



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Determinación del mecanismo de
acción relajante del aceite esencial de
toronjil morado (*Agastache mexicana*)
en la musculatura lisa bronquial de
cobayo

T E S I S

Para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA:

Natalia Avila Rosas



México, D. F., 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
P R E S E N T E .

Comunico a usted que la alumna AVILA ROSAS NATALIA
con número de cuenta 40803536-1 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 11 del mes de Septiembre de 2013 a las 15:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA
VOCAL	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
SECRETARIO	M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SUPLENTE	MTRO. VALENTÍN ISLAS PÉREZ
SUPLENTE	DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

El título de la tesis que se presenta es : **Determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*) en la musculatura lisa bronquial de cobayo**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 11 de Junio de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ
DIRECTOR
DIRECCION

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme su apoyo y asesoría en el proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 126 por las enseñanzas y la buena convivencia.

Al Dr. Fernando Rodríguez Ramos por el apoyo al proyecto.

Al proyecto PAPIIT-210112 y PAIP-4390-18 por el financiamiento del proyecto.

Al subprograma 127 “Formación de investigadores” de la Facultad de química por la por el apoyo económico y la experiencia adquirida.

DEDICATORIA

A la vida por permitirme vivir esta etapa tan maravillosa que me enriqueció como profesional y persona y porque no ha dejado de darme dichas y paz.

A mis padres Ernesto Avila y Minerva Rosas por amarme, encaminarme y apoyarme a lo largo de mi vida, hacerme sentir muy orgullosa y feliz de ser su hija y dar lo mejor de mi.

A mis hermanos Jaime, Eduardo y Cesar por los maravillosos momentos las lecciones aprendidas y su amor incondicional que me motivan día a día.

A mi amiga María de Lourdes Armas Barbosa por su amistad incondicional, los buenos ratos que hemos pasado juntas y que gracias a ella puedo decir que tengo una hermana.

A mis compañeros del laboratorio 126 por su amistad, las tantas risas y los buenos ratos vividos y por vivir.

A todos mis familiares, amigos, profesores y demás personas que a lo largo de la carrera me han apoyado, hecho reír, llorar, divertirme, desvelarme esforzarme, compartir sus conocimientos y brindarme lecciones de vida.

¡Muchas gracias a todos, se les quiere y buena vida siempre!

CONTENIDO

Introducción	5
1. Marco teórico.....	6
1.1. Vías aéreas y músculo liso bronquial.	6
1.1.1. Control del tono del musculo liso bronquial.....	6
1.2. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma bronquial	10
1.2.1 fármacos para el tratamiento de asma bronquial y EPOC.....	11
1.2.2 plantas medicinales para el tratamiento del asma y EPOC.....	12
1.3. TORONJIL MORADO (<i>Agastache mexicana</i> (H. B. K.) Lint & Epling subsp. <i>mexicana</i> Bye, Linares & Ramamoorthy).....	12
2. Planteamiento del problema	16
3. Objetivos	17
4. Hipótesis.....	18
5. Materiales y método	19
5.1 Material vegetal	19
5.2 Extracción del aceite esencial.....	19
5.3 Análisis del aceite esencial	20
5.4 Fármacos.....	20
5.5 Animales.....	20
5.6 Ensayo biológico.....	21
6. Diseño estadístico	25
7. Resultados	26
8. Discusión.....	43
9. Conclusiones	46
10. Perspectivas.....	47
11. Referencias	48

INTRODUCCIÓN

Las vías aéreas del sistema respiratorio tienen como función realizar el intercambio gaseoso y están conformadas principalmente por epitelio y musculo liso bronquial. El músculo liso bronquial se encarga de la regulación del flujo de aire mediante diferentes vías de contracción y relajación. Enfermedades como el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) afectan el control del tono del musculo liso bronquial. Para el tratamiento de estos padecimientos existen diversos fármacos, así como plantas medicinales y aceites esenciales. Se ha reportado que el aceite esencial de *Agastache mexicana subsp mexicana*, conocida comúnmente como toronjil morado, relaja la musculatura lisa de tráquea de cobayo, sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual actúa.

En el presente trabajo se investigó el mecanismo de acción relajante del aceite esencial de *Agastache mexicana subsp. mexicana* en la musculatura lisa de vías aéreas utilizando el modelo de tráquea aislada de cobayo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. VÍAS AÉREAS Y MÚSCULO LISO BRONQUIAL.

El sistema respiratorio trabaja en conjunto con el sistema circulatorio para administrar oxígeno hacia los tejidos y retirar dióxido de carbono hacia los pulmones para ser exhalado. A este proceso se le conoce como respiración. En el sistema respiratorio se encuentran las vías aéreas que se dividen en superiores (fosas nasales y boca), intermedias (faringe, laringe y tráquea) e inferiores (bronquios y bronquiolos). Las vías intermedias son denominadas vías conductuales y las inferiores son el sitio donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso ⁽¹⁾. Las vías aéreas se conforman principalmente por tejido epitelial y músculo liso; el epitelio está adaptado para defender la mucosa mediante el aclaramiento mucociliar, regulación de líquido en las vías aéreas, producción de mediadores de la inflamación y como fuente de óxido nítrico (NO) ^{(1) (2)}; el músculo liso bronquial (MLB) esta distribuido principalmente en las vías conductuales en una proporción del 3 al 8 % y su función es la regulación del flujo de aire mediante el control del tono muscular ^{(3) (4)}.

1.1.1. Control del tono del músculo liso bronquial

1.1.1.1 Contracción

El MLB está innervado por el sistema nervioso parasimpático donde se encuentran los receptores muscarínicos M_1 , M_2 y M_3 ⁽²⁾ (Figura 1A). Los receptores M_1 están ubicados en los ganglios parasimpáticos y facilitan la neurotransmisión ⁽⁵⁾. Los receptores M_2 están tanto a nivel presináptico como a nivel posináptico; a nivel presináptico regulan la liberación de acetilcolina ^{(5) (6)}, mientras que en el sitio posináptico se encuentran acoplados a proteínas G_i , que cuando se ocupa este receptor la subunidad $G_{\alpha i}$ inhibe la activación de la adenilciclase (AC) contrarrestando la relajación del MLB ^{(7) (8)}.

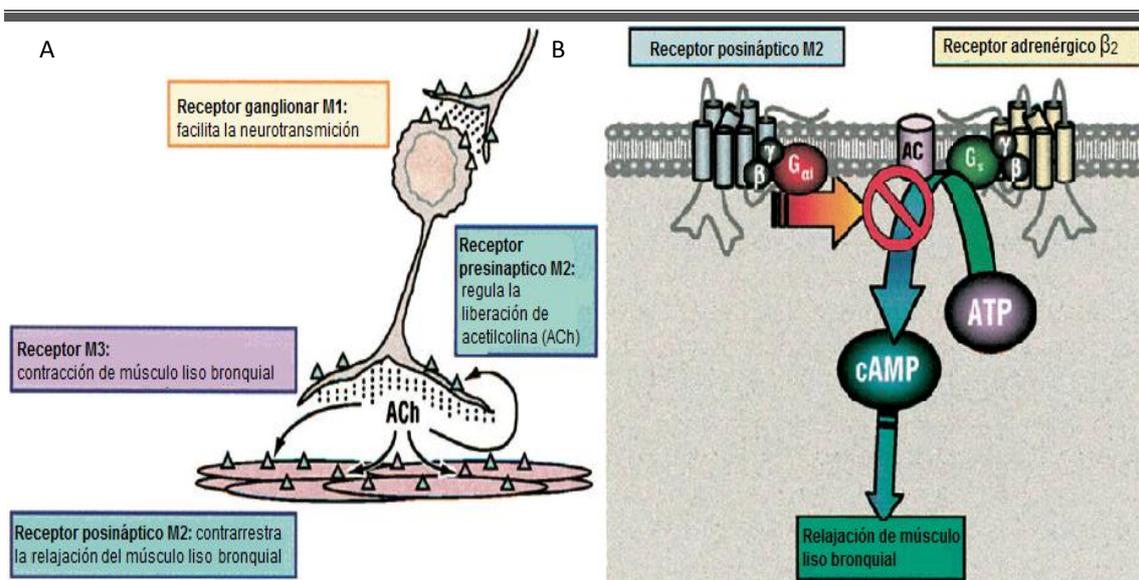


Figura 1. Innervación parasimpática en el MLB (A) y representación de la señalización del receptor muscarínico M₂ (B) ⁽⁸⁾.

Los receptores muscarínicos M₃ regulan la broncoconstricción, secreción de moco y vasodilatación ⁽⁵⁾. Se encuentran en el sitio posináptico acoplados a proteína G_q al igual que los receptores de histamina H₁, leucotrieno D₄, tromboxano, bradiquinina B₂ y adenosina A₃. Cuando el receptor es ocupado, la subunidad G_{αq} promueve la liberación de Guanosín difosfato (GDP) para formar Guanosín trifosfato (GTP). El GTP junto con la subunidad G_{αq} se disocia de la subunidad G_{βγ} y activa a la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en dos mensajeros intracelulares: el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El DAG se une a la membrana y promueve la activación de la proteincinasa C (PKC). La PKC estimula la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que induce la formación de mediadores de la inflamación a partir del ácido araquidónico, actúa en la fosforilación de la calponina cuya función es inhibir a la miosina ATPasa y fosforila a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina ⁽⁴⁾. Por otro lado, el IP₃ llega a receptores del retículo sarcoplásmico liberando calcio hacia el citosol y facilitando el flujo de calcio hacia el interior de la célula a través de canales de calcio dependientes del voltaje tipo L y tipo T ⁽⁹⁾. El aumento de calcio intracelular promueve la formación del complejo calcio-calmodulina que activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual fosforila a la cadena

ligera de miosina facilitando la interacción con la actina, la activación de la miosina-ATPasa y la contracción muscular ^{(7), (10)} (Figura 2). Después de la contracción muscular, el aumento de calcio es regulado por la inactivación de los receptores de IP₃ y la reacumulación de calcio en el retículo sarcoplásmico mediante el sistema calcio-ATPasa. El aumento de calcio también es regulado por la bomba Na⁺/Ca⁺⁺, los canales de potasio activados por calcio (K⁺_{Ca++}) y los canales de potasio dependientes de ATP (K⁺_{ATP}) ⁽⁹⁾. Otro factor que influye en la contracción del MLB es el papel de la Rho-Rho cinasa, ya que aumenta la sensibilización de calcio y promueve la polimerización de la actina al estimular a los receptores Rho acoplados a Gi ⁽¹⁰⁾.

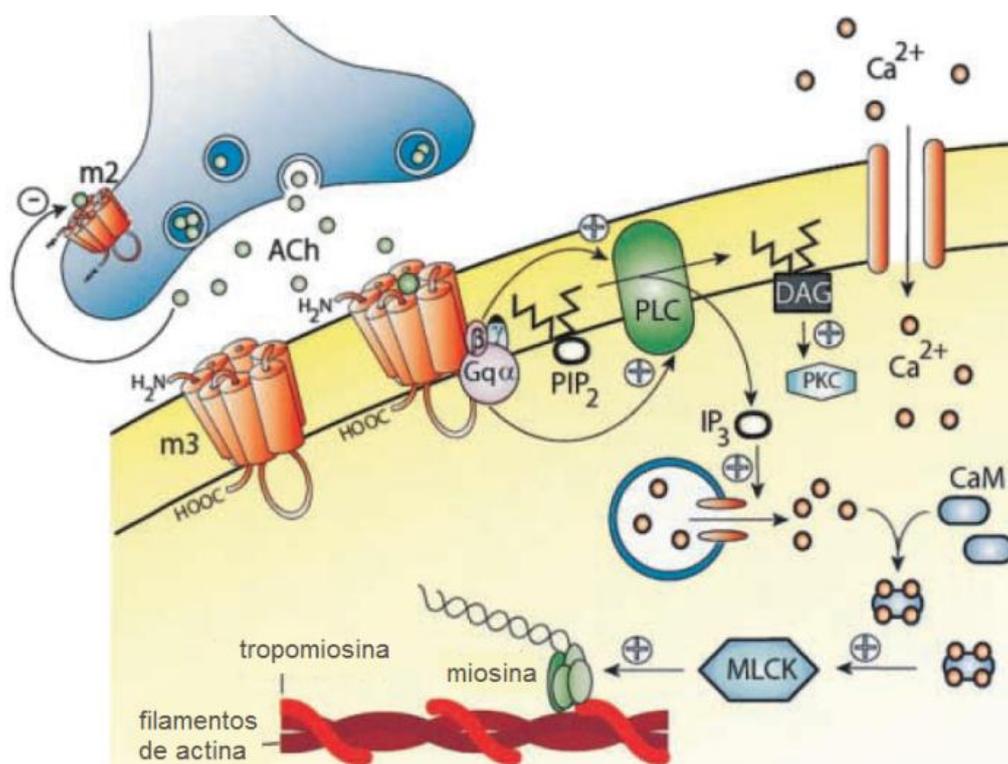


Figura 2. Contracción del MLB por receptores acoplados a proteína Gq. Fosfoinosítido bifosfato (PIP₂), fosfolipasa C (PLC), inositol trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DGA), complejo calcio-calmodulina (CaM), cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) ⁽¹¹⁾.

1.1.1.2. Relajación

La relajación del MLB se lleva a cabo principalmente por efectos simpaticomiméticos. Cabe mencionar que la inervación simpática no está directamente asociada al MLB, sino que por la circulación sanguínea las

catecolaminas llegan al sitio presináptico y posináptico de las vías aéreas⁽⁴⁾. En el MLB existe una gran población de receptores β_2 adrenérgicos, los cuales están acoplados a proteínas Gs, aunque también están los receptores prostanoideos E₂, adenosina A_{2A}, A_{2B} y péptidos vasoactivos intestinales (VIP)⁽¹⁰⁾.

En el sitio presináptico, al ocuparse los receptores β_2 -adrenérgicos se abren los canales de potasio activados por calcio, provocando una hiperpolarización en el nervio colinérgico y disminuyendo la liberación de la acetilcolina⁽¹²⁾. En el sitio posináptico cuando se ocupa el receptor acoplado a proteína Gs, la subunidad G α_s se une a la membrana y activa a la adenilato ciclasa (AC). La activación de AC cataliza la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosín trifosfato (ATP). El AMPc es un segundo mensajero que tiene múltiples funciones, como el control de secreción de moco, la supresión de la actividad inflamatoria y la activación de la proteincinasa A (PKA). La PKA reduce la movilización de calcio hacia el citosol, fosforila a PLC, IP₃ y MLCK, inhibe la afinidad de calmodulina por el calcio y activa los canales K⁺_{Ca++} que promueve la repolarización de la membrana y con ello la relajación del MLB⁽¹¹⁾ (Figura 3). La PKA también regula la transcripción de algunos genes responsables del crecimiento del MLB y la expresión de proteínas inmunomoduladoras⁽¹⁰⁾. Cabe mencionar que la activación de los receptores β_2 adrenérgicos aumenta el intercambio iónico por la bomba Na⁺-Ca⁺⁺ y la estimulación del sistema Na⁺-K⁺ATPasa⁽¹³⁾.

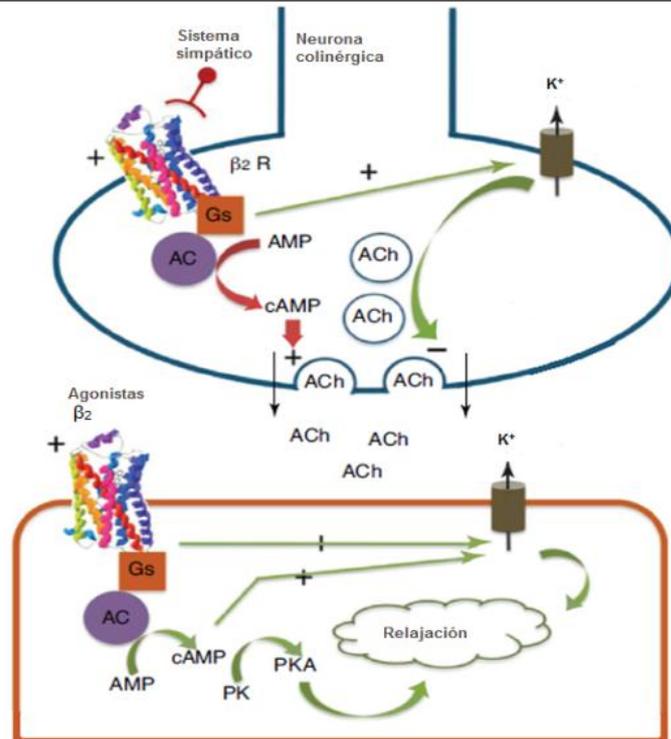


Figura 3. Relajación del MLB por receptores acoplados a proteínas Gs. Acetilcolina (ACh), adenilato ciclasa (AC), adenosín monofosfato (AMP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), proteincinasa (PK), proteincinasa A (PKA)⁽¹²⁾.

Para regular la actividad de PKA, el AMPc es hidrolizado por las fosfodiesterasas (PDE) a adenosín monofosfato (AMP). Existen 12 tipos de PDE, 5 se han identificado en seres humanos y cobayos. Las PDE 3 y 4 son las responsables de la degradación de AMPc en el MLB⁽¹³⁾.

1.2. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA Y ASMA BRONQUIAL

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma bronquial son enfermedades en las que se presenta obstrucción e inflamación de vías aéreas y las causan diversos factores como el frío, las infecciones respiratorias, el tabaco, los contaminantes atmosféricos o los productos químicos.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se presenta como bronquitis crónica o enfisema^{(14), (15)}. De acuerdo con el Programa Nacional de

Salud 2007-2012, es la cuarta causa de muerte en mujeres y la quinta en hombres.

El asma bronquial se caracteriza por remodelación e hiperactividad bronquial⁽²⁾. Existen dos respuestas en el proceso asmático: la fase temprana, que comienza durante los primeros minutos donde existe un incremento de mediadores inflamatorios, como histamina y leucotrieno B₄, C₄ y D₄ y la fase tardía, que comienza 6 horas después del contacto con el agente asmático y se caracteriza por una respuesta inflamatoria ocasionada por un aumento de neutrófilos y eosinófilos, además se presenta broncoespasmo, vasodilatación, edema de la mucosa, hipersecreción de moco e hipertrofia de la musculatura lisa⁽¹⁶⁾. De acuerdo con investigaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el asma afecta principalmente a niños y ancianos. Se estima que la prevalencia mundial de esta enfermedad es de aproximadamente de 5-10% de la población⁽¹⁷⁾.

1.2.1 Fármacos para el tratamiento de asma bronquial y EPOC.

En el tratamiento para el asma bronquial y EPOC se emplean fármacos broncodilatadores y antiinflamatorios. Dentro de los fármacos broncodilatadores se encuentran los agonistas β_2 -adrenérgicos, que promueven la relajación del MLB, inhibe el aclaramiento mucociliar, la permeabilidad mucociliar y la neurotransmisión colinérgica, además inducen la despolimerización de la actina, activan los canales K^+_{Ca++} , y reducen la liberación de histamina⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾. El fármaco más utilizado es el salbutamol, este fármaco es de acción rápida con un efecto máximo a los 15 minutos y una vida media de 6 horas⁽²⁰⁾. Otro tipo de fármacos broncodilatadores son los antagonistas muscarínicos, los cuales se unen a los receptores M₂ y M₃ bloqueando la broncoconstricción y favoreciendo la broncodilatación. El fármaco inicialmente empleado fue la atropina, pero presentaba múltiples efectos secundarios. El bromuro de ipratropio es un derivado sintético de la atropina que presenta menos efectos secundarios, aunque pueden ocasionar cefaleas y sequedad en la boca⁽²⁰⁾.

Dentro de los fármacos para reducir la inflamación se encuentran los antihistamínicos, que actúan como agonistas inversos sobre los receptores H₁⁽²¹⁾. Los fármacos más empleados son la clorferamina, loratadina,

difenhidramina y cetirizina. El principal efecto secundario de los antihistamínicos es la somnolencia, aunque los antihistamínicos de segunda generación son menos liposolubles y reducen este efecto. Sin embargo se llegan a presentar otros efectos secundarios como mareo, dolor de cabeza y sequedad en la boca.

1.2.2 Plantas medicinales para el tratamiento del asma y EPOC

Además del tratamiento farmacológico, el uso de plantas medicinales para enfermedades respiratorias es común en medicina tradicional mexicana. Algunas de estas plantas ya han sido estudiadas farmacológicamente, tal es el caso de *Argemone ochroleuca* (chicalote) ⁽²²⁾, *Gnaphalium liebmannii* (gordolobo) ⁽²³⁾, *Bougainvillea spectabilis* (bugambilia), *Bursera simaruba* (copal), *Croton glabellus* (cascarilla) y *Thymus vulgaris* (tomillo) entre otras ⁽²⁴⁾. El uso de los aceites esenciales se ha convertido en una alternativa para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Los aceites esenciales son productos naturales que se caracterizan por ser volátiles y de olor fuerte debido a los metabolitos secundarios aromáticos de naturaleza monoterpénica principalmente. Se les han atribuido propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y relajantes ⁽²⁵⁾. Los aceites esenciales de los que se ha reportado acción relajante en la vías aéreas son algunas especies del género *Mentha* (*M.pulegium* y *M.piperita*) cuyos componentes mayoritarios son mentol y pulegona respectivamente ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾. También se han encontrado propiedades broncodilatadoras en los aceites esenciales de *Tagetes florida* Sweet, *Psidium guajava* L, *Pipera uritum* Kunth, *Lippia graveolens* Kunth. ⁽²⁴⁾ y de varias especies de *Croton*, entre ellas *C. nepetaefolius* ⁽²⁸⁾.

1.3. TORONJIL MORADO (*Agastache mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy)

Agastache mexicana (Lamiaceae) se ha dividido en dos especies: *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy, y *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy, conocidas en la medicina tradicional mexicana como "Toronjil morado" y "Toronjil blanco", respectivamente ⁽²⁹⁾.

Agastache mexicana es conocida popularmente en México con los nombres de toronjil, olotillo, abejera, cidronela y melisa. Se encuentra distribuida en los estados de Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco y Michoacán ⁽³⁰⁾.

Se describe como una planta de tallos erguidos, angulosos y cuadrangulares en sección transversal, la parte basal y media del tallo es de color morado con hojas ovalo-lanceoladas de 2-8 cm de largo por 2-4 cm de ancho, ápice agudo, borde dentado-serrado, inflorescencia terminal en verticilos y corola de color rojizo-morado. Posee un aroma especiado débil a limón ^{(31) (32)} (Figura 4)



Figura 4 *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*

Se emplea comúnmente en el tratamiento de dolor de estómago, tos, enfriamiento, vómito, y nervios, pero principalmente se emplea para el “susto o espanto” ⁽³³⁾.

Contiene flavonoides como tilianina, el cual presenta efecto vasodilatador por la vía del óxido nítrico/guanosín monofosfato cíclico (NO/GMPc), mediado por los canales de potasio ⁽³³⁾. Se han aislado ácido ursólico y acacetina de la parte aérea de *A. mexicana*, las cuales presentan actividades antiinflamatorias similares al diclofenaco, además de actividades antiespasmódicas y antiinflamatorias en íleon de cobayo ^{(32) (34)}.

Contiene hasta 1.2% de aceite esencial, cuyos componentes mayoritarios son estragol (86.78%) y limoneno (11.24%)⁽³⁵⁾. Se ha encontrado que el aceite esencial de *A. mexicana* presenta actividad relajante sobre la musculatura lisa en tráquea de cobayo, encontrándose como componentes mayoritarios limoneno y anisol⁽³⁶⁾.

El *Estragol* o 4-(2-propenil)1-metoxibenceno también es conocido como p-alilanol o metilchavicol, es un éter terpénico líquido incoloro de olor característico a anís.. Se encuentra en el aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y manzana (*Malus domestica*) y en plantas como el tarragón (*Artemisia dracuncululus*) y mayorana (*Origanum majorana*)⁽³⁷⁾. Es metabolizado por o-metilación y 1'-hidroxilación. En seres humanos el 58% de la administración oral es excretada en la orina después de 48 horas y el 12% es exhalada como dióxido de carbono después de 8 horas. Se ha reportado que algunos metabolitos del estragol inducen la formación de hepatomas en ratones, de los cuales el 1-hidroxiestragol ha sido reportado como cancerígeno. En seres humano sólo el 0.3% de estragol es metabolizado a este compuesto, en comparación con ratones en donde se forma 23% de 1-hidroxiestragol⁽³⁷⁾. El estragol presenta una gran variedad de actividades biológicas, como antiinflamatorio, antibacteriano, antifúngico, insecticida, anestésico, antioxidante y antiespasmódico^{(38) (39)}. Se ha encontrado que el estragol inhibe la formación de edema plantar de ratón en el modelo de inflamación inducido por histamina, sustancia P y Nitroprusiato de sodio en una proporción del 70%⁽⁴⁰⁾. Además el aceite esencial de *Ocimum selloi* compuesto mayormente por estragol, reduce la contracción abdominal inducida por ácido acético y los episodios de diarrea inducidos por aceite de castor en ratones, lo que sugiere tener una actividad antiespasmódica y antidiarreica⁽⁴¹⁾, también se ha reportado actividad antiasmática del aceite esencial de *Ocimum basilicum*, teniendo como componentes mayoritarios al estragol⁽⁴²⁾.

El *D-limoneno* o 1-metil-4-(1-metilenetil) ciclohexano, es un monoterpeno monocíclico que se encuentra en cítricos como el limón, naranja y mandarina. Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y el 50-80% es excretado por la orina después de 48h. Se reporta una DL₅₀ de 4 a 6 g/kg en ratas. Se ha

empleado para tratar cálculos biliares, como neutralizador gástrico y como quimioprotector en varios tipos de cáncer ⁽⁴³⁾. Se han reportado propiedades inmunomoduladoras del D-limoneno, como la inhibición de la producción de prostaglandinas PGE₂ a partir del ácido araquidónico y de otras citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y leucotrienos, lo que sugiere el uso del limoneno en el tratamiento auxiliar en enfermedades inflamatorias como el asma ⁽⁴²⁾. El D-limoneno y sus productos de oxidación causa irritación en una concentración mayor a 500 μ M administrados por inhalación, en concentraciones menores reduce la inflamación provocada por especies reactivas de oxígeno y por el acaro de polvo (*Dermatophagoides farinae*) ⁽⁴⁴⁾, además, funciona como un agente profiláctico de la inflamación de las vías aéreas mediada por ozono ⁽⁴²⁾. El D-limoneno es un agonista de los receptores de adenosina A_{2A} que se encuentran acoplados a proteínas Gs en MLB, ⁽⁴⁵⁾ la activación de este receptor causa reducción en la quimiotaxis, fagocitosis, adherencia de neutrófilos al endotelio y en la secreción de citocinas pro-inflamatorias ⁽⁴⁶⁾.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma bronquial son catalogadas como enfermedades inflamatorias crónicas y se caracterizan por presentar broncoconstricción. Las tasas de morbilidad y mortalidad de estas enfermedades son altas y su prevalencia sigue en aumento. Existen diversos tratamientos para tratar al asma bronquial como los antiinflamatorios y broncodilatadores. En la medicina tradicional mexicana se utilizan diversos productos naturales para el tratamiento de dichas enfermedades entre ellos los aceites esenciales. El aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*) relaja el músculo liso de tráquea de cobayo, pero no se ha reportado el mecanismo por el que este actúa. Ante ello, se investigó el mecanismo de acción del efecto relajante del aceite esencial de toronjil morado en la musculatura lisa bronquial utilizando el modelo de tráquea aislada de cobayo.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Determinar el mecanismo de acción relajante del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* en tráquea aislada de cobayo.

3.2 PARTICULARES

- Analizar la composición química del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).
- Determinar la participación de los receptores colinérgicos, histaminérgicos y β -adrenérgicos en el mecanismo de acción relajante del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.
- Evaluar la participación y la adenilciclase en el mecanismo de acción relajante del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.
- Evaluar la participación de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) y el bloqueo de la entrada de calcio en el efecto relajante del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.
- Evaluar la interacción entre el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y fármacos antiasmáticos (salbutamol y bromuro de ipratropio) en tráquea aislada de cobayo como herramienta auxiliar en la determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de toronjil morado.

4. HIPÓTESIS

Considerando que los componentes mayoritarios del aceite esencial de toronjil morado son D-limoneno y estragol, se espera que su mecanismo de acción relajante se deba a más de una vía y que la administración del aceite esencial de toronjil morado en forma conjunta con un agonista β -adrenérgico o con un antagonista colinérgico potencie su acción relajante de la musculatura lisa bronquial de cobayo.

5.3 Análisis del aceite esencial

Para determinar la composición del aceite, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplado a masas (CG/EM). Se utilizó un cromatógrafo de gases LECO modelo Pegasus AD acoplado a un espectrómetro de masas Agilent modelo 6890N con inyector automático modelo T5606-01.

Se inyectó 1.0µL de la muestra en una columna capilar fase DB5 de Agilent (10m x 0.18mm de diámetro interno, espesor de la película de 0.18µm). El gas acarreador fue helio a una velocidad de flujo de 1mL/min. La temperatura del inyector fue de 300°C, con la temperatura de línea de transferencia de 250 °C y la temperatura de la cámara de 200°C. El retraso encendido del filamento fue de 100 segundos.

En el espectrómetro el calentamiento utilizado fue temperatura inicial de 40 °C durante 3 minutos, la velocidad de calentamiento de 50 °C por minuto hasta 280 °C durante 10 minutos. El intervalo de masa fue de 45-550U. Adquisición espectral de 10 espectros por segundo. Inyección con división de flujo (Split). La técnica utilizada fue de baja resolución por impacto electrónico y detección de iones positivos. Los componentes fueron identificados utilizando la biblioteca NIST version2.0.

5.4 Fármacos

La acetilcolina, carbacol, histamina, propranolol, forskolina, bromuro de ipratropio y 2',5'-didoxiadenosina fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El salbutamol y glibenclamida fueron adquiridos de Helm de México. El forslean (equivalente a 10 % de forskolina), fue adquirido de Savinsa Corporation.

La glibenclamida, la 2',5'-ideoxiadenosina, el extracto de forslean y la forskolina se disolvieron primero en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente se diluyeron con agua hasta una concentración final de menos del 0.1% de DMSO..

5.5 Animales

Se utilizaron cobayos macho con una masa corporal entre 350 y 450 g, mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso de alimento y agua. El cuidado y manejo de los animales fue de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana

NOM-062-ZOO-1999. Cuidado y mantenimiento de los animales. Especificaciones y técnicas para la producción, uso y cuidado de los animales de laboratorio.

5.6 Ensayo biológico

5.6.1 Disección de la tráquea de cobayo y estabilización del tejido.

Los animales se sacrificaron por una administración intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg). Se realizó la disección de la tráquea de manera inmediata y se limpió del tejido circundante. La tráquea se mantuvo a 37°C en una solución de Krebs, la cual se compone de (mM): NaCl 118, KCL 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂·2H₂O 2.2, glucosa 11 y EDTA. El tejido se cortó en anillos de aproximadamente 2mm, cada anillo fue colocado en una cámara de órgano aislado con 10mL de solución de Krebs suspendido entre dos ganchos de acero inoxidable, uno de los extremos se fijó a la cámara y otro al transductor de fuerza que se encuentra conectado a un polígrafo BiopackSystem. Los datos se obtuvieron mediante el programa Acknowledge Mp100 3.5.3. El tejido se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se estabilizó durante una hora realizando lavados con solución de Krebs cada 15 minutos. Pasado este tiempo, el tejido se estimuló con una solución de Acetilcolina 30 µM y después se realizaron tres lavados con solución de Krebs. La estimulación se repitió una vez más después de treinta minutos. Posteriormente el tejido se estabilizó durante 30 minutos antes de comenzar el experimento.

5.6.2 Efecto relajante del aceite esencial de *toronjil morado*.

Después del periodo de estabilización los anillos de tráquea aislada de cobayo (TAC) se contrajeron con Carbacol 3 µM hasta alcanzar la meseta de contracción y se añadieron emulsiones de aceite esencial de forma acumulativa (5-50 µg/mL). El aceite esencial de toronjil morado se disolvió primero con Tween 80 al 0.5% y se agitó por sonicación durante 3 minutos. Las soluciones posteriores se diluyeron con agua destilada.

5.6.3 Participación de los receptores β -adrenérgicos en el efecto relajante del aceite esencial.

Las preparaciones de TAC fueron precontraídas con Carbacol 3 μ M, una vez alcanzada la meseta se incubó con propranolol 3 μ M. Posteriormente se aplicó de forma acumulativa aceite esencial de toronjil morado en las mismas concentraciones empleadas para el efecto relajante (5- 50. μ g/mL)

5.6.4 Participación de los receptores muscarínicos en el efecto relajante del aceite esencial

En experimentos independientes, se obtuvo la curva acumulativa de carbacol (10^{-15} - 10^{-3} M). Se incubó el tejido con emulsiones de aceite esencial, a las concentraciones de 10, 50, 100 y 300 μ g/mL durante 15 minutos y se realizaron nuevamente curvas de contracción respuesta de carbacol

5.6.5 Participación de los receptores histaminérgicos en el efecto relajante del aceite esencial

Las preparaciones fueron contraídas con histamina 30 μ M hasta alcanzar la meseta de contracción y se añadieron soluciones de aceite esencial de forma acumulativa (5-50 μ g/mL).

En otro experimento, se obtuvo una curva acumulativa de contracción por histamina (10^{-15} - 10^{-3} M). Se incubó el tejido con emulsiones de aceite esencial, en concentraciones de 10, 50, 100 y 300 μ g/mL durante 15 minutos y se realizaron nuevamente curvas de contracción respuesta de histamina

5.6.6 Activación de adenilciclase en el efecto relajante del aceite esencial

Las preparaciones fueron precontraídas con Carbacol 3 μ M, una vez alcanzada la meseta se incubó con 2',5'-dideoxiadenosina 10 μ M y forskolina 10 μ M en experimentos independientes durante 5 minutos. Posteriormente se aplicó de forma acumulativa aceite esencial en las mismas concentraciones empleadas para el efecto relajante (5-50 μ g/mL).

En otro experimento, los tejidos fueron precontraídos con Carbacol 3 μ M, una vez alcanzada la meseta se incubó con aceite esencial en concentraciones de

10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ durante 5 minutos. Posteriormente se añadió forslean de forma acumulativa (4.105×10^{-3} - $4.105 \mu\text{g/mL}$).

5.6.7 Participación de los canales de potasio dependientes de ATP en el efecto relajante del aceite esencial.

Las preparaciones fueron contraídas con Carbacol 3 μM , una vez alcanzada la meseta se incubaron con glibenclamida 10 μM durante 5 minutos. Posteriormente se aplicó de forma acumulativa aceite esencial en las mismas concentraciones empleadas para el efecto relajante. (5-50 $\mu\text{g/mL}$).

5.6.8 Participación de aceite esencial sobre las contracciones inducidas por calcio.

Al estabilizar el tejido, el medio se modificó a una solución Krebs libre de calcio y se estabilizó el tejido por 30 minutos. Después el tejido se despolarizó con una solución de cloruro de potasio 80 mM hasta alcanzar la meseta y se realizaron 3 lavados con solución de Krebs libre de calcio. La despolarización se repitió media hora después con lavados con solución Krebs libre de calcio cada 15 minutos. Se realizó una tercera despolarización y una vez alcanzada la meseta el tejido se incubó con emulsiones de aceite esencial en concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 300 $\mu\text{g/mL}$ durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaron curvas acumulativas de cloruro de calcio (0.01-1mM).

5.6.8 Análisis isobolográfico del aceite esencial de *A. mexicana* y fármacos broncodilatadores

Se realizaron curvas dosis respuesta del efecto relajante de salbutamol (2.39×10^{-6} - $2.39 \mu\text{g/mL}$) y bromuro de ipratropio (4×10^{-9} - $4 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$). Después se calcularon CE_{50} y se calculó la dosis teórica aditiva mediante la ecuación $Z_{ad} = fA + (1-f)B$, en donde Z_{ad} es la dosis aditiva teórica, f es la proporción fija de los fármacos en la combinación (para 1:1 $f=0.5$, para 1:3, $f=0.25$ y para 3:1, $f=0.75$). Después se calcularon las proporciones de cada fármaco en la mezcla mediante $\rho A = fA/Z_{ad}$ y $\rho B = (1-f)B/Z_{ad}$. Con base a esas proporciones se

Determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*) en la musculatura lisa bronquial de cobayo.

realizó el experimento con diferentes concentraciones de los fármacos y se calculó la Zex, que es el efecto aditivo experimental de la misma manera que Zad.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CÁLCULO DE PARÁMETROS

Los datos fueron presentados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) con un nivel de confianza del 95%. Las CE_{50} se calcularon del modelo de Hill utilizando el software GraphpadPrism[®] versión 5.00. Las curvas dosis-respuesta y las CE_{50} de dos determinaciones fueron analizadas mediante una prueba t no pareada, mientras que las curvas dosis-respuesta y las CE_{50} de varias determinaciones fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. Se consideraron diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$. Se calculó el potencial del antagonista (pA_2') de acuerdo a la ecuación: $\frac{A'}{A} = 2 \log(X-1) = \log B - \log K_B$ donde X es la razón del efecto máximo del agonista en ausencia del antagonista entre el efecto máximo del agonista en presencia del antagonista; K_B es la constante de afinidad para el antagonista y B es la concentración del antagonista. El valor de pA_2' es la abscisa al origen cuando $X=2$

7. RESULTADOS

Se utilizaron 1467.1g de la parte aérea de la planta fresca, obteniéndose 8.98g de aceite esencial equivalente al rendimiento de 0.6824 %.

En el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se encontraron dos compuestos mayoritarios: estragol y D-limoneno. El compuesto minoritario fue linaliltranilato. En el Cuadro 1 se muestra el % de área, el tiempo de retención (TR) y la comparación de los índices de retención (Kovats). En la Figura 6 se presenta el cromatograma del aceite esencial de Toronjil morado y en las Figuras 7 y 8, los espectros de masas de los dos compuestos mayoritarios.

Pico No.	Componente	Área %	I.R.(Exp)	I.R.(Teo)	T. R(s)
1	D-limoneno	17.555	1045.3	1031	318.997
2	Linaliantranilato	2.164	1137.2	-	368.797
3	Estragol	80.281	1238.6	1195	419.547

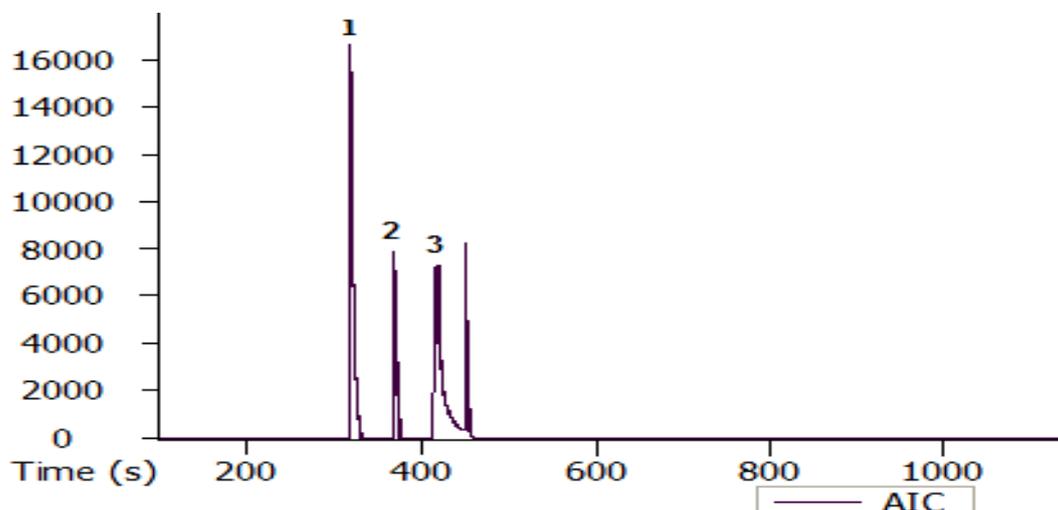


Figura 6 Cromatograma de gases del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*

Determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*) en la musculatura lisa bronquial de cobayo.

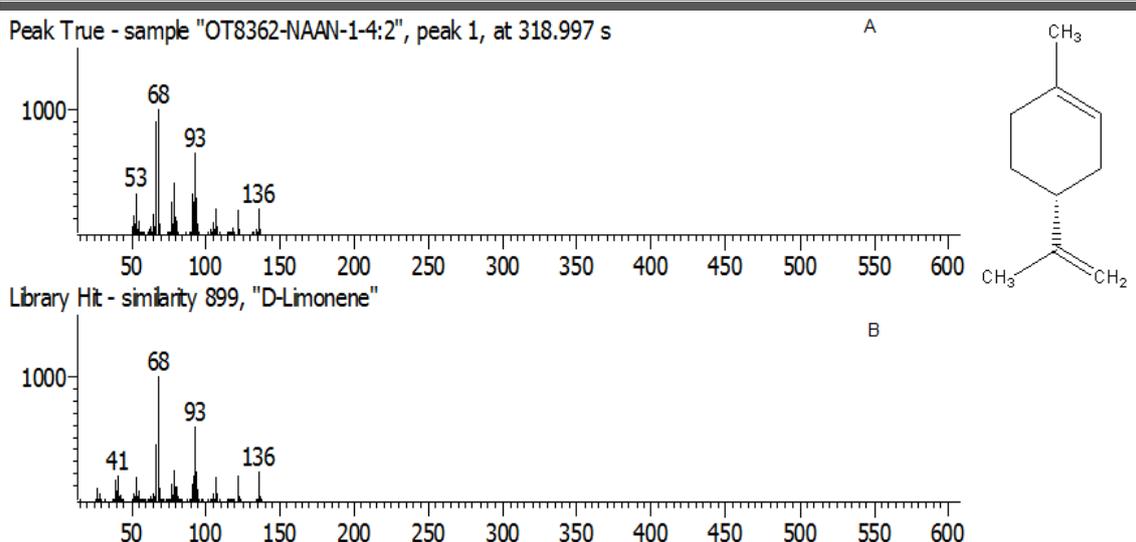


Figura 7. Espectro de masas de D-limoneno en el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (A) y su comparación con biblioteca NIST (B).

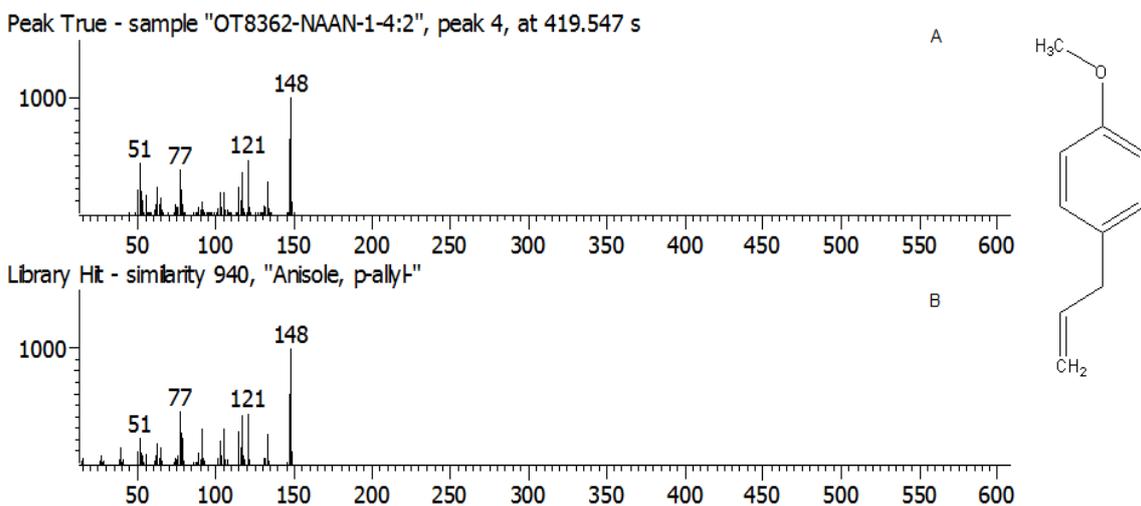


Figura 8. Espectro de masas de Estragol en el aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (A) y su comparación con biblioteca NIST (B).

El aceite esencial presentó un efecto relajante dosis-dependiente (Figura 9), con una CE_{50} de $18.25 \pm 1.026 \mu\text{g/mL}$.

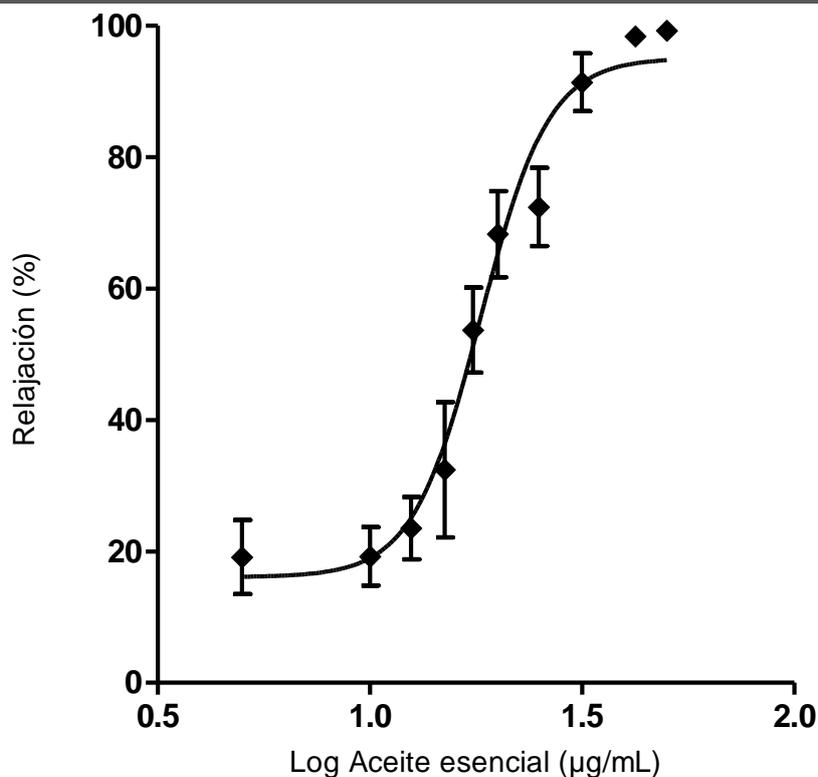


Figura 9. Curva dosis-respuesta del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

El efecto relajante no fue inhibido por propranolol (Figura 10). Los valores de la concentración efectiva 50 en presencia (CE_{50} de $19.66 \pm 1.021 \mu\text{g/mL}$) y en ausencia de propranolol (CE_{50} de $21.52 \pm 1.002 \mu\text{g/mL}$) fueron prácticamente los mismos ($p > 0.05$).

El aceite esencial de toronjil morado presentó un efecto antagonista de tipo no competitivo para las contracciones inducidas por carbacol (Figura 11). El efecto fue significativo a partir de la concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ (Cuadro 2)

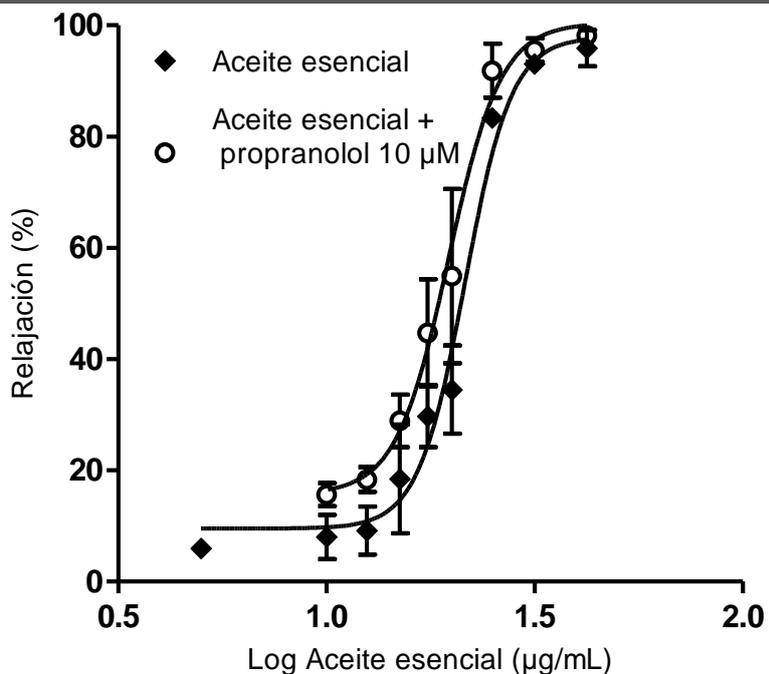


Figura 10. Curva dosis-respuesta de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y aceite esencial mas propranolol $10 \mu\text{M}$. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 2. Valores de los máximos de contracción presentados como la media \pm EEM de carbacol en ausencia y presencia de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp *mexicana*. *Diferencia significativa con ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. $p < 0.05$.

<i>A. mexicana</i> sub <i>mexicana</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Máximo de contracción de carbacol (%)
0	94.161 \pm 0.9069
10	88.266 \pm 1.618
50	52.185 \pm 4.484*
100	69.494 \pm 0.2694*
300	31.15 \pm 1.223*

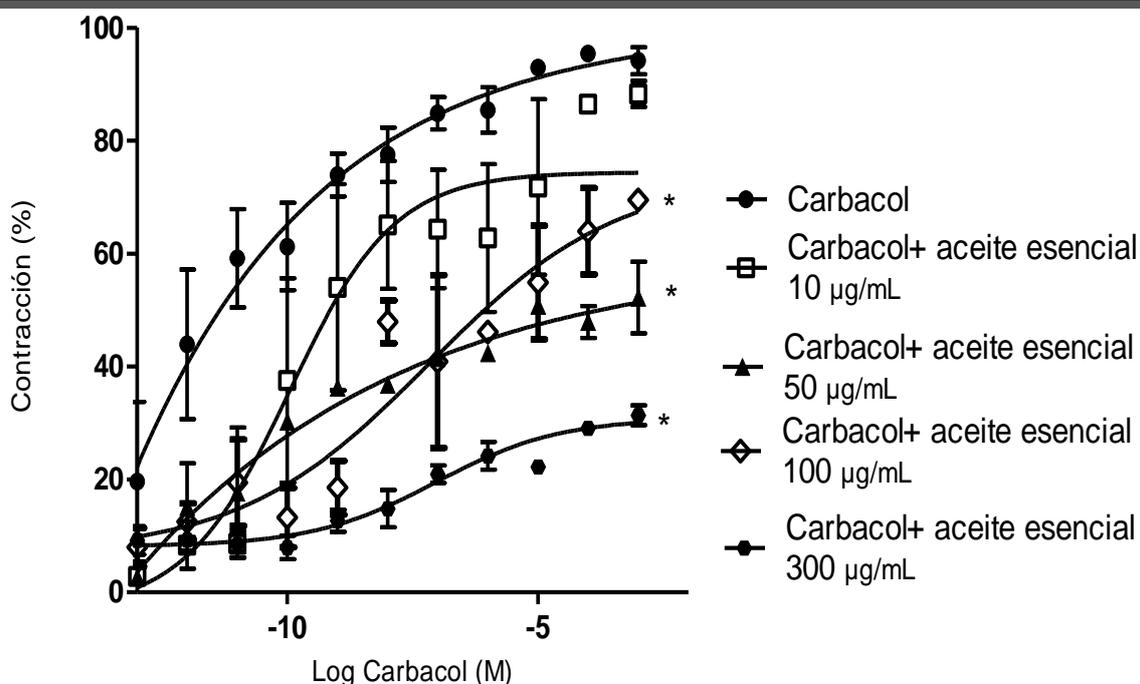


Figura 11. Curvas de contracción de carbacol con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Agastache mexicana*. * Diferencia significativa con ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. $p < 0.05$. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

El aceite esencial de Toronjil morado presentó un efecto relajante en la tráquea precontraída con histamina con una CE_{50} de 13.3 ± 1.026 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12). El aceite esencial también inhibió de manera no competitiva las contracciones de histamina (Cuadro 3, Figura 13).

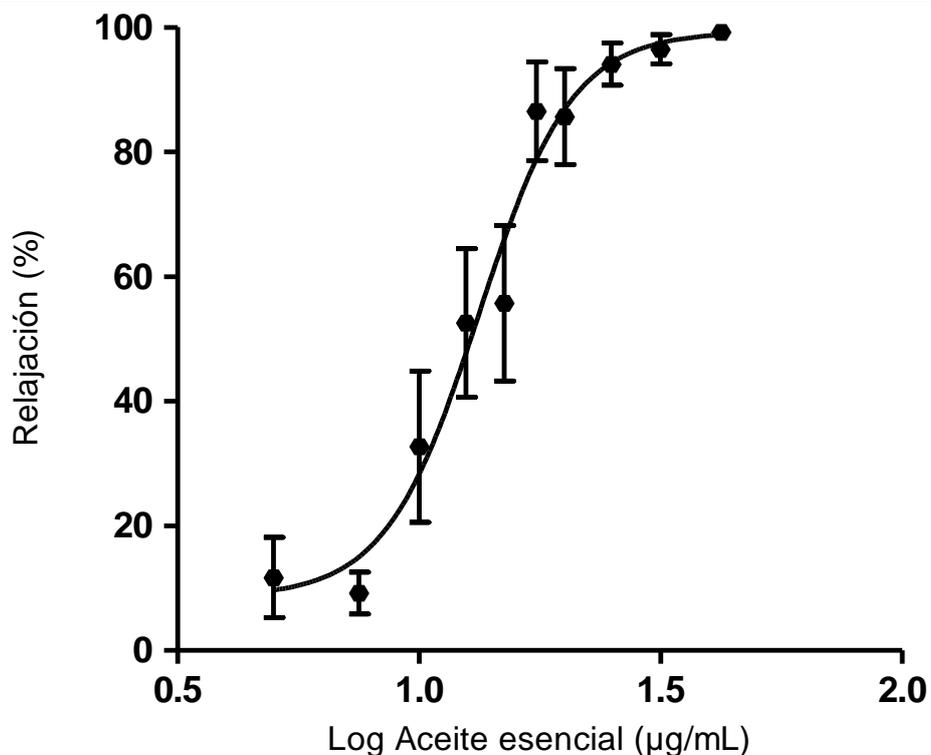


Figura 12. Curva dosis- respuesta del efecto relajante sobre contracción con histamina de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos

Cuadro 3. Valores de los máximos de contracción presentados como la media \pm EEM de histamina en ausencia y presencia de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp *mexicana*.

*Diferencia significativa con ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. $p < 0.05$.

<i>A. mexicana</i> sub <i>mexicana</i> (µg/mL)	Contracción máxima con histamina (%)
0	99.071 \pm 0.562
10	65.778 \pm 2.537
50	45.004 \pm 7.677*
100	48.064 \pm 4.456*
300	16.062 \pm 0.73*

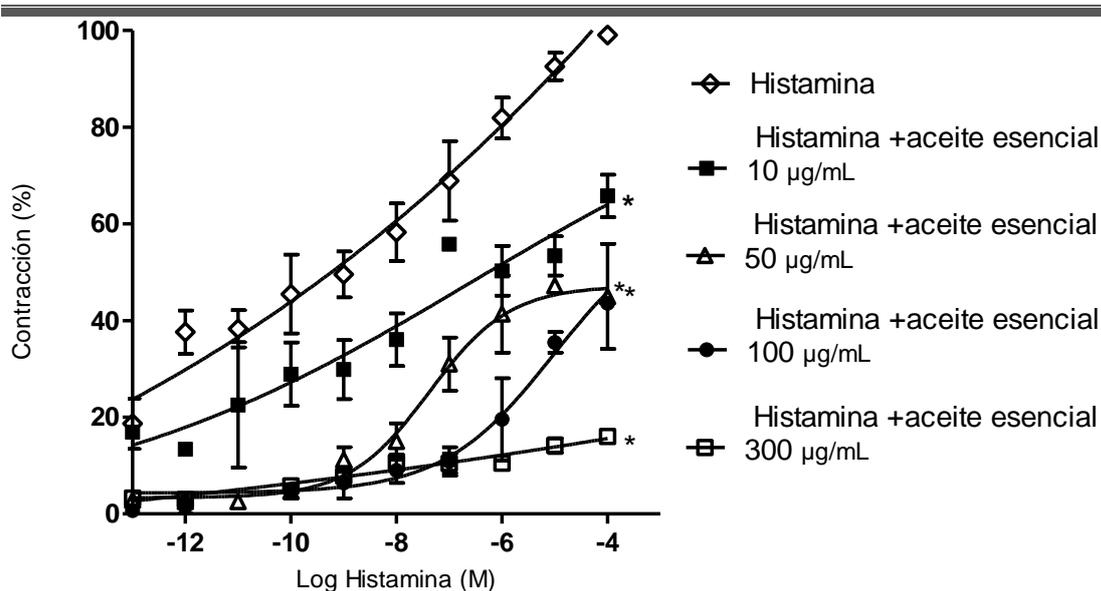


Figura 13. Curvas de contracción de Histamina diferentes concentraciones de aceite esencial. *Diferencia significativa con ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. P 0.05. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos

El aceite esencial presentó mayor potencia para antagonizar las contracciones inducidas por histamina ($pA_2' = -1.507 \pm 1.122$ ($32.13 \pm 1.32 \mu\text{g/mL}$); (Figura 15) que para antagonizar las contracciones inducidas por carbacol ($pA_2' = -2.180 \pm 0.357$ ($151.35 \pm 2.27 \mu\text{g/mL}$); (Figura 14).

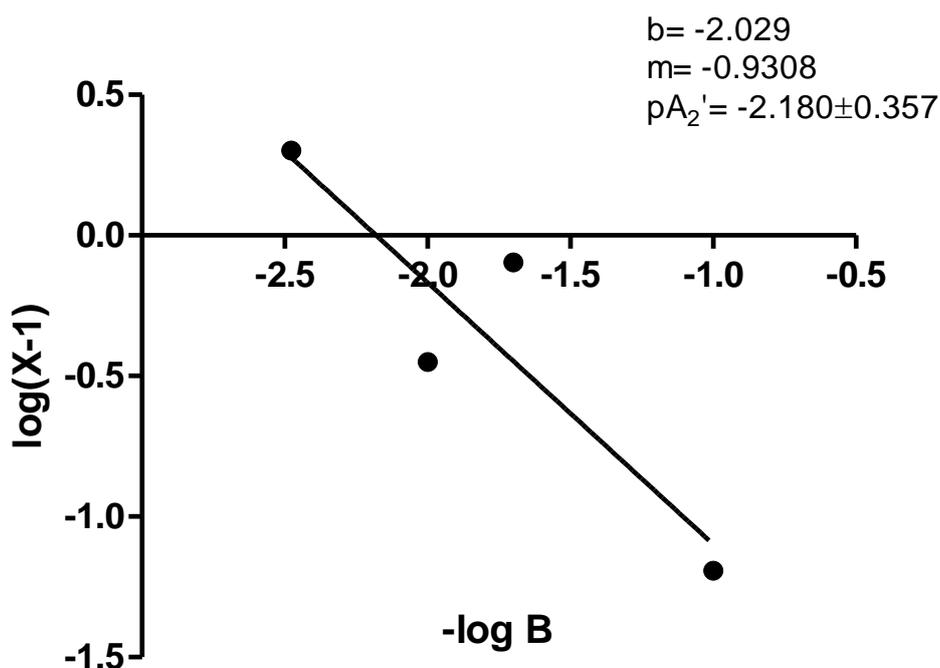


Figura 14. Grafico de Schild para la obtención de pA_2' de aceite esencial-carbacol.

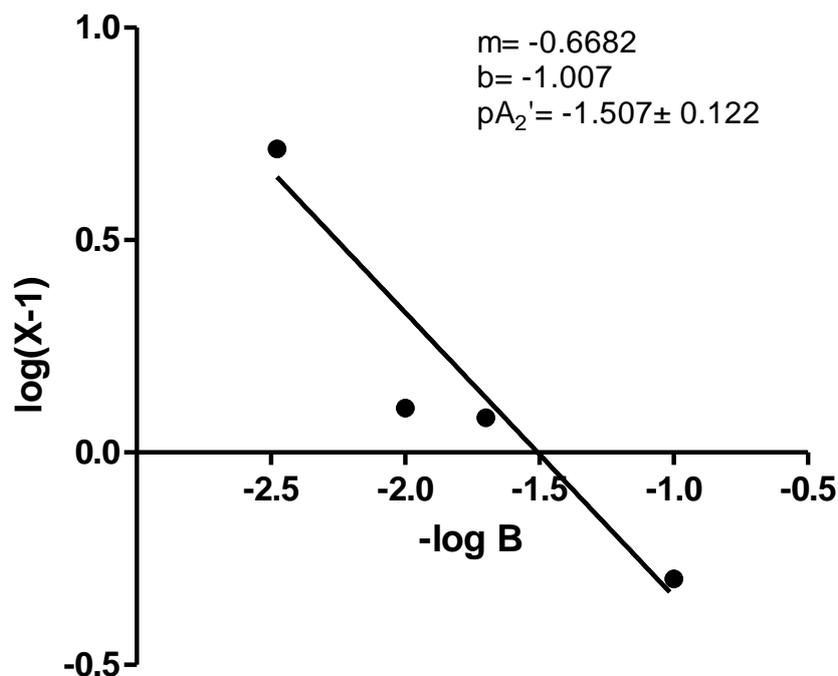


Figura 15. Gráfico de Schild para la obtención de pA_2' de aceite esencial-histamina.

La CE_{50} del aceite esencial ($CE_{50} = 19.99 \pm 1.042 \mu\text{g/mL}$) no se modificó por la activación de la adenilciclase con forskolina ($CE_{50} = 17.86 \pm 1.051 \mu\text{g/mL}$) o la inhibición con 2',5'dideoxiadenosina de la ($CE_{50} = 17.38 \pm 1.011 \mu\text{g/mL}$). En la Figura 16 se muestra las curvas de relajación del aceite esencial en presencia y ausencia del activador y del inhibidor de la adenilciclase. Resultados parecidos a los obtenidos con forskolina se obtuvieron con forslean, un extracto estandarizado al 10% de forskolina, que se obtiene de la raíz de la planta *Coleus forskohlii* (Figura 17); ni la CE_{50} ni los valores de efecto máximo relajante de forslean se modificaron por la presencia del aceite esencial de toronjil (Cuadro 4).

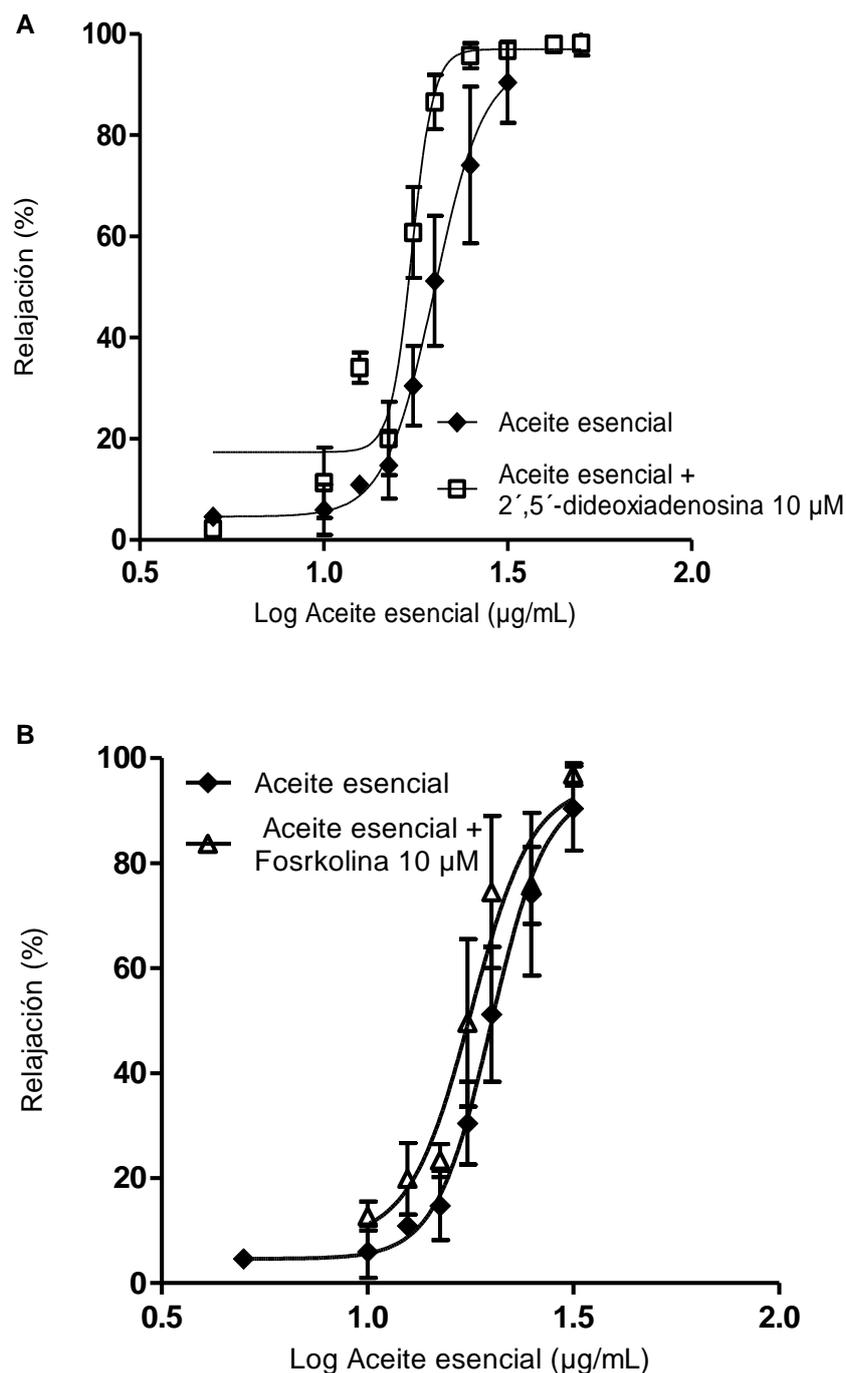


Figura 16. Curva dosis-respuesta de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y de 2'5'dideoxiadenosina 10 μM (A) y de forskolina 10 μM (B) mas aceite esencial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 4. Valores de CE_{50} presentados como la media \pm EEM de forslean en ausencia y presencia de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.

<i>A. mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$ forslean)
0	0.03801 ± 0.0146
10	0.1378 ± 0.0534
25	0.1116 ± 0.0505
50	0.0974 ± 0.0573

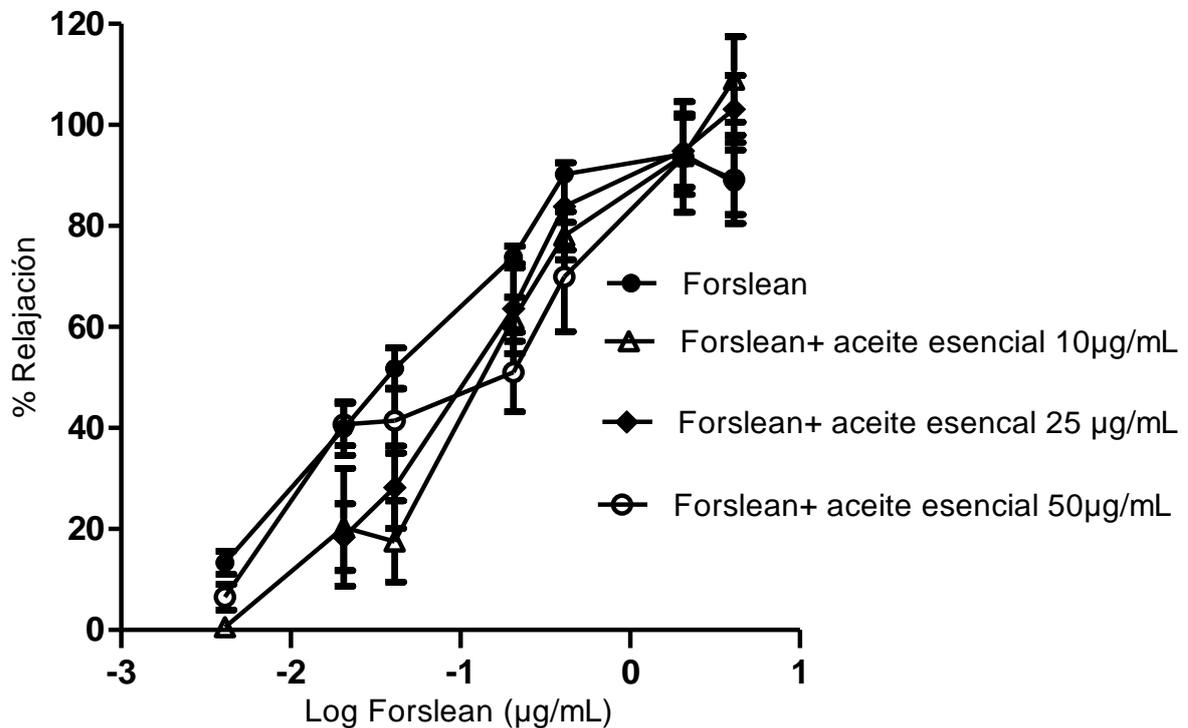


Figura 17. Curva dosis-respuesta de forslean (10% forskolina) y de forslean mas aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos

El aceite esencial de toronjil inhibió la contracción inducida por calcio a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 5). A dosis bajas de 25 $\mu\text{g/mL}$ incrementó la contracción de calcio (Figura 18)

Cuadro 5. Valores de los máximos de contracción presentados como la media \pm EEM de calcio en ausencia y presencia de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp *mexicana*.

<i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Contracción máxima con Calcio (%)
0	98.7378 \pm 0.2149
10	137.71 \pm 6.862
25	124.104 \pm 1.66
50	70.701 \pm 9.4967 *
100	66.9351 \pm 8.2057*
300	15.2949 \pm 1.2466*

Determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de toronjil morado (*Agastache mexicana*) en la musculatura lisa bronquial de cobayo.

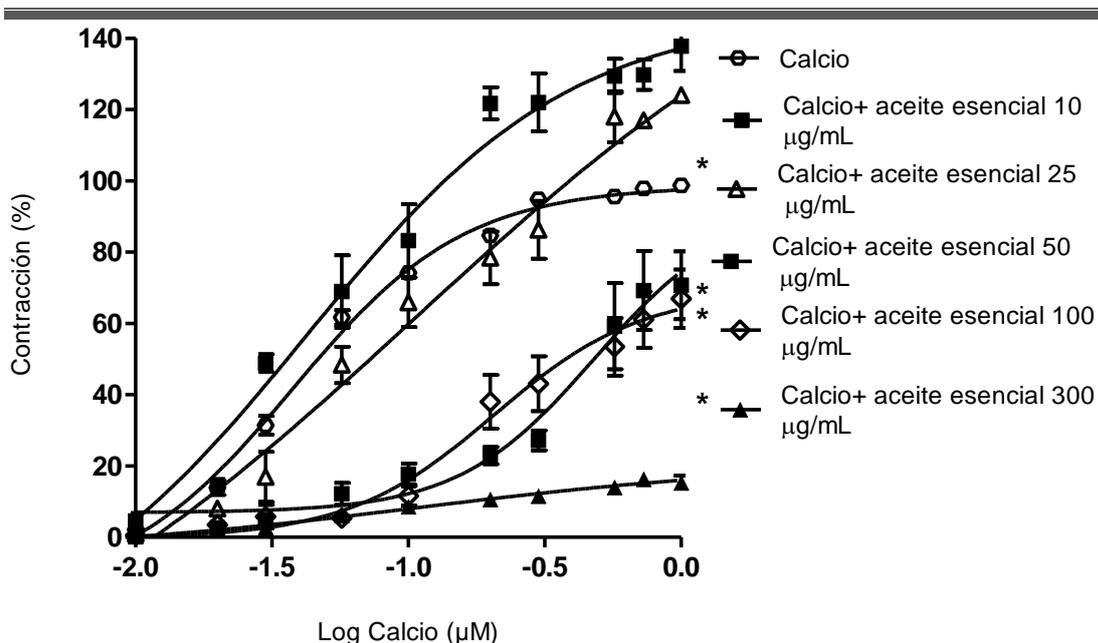


Figura 18. Curva dosis-respuesta de calcio y de calcio mas aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* * Diferencia significativa con ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett. $p < 0.05$. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos

La curva dosis-respuesta del aceite esencial con glibenclamida presentó un desplazamiento hacia la izquierda con respecto la curva control de aceite esencial (Figura 19). El valor de la CE_{50} de aceite esencial con glibenclamida ($CE_{50} = 17.55 \pm 1.013 \mu\text{g/mL}$) y al del aceite esencial solo ($CE_{50} = 21.52 \pm 1.002 \mu\text{g/mL}$) no presentó diferencia significativa.

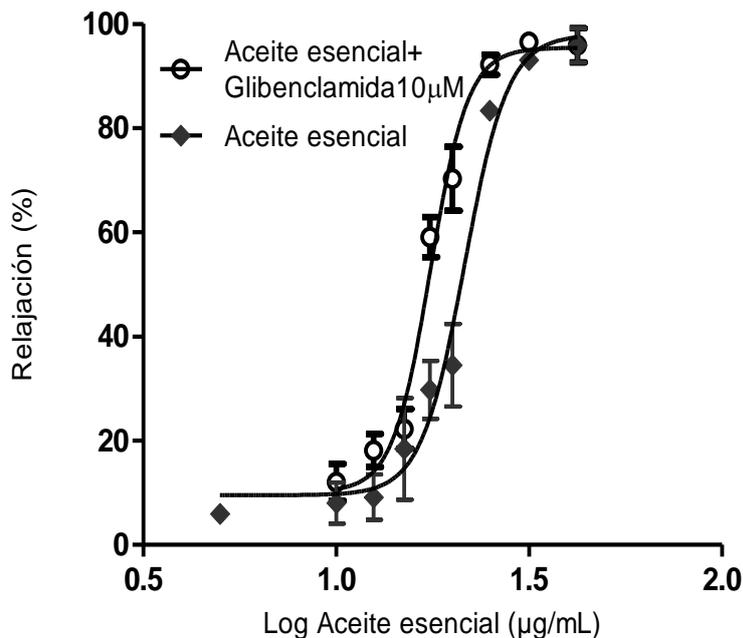


Figura 19. Curva dosis-respuesta de aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y de mas aceite esencial mas glibenclamida 10µM. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos

Los fármacos antiasmáticos salbutamol y bromuro de ipratropio presentaron efecto relajante dosis dependiente (Figura 20). La CE_{50} del salbutamol fue de $1.348 \times 10^{-3} \pm 1.66 \times 10^{-3}$ µg/mL y la del ipratropio fue de $4.448 \times 10^{-5} \pm 1.57 \times 10^{-5}$ µg/mL.

A partir de las CE_{50} se calcularon las Zad para hacer las distintas combinaciones de la interacción en proporciones de 1:1, 1:3, 3:1 entre el aceite esencial de toronjil y los fármacos antiasmáticos. Los valores teóricos (Zad) y experimentales ($Zexp$) del estudio de interacción de cada proporción se presentan en el Cuadro 6.

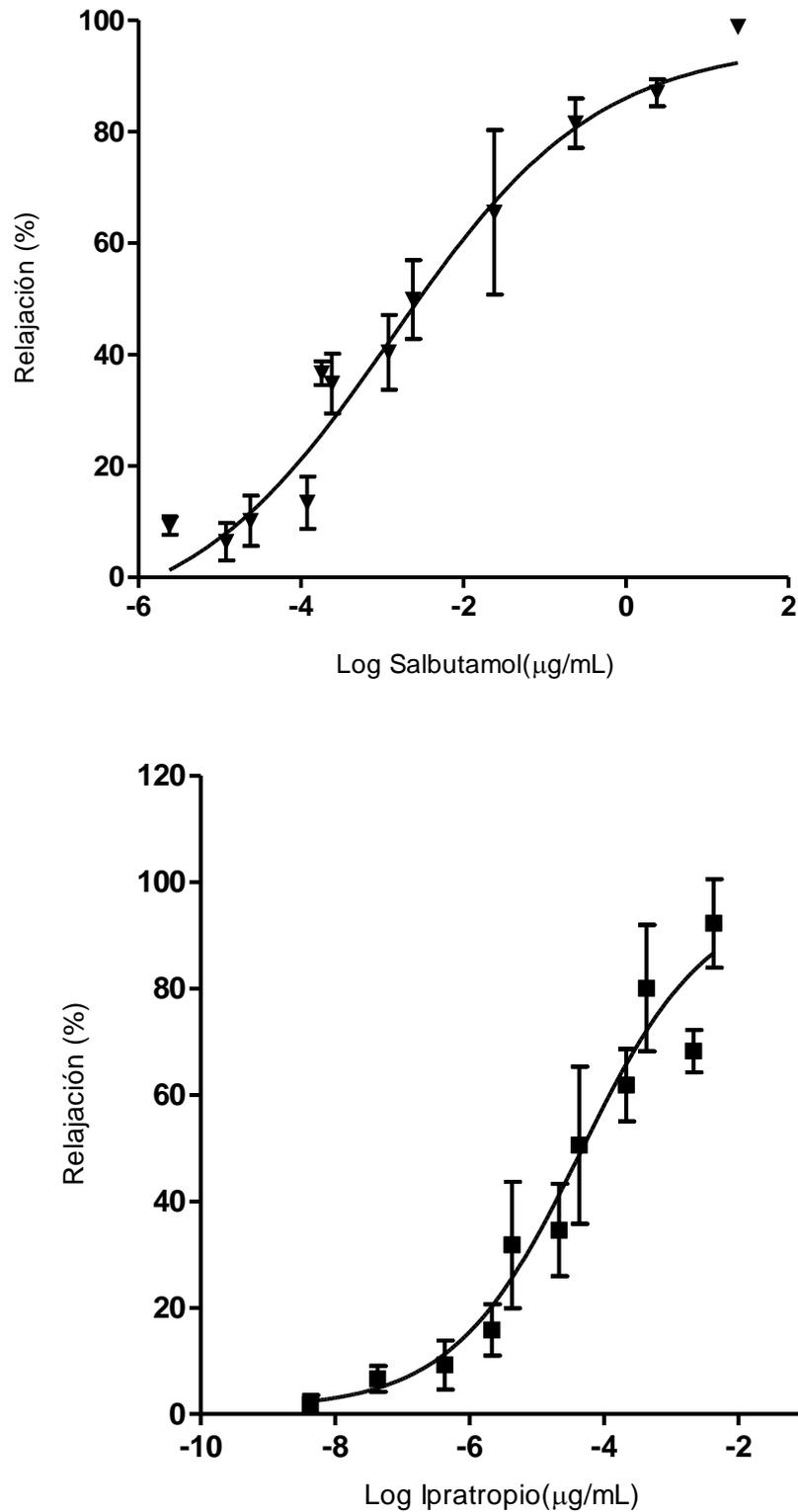


Figura 20. Curvas dosis- respuesta de fármacos antiasmáticos (salbutamol y bromuro de ipratropio) Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 6. Valores de Zad y Zexp del estudio de la interacción entre el aceite esencial y fármacos antiasmáticos

Combinación	f	f aceite	(1-f) fármaco	Zad (µg/mL)	ρ a	ρ b	Zexp (µg/mL)
Aceite esencial: ipratropio							
1:1	0.5	9.125	2.224×10^{-5}	9.1250	1	2.43×10^{-6}	0.156±0.28
1.3	0.75	4.562	3.336×10^{-5}	4.5625	0.999	7.311×10^{-6}	0.848±0.67
3:1	0.25	13.687	1.112×10^{-5}	13.6875	1	8.124×10^{-7}	1.23±0.76
Aceite esencial: salbutamol							
1:1	0.5	9.125	6.74×10^{-4}	9.1256	0.9999	7.38×10^{-5}	4.178±2.87
1.3	0.75	4.562	1.01×10^{-3}	4.5635	0.9997	2.22×10^{-4}	0.528±0.24
3:1	0.25	13.687	3.37×10^{-4}	13.6878	0.9999	2.46×10^{-5}	5.567±3.95

Para construir el isoblograma se calculó un área de aditividad definida mediante las ecuaciones $b = B_{50}(A-a/A_{50})^q/p$ y $a = A - [B_{50}/(A_{50}/a)]^q/p$, donde a y b son las concentraciones de los fármacos, A_{50} y B_{50} son las CE_{50} de los fármacos a y b respectivamente, A y B son las CE de los fármacos a y b, q es el número de Hill del fármaco a y p es el número de Hill del fármaco b⁴⁴. Debido a que la razón de pendientes del aceite esencial entre los fármacos es mayor a 1 (Cuadro 7, Figura 21), se observa una gran área de aditividad en los isoblogramas. En la interacción del aceite esencial con salbutamol, la combinación 1:1 se encuentra fuera del área de aditividad, mientras que en la interacción del aceite esencial con ipratropio las combinaciones se encuentran fuera del área de aditividad y desplazados a la izquierda con respecto a los puntos teóricos (Figura 22).

Cuadro 7. Comparación de CE_{50} y números de Hill del aceite esencial y fármacos antiasmáticos

Fármaco	N° de Hill	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Razón de pendientes (aceite esencial/fármaco)
Aceite esencial	5.428	$CE_{50}=18.25 \pm 1.026$	
Salbutamol	0.3438	$CE_{50}: 1.348 \times 10^{-3} \pm 1.66$	15.788249
Ipratropio	0.458	$CE_{50}: 7.071 \times 10^{-5} \pm 1.31$	11.85152838

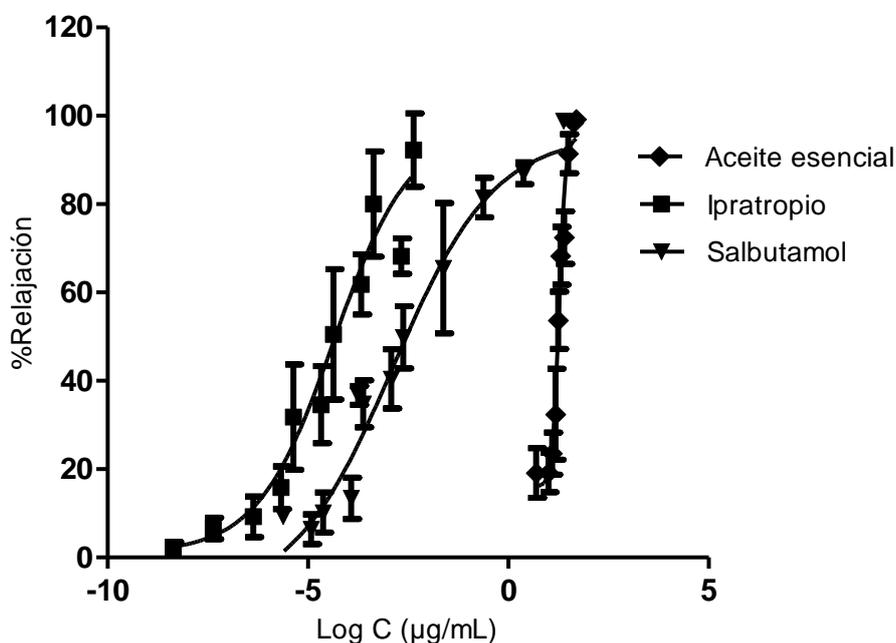


Figura 21. Curvas dosis-respuesta del efecto relajante de fármacos antiasmáticos (salbutamol y bromuro de ipratropio) y aceite esencial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

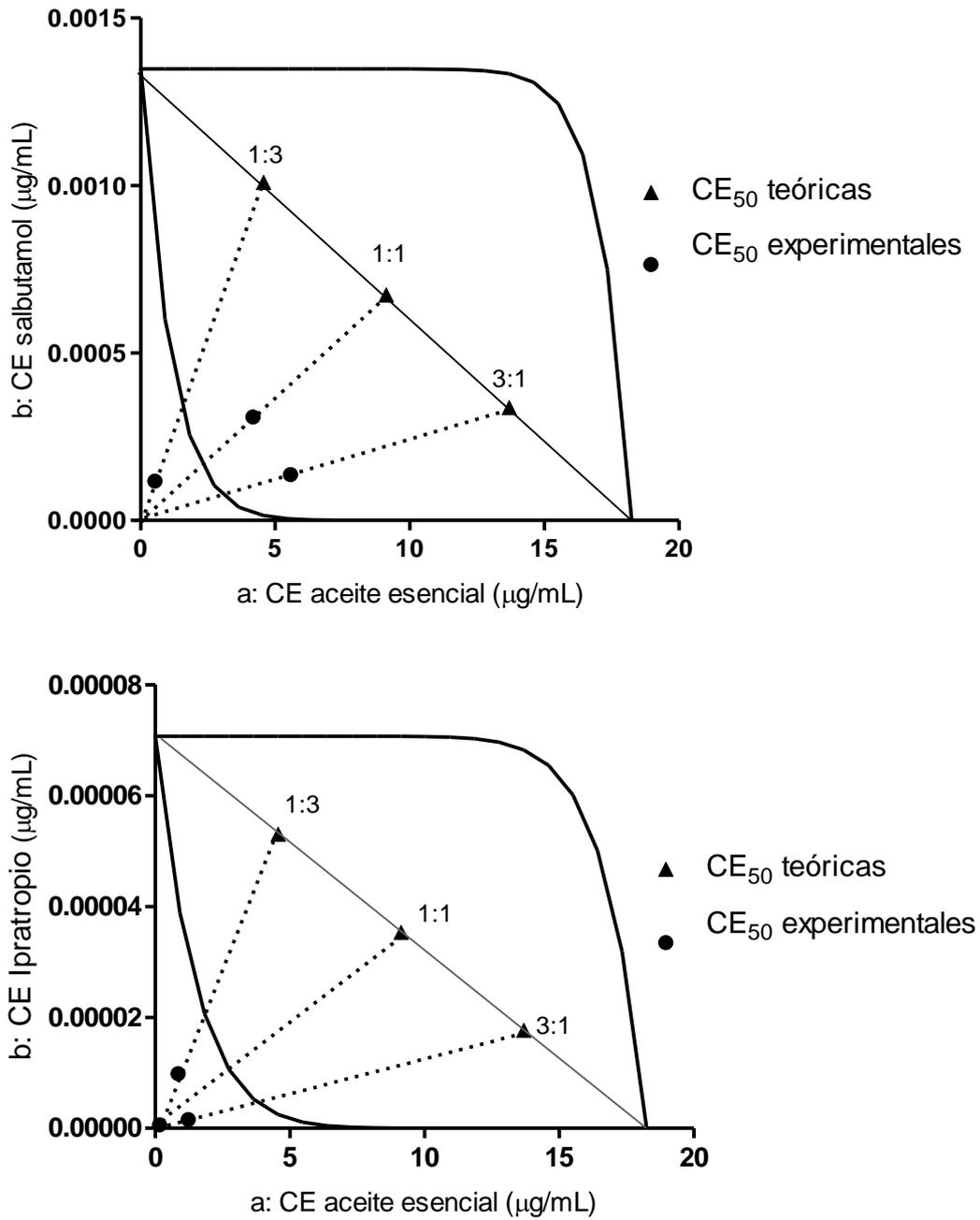


Figura 22. Isobogramas de la interacción entre el aceite esencial de *A. mexicana* subsp. *mexicana* y fármacos antiasmáticos en diferentes proporciones..

8. DISCUSIÓN

Se confirmó que el aceite esencial de toronjil tiene propiedades relajantes de la musculatura lisa bronquial de cobayo. El análisis del aceite esencial por CG/EM mostró que los componentes mayoritarios son estragol y D-limoneno, lo que coincide con lo previamente investigado por Estrada y colaboradores⁽³⁵⁾. El estragol y el D-limoneno son componentes mayoritarios de otras especies del género *Agastache* como *A. rugosa* y *A. foeniculum*⁽⁴⁹⁾, por lo que es de esperar que otras especies del género *Agastache* también presenten efecto relajante de la musculatura lisa bronquial. Es posible que el efecto relajante de la musculatura lisa bronquial se deba a la presencia de estos componentes mayoritarios ya que se ha descrito para estragol efecto relajante de la musculatura lisa intestinal⁽⁴¹⁾ y actividad antiasmática experimental⁽⁴²⁾, y para el D-limoneno se ha descrito efecto profiláctico antiinflamatorio de vías aéreas⁽⁴²⁾.

En la determinación del mecanismo de acción del aceite esencial, la incapacidad del propranolol para inhibir la relajación provocada por el aceite esencial en el MLB descarta que el efecto relajante del toronjil sea por la activación de los receptores β_2 - adrenérgicos.

El aceite esencial de toronjil presentó efecto antagonista muscarínico e histaminérgico de forma no competitiva, siendo más potente su efecto antihistamínico que anticolinérgico.

El efecto antagonista de los receptores muscarínicos e histaminérgicos se encuentra relacionado, ya que ambos receptores se encuentran ligados a proteínas Gq⁽¹⁰⁾. Además los resultados obtenidos coinciden con un estudio previo en el que el estragol relaja la musculatura lisa de intestino de cobayo precontraída con KCl y bloquea las contracciones inducidas con acetilcolina e histamina⁽⁵⁰⁾.

Para incrementar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de este aceite esencial, se considero que el bloqueo de los receptores muscarínicos, también promueve a la formación de adenilciclase (AC), por lo que se evaluó si en el efecto relajante del aceite esencial está involucrada la activación de la

enzima adenilciclasa. El efecto relajante no se vio modificado con la adición de la 2'5'-dideoxiadenosina, que inactiva a la AC ni con foskolina que activa a la AC. Estos resultados indican que en el efecto relajante no esta involucrada la adenilciclasa.

La contracción muscular esta dada por un aumento de la concentración de calcio intracelular, dicho incremento esta dado principalmente por la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico provocada por la activación del segundo mensajero IP₃ después de la activación de los receptores acoplados a proteína Gq.^{(9) (10)}. También el aumento de calcio intracelular esta dado por la apertura de canales de calcio. En el MLB existen diferentes canales de calcio: los dependientes de voltaje tipo L y tipo T, que responden a diferente intensidad de voltaje y producen despolarización de la membrana al ser activados⁽⁵¹⁾. También se encuentran los canales TRP que permiten el paso del calcio hacia el citosol. La disminución del flujo de calcio ocurre con la inactivación de IP₃ o el bloqueo de los canales de calcio al igual que por la apertura de los canales de K⁺_{Ca++}, K⁺_{ATP} y Na⁺ para regular las concentraciones de calcio⁽⁸⁾. De acuerdo a los resultados el aceite esencial inhibe las contracciones inducidas por calcio a partir de concentraciones de 50 µg/mL, dato que concuerda con el antagonismo de los receptores histaminérgicos y colinérgicos porque bloquea la cascada por la que se activa el IP₃ además se demostró que bloquea el flujo de calcio hacia el interior al aumentar las concentraciones de aceite esencial.

Se ha demostrado que fármacos que abren los canales K⁺_{ATP}, inhiben la liberación de acetilcolina y reducen la contracción inducida por acetilcolina e histamina⁽⁵²⁾. Sin embargo, la adición un bloqueador de esos canales, glibenclamida, no mostró diferencia significativa con respecto a la curva dosis respuesta de aceite esencial, lo que indica que la vía relajante esta dado por una vía diferente y no por la apertura de los canales de K⁺_{ATP}

El análisis isoblográfico es una metodología que permite evaluar las respuestas biológicas de una combinación de sustancias activas, determina si son mayores, iguales o menores a las respuestas de los componentes

individuales. En este estudio el análisis isobolográfico funcionó como una herramienta auxiliar para determinar el mecanismo de acción. Al observar las curvas dosis respuesta de los fármacos antiasmáticos y del aceite esencial, el aceite esencial tiene comportamiento diferente con respecto a salbutamol e ipratropio, con números de Hill muy distintos. Esto puede deberse a que el aceite esencial tiene 2 componentes activos y por lo tanto posee más de un mecanismo de acción relajante. Al observar los isobogramas, las combinaciones experimentales se encuentran por debajo del área de aditividad, lo que indica que el aceite esencial aumenta el efecto relajante de salbutamol y de ipratropio. Sin embargo, esta distancia de los puntos experimentales con respecto al área de aditividad no es descrita estadísticamente, debido a que el área de aditividad es muy amplia, por lo que no es aplicable la estadística sugerida por Tallarida en fenómenos de este tipo ⁽⁵³⁾. La información que se obtiene de este análisis es que la acción relajante del aceite esencial complementa a la acción relajante de los fármacos antiasmáticos por sus diferentes vías de relajación.

9. CONCLUSIONES

- El efecto relajante del aceite esencial en la musculatura lisa bronquial se debe a un antagonismo no competitivo de los receptores muscarínicos e histaminérgicos.
- Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* son estragol y D-limoneno.
- El aceite esencial también bloquea la entrada de calcio
- En el efecto relajante del aceite esencial no están involucrados los receptores β adrenérgicos, la activación de adenilciclase ni la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP.
- El aceite esencial aumenta el efecto relajante de los fármacos antiasmáticos salbutamol e ipratropio.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar los componentes mayoritarios del aceite esencial (estragol y D-limoneno) individualmente y en diferentes proporciones.
- Determinar el antagonismo específico del aceite esencial sobre los receptores muscarínicos M_1 , M_2 o M_3 .
- Determinar si el aceite esencial actúa como antagonista de los leucotrienos D_4
- Realizar interacción farmacológica entre el aceite esencial y fármacos antihistamínicos.

11. REFERENCIAS

1. BéruBé K., Prytherch Z., Job C., Hughes T. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*. 2010; 278: 311-318.
2. Dekkers B., Maarsingh H., Meurs H., Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009; 6: 683-692.
3. Carroll J. Airway smooth muscle in health and disease: methods of measurement and relation to function. *The European Respiratory Journal*. 2000; 15: 782-289.
4. Chitano P. Models to understand contractile function in the airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;24: 444-451.
5. Cao R, Dong X., Jiang J., Yan X., J., Deng Y., Li F., Bao M., Xie Y., Chen X., Xie Q. M₃ muscarinic receptor antagonist bencycloquidium bromide attenuates allergic airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice. *The European Journal of pharmacology*. 2011; 655: 83-90.
6. Walker J. Gainetdinov R.,² Feldman D., McFawn P., G. Caron M., Lefkowitz R., Premont R., Fisher J. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*. 2004; 286: L312-2319.
7. Casarosa Kiechle T., Bakker R. Differential Inverse Agonism at the Human Muscarinic M₃ Receptor. *Methods in Enzymology*. 2010; 485: 81-101.
8. Belmonte K.E. Cholinergic Pathways in the Lungs and Anticholinergic Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the*

- American Thoracic Society*.2005; 2: 297-304.
9. Perez J. Karner C., Ito S., Shepherd M., Alrashdan Y., Sanderson M. J Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 22: 388–397.
 10. Billington C. Penn R. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*. 2003; 4(2): 1-23.
 11. Billington C. Penn R. M₃ Muscarinic Acetylcholine Receptor Regulation in the Airway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002; 26: 269-272.
 12. Matera Calzetta L., Rogliani P., Bardaro F., Page C.P., Cazzola M. Evaluation of the effects of the R- and S-enantiomers of salbutamol on equine isolated bronchi. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2011; 24: 221-226.
 13. Thirstrup S. Control of airway smooth muscle tone: II-Pharmacology of relaxation. *Respiratory medicine*. 2000; 94: 519-528.
 14. Díez J.M., Morán L., Rodríguez P., Juárez M.C., Puente L., Álvarez-Sala L. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica como factor de riesgo cardiovascular. *Atención primaria*. 2012.
 15. Roca-Ferrer Roca-Ferrer J., Pujols L., Agustí C., Xaubet A., Mullol J. La ciclooxigenasa-2 está regulada al alza en el pulmón y en los tumores bronquiales de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch. Bronconeumol*. 2011; 47(12): 584–589.
 16. De Zubiría Consuegra E., De Zubiría Salgado E. De Zubiría Salgado A. Asma bronquial Bogotá: Médica panamericana; 2003: 153,154.
 17. Hiperactividad bronquial. [Internet].; 2012 [citado el 10 abril del 2013]. Disponible en:

http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/Hiperactividad_bronquial.html.

18. Brasó J.V. Manual de alergia España: Elsevier; 2003: 153,154.
19. Saul D., Kendall J. Respiratory system. Applied pharmacology. *Anaesthesia and intensive care medicine*. 2011; 12(12): 542-545.
20. Bellanti J. Alergia: enfermedad multisistémica: fundamentos básicos y clínicos Madrid: Ed. Médica panamericana; 2008:146
21. Church D.S, Church M.K. Pharmacology of Antihistamines. *World Allergy Organization journal*. 2011: S22-S27.
22. Sánchez-Mendoza Castillo C., Navarrete A. Relaxant action mechanism of berberine identified as the active pinciple of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2008; 60: 229-236.
23. Rodríguez Ramos F., González M. Navarrete A. Ghaphaliin A and B relax smooth muscle or guinea-pig trachea and rat aorta via phisphodiesterase inhibition. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011; 63: 926-935.
24. Waizel H. S Waizel B. J. Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Revista Anales de Otorrinolaringología Mexicana*. 2009; 54(4): 45-71.
25. Bakkali F. Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils- a review. *Foods and chemical toxicology*. 2008; 46: 446-475.
26. Sidney de Sousa A. Gomes P. Nara A., Rufino A., Prata E., Sampio A. Antiespasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil in tracheal smooth muscle of rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2010; 120: 423-436.
27. Gomes p. de Freitas A., Prata de Sousa E., Sarampio A., Criddle D. Relaxant effects of the essential oil of *Mentha pulegium* L., in trachea and urinary bladder. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2012; 64(12):

- 1777-1784.
28. Caldas P. Lahlou S., Vasconcelos A., Leite T., henrique J. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton mephetaefolius* on the contractile activity of the guinea pig smooth muscle. *Planta médica*.2003; 69: 874-877.
 29. Bye Bye, R., Linares, E., Ramamoorthy, T.P., García, F., Collera, O., Palomino, G., Corona, V *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* y subsp. *xolocotziana* (Limanaceae). A new taxon from mexican medicinal plans. *Phytologia*. 1987; 62: 156-163.
 30. Santiago R. Rojas I., Arvizu G., Muñoz D. Pérez D., Sucilla M.. Caracterización del potencial fitotóxico de *Agastache mexicana* (kunth.) Lint et Epling. *Universitaria Multidisciplinaria*. 2005; 4(4): 14-20.
 31. Comisión Permanente de la Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea Herbolaria de Los Estados Unidos Mexicanos. Segunda edicion México: Secretaria de Salud; 2012:33,34
 32. Santillán M.A., López M., Aguilar S., Aguilar A. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2008; 79: 513- 524.
 33. Hernández O., Castillo P., Rivera I., Ibarra M., Villalobos R., González J., Vergara J. Estrada S. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*. 2009; 78: 54–61.
 34. González-Trujano M.E., Ventura M., Chávez M., Díaz I., Pellicer F.. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta médica*. 2012; 78(8): 793-796.
 35. Estrada R., Aguirre E., Aguirre E., García A., Soto M., Linares E. Bye R.,

- Heinze G., Martínez M. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. Mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004; 32: 685-694.
36. Majín M. Efecto relajante en el musculo liso traqueal de extractos y productos naturales derivados de plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Tesis de licenciatura. UNAM, Farmacia; 2007.
37. Tice R. Brigette D., Brevard B., Bonnie L., Carson B., Cavender F., Claudine A., Gregorio C., Hendry K., Morris E., M.S., Winters J. Toxicological summary for estragole. *Integrated Laboratory System*. 1999.
38. Leal J.H. Matos B. G., Lopes E.G, Viana K.V., Sampaio A.B., Brasil R.O., Coelho A.N., Albuquerque A.A.C. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37: 119-1198.
39. Muñoz A. Kouznetsov V., Stashenko E. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. *Salud*. 2009; 41: 287-294.
40. Ponte E. Sousa P., Rocha M., Soares P., Coelho A.N., Leal J.H., Assreuy A. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacological Reports*. 2012; 64: 984-990.
41. Fraca C. S. Menezes F. S. Costa L. C. B., Niculau E. S., Alves P. B. Pinto J. E. B., Marcal R. M. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. *Fitoterapia*. 2008; 79: 569-573.
42. de Cássia R. Andrade L. N. Pergentino D. A review on anti-inflammatory Activity of monoterpenes. *Molecules*. 2013; 18: 1227-1254.
43. Sun J. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. *Alternative Medicine Review*. 2007; 12(3): 259-264.

44. Hirota R. Bhatti S. A., Ngatu N. R., Muzembo B. A., Dumavibhat N., Eitoku M., Sawamura M. Limonene inhalation reduces allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-treated mice. *Inhalation toxicology*. 2012; 24(6): 373-381.
45. Park H. Hae Lee J., Yaoyao J., Jin Jun H., Joon Lee S. Limonene, a natural cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A₂A receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 404: 345–348.
46. Nadeem A. Fan M., Ansari, H., Ledent C., Mustafa S. Enhanced airway reactivity and inflammation in A₂A adenosine receptor- deficient allergic mice. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*. 2007; 292: L1335–L1344.
47. Adams R.P. Nguyen S. Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* and *F. Sperryi* in the Davis Mountains of Texas: variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Phytologia*. 2005; 87(2): 96-108.
48. Adams R.P. González Elizondo, M.S., González Elizondo, M., Slinkman, E. DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2006; 34: 205-211.
49. Wilson L. A. Senechal N. P., Widrechner M. P. Headspace analysis of the volatile oils of *Agastache*. *Journal of Agricultural and Chemistry*. 1992; 40: 1362-1366.
50. Coehlo de Souza Barata E. L., Magalhanes P.J. C., Lima C. C. Leal-Cardoso H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytotherapy research*. 1997; 11: 299-304.
51. Valverde M. A. Cantero G., Garcia A. Jung C., Carreras A., Vicente R.. Ion channels in asthma. *The journal of biological chemistry*. 2011; 286(38):

2877-3282.

52. Sutovska M. Nosalova G., Franova S. The role of potassium ion channels in cough and other reflexes in airways. *Journal of physiology and pharmacology*. 2007; 58(5): 673-683.
53. Tallarida R. J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006; 319: 1-7.
54. Lopez-Lutz D. Alviano D.S. Kolodziejczyk P.. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 2008; 69: p. 1732-1738.