (Río-Navarro *et al.*, 2009).

El Omalizumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea la unión de IgE al receptor de alta afinidad y se indica en el tratamiento del asma muy grave. Este es administrado por vía subcutánea cada dos o tres semanas. Puede presentar reacciones anafilácticas y una desventaja es que, tras su suspensión, los síntomas pueden reaparecer (Medina, A. A., Armentia, S. M., & Cortés, S. F. 2021).

2.2.5.1 Tratamiento no farmacológico del asma

Existen distintos factores que predisponen el desarrollo de asma, la evaluación exhaustiva de los niveles de riesgo que pueden contribuir a desencadenar la crisis de asma y agravar los síntomas en el paciente. Es de gran importancia identificar cuáles son los riesgos que se pueden estar presentando ante el paciente.

El "control ambiental" hace referencia a la exposición del humo del tabaco ambiental (HTA), ya que se constituye como uno de los factores de riesgo doméstico y ambientales por la aparición de sibilancias, y esto es un inductor para desarrollar asma durante la infancia.

La actividad física es una recomendación que se debe orientar para ser constante y continua. El nivel de riesgo en los niños puede mantenerse bajo si se tiene una buena actividad física, porque previene y controla la obesidad, así como también proporciona protección cardiorrespiratoria, entre otras. Es importante mantener un ejercicio regular debido a que si se realiza actividad física de manera intensa puede generar hiperventilación secundaria al esfuerzo, produciendo enfriamiento y deshidratación de la vía aérea, que estimula la liberación de mediadores de la inflamación. Esto puede ser más agresivo si se respira aire frío y seco.

Por otro lado, la intervención psicológica también tiene correlación con el asma, el nivel de estrés, incluso el estrés de los padres puede tener influencia en la función pulmonar y puede agravar el asma. El llanto, el miedo entre otros factores en el paciente pueden provocar exacerbaciones, al producir hiperventilación e hipocapnia, generando constricción en la vía aérea. También deben considerarse los factores psicológicos y sociales para poder ofrecer un tratamiento integral que proporcione una mejor calidad de vida.

Como último punto, la alimentación también es una consideración importante en el tratamiento no farmacológico del paciente con asma. Llevar una dieta balanceada para prevenir la obesidad es un punto importante, aunque estudios han revelado que el rol de las dietas con sal, grasas, antioxidantes, vitaminas, minerales y oligoelementos en pacientes asmáticos ha sido difícil de controlar, esto por la complejidad del régimen de alimentación (Meléndez Núñez *et al.*, 2010).

2.2.5.2. Medicina tradicional

La medicina tradicional se conoce como el conjunto de prácticas, creencias y conocimientos sanitarios con base en el uso de recursos naturales, ya sea de plantas, animales o minerales, terapias espirituales y técnicas manuales que tienen el fin de mantener la salud individual y comunitaria (Pereyra-Elías & Fuentes Delgado 2012).

Es utilizada ampliamente en el mundo y es apreciada por diversos motivos. La medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud. Para millones de personas, los tratamientos tradicionales representan la principal fuente de atención sanitaria y en muchos casos es la única. Está próxima a los hogares, siendo accesible y asequible. Las prácticas son muy distintas dependiendo del país y algunas veces se consideran de distinta manera en función a la cultura, conocimiento y accesibilidad de la medicina convencional (Organización Mundial de la Salud, 2013).

2.3. Uso de plantas medicinales y Fitoterapia

Las terapias con medicina tradicional principalmente hacen uso de extractos de plantas o sus compuestos activos. Dichas terapias se toman como única opción, también como alternativa y hasta de manera concomitante a su tratamiento farmacológico. La mayoría de los pacientes que son tratados con fitoterapia presentan una serie de sintomatologías leves o moderadas, aunque también existen pacientes con afecciones crónicas.

Entre los productos de origen vegetal, hay una clasificación en el grado de potencia farmacológica, los cuales van desde muy potentes hasta potencia relativamente baja y esto es uno de los motivos por los cuales tienen poca trascendencia en el medio hospitalario. Hay que tomar en cuenta que el medicamento fitoterapéutico, por su definición se asocia al empleo de productos de origen vegetal con una actividad leve o moderada con distintos márgenes terapéuticos, lo que da lugar a tratamientos poco agresivos. Gracias a esto se han

podido destacar ampliamente productos naturales bioactivos que se han aislado a partir de plantas y que resultan de gran importancia por su uso como agentes terapéuticos o prototipos de compuestos clave para llevar a cabo el desarrollo de nuevos medicamentos, o como agentes de ensayos bioquímicos para desenlazar los principios de farmacología humana donde los productos naturales, especialmente las plantas, tienen su lugar (Prieto-González et al., 2004).

2.4. *Tagetes lucida*

2.4.1 Clasificación Taxonómica y Generalidades de la planta

Tagetes lucida (figura 7) es nativa de México, pertenece a una familia cosmopolita de riqueza y diversidad biológica, las Asteraceae. Esta planta se incluye en el género *Tagetes* que comprende muchas especies aromáticas autóctonas de América. Sus usos van desde alimento y condimento, extracción de pigmentos y en la medicina tradicional para tratar distintos padecimientos (Gutiérrez Gaitén *et al.*, 2018).

Las regiones montañosas de México son consideradas como los mayores centros de diversidad de Asteraceae por las numerosas especies, géneros y tribus que se pueden encontrar. La tribu Tageteae que es nativa de América, está distribuida principalmente en la región centro-sur del territorio mexicano. El género *Tagetes* está integrado por alrededor de 58 especies endémicas del continente americano, de las cuales 36 están en México (Serrato-Cruz & Cervantes-Martínez, 2012).

Es una planta herbácea perenne que puede llegar a medir hasta 1 m de altura, tiene un fuerte olor a anís al momento de estrujarse, de tallos erectos desde su base, tienen poca ramificación, sus hojas son simples, cabezuelas agrupadas en cimas corimbosas y terminales en pedúnculos de 0 a 20 mm de largo, las flores son ligadas, normalmente tres, de tonos amarillo claro a amarillo-anaranjado (Serrato, 2014).

Esta planta también es conocida como pericón, anisillo, hierbanís, hierba de Santa María, hierba de San Juan. Desde la época prehispánica se le atribuyen propiedades terapéuticas para tratar la “locura” y epilepsia, siendo registradas en varios documentos y códices del siglo XVI. En dichos documentos también se recomienda para tratar la disentería, la fiebre y tumores. Se puede preparar de distintas maneras y dependiendo de cómo sea la forma de preparación, será el efecto que genere. Por ejemplo, la infusión de las hojas y flores se bebe para combatir la diarrea, reumatismo, el asma y el resfriado. Mientras que la decocción de las partes aéreas se emplea en el tratamiento de disentería amebiana, giardiasis, ascaridiasis y otras infecciones (G. Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008).

Como ha sido mencionado, esta planta se ha utilizado como remedio a base de hierbas para tratar la fiebre, ansiedad, irritabilidad, trastornos estomacales, reumatismo, asma y gripe. Se han realizado estudios farmacológicos que han demostrado actividad antimicrobiana, hepatoprotectora, antinociceptiva, antiespasmódica, antihiper glucémica y antioxidante (Caballero-Gallardo *et al.*, 2022).

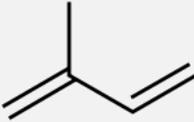
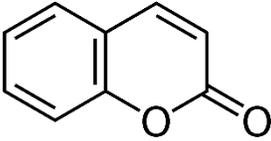
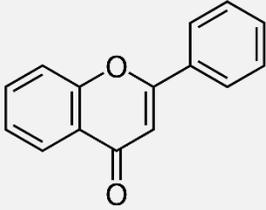


Figura 7. *Tagetes lucida* en floración (López López *et al.*, 2018).

2.4.1.1. Composición Química

Mediante numerosos estudios, se han encontrado distintos compuestos en la planta medicinal *Tagetes lucida*, los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Compuestos identificados en la planta T. lucida. (K.K. Jiménez Martínez. 2013).

Familia	Compuesto	Estructura base
Terpenos (fórmula química: $C_{30}H_{48}$), Aceites Esenciales	<i>Limoneno, β-ocimeno, cariofileno, mirceno, éter metílico de eugenol, eugenol, tagetona. Anetol, metileugenol y estragol.</i>	
Cumarinas (fórmula química: $C_9H_6O_2$)	<i>Dimetilalileter de 7-hidroxycumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina, 7,8-dihidroxycumarina, 6,7-dimetoxicumarina, 6,7-dihidroxycumarina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, 7-metoxicumarina, y 6-metoxi-7-hidroxycumarina.</i>	
Flavonoides (fórmula química: $C_{15}H_{10}O$)	<i>Patuletina, quercetagetina y quercetina.</i>	
Otros	<i>Gomas, dextrinas y Sales minerales.</i>	

3. JUSTIFICACIÓN

El asma se encuentra dentro de las principales enfermedades en la etapa infantil, limitando la calidad de vida de un alto número de niños y sus familias. Actualmente no hay un tratamiento curativo para el asma, aunque sí existe un objetivo claro en el tratamiento, que es controlar durante largos periodos de tiempo la sintomatología y alteración funcional de esta enfermedad, evitando las reagudizaciones y la pérdida progresiva de la función pulmonar.

Existen factores modificables que incluyen la no adherencia a la medicación, efectos adversos persistentes, que contribuyen a un control deficiente en los pacientes con asma, generando un número elevado de consultas médicas y hospitalizaciones. Pese al desarrollo de nuevos fármacos y la disponibilidad de directrices internacionales de tratamiento, el asma sigue siendo mal controlada.

Un reto que se mantiene dentro de la comunidad científica es la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial farmacológico para poder tratar distintas afecciones. Una fuente de obtención de nuevas moléculas son las plantas medicinales, que han desempeñado un papel importante en el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo el asma. Un claro ejemplo es la planta *Tagetes lucida*, comúnmente conocida como pericón que se le adjudican propiedades para tratar la diarrea, disentería, empacho, vómito, reumatismo, asma, tifoidea, varices y resfriados. Aunque son escasos los estudios farmacognósticos y no existen suficientes investigaciones sobre la actividad antiasmática de los extractos, esto ha generado interés en evidenciar su efecto farmacológico ante el asma, determinando su mecanismo de acción y el nivel de eficacia en un organismo, asimismo la identificación de los compuestos responsables de dicha actividad.

Tomando en cuenta estos puntos, el presente proyecto pretende aislar los compuestos responsables de la actividad relajante, determinar el mecanismo de acción mediante la evaluación del potencial farmacológico en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata.

4. HIPÓTESIS

El extracto etanólico derivado de *Tagetes lucida* (pericón) mostrará actividad relajante en tráquea aislada de rata.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto relajante y determinar el mecanismo de acción funcional del extracto etanólico derivado de *Tagetes lucida* en un modelo de órgano aislado de tráquea, asimismo aislar y purificar los compuestos responsables de la actividad tráqueo-relajante.

6. Objetivos particulares

- Obtener el extracto etanólico de la planta medicinal *Tagetes lucida* (pericón)
- Evaluar el efecto relajante del extracto etanólico de *Tagetes lucida* (pericón) en un modelo *ex vivo*.
- Determinar el mecanismo de acción funcional del extracto etanólico de *Tagetes lucida* en el modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata.
- Purificar y aislar los compuestos que tengan presencia en el extracto etanólico de *Tagetes lucida*.

7. METODOLOGÍA

7.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: Solución Ringer Krebs Normal, Solución Ringer Krebs KCl 80 mM, cloruro de carbacol, extracto etanólico de la planta *T. lucida*, Nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), CaCl₂ 80 mM a 27 mM, Isoproterenol, KCl 80 mM, teofilina, Glibenclamida y 2-Aminopiridina.

Para las pruebas químicas se emplearon: cloruro férrico (FeCl) y Vainillina.

7.1.1. Animales

Para la evaluación *ex vivo* del efecto relajante y de los diferentes mecanismos de acción, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250-300 g. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio con una dieta estándar (Rodent Labs Chow®) y agua *ad libitum*.

Para manipular a los animales, se revisó la Regulación Federal para el Manejo y Experimentación de Animales emitida por la Secretaría de Agricultura y Recursos Naturales (SAGARPA) junto con los procedimientos de experimentación descritos en la NOM-062-ZOO-1999, y la aprobación del Comité Universitario de Uso y Manejo de Animales.

7.2. Identificación y recolección del material vegetal

La planta *Tagetes lucida* fue comprada en el mercado de Santa María Ahuacatitlán, Cuernavaca, en el mes de octubre del año 2020, por el grupo de investigación perteneciente al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, bajo la dirección del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto.

Respecto a la identificación taxonómica; fue elaborada por la Dra. Irene Perea Arango y el código de referencia se encuentra en trámite.

Para poder comenzar con la obtención del extracto etanólico, previamente se dejó secar la planta a temperatura ambiente y en la sombra. Posterior a esto, se procedió a moler el material vegetal en un molino eléctrico modelo 100Y.

7.3. Obtención del extracto etanólico de *Tagetes lucida*

Para obtener el extracto etanólico, se aprovechó el material vegetal molido y este se sometió a un proceso de maceración exhaustiva con etanol (96%), durante 72 h por triplicado. El extracto obtenido de la maceración tuvo que pasar por otro proceso de secado a presión reducida mediante el uso del rotavapor marca BUCHI®.

7.4. Cromatografía en columna abierta

Mediante una columna cromatográfica abierta, se desarrolló la separación de los compuestos presentes en el extracto etanólico de la planta *Tagetes lucida*. Se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 90:10. Las fracciones obtenidas se fueron separando y ordenando por similitud cromatográfica.

7.5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para mantener un mejor control de los compuestos presentes en el extracto que se iban separando, se utilizaron placas de cromatografía en capa fina (CCF), silicagel 60 F₂₅₄, (Sigma-Aldrich, Merck), donde se colocaban las fracciones obtenidas y como referencia se tomó el extracto etanólico crudo de la planta. La fase móvil que se utilizó para la elucidación de las cromatoplasmas fue una mezcla de 65:35 hexano/acetato de etilo.

7.6. Determinación del mecanismo de acción del extracto etanólico derivado de *Tagetes lucida*

Se determinó el mecanismo funcional del extracto etanólico de la planta y poder indagar sobre las vías involucradas en la contracción y la relajación del músculo liso, con base en la metodología de la figura 8 con algunas modificaciones y haciendo uso de inhibidores.

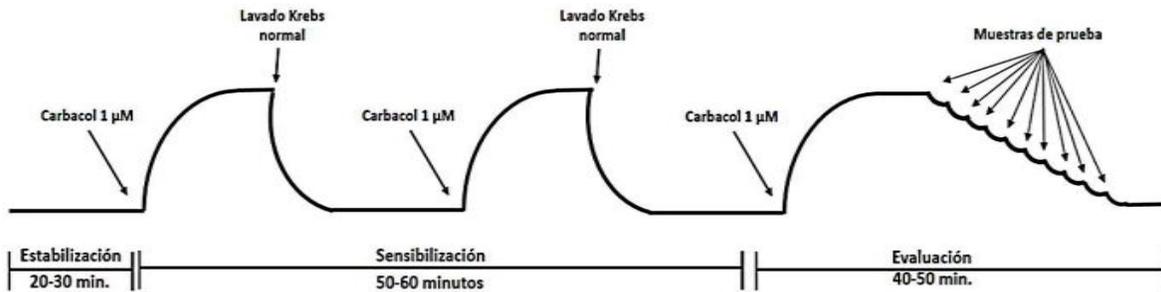


Figura 8. Proceso de estabilización-sensibilización del ensayo *ex vivo*.

7.6.1. Participación de receptores β_2 adrenérgicos

El receptor β_2 adrenérgico se acopla a proteínas G, asociado directamente al canal de calcio de tipo L. Este receptor tiene una proteína G, una cinasa dependiente de AMPc, adenilil ciclasa y fosfatasa compensadora. El ensamblaje del complejo de señalización brinda un mecanismo que asegura la señalización rápida y específica del receptor acoplado a proteína G.

El siguiente experimento se realizó para conocer si el extracto de la planta pudiera actuar a nivel de receptores β_2 adrenérgicos.

Posterior al proceso de estabilización-sensibilización, se realizó una preincubación con Isoproterenol (ya que este es un agonista adrenérgico β_1 y β_2) a una concentración de 10 µM, en un lapso de 15 min. Después del tiempo transcurrido se hizo una contracción del tejido con carbacol 1 µM, luego se agregaron de forma acumulativa las diluciones del extracto a partir de 100 µg/mL, para poder generar la curva concentración-respuesta (figura 9). Finalmente, se

realizó la comparación del efecto contráctil del extracto en ausencia y presencia del Isoproterenol.

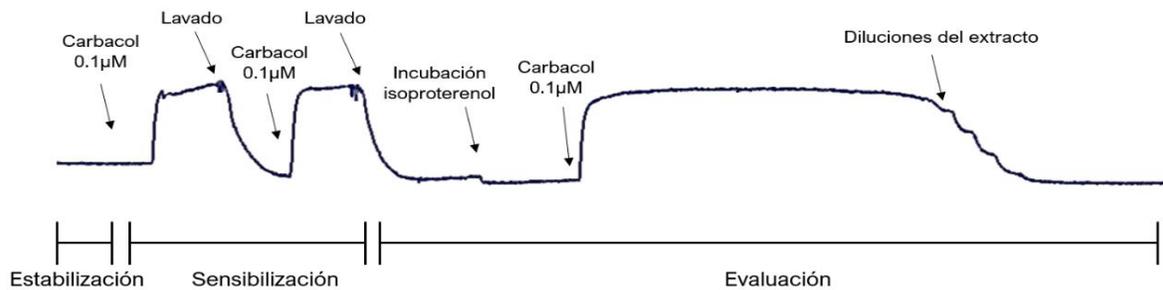


Figura 9. Procedimiento para el análisis de la participación de receptores $\beta 2$ adrenérgicos.

7.6.2. Participación de receptores Muscarínicos

Para establecer si el efecto relajante se debe al impedimento de la unión en los receptores muscarínicos del subtipo M3 de la acetilcolina que genera broncoconstricción, se realizó el siguiente experimento. Luego del proceso de estabilización-sensibilización, se añadió carbacol (agonista colinérgico) a las concentraciones de 0.16-54.7 μM de manera acumulativa en la cámara de incubación, para poder generar una curva concentración-respuesta control. Posteriormente, se incubó en un tiempo de 15 min la CE_{50} ($71.35 \pm 9.92 \mu\text{g/mL}$) del extracto. Después del tiempo establecido, se añadió carbacol de manera acumulativa a concentraciones de 0.16-54.7 μM , para así generar la curva concentración-respuesta (figura 10), estableciendo el efecto relajante en presencia y ausencia de la CE_{50} del extracto.

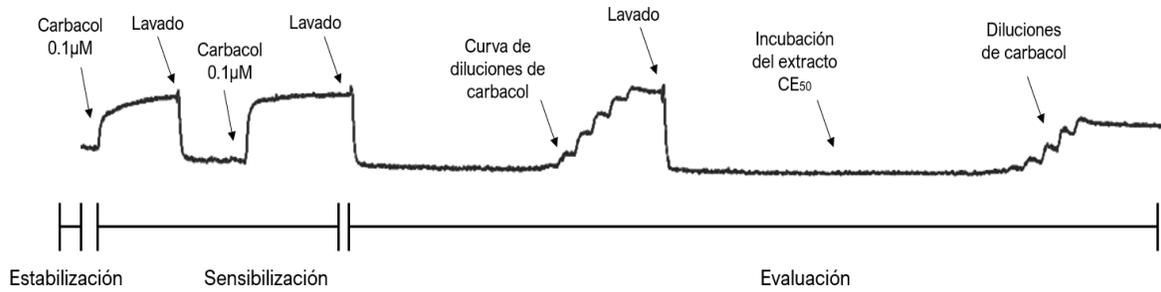


Figura 10. Procedimiento para el análisis de la participación de receptores muscarínicos.

7.6.3. Participación de canales de Calcio activados con KCl

Para conocer si el efecto tráqueo-relajante del extracto tiene influencia sobre la hiperpolarización de la membrana y movilización de Ca^{2+} ; se hizo una contracción de los anillos de tráquea con KCl 80 mM, esto después del periodo de estabilización-sensibilización. Pasando un tiempo de 15 minutos y alcanzando una contracción estable, se agregaron las diluciones de forma acumulativa del extracto (figura 11).

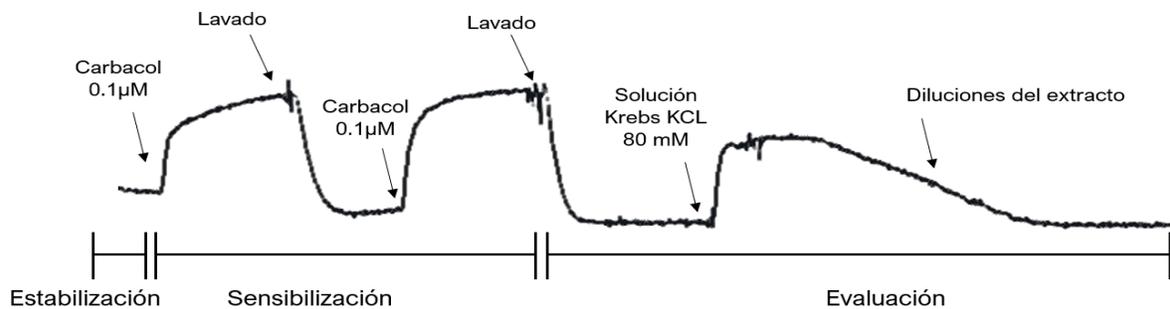


Figura 11. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de calcio activados por KCl.

7.6.4. Participación de canales de Calcio

Para saber si el extracto a evaluar está asociado al impedimento del influjo de Ca^{2+} hacia el interior de las células del músculo liso, los anillos de tráquea se lavaron con Krebs [80 mM] libre de Ca^{2+} , en un tiempo de 15 min. Después se agregó CaCl_2 (80 mM a 27 mM) de manera acumulativa a la cámara de incubación, todo esto con el propósito de obtener la curva control. Se realizó otro lavado con Krebs 80 mM libre de Ca^{2+} en un tiempo de 15 min. Posterior a este paso, se hizo una preincubación del extracto en un lapso de 15 min a la concentración efectiva media (CE_{50} $71.35 \pm 9.92 \mu\text{g/mL}$). Pasado este tiempo, se añadió CaCl_2 (80 mM a 27 mM) de manera acumulativa (figura 12). Como último paso, se hizo una comparación del efecto contráctil de CaCl_2 en ausencia y presencia de la CE_{50} del extracto.

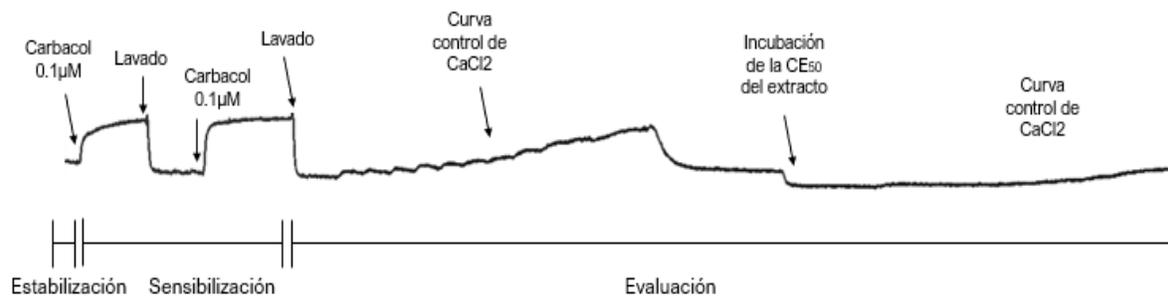


Figura 12. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de Calcio.

7.6.5. Participación de canales de Potasio

El papel de los canales de potasio es su participación en la regulación del gradiente electroquímico celular. En caso de que exista una apertura del canal, se generará un cambio de potencial de carácter hiperpolarizante, dando como resultado la relajación. De lo contrario, el cierre generará una despolarización que darán paso a la contracción. Para conocer si este mecanismo está relacionado con el efecto del extracto, se realizó la siguiente experimentación: después del proceso de estabilización-sensibilización, se realizaron incubaciones, utilizando dos inhibidores, los cuales son Glibenclamida y 2-Aminopiridina, en un tiempo de

15 min. Enseguida se hizo una contracción con carbacol 1 μM y se agregaron las diluciones de forma acumulativa (figura 13). Se hizo la comparación de la curva concentración-respuesta con presencia del bloqueador correspondiente, y ausencia de este.

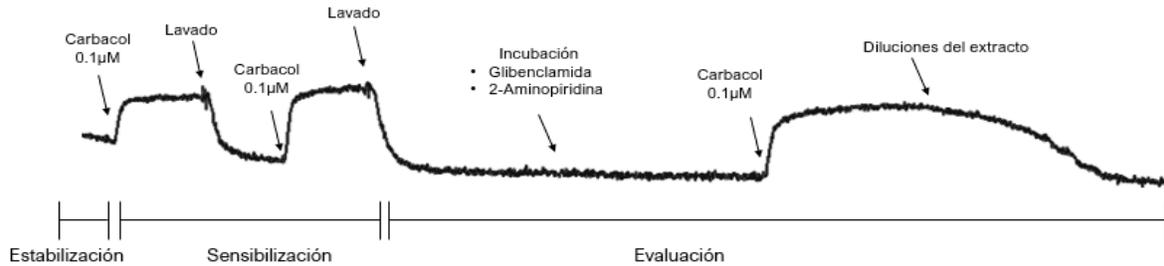


Figura 13. Procedimiento para el análisis de la participación de canales de Potasio.

7.6.6. Participación de Fosfodiesterasas

Para saber si el efecto que presenta el extracto está relacionado a la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas, se hizo el ensayo con teofilina, ya que es un inhibidor no selectivo y su acción relajante sobre el músculo liso está atribuida al incremento de los niveles celulares de AMPc, debido a la inhibición de la fosfodiesterasa, la cual degrada el AMPc. Para esto, después del proceso de estabilización-sensibilización, se incubó la CE₅₀ de teofilina a una concentración de 157.16 μM , en un tiempo de 15 min. Pasado el tiempo, el tejido se contrajo con carbacol 1 μM , una vez teniendo meseta, se integraron las diluciones de manera acumulativa del extracto (figura 14).

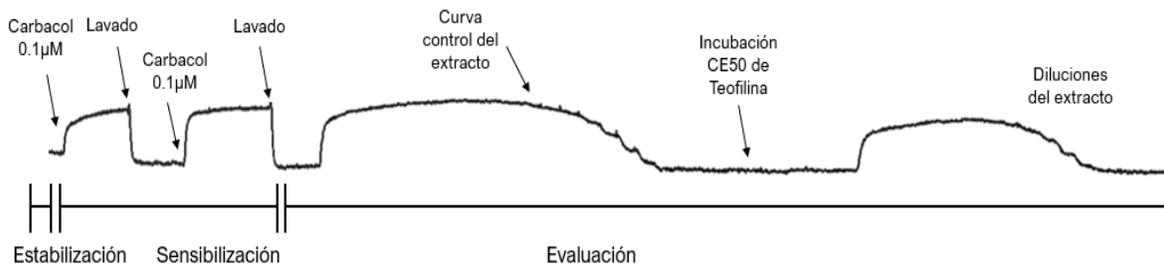


Figura 14. Procedimiento para el análisis de la participación de Fosfodiesterasas.

7.6.7. Participación de la vía NO/GMPc

Para conocer si mediante la activación de las guanilato ciclasa (Gc), que genera aumento en las concentraciones de Guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y el óxido nítrico (NO), que induce la relajación del músculo liso de la vía aérea, posterior a la etapa de estabilización-sensibilización, se hizo una preincubación del inhibidor correspondiente para cada enzima. Respecto al óxido nítrico sintasa, se realizó una preincubación con L-Nitro-Arginina-Metil-Ester (L-NAME) a una concentración de 2.66 μM .

Sobre la inhibición de la enzima guanilato ciclasa, se preincubó con 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), a una concentración 1 μM durante 15 min. Después se contrajo el tejido con carbacol 1 μM y se añadieron las diluciones de manera acumulativa del extracto (figura 15). Se comparó la curva concentración respuesta del extracto con la presencia y ausencia de los distintos inhibidores que se utilizaron durante el ensayo.

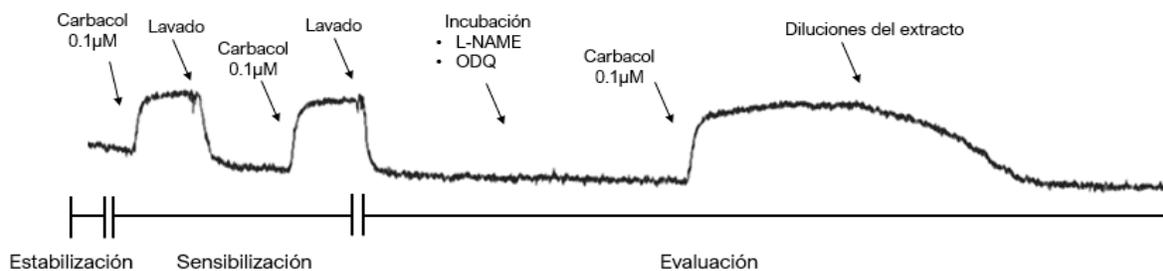


Figura 15. Procedimiento para el análisis de la participación de la vía ON/GMPc.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Obtención del extracto etanólico de *Tagetes lucida*

Después de una maceración exhaustiva por triplicado con etanol (96%) durante 72 h del material vegetal (73.8 g) de la planta *T. lucida*, se obtuvo un rendimiento del 15.98% correspondiente a 11.79 g (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento del extracto etanólico de la planta *T. lucida*.

Material vegetal (g)	Peso (g)	Rendimiento (%)
73.8 g	11.79 g	15.98%

8.2. Cromatografía en columna abierta (CC)

El extracto etanólico de la planta *Tagetes lucida* (EEtOHTI) se sometió a un fraccionamiento cromatográfico (elución isocrática) para poder conocer el perfil fitoquímico e identificar los potenciales metabolitos bioactivos presentes en el extracto, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 90:10 (figura 16).

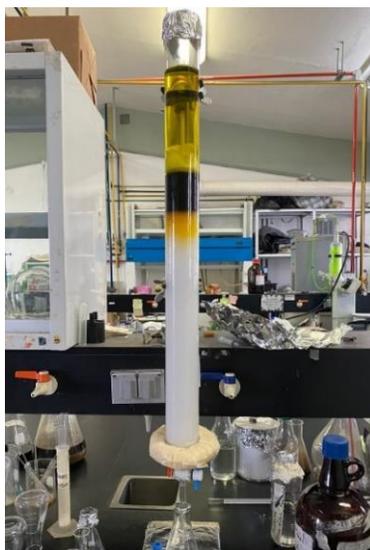


Figura 16. Columna cromatográfica del extracto etanólico de la planta *Tagetes lucida* (EEtOHTI).

A partir de la columna, se reunieron y al final se obtuvieron 7 grupos de fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica. De las fracciones primarias precipitaros de manera espontánea diversos sólidos amorfos o cristalinos que presentaban un grado de pureza importante. De éstos, se obtuvo el punto de fusión y cada uno de ellos se les asignó su respectiva clave de identificación (tabla 3). Con los datos de punto de fusión experimentales obtenidos, se hizo una comparación con algunos compuestos de tipo cumarina obtenidos y descritos previamente por la Dra. Amanda Sánchez-Recillas (figura 17) (Sánchez-Recillas et al. 2014).

Por ejemplo, el compuesto 7 (7-metoxicumarina) mostrado en la figura 17 tiene una alta similitud comparado con AH5, AH6 y AH7, lo que proporciona una alta probabilidad de que se trate del mismo compuesto de tipo cumarina. Otro claro ejemplo es AH8 y JM1, que mostraron un punto de fusión igual al de la 6,7,8-trimetoxicumarina descrita en la literatura (Estrada-Soto et al. 2021).

Tabla 3. Punto de fusión de las fracciones obtenidas.

<i>Clave de la fracción</i>	<i>Punto de fusión</i>
<i>AH4</i>	<i>77-78°C</i>
<i>AH5, AH6, AH7</i>	<i>117-118°C</i>
<i>AH8, JM1</i>	<i>103-104°C</i>
<i>JM2</i>	<i>138-140°C</i>

Compound number	R ₁	R ₂	R ₃	Molecular weight (g/mol)	Melting point (°C)	Reaction time (h)	Unoptimized yield (%)	M.W. EI MS: (m/z) [M] ⁺
7	-H	-H	-OMe	176	117.8-119.8	24	95	176

Figura 17. Punto de fusión de un compuesto de tipo cumarina

Los compuestos obtenidos y separados correspondientemente (figura 18) serán identificados mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS) y por resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13. A partir de algunas fracciones, se logró la obtención de cristales, los cuales están en proceso de identificación mediante rayos X. Posiblemente, estos compuestos podrían tratarse de cumarinas, debido a que son el marcador químico-taxonómico de esta especie y tomando en cuenta estudios previos de esta especie (Estrada-Soto et al. 2021).



Figura 18. Compuestos obtenidos a través de fraccionamiento cromatográfico.

8.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Con el objetivo de poder conocer y monitorear el perfil fitoquímico del extracto etanólico de la planta *Tagetes lucida*, se hizo uso de la cromatografía en capa fina en donde se lograron observar algunos compuestos en gran abundancia de forma cualitativa. Fueron probados tres sistemas distintos de elución, utilizando hexano/acetato de etilo para la fase móvil a proporciones de: 80:20, 70:30 y 65:35. Se observó que la proporción 65:35 logra separar de una mejor manera los compuestos del EEtOHTI.

Como se observa en la figura 19, se identificaron 7 compuestos que con base en su perfil cromatográfico muestran un grado importante de pureza como se puede establecer en la figura 19-B, sin embargo, también se observa que estos compuestos emiten una coloración diferente a dos longitudes de onda. Como se puede corroborar en la figura 19-A, se observan coloraciones en las emisiones de la luz UV, lo que sugiere que son compuestos diferentes entre ellos.

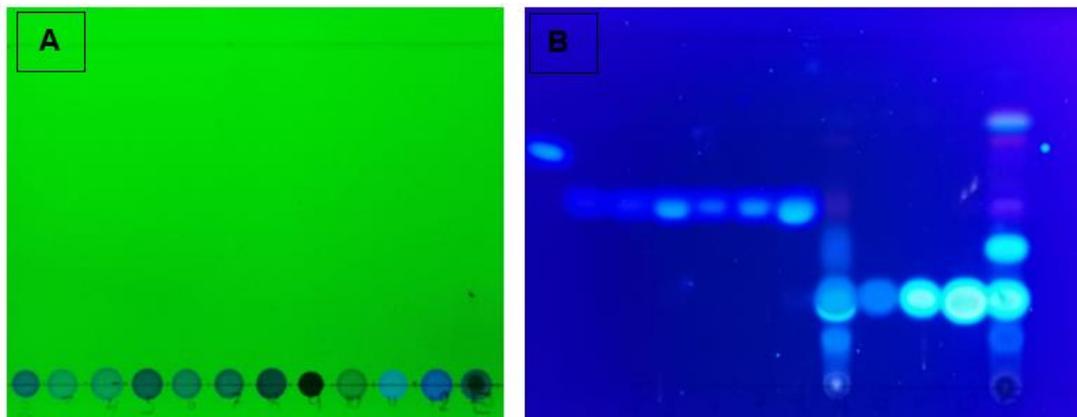


Figura 19. Identificación de similitud cromatográfica por cromatografía en capa fina (CCF) de los compuestos obtenidos, observados en U.V a longitud de onda corta (180-280 nm) (A) y larga (315-400 nm) (B).

Se realizaron pruebas con dos reveladores para comprobar la presencia de cumarinas. Por un lado, se utilizó la vainillina debido a que este es un gran revelador para nucleófilos débiles y fuertes, aldehídos y cetonas. La vainillina puede desencadenar dos tipos de reacción, por eso se conoce como un revelador general. En presencia de aldehídos o cetonas en medio ácido se genera una reacción aldólica. Al utilizar calor se deshidrata el compuesto aldólico que resultará un compuesto altamente conjugado, proporcionando una coloración azul en cetonas de cadena simple, rojo en cetonas unidas a un anillo aromático y los aldehídos pueden presentar una coloración morada. Si se presentan alcoholes, la vainillina reaccionará a través de una adición nucleofílica de alcoholes por la formación de acetales, lo que formará un catión estable debido a las condiciones

ácidas en la placa, presentando en este caso una coloración de rosa a morado (Hernández Morales, 2021).

Para realizar el revelado, se agregó la vainillina a la placa CCF, se dejó secar y se calentó en una parrilla para así poder observar pigmentaciones de color rosa, azul, morado, amarillo o rojo, que es un indicador positivo. En este caso se revelaron manchas con pigmento de tono azul y rosa, lo que demuestra la presencia de cetonas de cadena simple (Fig. 20).

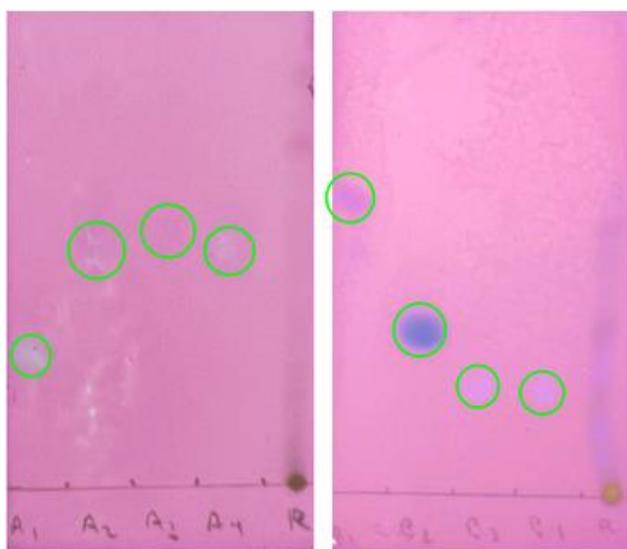


Figura 20. Placas cromatográficas del EEtOHTI reveladas con vainillina.

Al mismo tiempo, se utilizó Cloruro férrico, que en coloraciones rojo, azul, verde o marrón se valora como positivo para la detección de fenoles, aunque también para ácidos grasos o fenilpirazolinás. Hay casos de ciertos fenoles que no generan coloración, por lo que se necesita agregar una base para hidrolizar la molécula, un ejemplo es el ácido acetil salicílico (Hernández Morales, 2021).

Para el revelado, se agregó a la placa CCF la solución de cloruro férrico al 5% y después se calentó en una parrilla para observar las pigmentaciones de tono marrón presentadas en la figura 21. Lo que puede inducir que el EEtOHTI presenta compuestos de naturaleza fenólica.

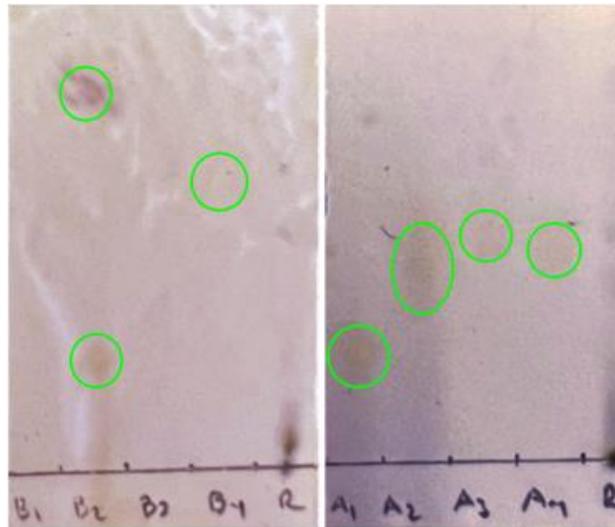
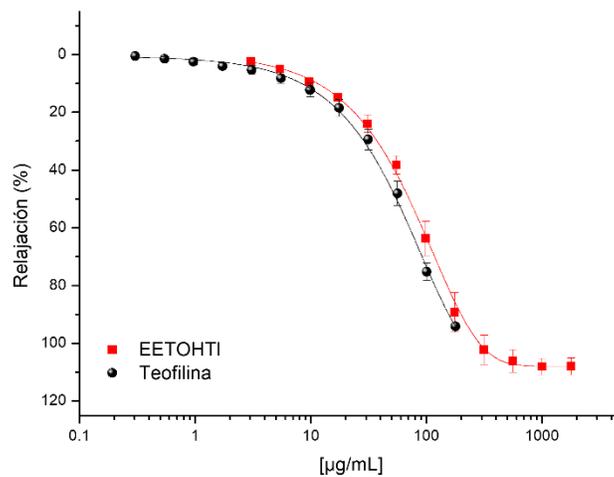


Figura 21. Placas cromatográficas del EETOHTI reveladas con cloruro férrico.

8.3. Efecto relajante del extracto etanólico de *Tagetes lucida*

En la gráfica 1 se muestra la curva concentración respuesta del extracto etanólico de *T. lucida* en comparación con la curva control con teofilina, demostrando que el extracto posee efecto traqueorrelajante, incluso muestra una mayor eficacia, con tendencia similar a la teofilina, además de que se puede observar que es dependiente de la concentración.



Gráfica 1. Efecto relajante del extracto etanólico de *Tagetes lucida*.

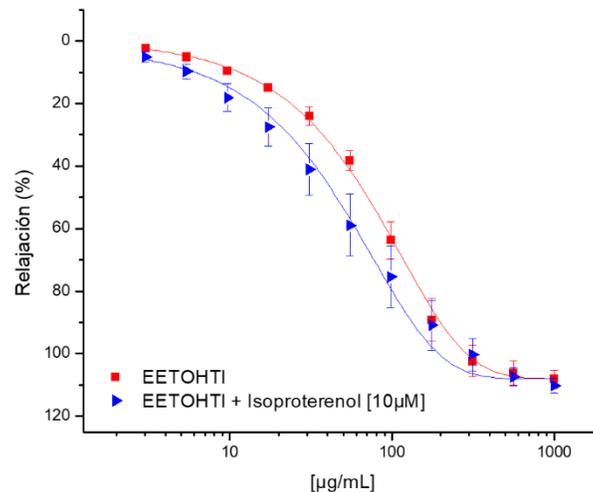
8.4. Determinación del mecanismo de acción funcional del extracto etanólico de *T. lucida*

8.4.1. Participación de receptores β_2 adrenérgicos en el mecanismo de acción relajante

Se sabe que la activación del receptor β_2 adrenérgico, en el músculo liso de las vías respiratorias, está mediada por niveles aumentados de AMPc intracelular, siendo el resultado de la estimulación de la adenilato ciclasa, que se encarga de catalizar la conversión de trifosfato de adenosina en AMPc. El acoplamiento del receptor β_2 al adenilato ciclasa, es afectado mediante una proteína Gs trimérica, la cual consta de una subunidad α , estimulando la adenilato ciclasa y subunidades $\beta\gamma$, transduciendo otras señales. Los niveles de AMPc se regulan mediante la actividad de las isoenzimas/isoformas de la fosfodiesterasa que degradan a 5'-AMP. Se cree que el mecanismo por el cual el AMPc induce la relajación de las células del músculo liso de las vías respiratorias cataliza la activación de proteína quinasa A, que fosforila proteínas reguladoras involucradas en el control del músculo. El AMPc también se involucra en la inhibición de iones de Ca^{2+} de reservas intracelulares, reducción de la entrada de Ca^{2+} en la membrana y el secuestro de Ca^{2+} intracelular que lleva a la relajación del músculo liso (Arcos, M.G.L 2014).

Para conocer si el EEtOHTI está relacionado a los receptores β_2 , se utilizó isoproterenol debido a que es un agonista de los receptores β_2 en los pulmones, relajando el músculo liso bronquial debido al aumento en la producción de AMPc por la activación de la enzima adenil-ciclasa.

Como se muestra en la gráfica 2, la curva del extracto con un Emax de $108.13 \pm 2.87\%$, comparada a la del extracto con isoproterenol preincubado, presenta un Emax de $110.20 \pm 2.42\%$. En ambos casos el efecto observado es el mismo, lo cual demuestra que el efecto relajante dado por el EEtOHTI no está relacionado a los receptores β_2 .



Gráfica 2. Efecto del isoproterenol [10 µM] en el proceso de relajación del extracto etanólico de *T. lucida* en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ Emax EEtOHTI $108.13 \pm 2.87\%$. Emax EEtOHTI + Isoproterenol $110.20 \pm 2.42\%$.

8.4.2. Participación de receptores Muscarínicos

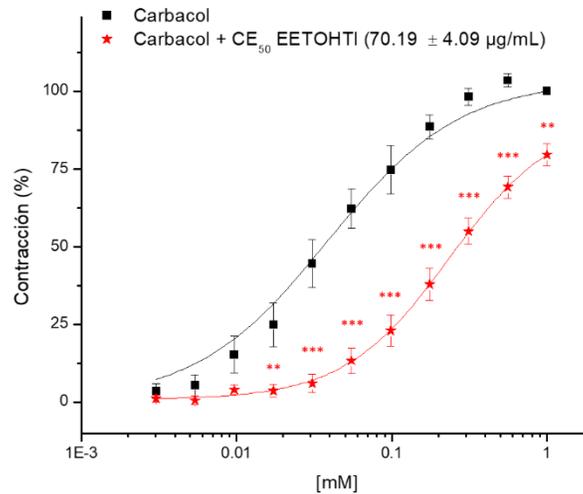
Los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) son receptores acoplados a proteína G de clase A (GPCR) y cuentan con 5 subtipos; M1-M5. Los M1, M3 y M5 se acoplan a la proteína Gq que activan la vía de señalización de la fosfolipasa C/inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) /Ca²⁺, mientras que los subtipos M2 y M4 se acoplan a la proteína Gi/o, y llevan a la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa (Tanaka H et al. 2020).

Los receptores muscarínicos se expresan en las células estructurales de las vías respiratorias predominan en el epitelio y los fibroblastos. Existe evidencia que ha demostrado que los receptores M2 y M3 desempeñan funciones de gran importancia en la fisiología de las vías respiratorias y en enfermedades como el asma, mientras que los receptores M3 son el subtipo que domina en la contracción del músculo liso bronquial de las vías respiratorias, además de las glándulas submucosas.

El receptor M3 también puede mediar la contracción del ASM mediante mecanismos dependientes e independientes de calcio, se conoce como sensibilización al calcio, a través de la activación de la GTPasa RhoA (que pertenece a una familia de pequeñas proteínas G de señalización), y que al mismo tiempo activa la RhoA-quinasa, las cuales van a aumentar la contracción inducida por agonistas al inactivar la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP), que es inhibido por la fosforilación directa de su subunidad reguladora de unión a miosina por RhoA-quinasa y por la unión a CPI-17, siendo el objetivo de la fosforilación tanto por Rho-quinasa y la proteína quinasa C, resultando niveles más altos de miosina fosforilada y contracción del ML (Wendell SG et al. 2020).

Entre las sustancias más usadas para el estudio de la actividad contráctil de las vías aéreas se encuentra el carbacol, por su estructura similar a la acetilcolina, pero es resistente a la hidrólisis por colinesterasa que actúa sobre receptores colinérgicos, siendo así más estable (J.L. Islas. 2013).

Los resultados obtenidos en la gráfica 3, muestran la curva control con carbacol ($E_{max} 100 \pm 0\%$) que actúa como agonista de la acetilcolina, comparada con la curva con carbacol en presencia de la CE_{50} del extracto ($E_{max} 0.19 \mu M \pm 5.08\%$), la cual presentó un E_{max} de $70.19 \pm 4.09\%$, oponiéndose parcialmente al efecto contráctil, inducido por carbacol, debido a que el extracto puede tener moléculas que estén relacionadas al efecto relajante mediado por alguna otra vía de señalización. Obtenidos estos resultados, podemos descartar que el EEtOHTI actúe de manera directa sobre los receptores M3 del músculo liso de las vías aéreas.



Gráfica 3. Efecto de la CE₅₀ del extracto etanólico de *T. lucida*, sobre la contracción inducida con carbacol en modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata vs curva control de carbacol. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$
Emax Carbacol $100 \pm 0\%$. Emax.Carbacol + CE₅₀ EEtOHTI $70.19 \pm 4.09\%$.

8.4.3. Participación de canales de Calcio activados con KCl

La regulación del influjo de calcio mediante los canales de calcio voltaje-dependientes es un medio de gran importancia para tener un control sobre el estado contráctil del músculo liso.

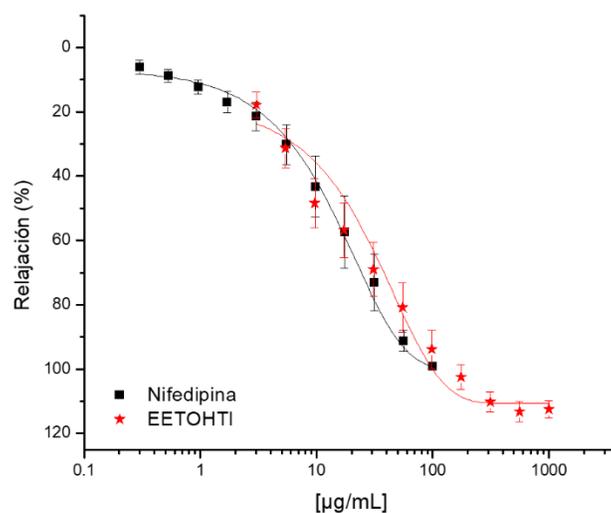
Dichos canales son muy susceptibles a ser bloqueados por las dihidropiridinas, como la nifedipina que fue utilizada en este ensayo inhibiendo la entrada de iones de calcio al bloquear los canales de tipo L dependientes de voltaje en el músculo liso (Khan KM et al. 2022).

El estado contráctil va a depender de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Los canales de Ca^{2+} se abren gracias a la despolarización del potencial de membrana induciendo contracción muscular, mientras que la hiperpolarización los cierra, ocasionando la relajación. El potencial de reposo del músculo liso está sujeto a la actividad de los canales de K^+ que están abiertos al potencial habitual de reposo del músculo, induciéndose un eflujo continuo de K^+ de la célula que establecerá el potencial de membrana en un valor que ronda entre los -40 y -50 mV. Si estos

canales son bloqueados, la célula se despolariza, abriendo los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, ingresando el Ca^{2+} a la célula. Por otra parte, si se abren más canales de K^+ se producirá una hiperpolarización, cerrando los canales de Ca^{2+} y generando relajación (Aiello EA. 2013).

Para identificar si el efecto del extracto está relacionado al bloqueo de estos canales, se contrajo el músculo con una solución de Krebs con KCl 80 mM, generando una despolarización de la membrana y abriendo los canales de Ca^{2+} , promoviendo su ingreso de estos iones al citosol y, por tanto, generando el efecto contráctil través del mecanismo mencionado anteriormente.

Los resultados obtenidos en la gráfica 4 muestran el efecto relajante del extracto, el cual presentó un E_{max} de $108.13 \pm 2.68\%$ comparado con la curva control con nifedipina, la cual mostró un E_{max} de 99.20 ± 0.92 , dicho lo anterior, el extracto podría influir en la hiperpolarización de la membrana, o bien actuar a nivel de canales de calcio, que estén impidiendo el influjo de iones calcio al medio intracelular, y por consecuente generando el efecto relajante.



*Gráfica 4. Efecto tráqueo-relajante del extracto etanólico de *T. lucida*, inducido por KCl 80 Mm vs curva control de Nifedipina. E_{max} EETOHTI. $108.13 \pm 2.68\%$. E_{max} Nifedipina $99.20 \pm 0.92\%$*

8.4.4. Participación de canales de Calcio

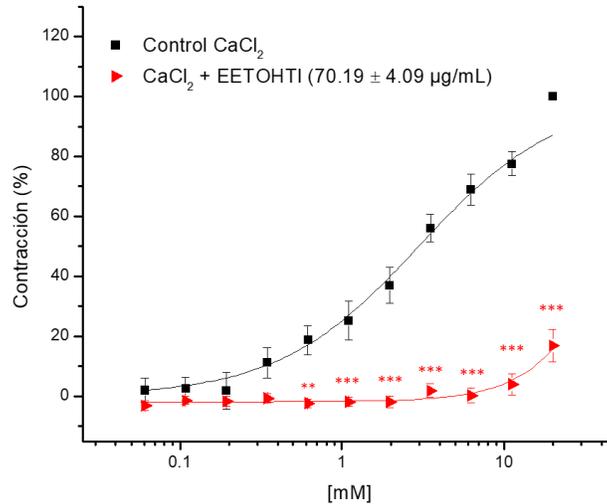
El ion Ca^{2+} es un regulador clave para que se genere la contracción muscular. En el músculo liso, el proceso comienza con un impulso nervioso que activa los canales de calcio dependientes de voltaje, a través de diferentes mediadores. El flujo de los iones de Ca^{2+} hacia el citoplasma aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico lo que influye en la interacción de las proteínas contráctiles como actina, miosina, troponina y tropomiosina, generando las vías de señalización que promueve la contracción.

En el músculo liso la contracción se da por la presencia de estímulos contráctiles que ayudan al aumento en la concentración de calcio intracelular. El Ca^{2+} citosólico se une a la proteína calmodulina que forma un complejo calcio-calmodulina, la cual fosforila la cadena ligera de miosina, facilitando la interacción con la actina y la contracción muscular. La relajación se da cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular disminuyen y reduce la actividad de la quinasa de la cadena ligera de la miosina y predomina la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, que desfosforila e inactiva la cadena ligera de la miosina (Lozano Jiménez, Y. Y., & Sánchez Mora, R. M. 2020).

Para saber si el efecto del extracto actúa mediante el bloqueo del influjo de Ca^{2+} , se realizó la metodología observada en la figura 9, para determinar la capacidad contráctil de CaCl_2 en ausencia y presencia de la CE_{50} del extracto.

A partir, de los resultados mostrados en la gráfica 5, se puede concluir que en presencia del extracto con un $\text{E}_{\text{max}} 16.83 \pm 5.29\%$, a diferencia de la curva control de Ca^{2+} no se genera una contracción del 100%. Como se puede observar, es una contracción parcial en comparación de la curva control que alcanza un E_{max} del $100 \pm 0\%$. Esto comprueba que la mezcla de compuestos del extracto etanólico de la planta *T. lucida* genera una actividad tráqueo-relajante al bloquear los canales de Ca^{2+} impidiendo la entrada de este, dando como resultado un efecto relajante. De igual manera, a altas concentraciones, se empieza a generar

una ligera contracción, lo cual nos indica que estos compuestos no se unen de manera covalente, y son dependientes de la concentración.

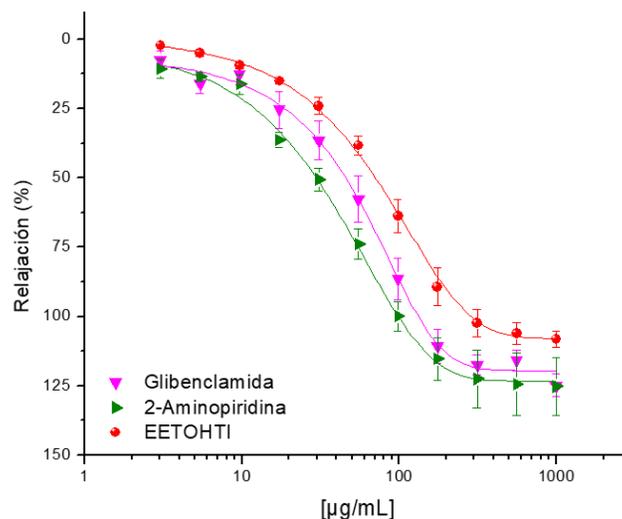


Gráfica 5. Efecto de contracción inducido por diluciones seriadas de CaCl₂, en ausencia y presencia del extracto etanólico de *T. lucida*, en modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ Emax control CaCl₂ 100 ± 0%. Emax EEtOHTI 16.83 ± 5.29%.

8.4.5. Participación de canales de Potasio

Los canales de potasio son de gran importancia en la regulación de la contracción y el crecimiento del músculo liso. Estos canales son la conductancia iónica dominante de la membrana celular del músculo liso, que de manera importante determina y regula el potencial de la membrana y a su vez regula el estado de abertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y a su vez la entrada de iones Ca²⁺, el Ca²⁺ intracelular y también la contracción del músculo liso. Además, el potencial de membrana afecta la liberación del Ca²⁺ de los depósitos internos y también la sensibilidad al Ca²⁺ de la maquinaria contráctil, de manera que los canales de K⁺ participan en todos los aspectos al regular la contracción del músculo liso (Jackson WF. 2017).

Para comprobar si el extracto actúa por esta vía, se utilizaron 2 inhibidores, la 2-Aminopiridina que bloquea los canales de potasio de manera no específica, lo cual evitará que haya fuga de corriente iónica. Esto prolongará la repolarización e intensificando la formación del potencial de acción. Como se observa en la gráfica 6, la relajación se efectúa con la presencia del extracto (E_{max} 108.13 ± 2.87) (CE_{50} 71.35 ± 9.92), en presencia del 2-Aminopiridina (E_{max} 125.22 ± 10.46) (CE_{50} 30.13 ± 4.14) y la Glibenclamida (E_{max} 124.89 ± 4.04) (CE_{50} 46.83 ± 7.16), siendo que no exista diferencia significativa entre ellos, proponiendo que el efecto relajante se da por otra vía de señalización.



Gráfica 6. Efecto de los inhibidores Glibenclamida y 2-Aminopiridina ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$ E_{max} . $108.13 \pm 2.87\%$.

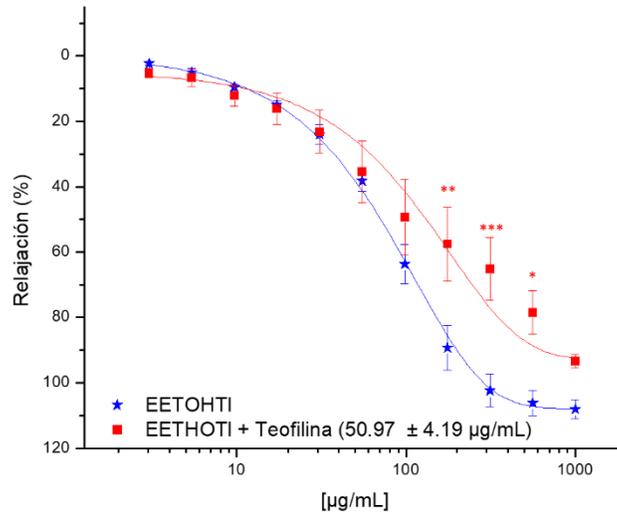
8.4.6. Participación de Fosfodiesterasas

Existe una amplia variedad de terapias potenciales para las afecciones pulmonares crónicas, como son los inhibidores de la fosfodiesterasa específica de AMPc tipo 4 (PDE4), un ejemplo es la teofilina, que es un inhibidor de la PDE no específico y por esta razón fue utilizada en este ensayo como control positivo (Billah et al. 2002).

Las fosfodiesterasas (PDEs) están compuestas de una gran superfamilia de proteínas que son responsables de la hidrólisis de AMPc y GMPc a sus correspondientes nucleósidos inactivos, 5'-monofosfatos AMP y GMP, como consecuencia, la inhibición de las fosfodiesterasas resulta en una broncodilatación, en el caso de las vías aéreas. En el músculo liso de las vías aéreas (MLA) por lo menos se encuentran 5 subtipos: I, II, III, IV, y V, resaltando las PDE3, PDE4 y PDE5 debido a que su inhibición, promueve la broncodilatación del músculo liso de la vía aérea. Por un lado, las PDE3 y PDE4 degradan al AMPc, mientras que la PDE5 degrada al GMPc (Santing et al. 2001).

La teofilina es una metilxantina que genera relajación directa del músculo liso bronquial. Su acción relajante sobre el músculo liso está atribuida al incremento de los niveles celulares de AMPc, debido a su capacidad para inhibir a la fosfodiesterasa que se encarga de degradar el AMPc (Rodríguez Carranza 2015).

En la gráfica 7 se presenta la comparación del efecto relajante en tráquea del extracto, el cual presentó un Emax de $108.1314 \pm 2.8706\%$ vs el efecto relajante generado por la teofilina (Emax $93.37 \pm 2.01\%$), como se puede observar, el extracto genera una relajación del 100%, siendo más eficaz que la teofilina y en cuanto a los valores de la CE₅₀ (CE₅₀ teofilina 121.46 ± 11.39) vs el extracto (CE₅₀ 71.35 ± 9.92) se requiere de menos concentración del extracto en comparación de la teofilina para poder generar su efecto máximo, siendo así más potente el extracto. Dado los resultados obtenidos, también se descarta una relación a las fosfodiesterasas, ya que el extracto está ocasionando un efecto relajante aun cuando la fosfodiesterasa está inhibida por la teofilina, por lo tanto, el extracto está actuando por otra vía con mayor eficacia.



Gráfica 7. Efecto de relajación de la CE₅₀ de teofilina [157.16 µM] en presencia del extracto etanólico de *T. lucida* en modelo *ex vivo* de tráquea aislado de rata. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni *p< 0.05, **p<0.01 ***p< 0.001 ****p<0.0001 Emax EETOHTI 108.13 ± 2.87.%. Emax EEtOHTI + Teofilina 93.37 ± 2.01%.

8.4.7. Participación de la vía NO/GMPc

Las guanilato ciclasas constituyen una subfamilia de receptores dentro de la superfamilia de las nucleótido ciclasas, que tienen una gran distribución en el organismo y están divididas en los subtipos: Guanilato Ciclasas Particuladas (GCp) asociadas a membrana plasmática y Guanilato Ciclasas Solubles (GCs) que están inmersas en el citoplasma, siendo el único receptor conocido del Óxido nítrico (NO) (Rivero-Vilches, S et al. 2001).

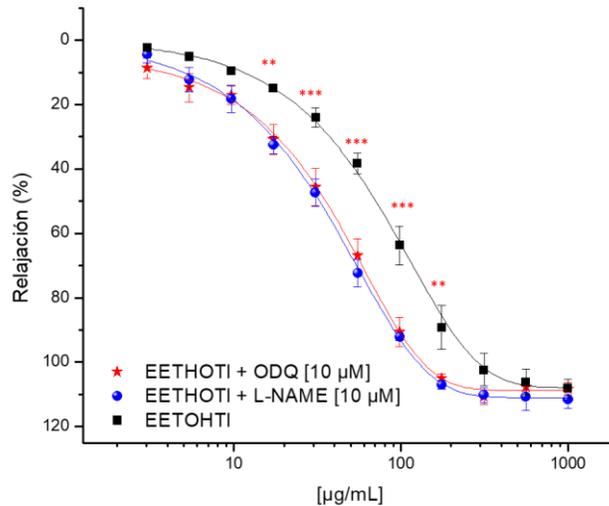
El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por una familia de enzimas oxidativas llamadas sintasas del óxido nítrico (NOS) para formar citrulina y NO (Durazo-Quiroz F. I. 2007).

Al activarse las formas de la enzima Gs (soluble y particulada) catalizan la conversión de GTP a GMPc, con la subsecuente activación de la proteína cinasa G, que fosforila sustratos, produciendo la relajación.

La Gs soluble es una enzima heterodimérica que contiene una subunidad larga (α) y una pequeña (β). Es activada por el NO endógeno y por los nitrovasodilatadores. El NO va a generar su efecto relajante por un incremento de GMPc y también, ha sido sugerido que en músculo liso de las vías aéreas activa directamente canales BKCa++ (alta conductancia a potasio), oxida proteínas contráctiles intracelulares y además disminuye la sensibilidad al calcio intracelular (Hamad et al. 2003).

L-NAME fue utilizado debido a que es un análogo de la L-arginina y se conoce como un inhibidor específico de la síntesis de NO y ODQ (inhibidor de guanilato ciclasa soluble) para establecer la participación de la actividad guanililciclasa estimulada por el NO (Mathison, Y, & Israel, A. 2002).

Los resultados de la gráfica 8 muestran un efecto relajante, el cual claramente se observa que no es a través del mecanismo de la vía NO/GMPc con L-NAME (Emax $111.58 \pm 2.81\%$) y ODQ (Emax 108.36 ± 1.92), inhibidores de sus respectivas enzimas, esto en presencia del EEtOHTI, comparado con el extracto sin la presencia de ningún inhibidor, ya que no se observa un cambio en la eficacia, ni en la potencia, demostrando que, aunque las enzimas sean inhibidas, se sigue generando un efecto relajante por otra vía de señalización.



Gráfica 8. Efecto relajante del extracto etanólico de *T. lucida* vs efecto relajante del extracto etanólico de *T. lucida* en presencia de inhibidores para cada enzima; ODQ [2.66 μM] y L-NAME [1 μM]. ANOVA de dos vías seguidas de una prueba pos hoc Bonferroni *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001 ****p < 0.0001 Emax ODQ. 108.36 ± 1.92 Emax L-NAME $111.58 \pm 2.81\%$.

9. CONCLUSIONES

A partir del extracto etanólico de la planta medicinal *Tagetes lucida*, se estableció que el efecto tráqueo-relajante fue significativo y dependiente de la concentración, además de que el efecto generado está relacionado a un bloqueo de canales de calcio, impidiendo el paso de los iones y consecuentemente, el proceso contráctil.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto ayudó a determinar que los posibles compuestos responsables de la actividad tráqueo-relajante, puedan ser de tipo cumarina.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar una comparación del efecto de la planta tomada de distintas zonas del territorio mexicano.
- Establecer si las condiciones de cultivo y ambientales afectan a la producción de los compuestos bioactivos de la planta.
- Determinar las estructuras químicas de las cumarinas aisladas y purificadas por técnicas espectroscópicas, espectrométricas y difracción de rayos X (cuando sea el caso).
- Cuantificar la presencia de cumarinas en el extracto de flor, tallo y de la planta íntegra de *Tagetes lucida* mediante HPLC.
- Determinar el efecto antiasmático del extracto etanólico de *Tagetes lucida* en modelos *in vivo* de hiperreactividad bronquial.
- Obtener mediante biotecnología, mayor producción de los compuestos encargados del efecto tráqueo-relajante.
- Determinar la toxicidad subcrónica y subaguda del extracto en un modelo *in vivo*.

11. REFERENCIAS

- Aiello EA. (2013). *Canales de potasio (K⁺) y calcio (Ca²⁺) en músculo 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- 88.
- Arcos, M. G. L. (2014). *Fosfodiesterasas del AMPc y del GMPc en el cerebro: Expresión en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos*. DIGITAL.CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/91733>
- Asenjo, C. A., & Pinto, R. A. (2017). *CARACTERÍSTICAS ANATOMO-FUNCIONAL DEL APARATO RESPIRATORIO DURANTE LA INFANCIA*. Revista Médica Clínica Las Condes, 28(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2017.01.002>
- Asensi Monzó MT, Duelo Marcos M, García Merino Á. *Manejo integral del asma en Atención Primaria*. En: AEPap (ed.). Curso de Actualización Pediatría 2018. Madrid: Lúa Ediciones 3.0; 2018. Madrid: Lúa Ediciones 3.0; 2018. p. 489-506.
- B., & Barrett, K. E. (2010). *Fisiología médica*. McGraw-Hill Education.
- Bicchi C, Fresia M, Rubiolo P, Monti D, Franz C, Goehler I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *Lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 12: 47–52.
- Brusco, H. A., Costa, J. J. L., & Loidl, C. F. (2014). *Histología médico-práctica*. Elsevier.
- Billah, M., Cooper, N., Minnicozzi, M., Warneck, J., Wang, P. y Hey, J., (2002) Pharmacology of N-(3,5-Dichloro-1-oxido-4-pyridinyl)-8-methoxy-2(trifluoromethyl)-5-quinoline carboxamide (SCH 351591), a Novel, Orally Active Phosphodiesterase 4 inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302: 127-137.
- Caballero-Gallardo, K., Quintero-Rincón, P., Stashenko, E. E. & Olivero-Verbel, J. (2022). Photoprotective Agents Obtained from Aromatic Plants Grown in Colombia: Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Assessment of Cytotoxic Potential in Cancer Cell Lines of *Cymbopogon flexuosus* L. and *Tagetes lucida* Cav. *Essential Oils. Plants*, 11(13), 1693. <https://doi.org/10.3390/plants11131693>
- David J. Stone y Thomas J. Gal. *Airway Anatomy*. En Miller RD (ed), 5th ed., New York: Churchill-Livingstone, 2000, pp. 1414-1451.

- Durazo-Quiroz F. I. *El óxido nítrico en medicina*. Gac Med Mex. 2007;143(5):401-405.
- Estrada-Soto, S., González-Trujano, M. E., Rendón-Vallejo, P., Arias-Durán, L., Ávila-Villarreal, G., & Villalobos-Molina, R. (2021). Antihypertensive and vasorelaxant mode of action of the ethanol-soluble extract from *Tagetes lucida* Cav. aerial parts and its main bioactive metabolites. *Journal of ethnopharmacology*, 266, 113399. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113399>
- G. Guadarrama-Cruz, F.J. Alarcon-Aguilar, R. Lezama-Velasco, G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 120, Issue 2, 2008, Pages 277-281, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.013>.
- Gavid, M., Dumollard, J. M., Vergnon, J. M., & Prades, J. M. (2021). *Tráquea: anatomía, fisiología, endoscopia y pruebas de imagen*. EMC - Otorrinolaringología, 50(4), 1–19. [https://doi.org/10.1016/s1632-3475\(21\)45691-2](https://doi.org/10.1016/s1632-3475(21)45691-2)
- García Merino, Á., & Mora Gandarillas, I. (2013). *Diagnóstico del asma*. *Pediatría Atención Primaria*, 15, 89–95. <https://doi.org/10.4321/s1139-76322013000300010>
- Gutiérrez Gaitén, Y., Scull Lizama, R., García Simón, G., & Montes Álvarez, A. (2018). *Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de Tagetes lucida Cavanilles*. *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 23(2). Recuperado de <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/669/308>
- Hall, J. E. (2010). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: With Student Consult Online Access*; Textbook of Medical Physiology (12 Har/Psc ed.). W B Saunders Co.
- Hamad, A., Clayton, A., Islam, B. y Knox, A. (2003) Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides and airway smooth muscle function. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*
- Hernández Morales, M. *Obtención de los compuestos bioactivos con potencial antiasmático a partir de Achillea Millefolium*, de Tesis de Maestría, México, Cuernavaca Morelos., Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2021.
- Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol.* 2017; 78:89-144. doi:

10.1016/bs.apha.2016.07.001. Epub 2016 Aug 17. PMID: 28212804; PMCID: PMC5518321.

- J.L. Islas. *Influencia de la regulación de las hormonas sexuales en la contracción y relajación de la tráquea en un modelo de asma alérgica*. De Tesis de Licenciatura, México D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- Khan KM, Patel JB, Schaefer TJ. Nifedipina. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537052/>
- K. K. Jiménez Martínez. *Estudio Químico y Actividad Antimicrobiana de la infusión de Tagetes lucida Cav.*, de Tesis de Licenciatura, México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, 2013
- Larenas-Linneman D, Salas-Hernández J, Del Río-Navarro BE, Luna-Pech JA, Navarrete- Rodríguez EM, Gochicoa L, et al. MIA 2021, *Manejo Integral del Asma. Lineamientos para México*. Rev Alerg Mex. 2021;68 Supl 1: s1-s122
- Llobell, F., Madrid, V., Santos, P., & Charco, P. (2017, 17 febrero). *ANATOMÍA DE LA VÍA AÉREA*. <https://portal.grupoaran.com/>. Recuperado 25 de enero de 2022, de http://www.grupoaran.com/sedar2005/cursos_talleres/taller22/Tema%20.%20Anatomia%20de%20la%20VA..pdf
- López López, E., Peña Ortega, M. G., Colinas León, M. T. B., Díaz Cedillo, F. & Serrato Cruz, M. A. (2018, 11 abril). *Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de Tagetes lucida de Hidalgo, México*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(2), 329-341. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1075>
- 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>
- Mathison, Y, & Israel, A. (2002). *El Sistema Óxido Nítrico/Gmpc como mecanismo de señalización de las Endotelinas en el Sistema Nervioso*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 21(1), 74-82. Recuperado en 02 de septiembre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000100012&lng=es&tlng=es.
- McDonough K.H. (2013). *Estructura y función del músculo liso*. Raff H, & Levitzky M (Eds.), Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas. McGrawHill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1501§ionid=101805819>

- Medina, A. A., Armentia, S. M., & Cortés, S. F. (2021). *Protocolo de tratamiento del asma*. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 13(28), 1588–1592. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.03.015>
- Meléndez Núñez, María Eugenia, & Barrios, Carolina, & Machado, Livia, & Meléndez Sánchez, Crhisol (2010). *TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO DEL ASMA BRONQUIAL*. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, 73(3), 20-25. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367936952005>
- Melo, A. (2011). *Introducción al aparato respiratorio*. ResearchGate.
- Mendoza Amatller, Alfredo, & Gorena Antezana, Samara. (2007). *Antileucotrienos y asma*. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 46(2), 113-117. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752007000200006&lng=es&tlng=es.
- Moral, L., Asensio, O., & Lozano, J. (2020). *Asma: aspectos clínicos y diagnósticos*. Protocolos de Alergología e Inmunología Clínica, 2. https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/07_asma_clinica_diagnostico.pdf
- Navarro, P. C., de Castro, F. R., Gilart, J. F., de Castro, F. R., & Serdá, G. J. (2005). *Manual de enfermedades respiratorias*. UTB.
- Netter, F. H., & García, V. G. (2014). *Atlas de anatomía humana*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
- Pereyra-Elías, Reneé, & Fuentes Delgado, Duilio. (2012). *Medicina Tradicional versus Medicina Científica ¿En verdad somos tan diferentes en lo esencial?* Acta Médica Peruana, 29(2), 62-63.
- Prieto-González, Sylvia, & Garrido-Garrido, Gabino, & González-Lavaut, José Antonio, & Molina-Torres, Jorge (2004). *Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 35(1),19-36. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226086004>
- 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.

- 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
- Rodríguez Carranza R(Ed.), (2015). *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGrawHill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90365887>
- Rodríguez Rodríguez, M., Antolín Amérigo, D., Barbarroja Escudero, J., & Sánchez González, M. (2017). *Actualización en asma*. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 12(30), 1745–1756. <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.03.010>
- Saladin, K. S. (2017). *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function* (8 Student ed.). *Mcgraw-Hill College*.
- Sameer, K. M., & William, W. B. (2006). *Asma: diagnóstico y tratamiento*. *Med Clin N Am*, 90, 39-60.
- Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Rios, M. Y., Ibarra-Barajas, M., & Estrada-Soto, S. (2014). Semisynthesis, ex vivo evaluation, and SAR studies of coumarin derivatives as potential antiasthmatic drugs. *European journal of medicinal chemistry*, 77, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.029>
- Sánchez, T., & Concha, I. (2018). *ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL SISTEMA RESPIRATORIO*. *Neumología pediátrica*, 13(3). <https://www.neumologia-pediatrica.cl/index.php/NP/article/view/212/203>.
- Santing, R., Boer, J., Rohof, A. y Zaagsma, J. (2001) Bronchodilatory and antiinflammatory properties of inhaled selective phosphodiesterase inhibitors in a guinea pig model of allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 335- 344.
- Serrato C. M. A. (2014) *El Recurso Genético Cempoalxóchitl (Tagetes spp.) de México (Diagnóstico)*. Universidad Autónoma Chapingo-SINAREFI-SNICS-SAGARPA. Chapingo, Edo. de México
- Serrato-Cruz, M. & Cervantes-Martínez, T. (2012, diciembre). *MORFOLOGÍA DE ESTRUCTURAS FLORALES RELACIONADAS CON LA DISPERSIÓN ANTITELÉCORA DE FRUTOS EN Tagetes moorei* H. Rob. var. breviligulata Villarreal. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XVIII (3), 261-269. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.11.122>

- Sologuren, N. (2009). *ANATOMÍA DE LA VÍA AÉREA*. Revista Chilena De Anestesia, 38(2), 78–83. <https://revistachilenadeanestesia.cl/anatomia-de-la-via-aerea/>
- Tanaka H, Negoro K, Koike T, Tsukamoto I, Yokoyama K, Maeda J, Inagaki Y, Shimoshige Y, Ino K, Ishizu K, Takahashi T. Discovery and structure-activity relationships study of positive allosteric modulators of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Bioorg Med Chem*. 2020 Jul 1;28(13):115531. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115531. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32386953.
- *Tejido excitable: músculo*. Barrett K.E., & Barman S.M., & Boitano S, & Brooks H.L.(Eds.), (2016). Ganong. Fisiología médica, 25e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1800§ionid=125143581>
- *Teofilina: antiasmáticos • broncodilatadores*. Rodríguez Carranza R(Ed.), (2015). Vademécum Académico de Medicamentos. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90375539>
- Villa Asensi, J. R. (2004). *La inflamación y el músculo: antigua y nueva relación*. Anales de Pediatría, 02, 30–36. <https://www.analesdepediatria.org/es-la-inflamacion-el-musculo-antigua-articulo-13060320>
- Webb, R. C. (2003). SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. *Advances in Physiology Education*, 27(4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Wendell SG, Fan H, Zhang C. G Protein-Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. *Pharmacol Rev*. 2020 Jan;72(1):1-49. doi: 10.1124/pr.118.016899. PMID: 31767622; PMCID: PMC6878000.
- Zappia, C. D., Soto, A., Granja-Galeano, G., Fenoy, I., Fernandez, N., Davio, C. A., Shayo, C., Fitzsimons, C. P., Goldman, A. & Monczor, F. (2019). Azelastine potentiates antiasthmatic dexamethasone effect on a murine asthma model. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6). <https://doi.org/10.1002/prp2.531>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Licenciatura en Farmacia

Fecha: 14 de marzo del 2023

Asunto: VOTOS APROBATORIOS

Medio de notificación: Electrónico

Folio: FF/D/SD/JLF/49/2023

DR. 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 **“Estudio fitoquímico biodirigido y evaluación del mecanismo de acción relajante en tráquea aislada de rata del extracto etanólico derivado de *Tagetes lucida* (pericón)”** presentado por el/la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Bryan Alexis Huerta García (10010954)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dr. Jorge Armando Moreno Escobar

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Dr. Luis Arias Durán



Atentamente

**“Por una humanidad culta
una Universidad de excelencia”**

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

C.c.p.: archivo
*BEDM

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000.



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2023-03-16 17:56:37 | Firmante

r8dLv4NNF5+++angqEn1hNo3WONa7awj70qru5DW5QC9XVQ6GAfoXx5eF2IfT/DKIEWiyuZoE/7TcqrGszl/xwOa98m+IQD0YB4hKE8nSEXWTZY43NFS0yms+Ma4fd4ohyeJ69H+lcHERR+N5mAKjEXADWROddCehYgrjafm4dvbZfdZx7Cwmoocz2/gQLqo/VpZVBFfr8Lgz9PR6b1MM28pc3n82CNGIHVlezpTxVxNIdde3DFeQVZdf8UGpif3ubFt9Q52Jar9nbgP7CGPeDulGrkMfxRhOljihCWP7Pgsm6KzXSgb2FRcsyMpTEE1qblcY6wGcYE4ldC58phXEQ==

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



[gF9Wb0Ua8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NoEHeFHD2RnOxApRjHXvAc9WNNhEvNCY>





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

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2023-03-23 11:45:16 | Firmante

b0hKfeviyd7ZjTF5CIs8FCYj1llqfodEIHaF0lQLhu2NAdayoieXs3M/MVjQolt6P8qmVPi4AbLuPyPnyzs0vyzJ1yPVFFThOzb1NoCltDAZ0XAGKHo3oHdmHnaoSipmFJF/SF2H32miZ4ws7DQVda8hj79D9b5qWPnq+f9DC+YYY48fViDnFj9YNJ23uazp8mF/6HO5OolooVK+2PYM39X88PVK6kcZgEckN3GTO4UZaoBvpyG7JR33wYm4aqkUEqJWitKEbmgSPfE6CktSfzrs7PvalMzQdbelpGWNftbDJETzRDbEzicOTVUcdzyl7ToSGQA+wLkaoli3u9A==

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2023-03-23 11:57:47 | Firmante

jJXXGaRqVD4UgV5CVrivPPwjdHOBzwJYBzGxfZ7wpCufb1vRuzRLesLvQ45+/1DRGf8HwgFQwkCpLqCzsJTbrtID7PSy6sdqRvXmL/pyIN9p3ZEFVsoBGBvew5g4H6r41X9v10l1KAj06oM1vMnwXoQA0W6k/N7U7SnAsoHijpy8rOhu89Y96r3UxeWHWuXQ0XqCF7GgXLZOEU1gVvG1X1bsUZZh1XjHqGgMTRJnlHpukXNzOnEXXPzEQvin2rTxH3NVFyWnDTUFzzyj2t2KYWM+PVVtk6l0La0b6d8y7MKFRDThuAYC8Wbtcmtr0LWpPcDitWLy8GfDw7A==

LUIS ARIAS DURAN | Fecha:2023-03-23 12:04:13 | Firmante

QtOvAuFq7cRmlv0bn3dGMF5ciPE9VeY1t0tbvkm7JpldaTVITqd+RWzExTNVH6BKN0CSp9D1iS52xmh7ssqC4p8KFGbtJePFrmXrd73+RzdMqP99aztSdl8D6b5c2L97dR5RvOF5433KpKIO6Bt6ehD9mM5NTh5tNAW3Pb649O3DTp5xJ4yqAmo0ewbSzxllgemdl+O9GbpaN+z9l+E3lcatTKpsrbeQqtB7KiRkFh7rL0sZq57vAxulDkmvf34zFq9m6DlrmL+5iif2aNTpJTh+qmpPPIlvCv5pZPHgb8jTcN1WLk86mH2VKeOlxedwqh82ZznFzYw/4L7bMNFA==

JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha:2023-03-27 09:56:38 | Firmante

aXs0wilS3NE6MFKh1M+8MvUUIjccRV5RDDb6hz4PLn8NnXln5OgJynt/ZGjSxZKmcBKIYnA3WJrlASLWzygrF9QsMhwEO1Fgt+vclDB5NfVLQc9B9AWFEAAUiiASVeHvScKMTfB9DN1EVjgq0ABXNBm1RvQZcoabWGJsMDKYmxeymgI/z81OCSS4xvt+zjFvyE1nvl0Cs20WCg/ROGSbz9WHDnd0rZc5YeN0pH017cAQreDIBn6xafyW3UBSVvLsBW02RBPzL7liEoPTybTJocrk35QmBuZHyIvDbNcYn5PyQkipBUgAx+d+4xo8r9B1ny5NOu5ZLaX0GZ3t7IQ==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2023-03-27 12:28:17 | Firmante

xDeQDNG/8cuoxBeCZnZQExfpSSuf1A9KiurPEG+HQOQZzuas7MczbuVNCBjcxalt0rzRXwtuXsuX1Pa6i0RfxNRMu2XQ2K+0sHKWDAiE502xBu7ZJaHpv0v+dMDyrC3u+0XhCTEDRww2g7FMzbZepkFL76ovFCxxn6RGM6INhB2krftUxNUL9lsJZkut8mD4YSi0Ag8JKcQkTetHGJWwhMpDEIXn3YRJV0JGp4SWjfvWVGBL6U7/k9xSWBPMTimywLlbpTnDA4s4UgOGK2HHRELH/fMMNq0AA41rHEdE3X/B4GiK7Ljo/k4Dvgx6CA/HJAW+72dvZs6htPyVXJo45A==

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



jEbY10A93

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uYRL2v3PsdVY3AdxGSW6zMRvEH8Q6PcE>

