



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MORELOS**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**“Caracterización química y farmacológica de  
*Salvia mexicana* en la contractilidad del  
músculo liso de las vías aéreas”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN FARMACIA**

PRESENTA:

**L.F. Alexis Raynet Montesinos Vique**

Codirectores:

**Dra. Blanca Bazán Perkins**

**Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**

**Cuernavaca, Morelos 2019**



## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo a través de la Beca de Maestría No. 825807.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por la dirección y tutoría brindada durante la elaboración de este proyecto, por su comprensión y dedicación otorgado en cada uno de los procesos implicados. Gracias por todo, es un gran amigo y ejemplo para seguir, me quedo con lo mejor de usted.

Al Dr. Ismael León Rivera por la ayuda brindada con los espectros espectroscópicos.

A la Dra. Gabriela Maria Avila Villarreal por la ayuda brindada durante el análisis cromatográfico de las muestras estudiadas.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a la Facultad de Farmacia por permitirme usar sus instalaciones y por la formación académica y humana brindada durante el transcurso de mi licenciatura.





*A mis padres:*

*J. R. Montesinos y Guadalupe Víque*

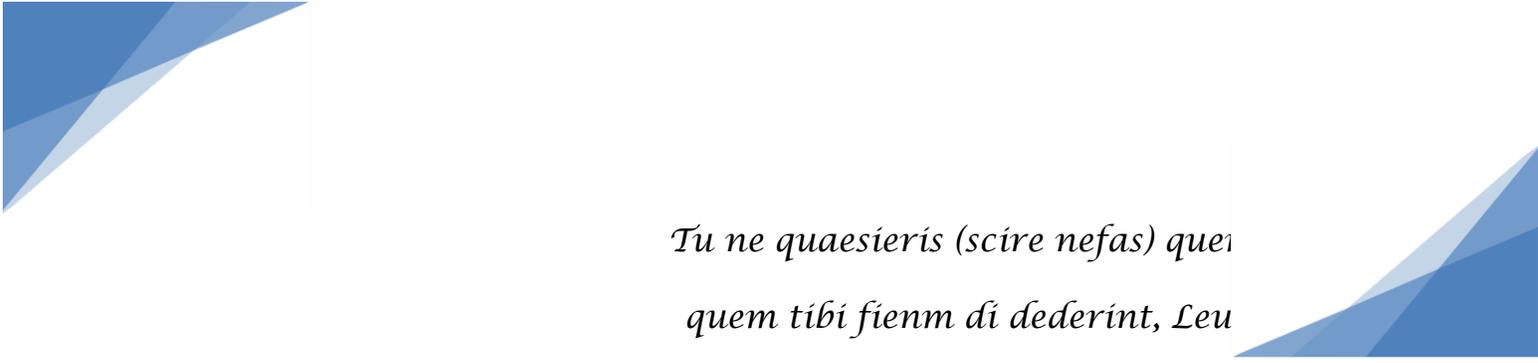
*Nuevamente aquí me encuentro, agradeciendo a ustedes, otro escalón más alcanzado.*

*Gracias por su apoyo incondicional, por enseñarme a luchar con razón, por su ejemplo, amor y confianza, a ustedes que fueron testigos del camino andado para llegar hasta aquí y porque sé que mi sueño era el suyo también.*

*Porque solo la superación de mis ideales, me han permitido comprender cada día más, la difícil posición de ser padres, mis conceptos, mis valores morales y mi superación se las debo a ustedes, lo reconozco y lo agradeceré eternamente.*

*El logro hoy alcanzado es también de ustedes, resultado de sus esfuerzos, sacrificios y el tiempo invertido en mí. Por lo que ha sido y será Gracias. Con amor y admiración.*

*Alexis Montesinos*



*Tu ne quaesieris (scire nefas) quem  
quem tibi finem di dederint, Leu  
...carpe diem, quam minimum credula postero.*

*Memento Mori.*

(Horacio, Oda 1)

*No busques el final que a tí o a mí nos tienen reservado los  
dioses (que por otra parte es sacrilegio saberlo), oh Leuconoé...  
Aprovecha el día de hoy, y no confíes en el mañana.  
Recuerda que vas a morir.*





# ÍNDICE

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Salvia mexicana</i> .....	4
2.1.1 Composición química.....	5
2.1.2 Estudios farmacológicos .....	8
2.2 Aparato respiratorio.....	10
2.3 Tráquea.....	12
2.4 Bronquios y bronquiolos .....	12
2.5 Funciones (tráquea, bronquios y bronquiolos).....	13
2.6 Mecanismo de contracción en la musculatura lisa de las vías aéreas .....	14
2.7 Asma.....	16
2.7.1 Epidemiología .....	18
2.8 Tratamiento.....	19
2.9 Farmacología .....	19
2.9.1 Fármacos broncodilatadores.....	19
2.9.2 Agonistas $\beta_2$ .....	20
2.9.3 Teofilina .....	21
2.9.4 Anticolinérgicos.....	21
2.9.5 Fármacos controladores (ICS) .....	21
2.9.6 Anti- IgE.....	22

2.10 Estrategia escalonada en el tratamiento contra el asma.....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>31</b>
<b>6. METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
6.1 Obtención de los extractos .....	33
6.2 Estudio químico biodirigido.....	33
6.2.1 Caracterización estructural .....	33
6.3 Determinación del efecto relajante de los extractos y fracciones sobre anillos de tráquea aislados de rata.....	33
6.3.1 Animales.....	33
6.3.2 Reactivos.....	33
6.3.3 Obtención del tejido .....	34
6.3.4 Sistema de registro .....	34
6.3.5 Proceso de estabilización y sensibilización .....	34
6.3.6 Evaluación <i>ex vivo</i> del efecto relajante, sobre la contracción inducida por carbacol 1 $\mu$ M; en anillos de tráquea aislados de rata .....	34
6.4 Determinación del mecanismo de acción .....	35
6.4.1 Participación de los receptores muscarínicos .....	35
6.4.2 Bloqueo de receptores $\beta$ adrenérgicos.....	36
6.4.3 Inhibición de fosfodiesterasas .....	36
6.4.4 Participación de la vía NO-GMPc e inhibición de la enzima guanilato ciclasa ..	37
<b>7. Resultados .....</b>	<b>40</b>
7.1 Selección de las especies de estudio y obtención de extractos.....	40
7.2 Estudio químico de <i>Salvia mexicana</i> .....	41
7.2 Actividad relajante de los extractos de las especies en estudio.....	59



7.3 Determinación del mecanismo de acción del extracto hexánico de <i>Salvia mexicana</i> .	61
7.3.1 Participación de los receptores muscarínicos	62
7.3.4 Participación de la vía NO-GMPC e inhibición de la enzima Guanilato ciclasa	65
7.3.5 Bloqueo de receptores $\beta$ adrenérgicos	71
7.3.6 Inhibición de fosfodiesterasas	76
<b>8. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>59</b>
<b>10. Referencias bibliográficas</b>	<b>83</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Salvia mexicana</i> .....	4
<b>Figura 2</b> Principales metabolitos encontrados en el género salvia.....	6
<b>Figura 3</b> Curva concentración respuesta del efecto contráctil de CaCl <sub>2</sub> sobre anillos de tráquea aislados de rata en ausencia y presencia de SmED .....	9
<b>Figura 4</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmED sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME.....	10
<b>Figura 5</b> Visión general del sistema respiratorio.....	11
<b>Figura 6</b> Anatomía de las vías respiratorias inferiores .....	13
<b>Figura 7</b> Inervación del músculo liso por fibras nerviosas autónomas .....	14
<b>Figura 8</b> Mecanismo de contracción en la musculatura lisa de las vías aéreas .....	15
<b>Figura 9</b> Vías respiratorias antes y después del asma.....	16
<b>Figura 10</b> Mecanismos de acción de agonista $\beta_2$ y fosfodiesterasas.....	20
<b>Figura 11</b> Estrategia escalonada en el abordaje del asma.....	25
<b>Figura 12</b> Procedimiento general para la determinación del efecto relajante de las muestras de prueba.....	35
<b>Figura 13</b> Procedimiento general para la determinación de la participación de los receptores muscarínicos .....	35
<b>Figura 14</b> Procedimiento general para determinar la participación de los receptores $\beta$ Adrenérgicos .....	36
<b>Figura 15</b> Procedimiento general para determinar la participación de los extractos de prueba en la relajación del músculo liso a través de la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas.....	36
<b>Figura 16</b> Procedimiento general para determinar la participación de los compuestos de prueba en la relajación del músculo liso utilizando inhibidores enzimáticos .....	37
<b>Figura 17</b> Proceso de obtención del precipitado de SmEH.....	41
<b>Figura 18</b> Cromatografía en capa fina de pS1-pS5 .....	42
<b>Figura 19</b> Resumen general de la purificación de los pp obtenidos de SmEH.....	42

<b>Figura 20</b> Estructura del Ácido oleanólico .....	<b>43</b>
<b>Figura 21</b> Cromatograma UHPLC, de PS1.....	<b>44</b>
<b>Figura 22</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz) Ácido Oleanólico en DMSO-.....	<b>47</b>
<b>Figura 23</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (400 MHz) Ácido Oleanólico en DMSO-d6.....	<b>48</b>
<b>Figura 24</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz) de PS4 en DMSO-d6.....	<b>49</b>
<b>Figura 25</b> Cromatogramas gases/masa del precipitado PS4 .....	<b>50</b>
<b>Figura 26</b> Espectro de masas, tomado a un tiempo de 36.143min, m/z 464::.....	<b>51</b>
<b>Figura 27</b> Fraccionamiento cromatográfico de SmED::.....	<b>52</b>
<b>Figura 28</b> Precipitados obtenidos a partir del fraccionamiento de SmED.....	<b>53</b>
<b>Figura 29</b> Placas cromatograficas de los precipitados obtenidos a partir del fraccionamiento de SmED.....	<b>54</b>
<b>Figura 30</b> Estructuras químicas del Ácido ursólico y betulínico.....	<b>55</b>
<b>Figura 31</b> Cromatograma UHPLC, de PSD11.....	<b>57</b>
<b>Figura 32</b> Cromatograma UHPLC, de PSD11.....	<b>58</b>
<b>Figura 33</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de los extractos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos sobre anillos de tráquea aislados de rata.....	<b>59</b>
<b>Figura 34</b> Porcentaje de inhibición del efecto contráctil de diversos precipitados sobre anillos de tráquea.....	<b>61</b>
<b>Figura 35</b> Curva concentración respuesta del efecto contráctil de carbacol sobre anillos de tráquea aislados de rata en ausencia y presencia de SmED y SmEH.....	<b>62</b>
<b>Figura 36</b> Mecanismo de acción de los receptores muscarínicos .....	<b>63</b>
<b>Figura 37</b> Mecanismo de acción de la vía NO-GMPC.....	<b>65</b>
<b>Figura 38</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME .....	<b>66</b>

<b>Figura 39</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de PS4 sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME .....	<b>67</b>
<b>Figura 40</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante del Ácido betulínico sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME .....	<b>69</b>
<b>Figura 41</b> Mecanismo de acción de los receptores $\beta$ adrenérgicos.....	<b>71</b>
<b>Figura 42</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH y SmED sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Isoproterenol.....	<b>72</b>
<b>Figura 43</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Propanolol.....	<b>73</b>
<b>Figura 44</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de PS4 sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Propanolol.....	<b>75</b>
<b>Figura 45</b> Mecanismo de acción de las fosfodiesterasas .....	<b>76</b>
<b>Figura 46</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante de teofilina sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia y ausencia de SmEH y SmED.....	<b>77</b>



## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Principales metabolitos presentes en <i>Salvia mexicana</i> y actividades farmacológica reportada.....	<b>7</b>
<b>Tabla 2</b> Principales fármacos utilizados en el tratamiento contra el asma .....	<b>23</b>
<b>Tabla 3</b> Clasificación del asma según niveles de severidad .....	<b>24</b>
<b>Tabla 4</b> Obtención de los extractos de las especies en estudio.....	<b>41</b>
<b>Tabla 5</b> Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz) y <sup>13</sup> C-RMN (400 MHz) del Ácido Oleanólico en DMSO-d6.....	<b>416</b>
<b>Tabla 6</b> Comparación de efecto máximo y potencia de los extractos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos de la especie en estudio .....	<b>60</b>



## Abreviaturas

Abreviatura	Concepto
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva cincuenta
<b>CONABIO</b>	Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>E<sub>máx</sub></b>	Efecto máximo
<b>GINA</b>	iniciativa global para asma
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>ICS</b>	Corticosteroides inhalados
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>LABA</b>	Agonistas □ de acción prolongada
<b>L-NAME</b>	<i>N</i> ω-Nitro-L-arginine methyl ester (inglés)
<b>m</b>	Metro
<b>MLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de miosina
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células □ activadas
<b>OCS</b>	Corticoesteroides orales
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (inglés)
<b>PEF</b>	Flujo espiratorio máximo
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol bifosfato
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SABA</b>	Agonistas □ de acción corta



**SD**

Desviación estándar

**SmED**

*Salvia mexicana* extracto diclorometánico

**SmEH**

*Salvia mexicana* extracto hexánicos

**SmEM**

*Salvia mexicana* extracto metanólicos

**VEF<sub>1</sub>**

Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

Microgramos

**µg**

Micromolar

**µM**



## RESUMEN

El presente trabajo utiliza el conocimiento empírico sobre el uso de los productos naturales, y lo enfoca en la búsqueda de moléculas bioactivas obtenidas a partir de *Salvia mexicana* con el fin de buscar una posible actividad farmacológica útil en el tratamiento del asma.

Se obtuvieron los extractos de la especie estudiada, mediante maceraciones exhaustivas con disolventes de diferente polaridad, posteriormente los extractos: hexánico (SmEH), diclorometánico (SmED) y metanólico (SmEM), se llevaron a sequedad. Al resultante se le determinó el efecto relajante en anillos de tráquea aislados de rata, sometidos a un sistema de registro isométrico vertical y mantenidos en condiciones y fisiológica. Posteriormente, se construyeron curvas concentración respuesta y el efecto de los extractos se determinó mediante la comparación con el efecto del control positivo (teofilina). Posteriormente, se seleccionaron los extractos SmEH y SmED para elucidar el posible mecanismo de acción, utilizando diversos inhibidores y agonistas involucrados en el proceso de señalización de las vías respiratorias. Por último, se realizó el fraccionamiento del extracto diclorometánico, en una columna de vidrio, empleando diversos sistemas de elución y aplicando técnicas convencionales, el análisis de las fracciones obtenidas se realizó por cromatografía en capa fina, y se utilizó una lámpara de UV para la visualización de las placas, así como de diversos agentes reveladores, se obtuvieron de este proceso un total de 13 precipitados de los cuales dos han sido caracterizados como ácido ursólico y ácido betulínico.

Con lo que respecta al mecanismo de acción se observando que el mecanismo de acción de SmED y SmEH resultaron ser completamente distintos, mientras el primero tiene una fuerte participación en canales de calcio dependientes de voltaje, el extracto hexánico participa fuertemente en la vía de los receptores B adrenérgico; esta diferencia en mecanismos de acción es debido a que ambos extractos presentan composición metabólica diferente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano, una especie curiosa, siempre tratando de superarse día con día, para de esta forma alcanzar el bienestar máximo posible, ya sea físico, mental o espiritual.

Siempre observando su entorno y aprendiendo de él; en un inicio organizados en pequeños grupos nómadas, exploraban el territorio buscando cobijo temporal en cuevas, y buscando sustento en la práctica de la caza, pesca y recolección de flora silvestre. Convirtiéndose en grandes conocedores de las propiedades alimenticias y terapéuticas de la flora silvestre, conocimiento, que se ha ido transmitiendo y concentrando a lo largo de las generaciones; evidencia de ello son una gran cantidad de compilaciones, libros y documentos que reportan los usos de diversos productos naturales útiles en el tratamiento de diversas enfermedades, un claro ejemplo de ello es el código de la cruz-badiano, libro representativo de la medicina tradicional mexicana de la época prehispánica.

Durante mucho tiempo, la naturaleza ha sido la única proveedora de medicamentos. Ahora bien, desde el advenimiento de la física y de la química, el hombre inventa cada día nuevas moléculas, sin embargo, esto no es suficiente. De tal manera, el reino vegetal sigue desempeñando un papel importante, siendo una mina moléculas nuevas, usadas con fines farmacológicos, ya que la imaginación humana nunca superara a la naturaleza.

Este trabajo hace uso del conocimiento etnomédico, y lo enfoca en la búsqueda de moléculas bioactivas obtenidas a partir de *Salvia mexicana* con el fin de buscar una posible actividad farmacológica útil en el tratamiento del asma y/o enfermedades asociadas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# ANTECEDENTES

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Salvia mexicana*

Sinonimia botánica: *Salvia hispánica* (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, 2015)

*Salvia mexicana* conocida como “salvia española”, “artemisa española”, “chía mexicana”, “chía negra” o simplemente “chía”, es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia de las Labiatae ó Lamiacea (Bueno *et al.*,2010).

El género salvia incluye arbustos trepadores y hierbas anuales perennes con flores que presentan cáliz y corola bilabiados, es el género más extenso de su familia (lamiaceas), y existen alrededor de 1000 especies. Se distribuyen ampliamente por todo mundo, encontrándose aproximadamente 500 de estas especies en el continente americano.

*Salvia hispánica*, especie nativa del centro, sur de México y Guatemala, donde históricamente ha sido considerada como un ingrediente alimentario esencial. Presenta tallos delgados y erectos, pueden alcanzar un tamaño de 1.5 m de altura, con hojas estrechas y puntiagudas, de bordes lisos, dentados, peludos y suaves de color verde, Presenta una floración anual en verano, la cual es característica por la presencia pétalos de color púrpura y / o blanco, las semillas ovaladas de *Salvia hispánica* son aproximadamente 1 mm de diámetro y son de color marrón oscuro a grisáceo de color blanco. (Monroy Ortiz & Castillo España, 2007).



**Figura 1**

*Salvia mexicana* (Instituto Nacional Indigenista, 2009).

El origen del uso *Salvia hispánica* se encuentra en América Central, donde su semilla fue asada y molida en "pinole" e incorporado en muchos alimentos en la antigua dieta azteca. los mensajeros tenían fama de consumir semillas de *Salvia hispánica* para mantener la energía, y se lo conocía como "alimento para correr" (Cahill, 2003). El cultivo de *Salvia hispánica* terminó con la caída de la civilización azteca; Sin embargo, el concepto de *Salvia hispánica* como suplemento nutricional, también para animales como humanos, se reintrodujo fuertemente en las últimas décadas.

En el Estado de México y Morelos es utilizada para curar la enfermedad cultural denominada aire; en combinación con otras plantas como hinojo (*Foeniculum vulgare*) o canela, se suelen preparar infusiones para el tratamiento de enfermedades respiratorias, tos, dolor de pecho y dolor de pulmón. De igual forma se emplea contra las afecciones gástricas e intestinales, y concretamente sus procesos inflamatorios (Instituto Nacional Indigenista, 2009).

Las semillas de la Chía actualmente no es lo único que se consume, sino también se preparan aceites esenciales, ya que produce efectos similares, siendo utilizados principalmente como un producto alimenticio. El aceite también se usa popularmente como ingrediente dietético utilizado en varios suplementos dietéticos disponibles en el mercado de EE. UU.

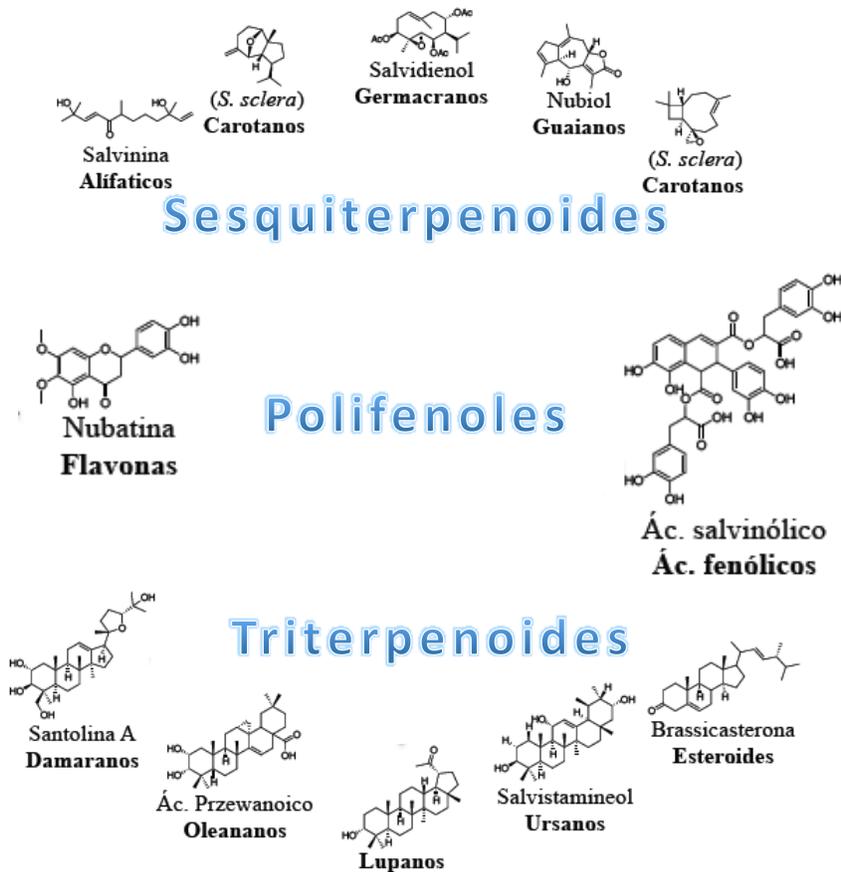
El USP define a el aceite de semillas como el aceite extraído de las semillas mediante prensado en frío y excluye el uso de solventes o calor externo en el proceso de extracción. Para propósitos de preservar el aceite, los tocoferoles pueden ser agregado como antioxidantes. Debido al uso creciente de chía aceite de semilla en suplementos dietéticos, el USP desarrolló recientemente una norma de calidad pública para el aceite de semilla de chía para proporcionar suplementos dietéticos.

### **2.1.1 Composición química**

El estudio químico de diversas especies de *Salvia* ha permitido establecer que este género presenta una gran cantidad de metabolitos secundarios bioactivos, de las 1000 especies de este género, aproximadamente solo 134 especies han sido estudiadas, con la finalidad de saber su composición metabólica. Como resultado de estos trabajos se sabe que sus principales componentes químicos son di terpenos tricíclicos (carnasol y somanolol), triterpenos como el ácido ursólico, linolénico, taninos, así como flavonoides y ácidos fenólicos; los diterpenoides son los constituyentes mas abundantes y característicos de las salvias con estructuras muy variadas y pueden ser principalmente del tipo primarano,

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

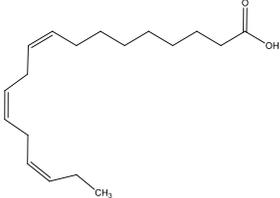
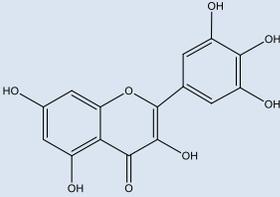
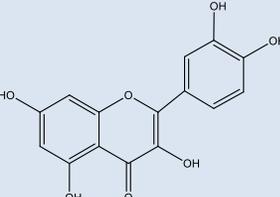
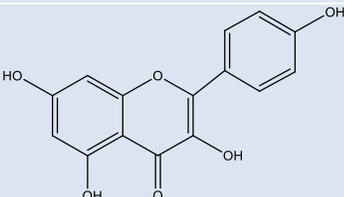
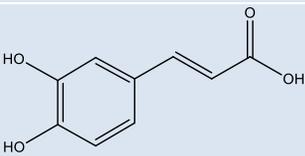
labdanos, abietano y clerodano, siendo estos últimos dos los más abundantes (Bonito et al., 2011; Reza et al., 2016; Wu et al., 2012).



**Figura 2** Principales metabolitos encontrados en el género salvia. (Bonito et al., 2011; Reza et al., 2016; Wu et al., 2012)

Sin embargo los diterpenos no son los únicos componentes abundantes en el género salvia, también se ha reportado la presencia flavonoides, en la tabla número 1 se muestran algunos de estos metabolitos y su actividad farmacológica reportada (Norlailly Mohd Ali et al., 2012). Estudios farmacológicos de compuestos como la Miricetina, Quercetina y Kaempferol en miocitos de arteria de cola de rata han demostrado tener actividad como bloqueadores de canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (Saponara S. et al., 2011). De igual forma el ácido cafeico ha demostrado tener propiedades antiasmáticas regulando las vías aéreas mediante la vía de señalización sensibles a especies reactivas de oxígeno (ROS) MAPK/Akt. (Ma Y et al., 2016).

**Tabla 1** Principales metabolitos presentes en *Salvia mexicana* y actividades farmacológica reportada

Compuestos activos	Estructura	Actividad biológica
<b>Omega 3 Ácido alfa linolénico ; <math>\omega</math>-3 ALA</b>		Disminuye TG y colesterol, antiinflamatorio, cardio protector y hepato protector, antidiabético, protección contra cáncer, enfermedades autoinmunes y artritis.
<b>Miricetina</b>		Antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y actividades antitrombóticas, antihipertensivos.
<b>Quercetina</b>		
<b>Kaempferol</b>		
<b>Ácido cafeico</b>		

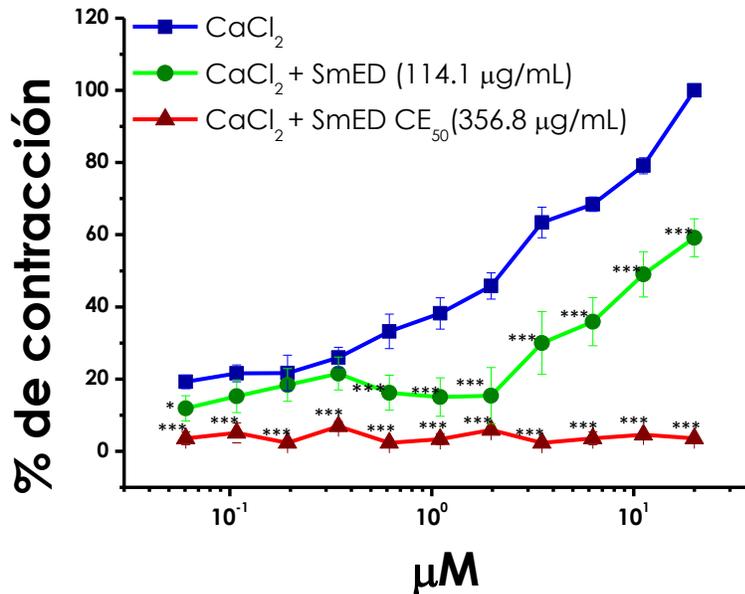
### 2.1.2 Estudios farmacológicos

Con lo que respecta a estudios farmacológicos Ayerza y Coates (2015), evaluaron la actividad inmune estimulante de la chía y concluyeron que el producto tiene ventajas estratégicas sobre otros productos de PUFA omega-3 en condiciones de alivio tales como diarrea, alergias, pérdida de peso y problemas digestivo. Se descubrió que Chía tiene un efecto comparable al del aceite de pescado en parámetros como es peso corporal, peso del timo, numero de timocitos y niveles de inmunoglobulina. Este estudio es el único con este enfoque en el sistema inmune, el conocimiento actual de los efectos inmunoestimulantes de la chía es muy escaso.

Hablando de su actividad antioxidante y antihipertensivo *in vitro*; Rahman et al. (2012), realizó un estudio en el que afirman que *S. hispánica* presenta potencial antioxidante. La hidrólisis de chía produce péptidos bioactivos con bajo peso molecular. Estas moléculas han demostrado ser inhibidores de las enzimas conversoras de angiotensina y presentan actividad antioxidante. Un estudio realizado por Salazar-Vega et al. (2009) mostró que, hidrolizados de proteína de semillas de chía, tenían un efecto inhibitor en la enzima convertidora de angiotensina que era varias veces más potente que *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae) y *Phaseolus vulgais* L. (Fabaceae). Esto sugiere que la chía actúa como donante de electrones y captor de radicales libres lo que proporciona protección antioxidante y consecutivamente actividad antihipertensiva. El efecto antioxidante y posibles efectos antihipertensivos también fueron implicados en un estudio de Orono-Tamayo et al. (2013), en el que una simulación gastrointestinal con chía resultó en una alta actividad antirradical contra 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzothiazoline,6- sulfónico), 2,2-difenila-1-picrilhidrazilo, así como actividad sobre la enzima de conversión de angiotensina.

Por otro lado estudios farmacológicos previos Montesinos Vique et al., (2016), sugieren que el extracto diclorometánico de *Salvia mexicana* presenta un efecto relajante dependiente de la concentración, en la que participan diversas vías de señalización: Actúa principalmente mediante el bloqueo directo de canales de calcio (figura 3), lo que genera una disminución del calcio intracelular y por consiguiente se inhibe la contracción de las células de la musculatura lisa presente en la tráquea de rata.

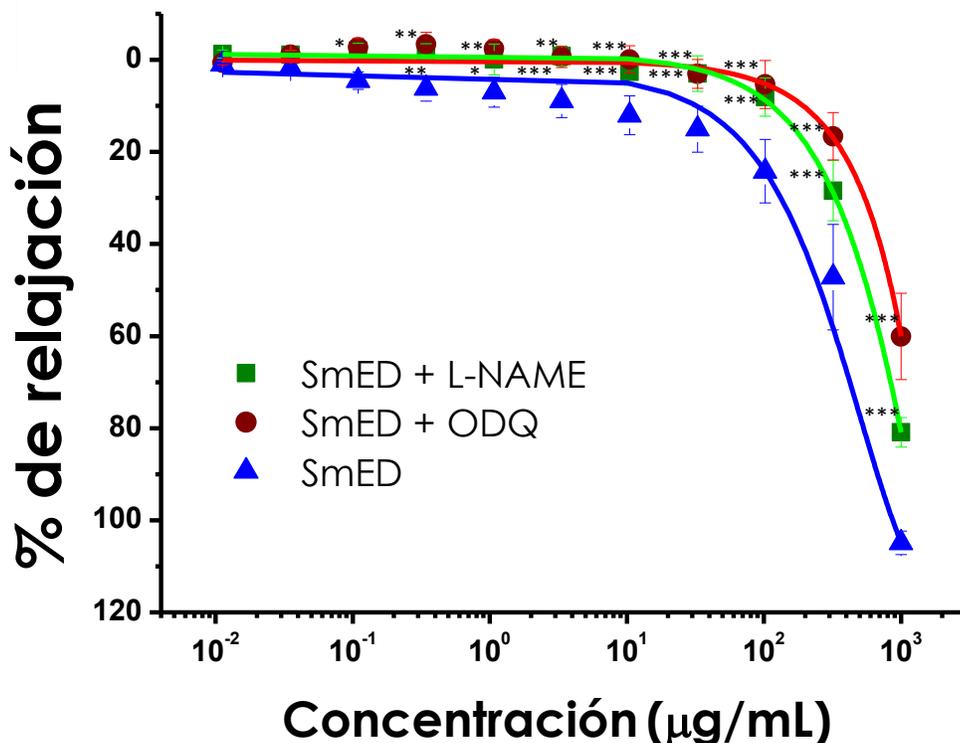
Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 3** Curva concentración respuesta del efecto contráctil de CaCl<sub>2</sub> sobre anillos de tráquea aislados de rata en ausencia y presencia de SmED. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*\*) P < 0.001 y \*\* P < 0.01

En la vía NO-GMPC e inhibición de la enzima Guanilato ciclasa, se observó que a partir de la de la concentración de 0.00351 µg/mL, la curva de respuesta en presencia de L-NAME se desplazó de manera estadísticamente significativa hacia la derecha y sin lograr alcanzar el efecto máximo, lo cual es indicativo está actuando en la activación parcial de NO. Mientras cuando se incubó ODQ, se apreció un desplazamiento significativo hacia la derecha a partir de la concentración (0.01099 µg/mL) y sin alcanzar la relajación máxima obtenida sin este inhibidor, lo cual nos indica que la disminución de GMPC está relacionado con un decremento del efecto relajante de SmED. Por lo que se concluyó que el extracto está actuando de manera parcial mediante la vía de NO/GMPC (Figura 4).

Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 4** Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmED sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME.

ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*P<0.001; \*\*P<0.01; \*P<0.05 vs control).

En este contexto, se realizará un estudio químico biodirigido de *Salvia mexicana* con la finalidad de buscar las moléculas bioactivas responsables actividad farmacológica, en la musculatura lisa de las vías aéreas, con posible aplicación para el tratamiento del asma y/o enfermedades asociadas.

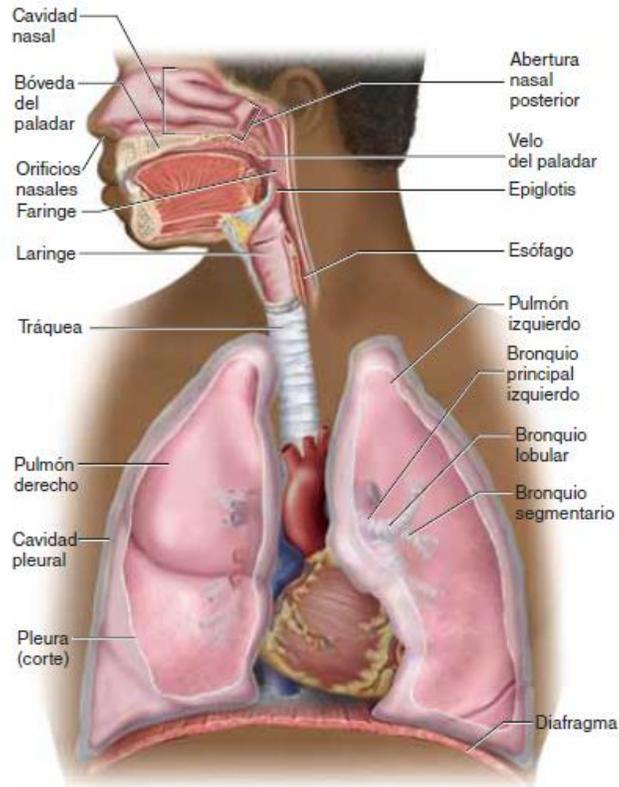
## 2.2 Aparato respiratorio

La respiración es la función mediante la cual los seres vivos, ya sean unicelulares o pluricelulares, adquieren el oxígeno presente en el medio y desechan el dióxido de carbono que resulta de la actividad celular.

El aparato respiratorio y cardiovascular humano cooperan para realizar esta función, siendo el primero el encargado del intercambio gaseoso, mientras que el aparato cardiovascular es el que transporta la sangre que contiene los gases de los pulmones y las células (Guyton & Hall, 2011).

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

EL aparato respiratorio abarca la nariz, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones como se puede apreciar en la figura 5. Cada una de sus partes se puede clasificar de acuerdo con su estructura y función (Saladin, 2012).



**Figura 5** Visión general del sistema respiratorio (Saladin, 2012)

Si hablamos de la estructura, se puede clasificar en aparato respiratorio superior e inferior; el primero abarca la nariz, la faringe y las estructuras asociadas; mientras que el inferior incluye la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones.

De acuerdo con su función lo podemos clasificar como:

- 1) La zona de conducción; la cual consiste en un conjunto de cavidades y tubos interconectados fuera y dentro de los pulmones (la nariz, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos), su principal función es filtrar, calentar y humectar el aire, para finalmente conducirlo a los pulmones.

- 2) La zona respiratoria; está conformada por tejidos dentro de los pulmones, lugar donde se da el intercambio gaseoso (bronquios respiratorios, conductos alveolares, los sacos alveolares y los alvéolos) (Tortora & Derrickson, 2013).

### 2.3 Tráquea

La tráquea es un conducto aéreo tubular, aproximadamente mide 12 cm de largo y 2.5 de diámetro; se encuentra por delante del esófago y se extiende desde la laringe hasta el borde superior de la quinta vértebra torácica, lugar donde se divide en los bronquios primarios derecho e izquierdo (figura 6).

La pared de la tráquea está conformada por diversas capas:

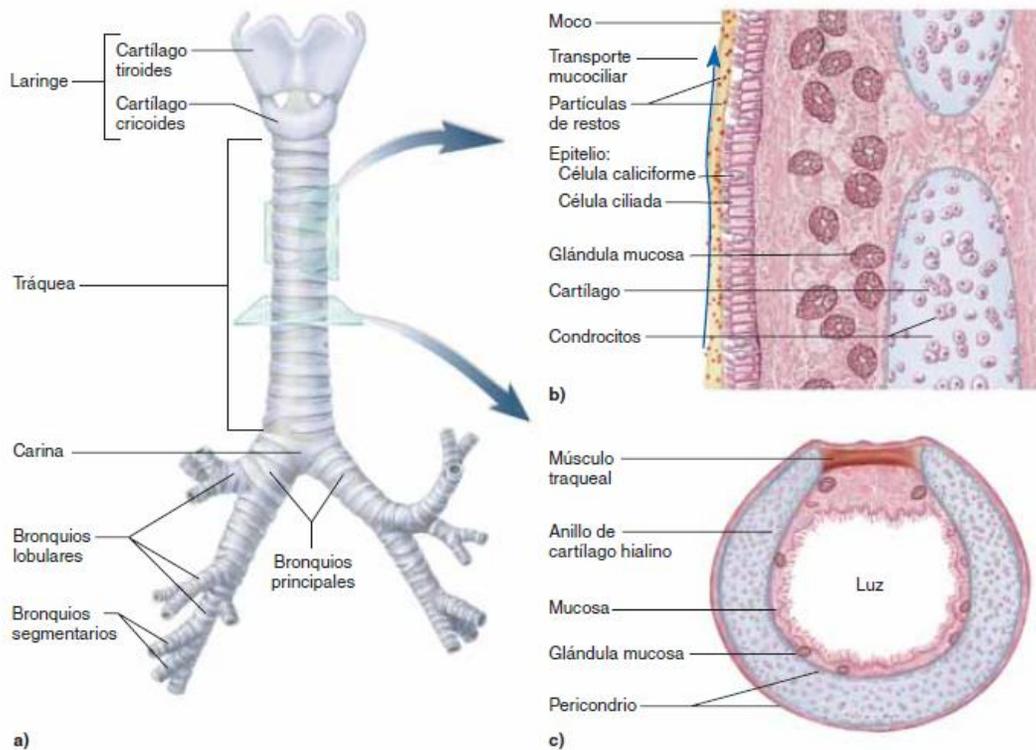
- a) Mucosa, la cual es una capa de epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado y una capa subyacente de lámina propia que contiene fibras elásticas y reticulares.
- b) Submucosa, está constituida por tejido conectivo areolar que contiene glándulas seromucosas y sus conductos.
- c) Cartílago hialino, consta de 16 a 20 anillos incompletos, superpuestos y parecidos a una letra "C". La parte abierta de cada anillo se encuentra del lado del esófago, lo que permite a este expandirse durante la deglución. El músculo traqueal y el tejido conectivo son los que permiten estabilizar los extremos abiertos de los anillos.
- d) La adventicia consta de tejido conectivo cuya función es unir a la tráquea con los tejidos circundantes (Tortora & Derrickson, 2013).

### 2.4 Bronquios y bronquiolos

La tráquea se bifurca en dos conductos, los bronquios, en una zona llamada carina. Estos están conformados por un conjunto de anillos cartilaginosos y completos en los más finos, los cuales se dirigen hacia los pulmones, ingresando por el hilio pulmonar.

En la entrada de los pulmones, los bronquios se dividen en otros más pequeños (bronquios lobulares); estos se siguen ramificando hasta dar lugar a los bronquios segmentarios, estos últimos se dividen y dan lugar a los bronquiolos; éstos se siguen ramificando continuamente y formando el árbol bronquial (Tortora & Derrickson, 2013).

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 6** Anatomía de las vías respiratorias inferiores.

a) Vista anterior. b) Corte longitudinal de la tráquea que muestra la acción del transporte mucociliar. c) Corte transversal de la tráquea que muestra el cartílago traqueal en forma de "C" (Saladin, 2012).

### 2.5 Funciones (tráquea, bronquios y bronquiolos)

Uno de los problemas más importantes de las vías respiratorias, es mantenerlas abiertas para permitir el paso fácil del aire a los alvéolos y su salida de ellos.

Los anillos cartilaginosos que se encuentran rodeando cinco sextas partes de la tráquea, evitan el colapso de esta. Mientras que, en las paredes de los bronquios, existen placas de cartílago menos extensas, las cuales mantienen un grado estable de rigidez, permitiendo a los pulmones contraerse y expandirse.

En todas las partes aéreas de la tráquea y de los bronquios no ocupados por placas de cartílago, las paredes están conformadas en su mayoría de músculo liso. Esto mismo ocurre

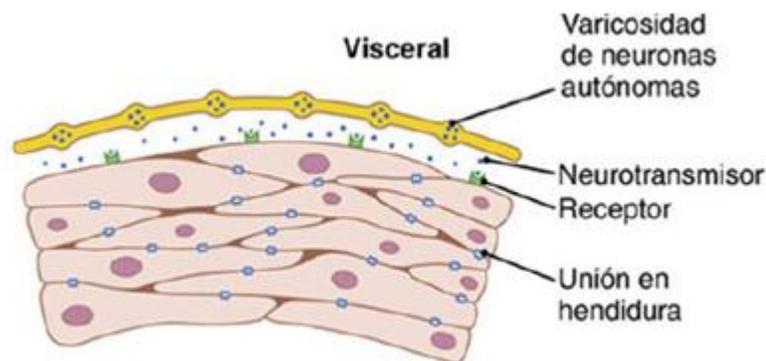
en los bronquiolos, con excepción del último y más pequeño que sólo está compuesto por epitelio pulmonar y únicamente presenta algunas fibras de músculo.

En condiciones normales el aire entra por las vías respiratorias fácilmente con un gradiente de presión menor a 1 cm H<sub>2</sub>O de los alvéolos a la atmósfera para generar un flujo aéreo suficiente para mantener una respiración tranquila.

La mayoría de las enfermedades obstructivas de los pulmones se debe al estrechamiento de los bronquios más pequeños, y de los bronquiolos, con frecuencia por una contracción excesiva del propio músculo liso; un claro ejemplo de esto es el asma (Guyton & Hall, 2011).

## 2.6 Mecanismo de contracción en la musculatura lisa de las vías aéreas

La contracción muscular se produce cuando un potencial de acción viaja a lo largo de una fibra muscular y forma uniones difusas con el músculo liso, posterior a esto se secretan la sustancia transmisora (acetilcolina) hacia el recubrimiento de matriz del músculo, después de esto el neurotransmisor difunde al interior de las células (figura 7).



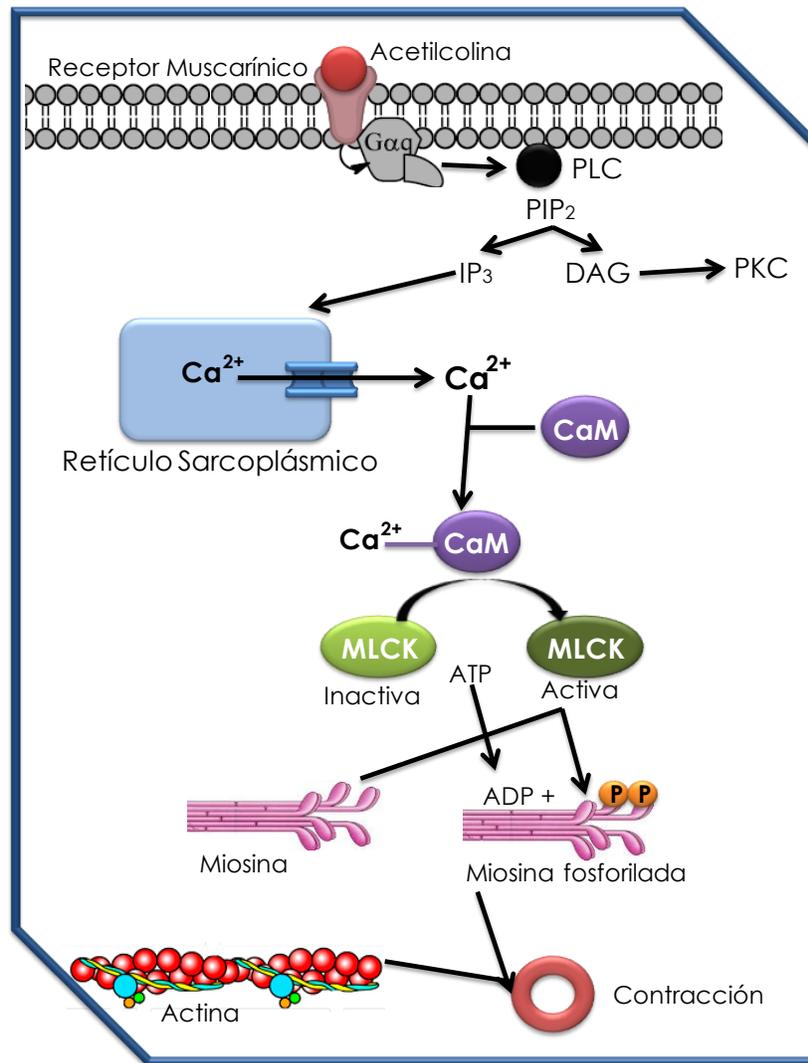
**Figura 7**

Las células unitarias de la musculatura lisa están conectadas por uniones en hendidura, de esta forma la despolarización puede difundirse rápidamente entre células (Guyton & Hall, 2011).

La acetilcolina se unirá al receptor muscarínico (receptores metabotrópicos puesto que presenta siete dominios transmembranales y se encuentra acoplado a proteína) y se desprende la subunidad alfa de la proteína G, la cual regulará positivamente la actividad de fosfolipasa C, enzima que se encuentra en la membrana y se encarga de hidrolizar

Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

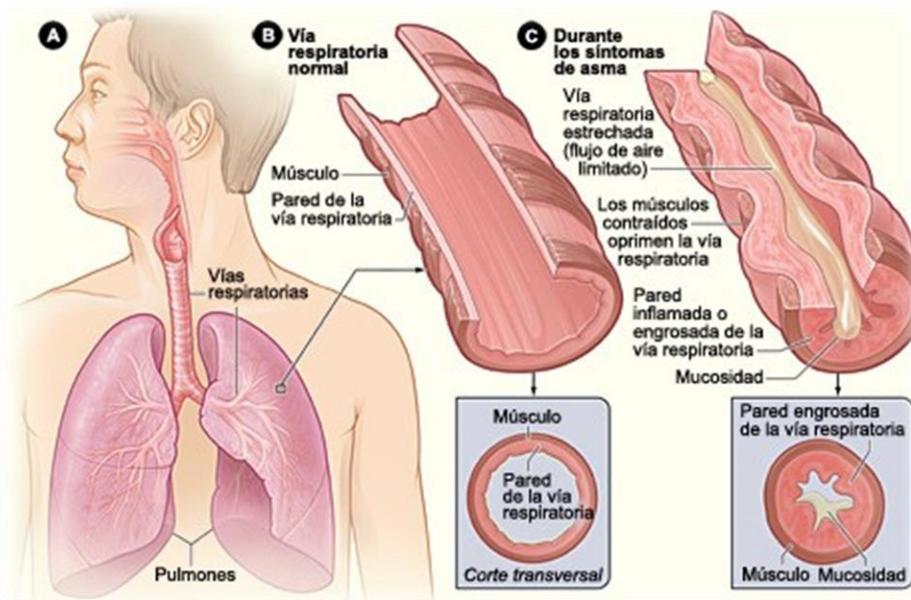
fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> difunde a través del citoplasma y se une con su receptor específico en retículo sarcoplásmico, lo que conlleva a la liberación de calcio, aumentando de esta forma las concentraciones de calcio intracelular. Estos iones se unirán de manera reversible con la calmodulina, formándose el complejo calcio-calmodulina, el cual se unirá a la miosina cinasa de cadena ligera (MLCK), enzima cuya función es fosforilar una de las cadenas ligeras de cada una de las cabezas de miosina, denominada cabeza reguladora, cuando esta se encuentra fosforilada tiene la capacidad de unirse repetitivamente al filamento de actina, produciendo de esta manera la contracción muscular (figura 8) (Webb, 2003).



**Figura 8** Mecanismo de contracción en la musculatura lisa de las vías aéreas (imagen propia).

## 2.7 Asma

El asma es una enfermedad compleja, heterogénea y variable de las vías aéreas caracterizado por inflamación persistente e hiperreactividad bronquial en el que participan diversas células (Global Initiative for Asthma, 2016). La limitación del flujo aéreo es derivada de un broncoespasmo agudo, edema de la pared bronquial, formación de tapones de moco, inflamación, así como de la remodelación bronquial (Sienra Monge *et al.*, 1999).



**Figura 9** Vías respiratorias antes y después del asma

La figura A muestra la ubicación de los pulmones y las vías respiratorias en el cuerpo. La figura B muestra un corte transversal de una vía respiratoria normal. La figura C muestra un corte transversal de una vía respiratoria durante los síntomas de asma (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2015).

La forma más común de asma es de origen alérgico. Esta ocurre en dos principales fases, durante la primera fase, se produce la sensibilización al alérgeno, el cual será atrapado y procesado por las células presentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas y macrófagos, posterior a esto los péptidos resultantes son presentados mediante el complejo de histocompatibilidad de tipo II a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inmaduros (Ying *et al.*, 2006), los cuales en presencia de IL-4 se diferenciara a un linfocito Th2 secretor

de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, dichas interleucinas participan tanto en la maduración y el reclutamiento de eosinófilos a la vía respiratoria, como en la secreción de mediadores por parte de los mismos (IL-5) y en la activación de los linfocitos B (IL-4, IL-9 e IL-13), dando como resultado linfocitos productores de IgE, esta IgE se trasladará a la superficie de las células cebadas y se unirá mediante su receptor de alta afinidad (FcεRI), concluyendo de esta forma el proceso de sensibilización (Robinson, 2004, Ramos Barbón, 2007, Galli *et al.*, 2008, Pulendran *et al.*, 2012, Galli *et al.*, 2008.)

Tras una segunda exposición al alérgeno, éste se unirá a la IgE específica que se encuentra fijada a la membrana de las células cebadas, generadas durante el proceso de sensibilización, originando de esta forma la transducción de señales que llevarán a su degranulación y por consiguiente a la liberación de diversos mediadores (Holcomb, 2004), como histamina (provoca vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, contracción de músculo liso bronquial e intestinal y aumento en la producción de moco), prostaglandinas ( como PGD<sub>2</sub> la cual provoca vasodilatación y actúa como mediador de anafilaxia, mientras que la PGF<sub>2α</sub> causa bronco constricción), tromboxanos (como los A<sub>2</sub> que son vasodilatadores bronco génicos), leucotrienos (como el LTB<sub>4</sub> el cual es quimio atrayente de neutrófilos y LT) y mediadores derivados de fosfolípidos como el PAF (el cual es mucho más potente que la histamina y posee un factor quimiotáctico para polimorfonucleares, aumenta la permeabilidad vascular y produce un factor liberador de histamina). Dichos mediadores dan lugar a la respuesta alérgica temprana (Sienra Monge *et al.*, 1999, Bloemen *et al.*, 2007), la cual alcanza su punto máximo alrededor del minuto 15 y tarda aproximadamente 30 a 60 minutos su resolución.

Horas después de la segunda exposición al alérgeno, aparece la respuesta tardía, llegando a su punto máximo entre 5 y 12 horas, en algunos casos puede durar varios días, y se caracteriza por la infiltración de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos Th2. Para que ocurra esto es necesaria la presencia de moléculas de adhesión como pueden ser: integrinas, selectinas, caderinas y una superfamilia de inmunoglobulinas, las cuales se expresan en las superficies endoteliales o en la superficie celular de los leucocitos. Todo esto da origen a una segunda manifestación de los síntomas respiratorios, si la exposición al alérgeno es repetitiva se pasa a un proceso de inflamación crónica y puede acompañarse de exacerbaciones agudas con un incremento en el número de eosinófilos y neutrófilos en la submucosa de las vías aéreas y la liberación de mediadores. (Vignola *et al.*, 2003 Bloemen *et al.*, 2007).

En este sentido los modelos de asma en animales son fundamentales para comprender los mecanismos inmuno-fisiopatológicos de la enfermedad. En particular, el modelo en cobayo ha sido ampliamente utilizado en el estudio del asma ya que desarrolla una respuesta alérgica muy similar a la del humano (Pretolani *et al.*, 1996, Karol *et al.*, 1994, Ricciardolo *et al.*, 2008).

### 2.7.1 Epidemiología

La prevalencia del asma varía de acuerdo con el estilo de vida, clima, zona geográfica, así como del desarrollo económico de cada una de estas. Estudios de la OMS estiman que esta enfermedad afecta a 300 millones de personas, y estimando que alrededor de 250 000 mil personas mueren por esta enfermedad al año, siendo el 80 % de esta cantidad personas pertenecientes a países bajos y medio bajos (OMS, 2016).

EL asma produce importante carga socioeconómica, ausentismo escolar y laboral, limitación de las actividades físicas y una mayor utilización de los servicios de salud. La OMS advierte que, si no se toman medidas en los próximos años, se espera un aumento del 20 % en muertes (García Sancho, 2012).

En México, el asma y el estado asmático constituyen la decimotercera causa de morbilidad en los últimos años. Análisis realizados por la Secretaría de Salud, revelaron que la tasa más alta en el año 2015 la tiene el grupo de edad de 1 a 4 años (586.58 casos por 100 000 habitantes), seguida por el grupo de 5 a 9 años (459.12 casos por 100 000 habitantes). Mientras que los grupos de edad con menor tasa son 20 a 24 años (113.82 casos por 100 000 habitantes) y el de 25 a 44 años (117.02 casos por 100 000 habitantes). Durante este mismo año se calcula una morbilidad promedio de 220.49 casos por cada 100 000 habitantes (Secretaria de Salud, 2015).

En el estado de Morelos la tasa de incidencia promedio de asma y estado asmático es de 260.06 casos por cada 100 000 habitantes. Siendo el grupo de 1 a 4 años los que presentaron una mayor cantidad de casos (718.67 por cada 100 000 habitantes) durante el año 2015 (Secretaria de Salud, 2015).

## 2.8 Tratamiento

Para alcanzar y lograr mantener un correcto control del asma, GINA considera cuatro componentes fundamentales en la terapia:

Componente 1. Desarrollar una adecuada relación médico paciente

Componente 2. Identificar y reducir la exposición a factores de riesgo

Componente 3. Abordaje, tratamiento y monitoreo del asma

Componente 4. Manejo de exacerbaciones.

El tratamiento del asma debe ser directo, eficaz e inocuo; y tener como objetivo controlar y mantener los síntomas crónicos al mínimo posible, exacerbaciones mínimas o poco frecuentes, un uso mínimo (lo óptimo es un uso nulo) de agonistas  $\beta_2$ , que el enfermo no presente ninguna limitación de actividades, ni ejercicio, así como de alcanzar variaciones circadianas de PEF <20 % (alcanzando valores casi normales) y que el efecto secundario de los fármacos sea el mínimo (Global Initiative for Asthma, 2016).

## 2.9 Farmacología

Los principales antiasmáticos o de uso más frecuente en el tratamiento del asma son los agonistas de adrenorreceptores o simpaticomiméticos (utilizados como broncodilatadores) y los corticoesteroides inhalados (utilizados como agentes antiinflamatorios). Siendo los broncodilatadores los que alcanzan un alivio rápido de los síntomas, debido a que relajan el músculo liso de las vías respiratorias, mientras que los corticoesteroides tienen un papel como controladores, puesto que inhiben los mecanismos inflamatorios básicos. (Katzung Bertram G. *et al.*, 2013).

### 2.9.1 Fármacos broncodilatadores

Los fármacos que se encuentran en esta categoría actúan relajando el músculo liso de las vías respiratorias e inhiben la emisión de los mediadores de broncoconstricción de la célula cebada, de igual forma, inhiben las fugas en la microvasculatura y aumenta el transporte mucociliar por incremento de la actividad de los cilios.

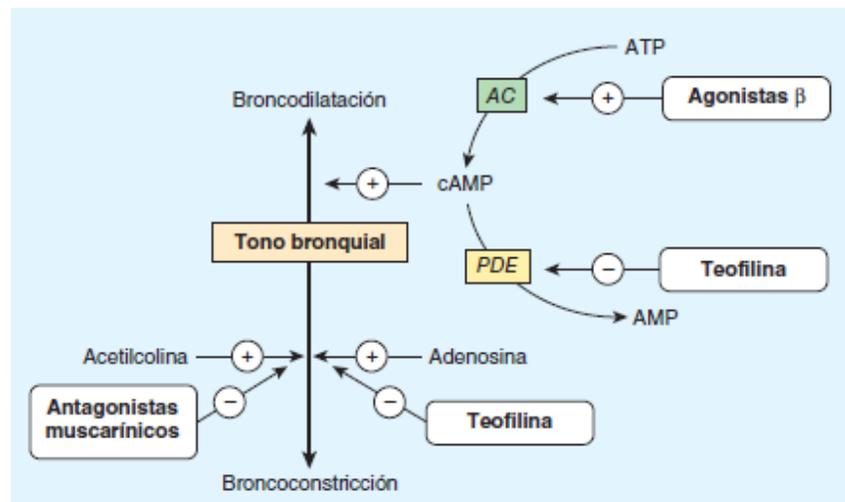
En la actualidad se utilizan tres clases de broncodilatadores: agonistas adrenérgicos  $\beta_2$ , anticolinérgicos y teofilina (Kasper, 2016).

### 2.9.2 Agonistas $\beta_2$

Los fármacos de esta clase activan a los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  que se expresan con abundancia en las vías respiratorias, los cuales están acoplados a través de una proteína G estimuladora a la adenilciclasa, lo que genera un aumento de AMPc intracelular, que libera a su vez las células del musculo liso, logrando de esta forma relajar a estas células en todo el árbol respiratorio (figura 10).

Los agonistas  $\beta_2$  se pueden clasificar a su vez en SABA y LABA.

Los agonistas de corta duración (SABA) como el albuterol tienen una duración de 3 a 6h. Mientras que los agonistas de acción prolongada (LABA) como son el salmeterol y formoterol, tienen una duración de más de 12h; siendo estos últimos los que se usan en el tratamiento cotidiano (Kasper, 2016).



**Figura 10**

Mecanismos de acción de agonistas  $\beta_2$  y fosfodiesterasas.

La broncodilatación es inducida por el AMPc. Se puede generar un aumento de las cifras intracelulares de AMPc por el uso de agonistas adrenorreceptores  $\beta_2$ , que aumentan su velocidad de síntesis por la adenilciclasa; o por inhibidores de la fosfodiesterasa, como la teofilina, que disminuyen su velocidad de degradación.

### 2.9.3 Teofilina

La teofilina se utilizaba como broncodilatador, el efecto lo genera mediante la inhibición de las fosfodiesterasas en las células del músculo liso del árbol bronquial, evitando la formación de 5-AMP (adenosín monofosfato) lo que genera un aumento de la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), induciendo la relajación del músculo liso y la disminución de la actividad inmunitaria e inflamatoria de células específicas (figura 10). La importancia terapéutica de la teofilina decreció debido a la aparición de fármacos nuevos, y a los efectos secundarios que presenta; sin embargo, sigue siendo una opción para comunidades de bajos recursos, puesto que su precio es muy bajo (Katzung *et al.*, 2013).

### 2.9.4 Anticolinérgicos

Los agonistas de los receptores muscarínicos como el bromuro ipratropio evitan la broncoconstricción inducida por los nervios colinérgicos y la secreción de moco. Su eficacia es mucho menor que los agonistas de  $\beta_2$  debido a que sólo inhiben el componente reflejo colinérgico de la broncoconstricción, es por eso por lo que únicamente se utilizan como complemento en terapias de asma no controlada (Katzung *et al.*, 2013).

### 2.9.5 Fármacos controladores (ICS)

Los corticoesteroides inhalados (ICS) son antiinflamatorios contra el asma. Su mecanismo consiste en la disminución del número de células inflamatorias como son neutrófilos, linfocitos T activados y mastocitos presentes en la superficie en la mucosa de las vías respiratorias; así como de su activación en el árbol bronquial.

El principal efecto de los ICS es anular la transcripción de múltiples genes activados que codifican proteínas de inflamación como las citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas de tipo inflamatorio. El efecto de igual forma abarca algunos mecanismos como la inhibición de los factores de transcripción NFkB Y AP-1. Uno de los mecanismos importantes es el reclutamiento de la histona desacetilasa-2, para el complejo del gen de inflamación que revierte la acetilación de histonas asociadas a la mayor transcripción génica.

Los ICS de igual forma pueden activar los genes antiinflamatorios, como el de la proteína cinasa activada por mitógenos fosfatasa-1 e intensifican la expresión de los receptores  $\beta_2$  (Katzung *et al.*, 2013).

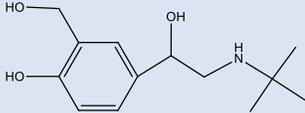
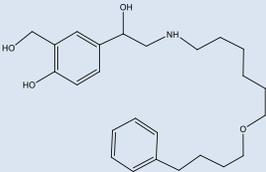
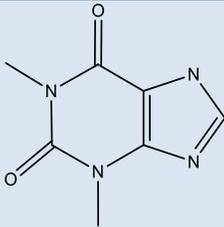
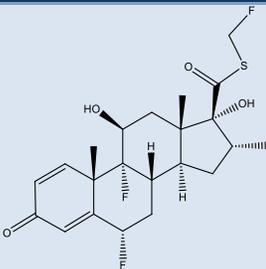
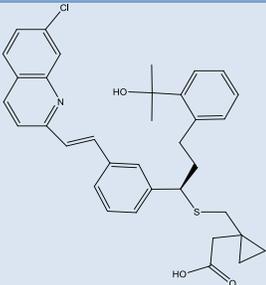
### 2.9.6 Anti- IgE

El omalizumab es un anticuerpo bloqueador que neutraliza la IgE circulante, sin unirse a la IgE unida a las células cebadas. Inhibe las reacciones mediadas por IgE, disminuyendo la inflamación bronquial, linfocítica y eosinofilia. Además, aminora eficazmente la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones (Kasper, 2016).

En la tabla 3 se engloban los principales fármacos utilizados en el tratamiento del asma en la que se muestra sus principales aplicaciones clínicas, efectos y clasificación con base a su subclase como se describe en los puntos anteriores.

**Tabla 2**

Principales fármacos utilizados en el tratamiento contra el asma.

Principales fármacos utilizados en el tratamiento contra el asma				
Subclase	Mecanismo de acción	Efectos	Estructura	Farmacocinética, toxicidad
<b>Agonista Beta</b>				
<b>Albuterol</b>	Agonistas selectivos $\beta_2$	Broncodilatación rápida y eficaz		Temblor, taquicardia, arritmias
<b>Salmeterol</b>		Inicio lento, acción principalmente preventiva, uso con corticoesteroides		
<b>Metilxantinas</b>				
<b>Teofilina</b>	Inhibición de la fosfodiesterasa	Broncodilatación, estimulación cardiaca, aumento de la fortaleza del musculo estriado		Múltiple, taquidisritmias, hipotencion y paro cardiaco
<b>Corticoesteroides inhalados</b>				
<b>Fluticasona</b>	Altera la expresión genética	Disminuye los mediadores de la inflamación, profilaxis intensa de exacerbaciones		Infección por especies de cándida, cambios de cuerdas bucales.
*Beclametasona, budesónida, flunisolida.				
<b>Antagonista de receptor de leucotrienos</b>				
<b>Montelukast</b>	Antagonista selectivo del receptor LTD <sub>4</sub>	Inhibe la broncoconstricción inducida por la exposición al antígeno		Efectos cardiovasculares, riesgos altos de contraer infecciones respiratorias

## 2.10 Estrategia escalonada en el tratamiento contra el asma

En la figura 11 se aprecia la estrategia para el abordaje en la terapia del asma, según la gravedad de la enfermedad y la posibilidad de controlar los síntomas; la clasificación de la enfermedad se realiza con base a las guías de GINA como se muestra en la tabla 4, para hacer un correcto tratamiento del paciente se toma en cuenta la frecuencia de los síntomas, la intensidad de las exacerbaciones y pruebas de función pulmonar.

**Tabla 3**

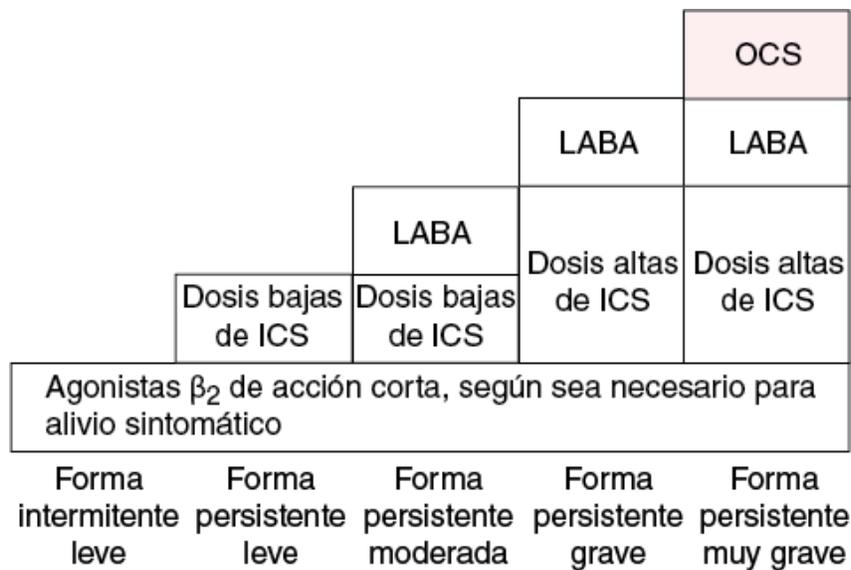
Clasificación del asma según niveles de severidad

Donde VEF<sub>1</sub>PEF es la relación de el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>) y el flujo espiratorio máximo (PEF) (Global Initiative for Asthma, 2016).

<b>Intermitente</b>
Síntomas <1 vez por semana Exacerbaciones leves Síntomas nocturnos no menos a 2 veces por mes VEF <sub>1</sub> PEF ≥ 80 % y una variabilidad < 20 %
<b>Persistente leve</b>
Síntomas > 1 vez por semana, pero < 1 vez por día Exacerbaciones pueden afectar actividad y sueño Síntomas nocturnos > 2 veces al mes VEF <sub>1</sub> PEF ≥ 80 % y una variabilidad < 20 %- 30 %
<b>Persistente moderado</b>
Síntomas diarios Exacerbaciones pueden afectar actividad y sueño Síntomas nocturnos > 1 vez por semana VEF <sub>1</sub> PEF entre 60 - 80 % y una variabilidad > 30 %
<b>Persistente severo</b>
Síntomas diarios Exacerbaciones frecuentes Síntomas nocturnos frecuentes Limitación de la actividad y el sueño VEF <sub>1</sub> PEF ≤ 60 % y una variabilidad > 30 %

**Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas**

En las formas intermitentes leve se puede solo llevar un tratamiento con agonistas  $\beta_2$  de corta duración para obtener un alivio sintomático, con forme aumenta la gravedad de la enfermedad es necesario recurrir a otro tipo de fármacos como es el caso de la forma persistente moderada, donde es necesario una administración conjunta de agonistas  $\beta_2$  de larga duración (LABA), dosis bajas de corticoesteroides inhalados (ICS) y en algunos casos agonistas  $\beta_2$  de corta acción para generar alivio sintomático en el paciente. En la forma persistente grave ya es necesario agregar fármacos del tipo corticoesteroides orales (OCS) a la terapia, GINA recomienda siempre realizar un diagnóstico correcto de la enfermedad para utilizar la menor cantidad de fármacos.



**Figura 4** Estrategia escalonada en el abordaje del asma Utilizando corticoesteroides inhalado (ICS), agonistas  $\beta_2$  de larga acción (LABA), corticoesteroides orales (OCS) (Kasper, 2016).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# JUSTIFICACIÓN

### 3. JUSTIFICACIÓN

El asma es una enfermedad cuyas cifras tienen tendencia a aumentar conforme pasan los años, atribuible a aumentos en la exposición a diversos factores desencadenantes de la enfermedad, como es la contaminación y condiciones climáticas (OMS, 2018). Es por esto por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos útiles en el tratamiento y control de esta enfermedad, siendo los productos naturales candidatos idóneos para la búsqueda y obtención de compuestos bioactivos. Estudios farmacológicos sugieren que el extracto diclorometánico de *Salvia mexicana* presenta un efecto relajante dependiente de la concentración, mediado por diversas vías de señalización. Por lo tanto, en el presente proyecto se pretende utilizar el conocimiento farmacológico que se tiene la especie, para la búsqueda de compuestos bioactivos útiles para el desarrollo de un posible fármaco para la terapia en asma y/o enfermedades asociadas.



# HIPÓTESIS

#### 4. HIPÓTESIS

Los metabolitos presentes en la especie *Salvia mexicana* mostrarán un efecto relajante en la musculatura lisa de las vías aéreas, útil para un futuro desarrollo de potenciales fármacos aplicables en el tratamiento y/o control del asma.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# OBJETIVOS

## 5. OBJETIVO GENERAL

- Obtener el/los compuestos(s) bioactivo(s) responsables de la actividad farmacológica de *Salvia mexicana* y determinar la actividad relajante en un modelo de anillos aislados de tráquea de rata.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de los extractos: Hexánico y diclorometánico, de la especie seleccionada.
- Determinación del potencial mecanismo de acción del extracto hexánico.
- Realizar la caracterización química del extracto diclorometánico de *Salvia mexicana* (SmED).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# METODOLOGÍA

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Obtención de los extractos

A partir de 1500 g de material vegetal previamente secado y molido de *Salvia mexicana*, se obtuvo el extracto hexánico y diclorometánico vía maceración exhaustiva durante 72 horas por triplicado. Los cuáles fueron concentrados a sequedad en un rota evaporador Heidolph a presión reducida y a una temperatura entre 50-60° C.

### 6.2 Estudio químico biodirigido

El fraccionamiento del extracto diclorometánico (SmED) se llevó a cabo en una columna de vidrio, empleando diversos sistemas de elución y aplicando técnicas convencionales, el análisis de las fracciones obtenidas se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), se realizó sobre placas de aluminio de distintas dimensiones, recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>245</sub>, empleando distintos sistemas de elución. Se utilizó una lámpara de UV (254 y 365 nm) para la visualización de las placas y como agente revelador se utilizó una solución de sulfato sérico amoniacal al 10% en ácido sulfúrico; para desarrollar la coloración de las placas estas se calentaron aproximadamente a 90 °C por un minuto.

#### 6.2.1 Caracterización estructural

Una vez purificados, los metabolitos secundarios fueron caracterizados a través de la interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear en sus diferentes versiones, así como de los espectros de masas.

### 6.3 Determinación del efecto relajante de los extractos y fracciones sobre anillos de tráquea aislados de rata.

#### 6.3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 250 y 300 g de peso, alimentadas con Purina Chow® y mantenidas en condiciones de bioterio en la Facultad de Farmacia de la UAEM.

#### 6.3.2 Reactivos

Se utilizaron los extractos hexánicos y diclorometánicos de *Salvia mexicana*, y además se utilizaron los controles positivos teofilina y carbacol. Adicionalmente, para la determinación del mecanismo de acción del extracto más activo se usaron las siguientes sustancias: isoproterenol, cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), L-Nitroarginina Metil Éster (L-NAME) y 1H-(1, 2, 4) oxadiazol (4, 3a) quinoxalin-1-one (ODQ).

### 6.3.3 Obtención del tejido

Los roedores fueron sacrificados por una sobredosis de éter etílico, y posteriormente, se realizó una disección a nivel del cuello con la finalidad de aislar la tráquea. A continuación, la tráquea se limpió del tejido conectivo adyacente y mucosidad, y finalmente, se cortaron 3 anillos de aproximadamente 3 mm de longitud, los cuales fueron colocados en una cámara de incubación con 10 mL de solución de Krebs (NaCl, 118mM; KCl, 4.7 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 mM; EDTA, 0.026 mM; glucosa, 11,1 mM y CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM) constantemente burbujando con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>.

### 6.3.4 Sistema de registro

Para determinar el efecto relajante de los extractos obtenidos, así como de los controles, se utilizó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. En este sistema, el tejido en estudio (anillos de tráquea) se sujetó a la parte inferior de la cámara y a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT03<sup>®</sup> de 6 canales. Para esto se monitoreo con el programa Acknowledge<sup>®</sup> (BIOPAC, CA, USA).

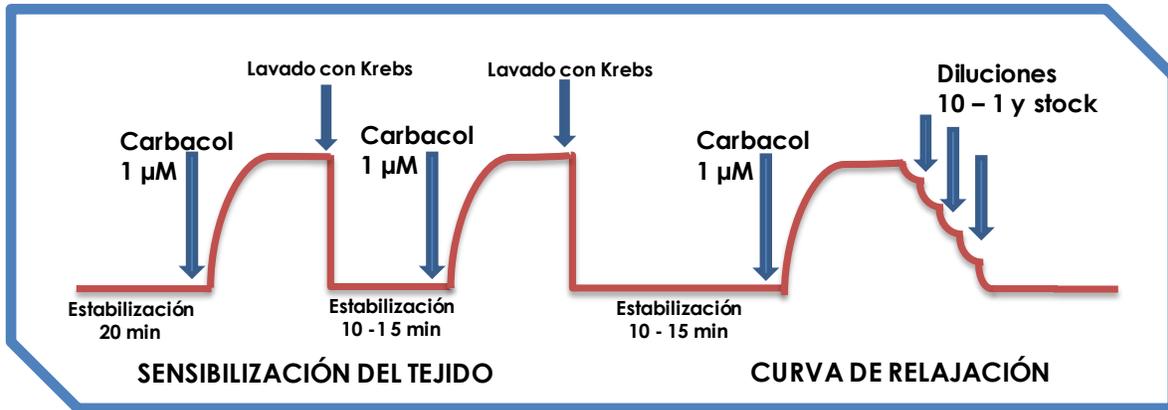
### 6.3.5 Proceso de estabilización y sensibilización

Antes de analizar el efecto relajante, los anillos de tráquea fueron sometidos a un proceso de estabilización, en el cual el tejido es ajustado a una tensión inicial de 2 g durante 60 min, lavado con solución de Krebs cada 20 min y ajustado a la tensión inicial después de cada lavado. Posteriormente, el tejido fue sensibilizado 2 veces, induciendo la contracción con 1 μM de carbacol (agonista colinérgico), y una vez alcanzada la meseta de la curva, se procedió a hacer un lavado para que el tejido regrese a su estado basal (30 min).

### 6.3.6 Evaluación *ex vivo* del efecto relajante, sobre la contracción inducida por carbacol 1 μM; en anillos de tráquea aislados de rata

Para determinar el efecto relajante, se utilizó un modelo *ex vivo* de anillos de tráquea aislados de rata, pre-contraídos con carbacol (1 μM) hasta que se alcanzó una concentración constante, posteriormente, se construyeron curvas concentración-respuesta acumulativas de las muestras de prueba, la concentración dependerá de la muestra, del control positivo teofilina (1.68 a 554.98 μM) y vehículo (DMSO; 1 % concentración final). La contracción máxima alcanzada con carbacol se considera el 100 % de contracción, la

actividad se determinó mediante la comparación de los valores que se generaran antes y después de la aplicación de la muestra (figura 12).



**Figura 5** Procedimiento general para la determinación del efecto relajante de las muestras de prueba.

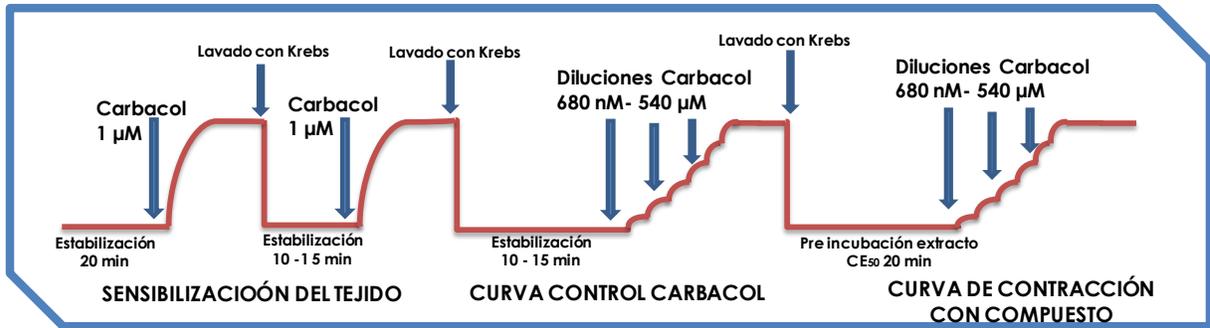
#### 6.4 Determinación del mecanismo de acción

Una vez obtenidos los extractos se procedió a la determinación del posible mecanismo de acción del extracto hexánico, bajo la siguiente metodología:

##### 6.4.1 Participación de los receptores muscarínicos

El tejido fue sometido a un proceso de sensibilización y estabilización como se describió en los puntos anteriores. A continuación, se agregaron diluciones de carbacol (0.00608 a 540 µM) de forma acumulativa como agente contráctil, para construir una curva concentración-respuesta utilizada como curva control. Posteriormente, se lavó el tejido y mantuvo en condiciones fisiológicas estables, para después incubar el tejido con una  $CE_{50}$  del extracto hexánico de *Salvia mexicana* (SmEH), durante 20 minutos; pasando este tiempo se procedió a agregar las diluciones acumulativas de carbacol. Todo esto con la finalidad de comparar el efecto contráctil de carbacol en ausencia y presencia del extracto (figura 13).

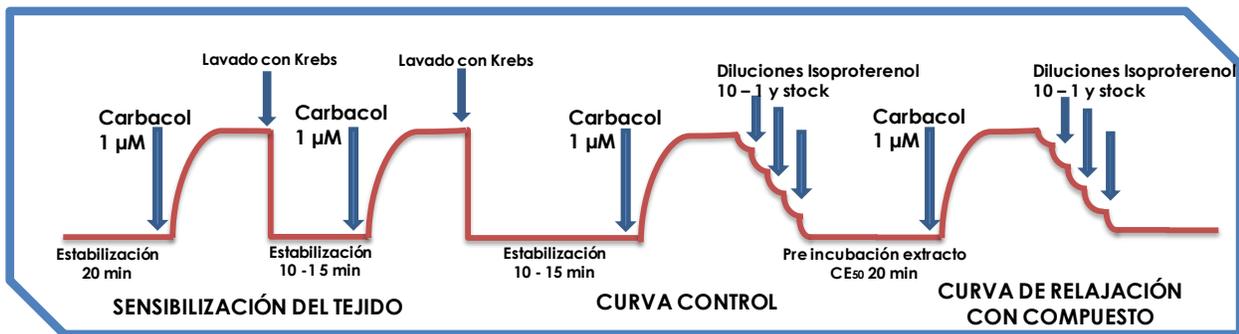
## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 6** Procedimiento general para la determinación de la participación de los receptores muscarínicos.

### 6.4.2 Bloqueo de receptores $\beta$ adrenérgicos

Con la finalidad de conocer si el extracto SmEH actúa mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa e induce la ciclación de AMP a AMPc, después del proceso de sensibilización se incubó el tejido durante 20 minutos con isoproterenol  $10 \mu\text{M}$ , el cual es un agonista de receptores  $\beta$ - adrenérgicos, posterior a esto se contrajo el tejido con carbacol  $1 \mu\text{M}$  para después agregar diluciones acumulativas de SmED. Todo esto se realizó para comparar el efecto relajante del extracto en ausencia y presencia de isoproterenol (figura 14).



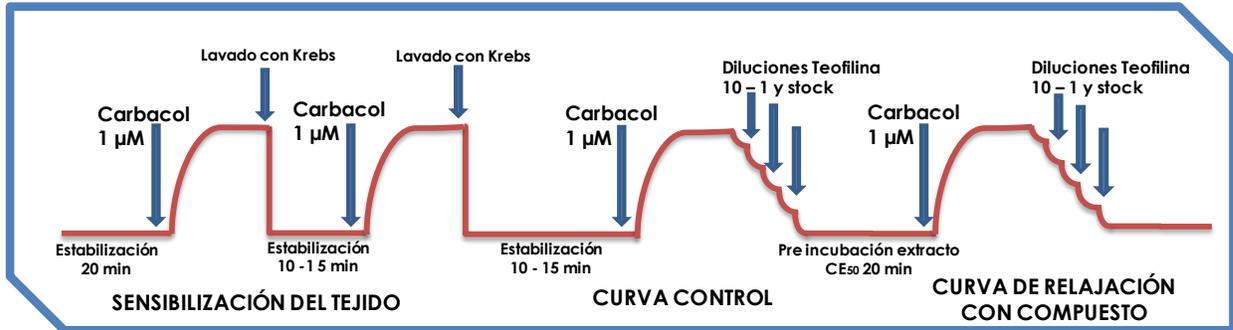
**Figura 14** Procedimiento general para la determinación de la participación de los receptores  $\beta$  Adrenérgicos.

### 6.4.3 Inhibición de fosfodiesterasas

Para realizar esta determinación, se construyeron curvas de relajación utilizando teofilina (inhibidor no selectivo de fosfodiesterasas). De esta forma, y posterior al proceso de sensibilización, se incubó el tejido con una  $\text{CE}_{50}$  de SmEH, a continuación, se contrajo el

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

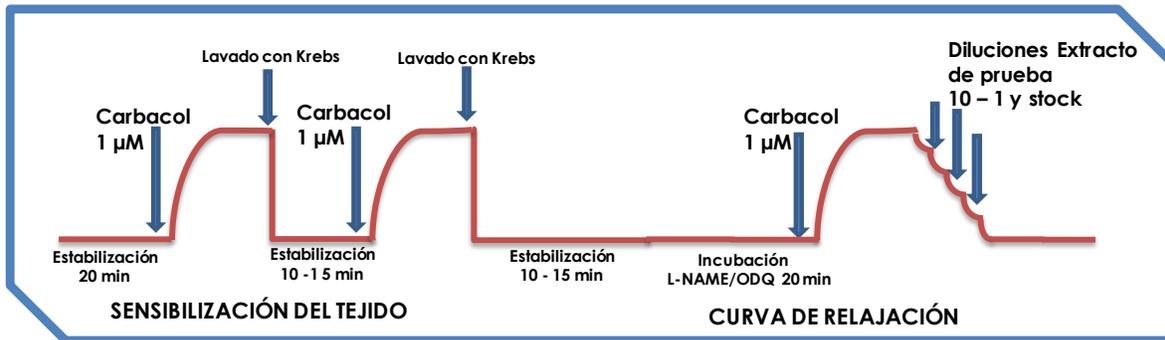
tejido con carbacol 1  $\mu\text{M}$ , para después realizar curvas de relajación a papaverina y teofilina con la finalidad de comparar las curvas de relajación en ausencia y presencia de SmEH (figura 15).



**Figura 7** Procedimiento general para determinar la participación de los extractos de prueba en la relajación del músculo liso a través de la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas.

### 6.4.4 Participación de la vía NO-GMPc e inhibición de la enzima guanilato ciclasa

Para determinar la participación de SmEH en la vía del óxido nítrico, posterior al proceso de sensibilización se incubó el tejido con L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) y ODQ (inhibidor de guanilato ciclasa), posterior a esto se contrajo el tejido con carbacol 1  $\mu\text{M}$ , para después realizar curvas de relajación a SmED, esto con el fin de comparar el efecto relajante producido (figura 16).



**Figura 16** Procedimiento general para determinar la participación de los compuestos de prueba en la relajación del músculo liso utilizando inhibidores enzimáticos



## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

Seguido a esto se realizará un estudio químico biodirigido de SmED, mediante cromatografía en columna. Posteriormente, se realizarán cromatografías sucesivas hasta la purificación y caracterización de los metabolitos responsables de la actividad farmacológica. La evaluación *ex vivo* del efecto relajante de las fracciones obtenidas, se realizará sobre la contracción inducida por carbacol 1  $\mu\text{M}$ ; en anillos de tráquea aislados de rata, mediante el uso de un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado (Sánchez Recillas *et al.*, 2014).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*Facultad  
de Farmacia*  
*Conocimiento al servicio de la salud*

# RESULTADOS

## 7. Resultados

### 7.1 Selección de las especies de estudio y obtención de extractos

La selección de las especies de estudio se realizó mediante un criterio de selección etnomédico, bajo la hipótesis de que las plantas utilizadas en la medicina tradicional son candidatas idóneas para la búsqueda de moléculas bioactivas con posibles aplicaciones terapéuticas, además de que en estudios previos sobre esta especie se demostró que los extractos hexánicos y diclorometánicos, presentan actividad relajante sobre anillos de tráquea aislada de rata, pre-contraídos con carbacol

De esta forma se eligió la especie vegetales *Salvia mexicana*, como candidato a posibles fuentes de metabolitos secundarios que podrían ser utilizados a futuro como fármacos en la terapia contra asma y enfermedades asociadas.

Posterior al proceso de selección, se dio continuación a la obtención de los extractos, utilizando 1500 g de material; el cual pasó por un proceso de preparación previo a las extracciones, este fue el secado a temperatura ambiente (25°C) y fragmentado para reducir el tamaño de partícula y garantizar una mejor superficie de contacto, para de esta forma garantizar un mayor rendimiento.

A continuación, se obtuvieron los extractos mediante maceración exhaustiva de 72 horas utilizando disolventes en orden de polaridad creciente (hexano, diclorometano). Una vez obtenidos los extractos, fueron concentrados en un rota evaporador de marca Heidolph® en un sistema a presión reducida y temperatura entre 50 a 60 °C. Posteriormente, se calcularon los rendimientos que se aprecian en la tabla 5, siendo el extracto diclorometánico el que presentó un mayor rendimiento, 42 %, esta diferencia elevada en los rendimientos puede ser atribuida a que en la obtención de dicho extracto la maceración fue de 96 horas.

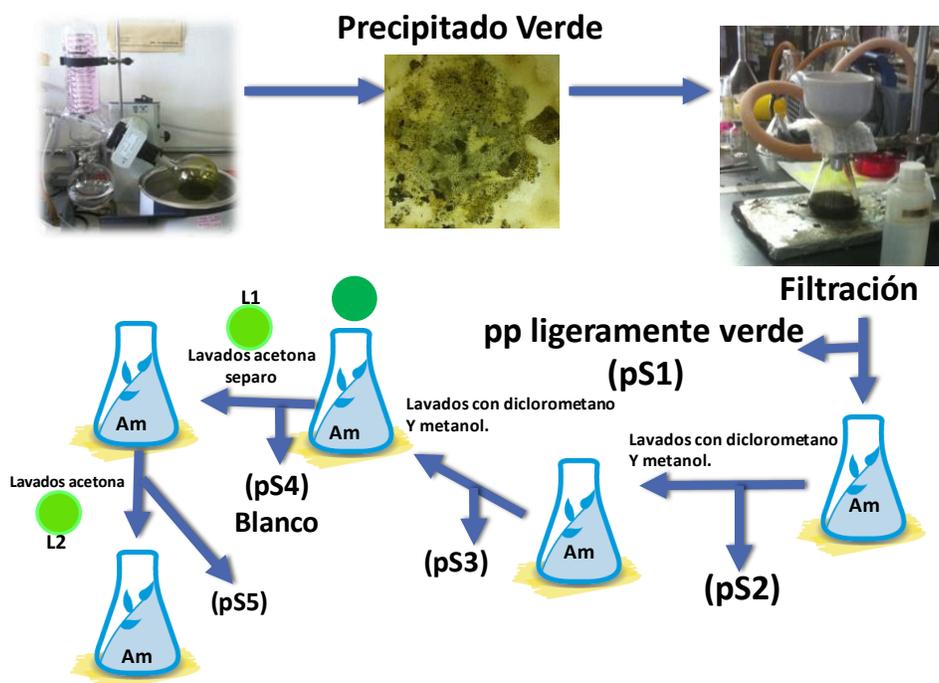
**Tabla 4** Obtención de los extractos de las especies en estudio.

\*Se utilizaron 1500 g (peso seco) de material vegetal.

Extracto	Rendimiento (%)	Cantidad de extracto (g)
Hexano (EH)	0.8	12.00
Diclorometano (ED)	2.8	42.00

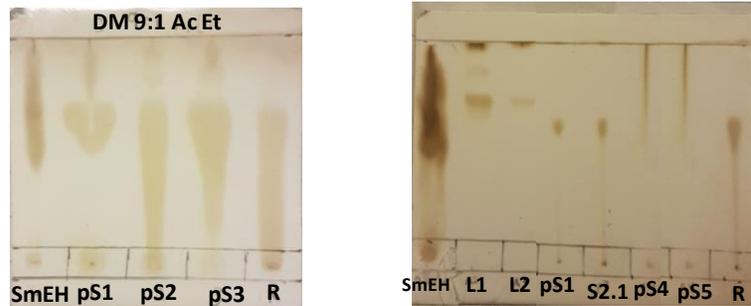
## 7.2 Estudio químico de *Salvia mexicana*.

Durante el proceso de obtención del extracto hexánico, se empezó a formar un precipitado con una coloración ligeramente verde, este fue recuperado mediante el uso de la técnica de filtrado a el vacío, y posteriormente se realizaron lavados con diversos disolventes proceso que se detalla en la figura 17. Obteniendo de este proceso un total de cinco precipitados que fueron colocados en recipientes diferentes y se rotularon como PS1-PS5, se realizaron placas cromatográficas en capa fina y posteriormente de determinaron los puntos de fusión.

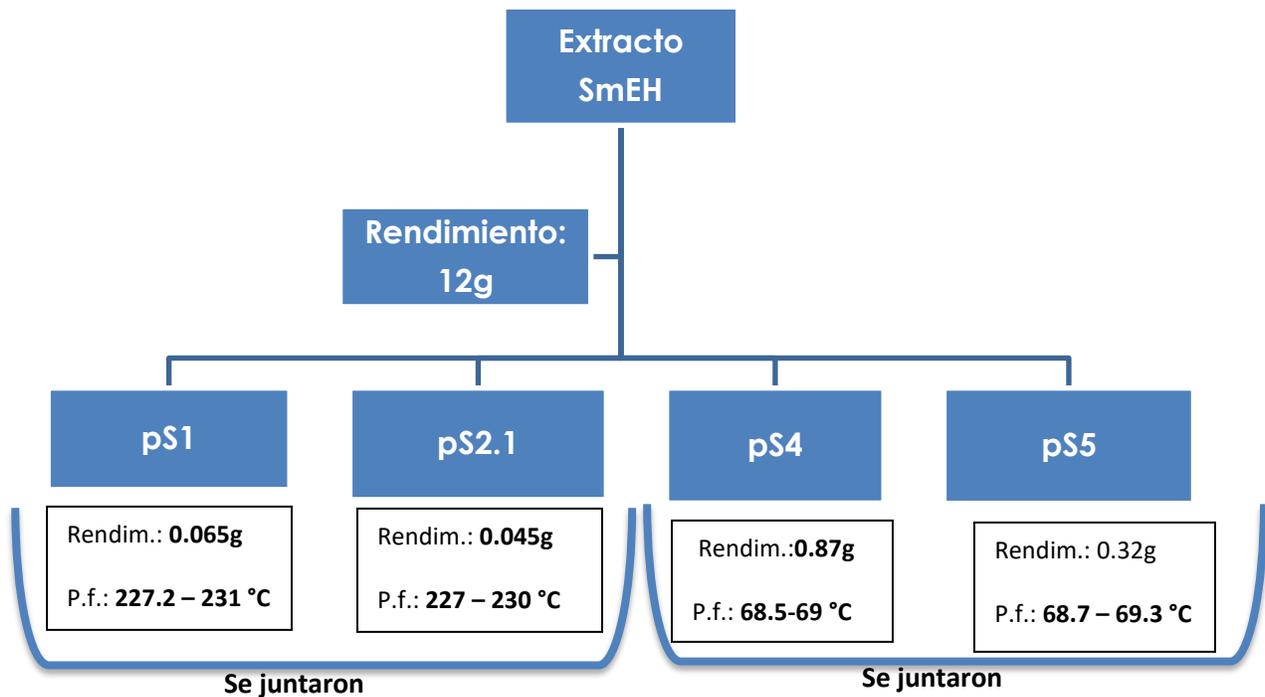


**Figura 8** Proceso de obtención del precipitado de SmEH

Con base en las observaciones realizadas en las placas cromatográficas (figura 18), se decidió juntar PS2 y PS3, obteniendo a PS2.1



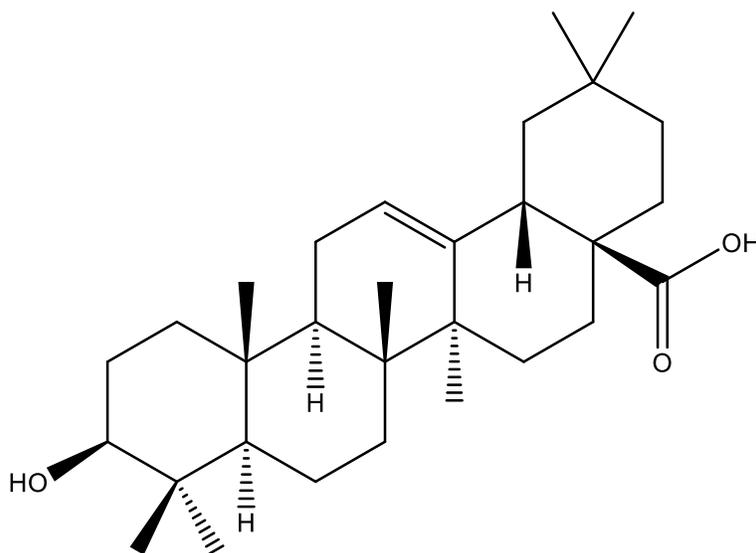
**Figura 9** Cromatografía en capa fina de pS1-pS5  
Donde se muestran L1 y L2 (Lavados), R (referencia utilizada, ácido ursólico) y SmEH (Extracto integro), en ambas placas de utilizo un sistema Diclorometano: Acetato de etilo (90:10) y se revelo con sulfato sérico.



**Figura 10** Resumen general de la purificación de los PP obtenidos de SmEH

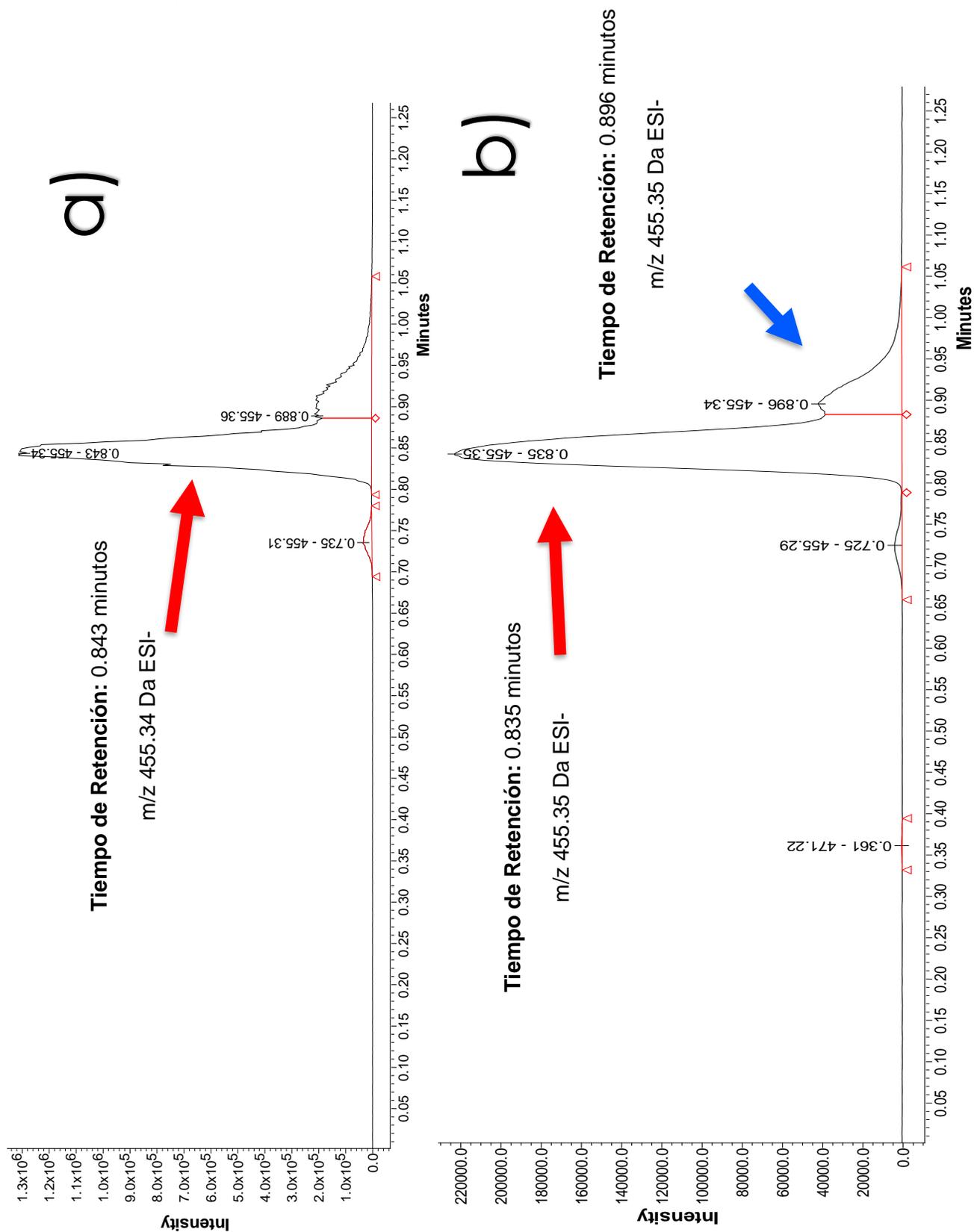
Después de continuar con el análisis, se decidió juntar los precipitados pS1 y 2.1; al igual que pS4 y 5, para de esta manera obtener dos distintos que para fines prácticos de ahora en adelante se mencionaran como PS1 y PS4 (figura 19).

Con la finalidad de establecer la composición química e identificar los metabolitos de los precipitados obtenidos, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra resolución (UPLC) Acquity Bio H Class, acoplado a un detector de masas (QDA) y una columna con las siguientes características: ACQUITY UPLC® HBE C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50mm, Waters®, USA). Las condiciones del método fueron: Fase Móvil: agua basificada con hidróxido de amonio 0.05% - acetonitrilo en proporción 10:90; con un flujo: 0.35ml/min; tiempo de corrida 2.00min; temperatura de la columna 30°C y temperatura de la muestra 20°C



**Figura 20** Estructura del Ácido oleanólico

Se determinó que el precipitado PS1, se trataba de ácido oleanólico (estructura en la figura 20), debido a que en el cromatograma se observa una banda mayoritaria, con un tiempo de retención de 0.835 minutos y con un  $m/z$  455.35 Da ESI-; valor que resulta muy similar al estándar de ácido oleanólico, tiempo de retención 0.843 minutos y 455.34  $m/z$  Da (figura 21); sin embargo en la muestra PS1 también se logra observar una banda con un tiempo de retención de 0.896 minutos y con un  $m/z$  455.35 Da ESI-, esto da pauta a sospechar, la presencia de otro compuesto, que se encuentra en co-elución con nuestro precipitado.



**Figura 21** Cromatogramas UHPLC donde:  
a) Estándar de ácido oleonólico  
b) PS1

Para corroborar los resultados obtenidos en cromatógrafo de líquidos de ultra resolución, se decidió someter las muestras a técnicas espectroscópicas.

Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , fueron analizados por medio del programa MestReNova y con ello se sacaron las conclusiones y una predicción de la molécula (figura 22 y 23). Los desplazamientos químicos obtenidos se describen en la tabla 5 y todo indica que el precipitado obtenido es ácido oleanólico, en el espectro destacan algunas señales características de este compuesto, como las de los protones COO-H ( $\delta_{\text{H}}$  1.89), O-H ( $\delta_{\text{H}}$  1.89), de los protones de los carbonos 23 y 24  $\text{CH}_3$  (m,  $\delta_{\text{H}}$  0.91), el protón de la posición 29, CH que aparece como una señal triple (t,  $\delta_{\text{H}}$  5.12); así como la de los carbonos en la posición 1C ( $\delta_{\text{C}}$  178.71), 28 y 29 que corresponden a C=CH ( $\delta_{\text{C}}$  138.61 y 125.01 respectivamente), y al carbono de la posición 2 CH ( $\delta_{\text{C}}$  77.10). Dichos valores son muy semejantes a los reportados en la literatura por Perojil-Jiménez (2014), de esta forma podemos decir con certeza que el precipitado PS1, está conformado por Acido oleanólico.

**Tabla 5** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (400 MHz) del Ácido Oleanólico en DMSO- $d_6$ .

Posición	$\delta_c$	Tipo	$\delta_H$
1	178.71	C	
2	77.10	CH	3.00
3		OH	1.89
4	24.25	CH <sub>2</sub>	1.54 (0.91)
5	38.67	CH <sub>2</sub>	1.64 (0.68)
6	38.81	C	
7	23.71	CH <sub>3</sub>	0.91
8	17.46	CH <sub>3</sub>	0.91
9	55.22	C	
10		H	0.91
11	18.44	CH <sub>2</sub>	1.27(2.12)
12	36.75	CH <sub>2</sub>	1.27(1.44)
13	38.88	C	
14	17.35	CH <sub>3</sub>	0.91
15	42.07	C	
16	23.29	CH <sub>3</sub>	1.44
17	27.42	CH <sub>2</sub>	0.91
18	21.52	CH <sub>2</sub>	1.27(1.44)
19	52.81	C	
20	30.63	CH <sub>2</sub>	1.27(1.54)
21	38.94	CH <sub>2</sub>	0.68(1.27)
22	33.14	C	
23	28.70	CH <sub>3</sub>	0.91
24	28.70	CH <sub>3</sub>	0.91
25	47.26	CH <sub>2</sub>	0.68
26	36.96	C	
27		H	3.00
28	138.61	C	
29	125.01	CH	5.12
30	27.98	CH <sub>2</sub>	1.44
31	47.45	C	
32	36.52	C	
33	16.52	CH <sub>3</sub>	0.91
34		O	
35		O	
36		H	1.54

Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

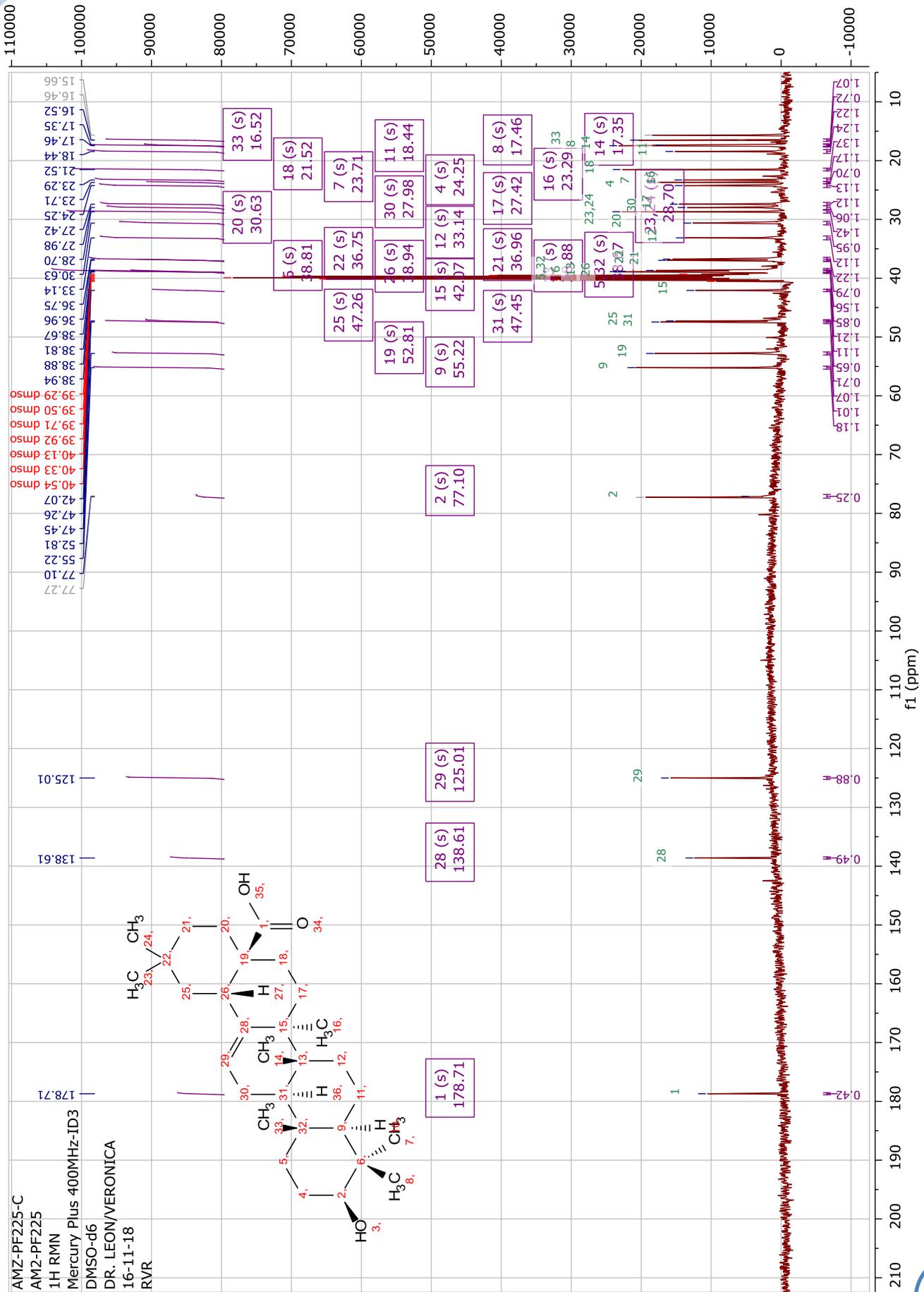
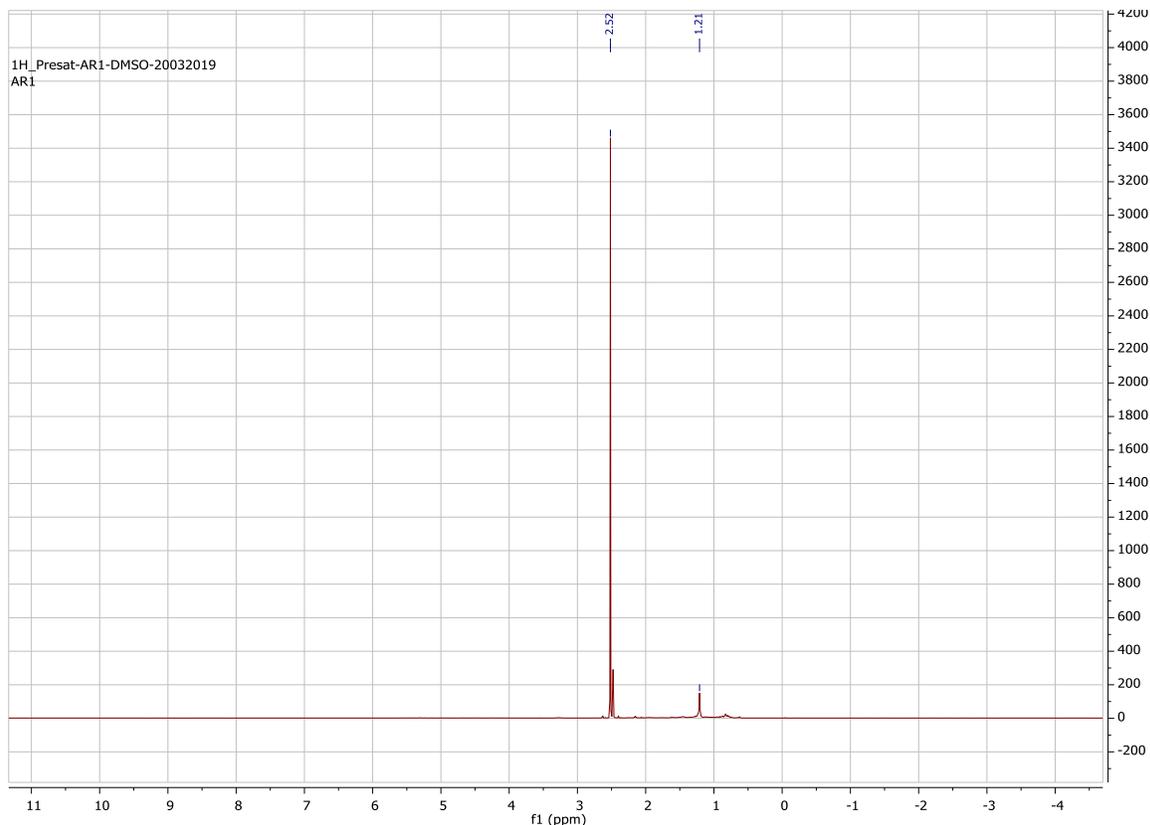


Figura 11 Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) Ácido Oleanólico en DMSO-d6



## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

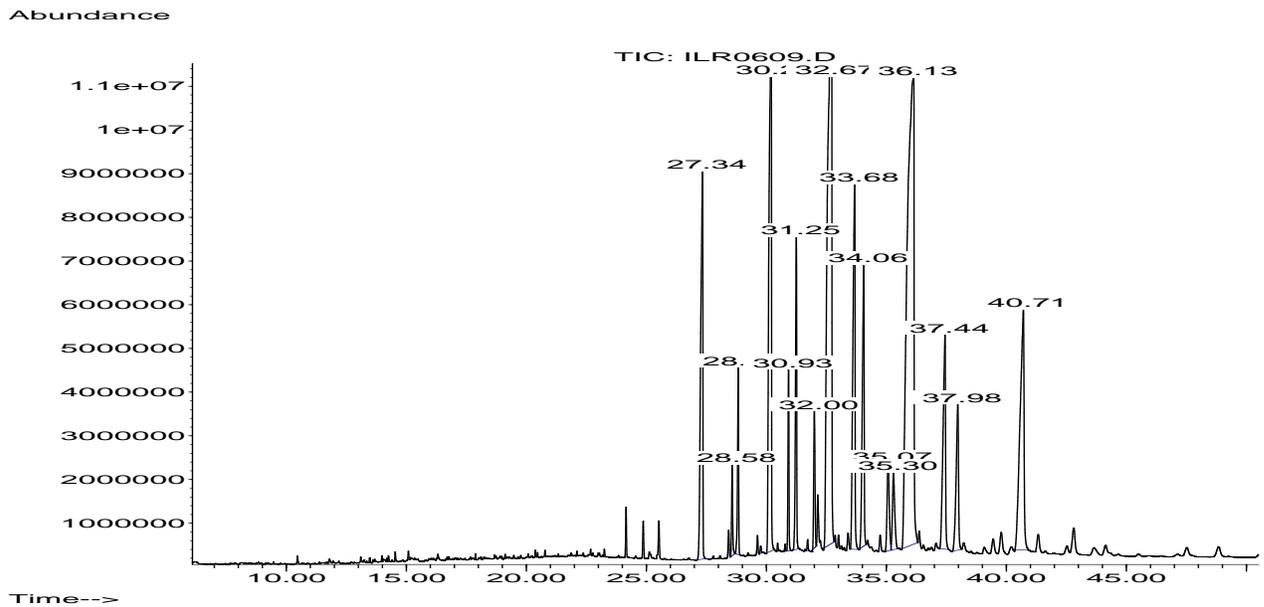
Con lo que respecta a PS4, un análisis preliminar mediante técnicas espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 24), mostro un pico con una fuerte intensidad ( $\delta_{\text{H}}$  2.52); señal características de grupos metileno, dando indicio de la presencia de posibles cadenas largas de carbonos, posiblemente ácidos grasos; en estudios encontrados en la literatura Gutiérrez-Tolentino *et al.*(2014), ha reportado la presencia de diversos ácidos grasos, entre los que destacan ácido palmítico, ácidos palmitoleico, esteárico, oleico cis-9, oleico cis-11, oleico cis-12, linoleico, araquídico, linolénico y alfa-linolénico.



**Figura 24** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de PS4, en DMSO-6d

Es por ello, que se recurrió al uso de la cromatografía de gases acoplado a un detector de masas, para el análisis de este precipitado. Dicho proceso fue realizado en colaboración del Dr. Dr. Ismael León Rivera, del Centro de Investigaciones Químicas, UAEM; obteniéndose de este proceso, el cromatograma de la figura 25.

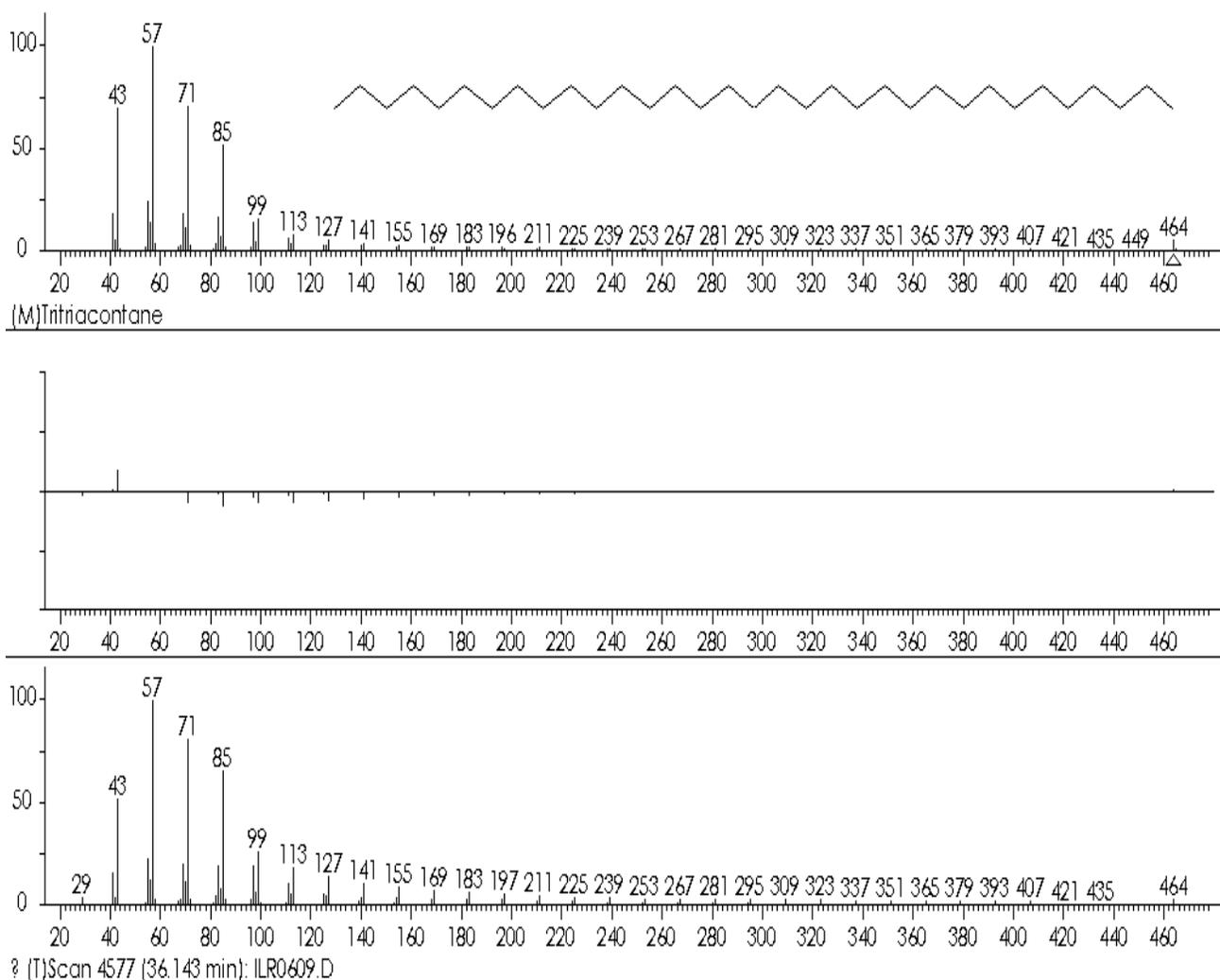
Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 25** Cromatograma gases/masas del precipitado PS4

El análisis del cromatograma obtenido de GC, revela la presencia de 16 moléculas que posiblemente conformen el precipitado; los resultados proporcionados por dicho laboratorio fueron entregados con base de datos de nombres comunes de químicos y librería de tóxicos (anexo 1). Siendo el pico que se encuentra a un tiempo de retención de 36.14 minutos, el que presenta mayor porcentaje en similitud a los estándares con la base de datos del cromatógrafo de gases. Sugiriendo en este sentido que se podría tratar del hidrocarburo, Tritriacontano; mostrando un rendimiento de 26.215% del total máximo (figura 26). El espectro de masas obtenido muestra patrones de fragmentación muy característicos de los alcanos, en los que ocurren pérdidas seriadas de 14 UMA, valor que podría atribuirse a la fragmentación de grupos metilo.

Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 26** Espectro de masas, tomado a un tiempo de 36.143 minutos, m/z 464

No existen reportes de la presencia de Triacontano, en el extracto hexánico de *Salvia hispánica*, sin embargo Riccobono-L et al., (2015), habla sobre la presencia de este compuesto, en *Salvia argentea* L. en extractos no polares, con porcentajes de 9.9% a 14.1%. En otro trabajo Damla-Hatipoglu et al., (2016), estudio 45 especies distintas de salvia, nativas de Turquía, en las que encontró la presencia de Triacontano en varias ellas. Todo esto nos da pauta a pensar que *Salvia hispánica* también presenta este compuesto, sin embargo, son necesarias más pruebas para asegurar la veracidad de los resultados.

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

Con la finalidad de establecer la composición química e identificar los metabolitos activos de la especie, en el extracto diclorometánico, este se sometió a un fraccionamiento cromatográfico, se utilizaron, 24g de extracto seco de SmED y se colocó en una columna abierta (figura 27); se preparó adicionando gel de sílice y haciendo pasar hexano a través de la fase estacionaria hasta lograr la compactación adecuada. Posteriormente, la muestra sólida fue compactada hasta obtener un lecho uniforme, quedando listo el sistema cromatográfico para el proceso de separación; la elución se realizó con un gradiente el cual comenzó con un sistema Hexano-Diclorometano (100:0 → 0:100); con incrementos de la polaridad hasta un sistema Diclorometano-AcOEt (100:0 → 0:100), para finalizar con un sistema AcOEt-MeOH (100:0 → 0:100), se colectaron fracciones de 250 mL, sumando un total de 680 fracciones, las cuales por similitud cromatográfica, se fueron juntando; durante todo el proceso se obtuvieron un total de 13 precipitados, se tomaron puntos de fusión y rendimientos netos, estos valores se aprecian en la figura 28.



**Figura 27** Fraccionamiento cromatográfico de SmED

Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

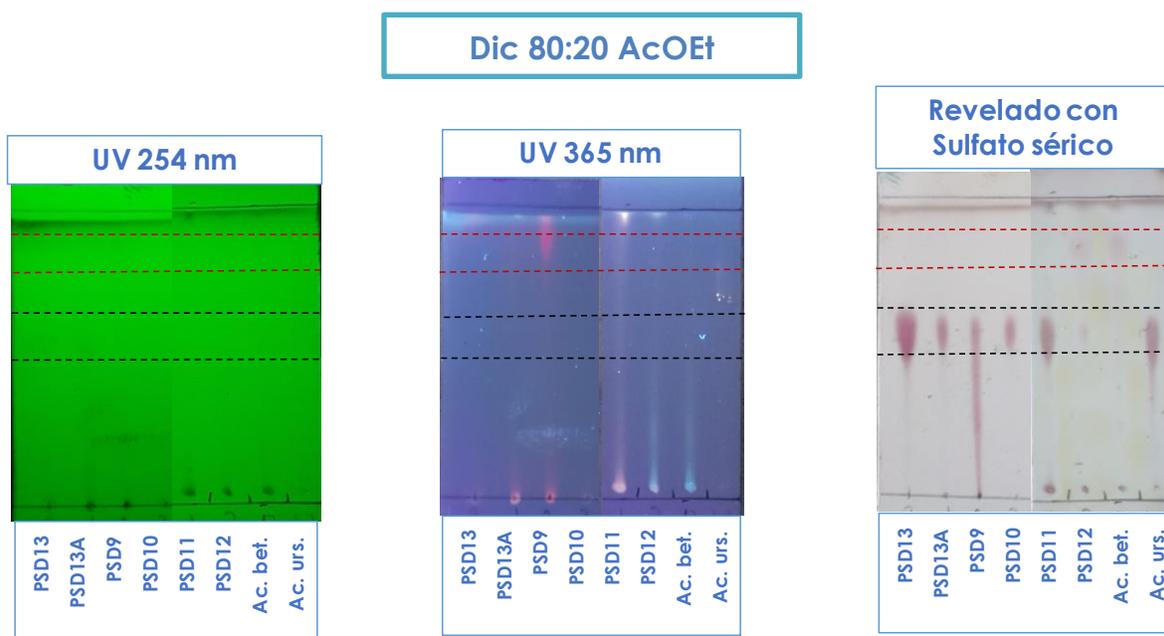
SmED		R. 42g	
Sistema y Fracción			
Hex	Clave de control	Rendimiento	
1-8	PSD1	R. 16mg	P.f. 71.2-73 °C
9-14	PSD2	R. 21mg	P.f. 68-70.3 °C
19-55	PSD3	R. 19mg	P.F 69.3- 70.1 °C
H 9:1 D 56-81	PSD4	R. 200mg	P.f1. 181.1 / 190 °C
H 5:5 D 190-194	PSD5	R. 13mg	
195-207	PSD6	R. 27mg	P.f1. 81.1/83.5 °C
208-209	PSD7	R. 9mg	
H 4:6 D 251-276	PSD8	R. 21mg	
Dicloro 356-400	PSD9	R. 910 mg *	
401-455	PSD10	R. 1138 mg	P.f1. 185.3 / 193.2 °C
D 9:1 AcEt 468-481	PSD11	R. 1600 mg *	
AcOEt 9:1 MeoH 530-540	PSD 12	R. 581 mg *	
AcOEt 7:3 MeoH 550:630	PSD 13	R. 1257 mg *	

**Figura 28** Precipitados obtenidos a partir del fraccionamiento cromatográfico de SmED.  
\*punto de fusión no determinado, debido a que superaba el límite de temperatura del equipo utilizado

El análisis de los precipitados se realizó mediante cromatografía en capa delgada (CCD), sobre placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con gel de sílice, empleando distintos sistemas de elución. Se utilizó una lámpara de UV (254 y 365 nm) para la visualización de las placas, y como agente revelador se utilizó una solución de sulfato sérico amoniacal al 10% en ácido sulfúrico; para desarrollar el color de las placas se calentaron a 90°C aproximadamente por un lapso pequeño de tiempo.

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

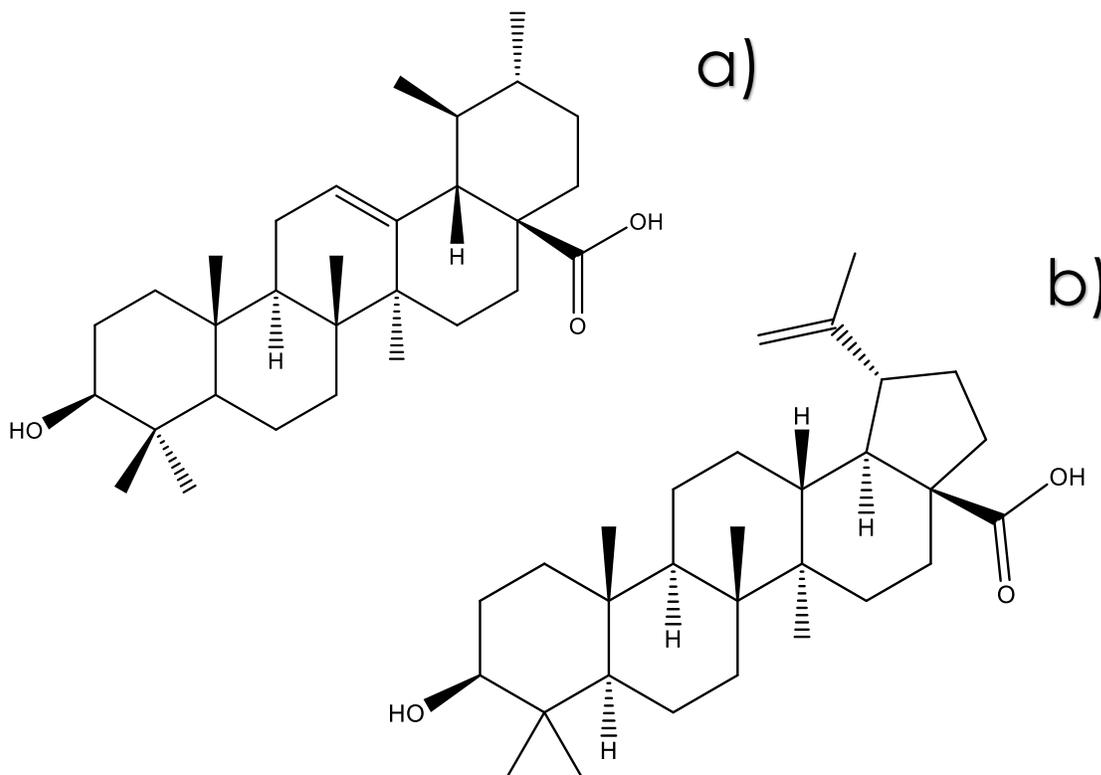
Con lo que respecta al análisis de las placas cromatográficas de los precipitados que obtuvieron un mayor rendimiento (PSD9-PSD13) representados en la figura 29. Se logran apreciar RF muy parecidos en todos ellos; realizando una comparación con el ácido ursólico, se sospecha de la presencia de triterpenos pentacíclicos en estos precipitados, ligado además de que todos ellos presentaron puntos de fusión mayores a 240 °C, valor característico de este grupo de metabolitos.



**Figura 29** Placas cromatográficas de los precipitados obtenidos en mayor rendimiento partir del fraccionamiento de SmED.

Con base en las placas cromatográficas se decidió utilizar un cromatógrafo de líquidos de ultra resolución (UPLC) Acquity Bio H Class, acoplado a un detector de masas (QDA), para analizar la posible composición metabólica de (PSD9-PSD13), se utilizaran las condiciones antes descritas para la determinación de Acido ursólico, oleanólico y para el betulínico se realizó un cambio de la fase móvil (H<sub>2</sub>O Basificada con NH<sub>4</sub>OH- 0.05% - ACN en proporción 5:95). Obteniéndose los cromatogramas representados en las figuras 31 y 32.

Se determinó que el precipitado PSD11, se trataba de ácido ursólico (estructura en la figura 30), debido a que en el cromatograma obtenido se observa una banda mayoritaria, con un tiempo de retención de 0.877 minutos y con un  $m/z$  455.35 Da ESI-; valor que resulta muy similar al estándar de ácido ursólico, tiempo de retención 0.875 minutos y 455.32  $m/z$  Da (figura 31); sin embargo en la muestra PS11 también se logra observar una banda con un tiempo de retención de 0.750 minutos y con un  $m/z$  455.30 Da ESI-, y una banda muy pequeña, prácticamente nula, a un tiempo de retención de 1.70 minutos, que ve más clara en el espectro de masas con un  $m/z$  487.30 Da ESI-, esto da pauta a sospechar, la presencia de otros compuesto, que se encuentra en co-elucion con nuestro precipitado.



**Figura 30** Estructuras químicas donde: a) Acido ursólico  
b) Acido betulínico

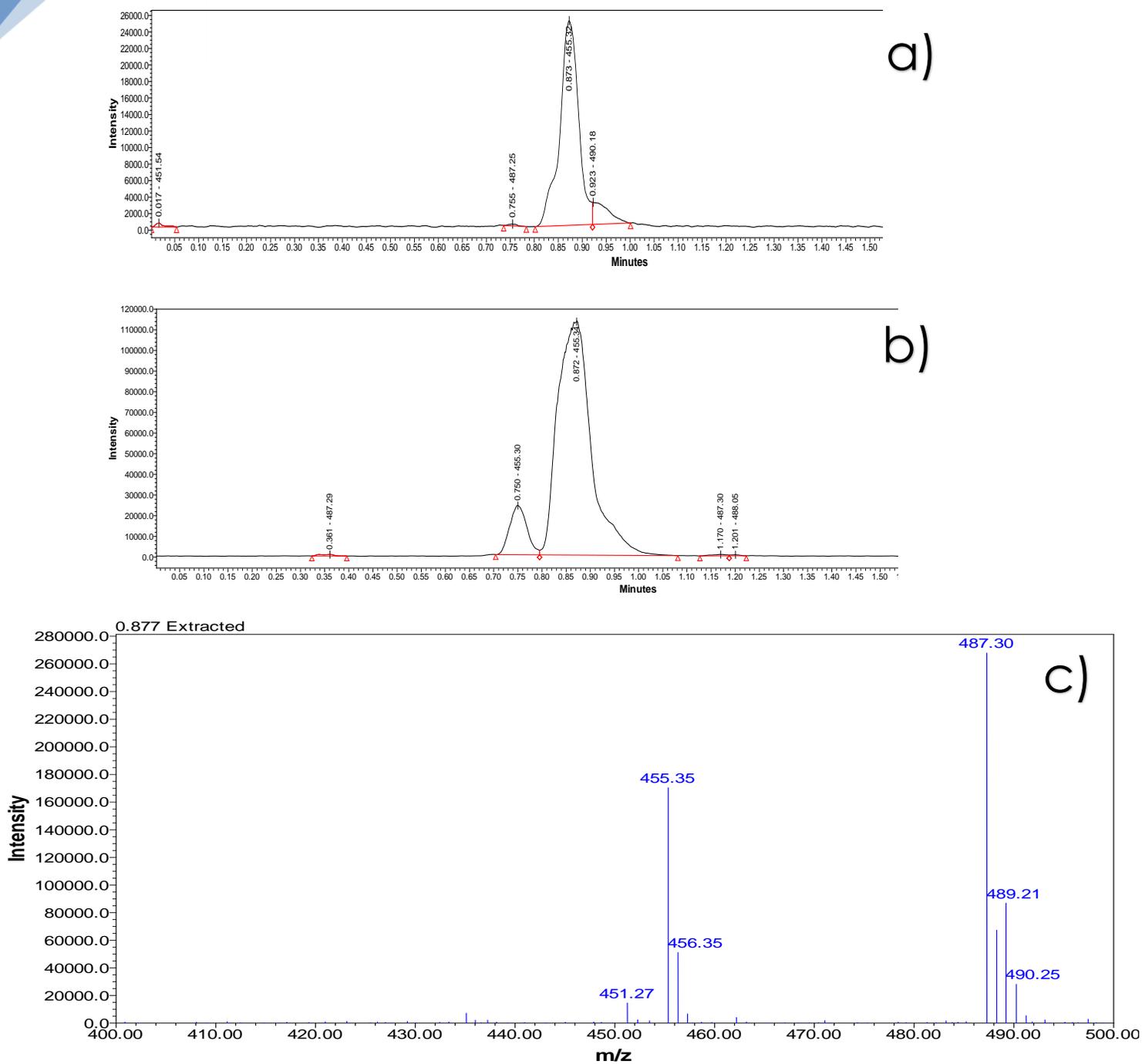


## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

Con lo que respecta a PSD12, se sospecha que se trata del ácido betulínico (estructura en la figura 30), esto debido a que se observa una banda mayoritaria, con un tiempo de retención de 0.799 minutos y con un  $m/z$  455.27 Da ESI-; valor que resulta muy similar al estándar de ácido betulínico, tiempo de retención 0.875 minutos y 455.3  $m/z$  Da (figura 32); sin embargo, también se logra observar otra banda con un tiempo de retención de 0.342 minutos y con un  $m/z$  325.18 Da ESI-, esto podría tratarse de la presencia de otro compuesto.

Se recomienda hacer uso de técnicas espectroscópicas, para realizar una correcta caracterización de los metabolitos presentes en estos precipitados.

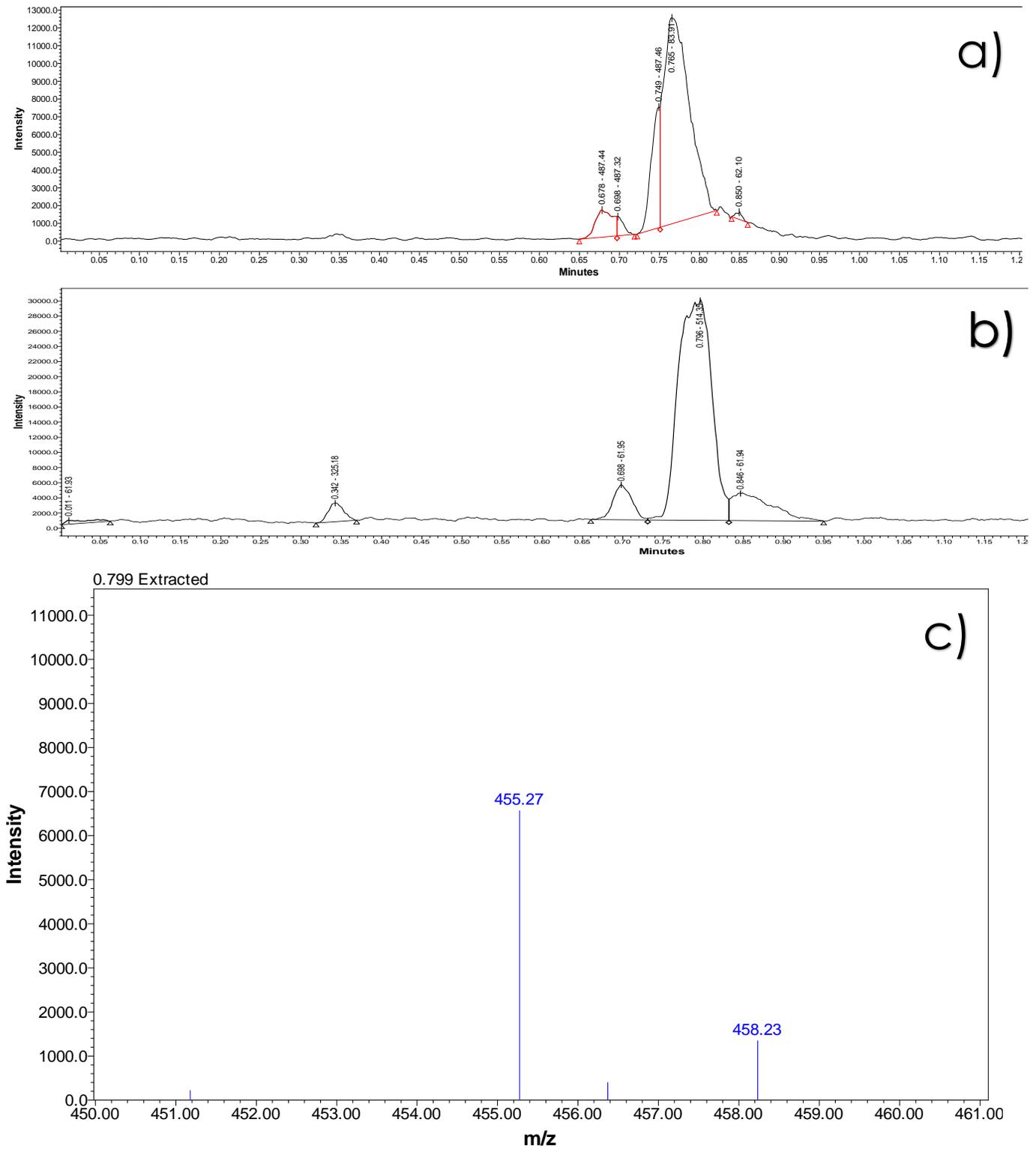
Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 31** Cromatogramas UHPLC donde:  
a) Estándar de ácido ursólico  
b) PSD11

c) Espectro de masas PSD tomado a un tiempo de 0.877 minutos,  
m/z 455.35

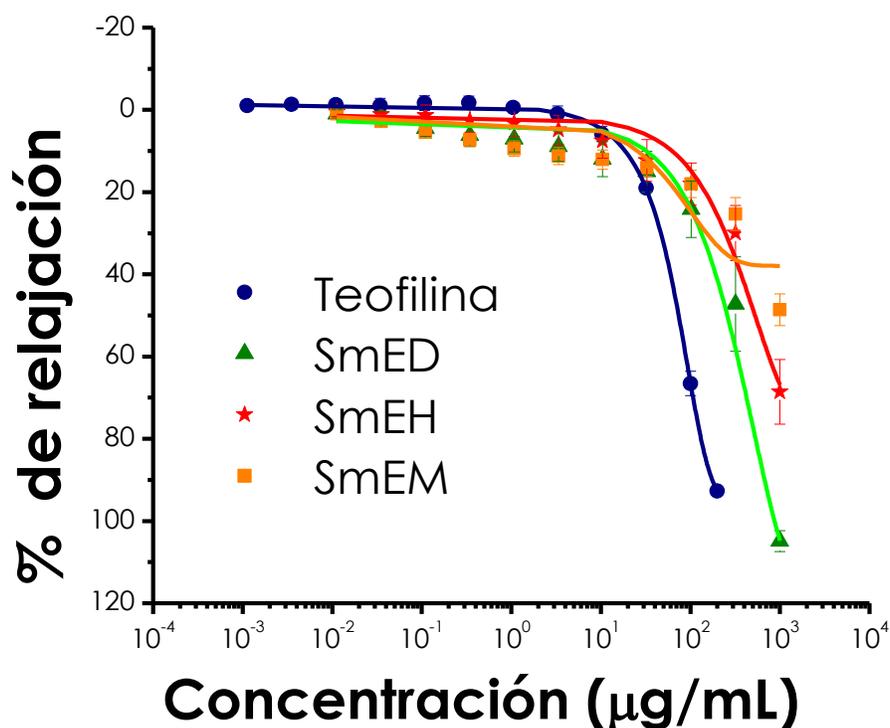
Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas



**Figura 32** Cromatogramas UHPLC donde:  
a) Estándar de ácido betulínico  
b) PSD12  
c) Espectro de masas PSD tomado a un tiempo de 0.799 minutos, m/z 455.27

## 7.2 Actividad relajante de los extractos de las especies en estudio.

Se evaluaron los dos extractos: hexánico y diclorometánico obtenidos a partir de la segunda maceración de la especie vegetal, de igual forma se incluyó el extracto metanólico obtenido a partir de las primeras maceraciones, en el modelo *ex vivo* de anillos de tráquea aislados de rata, pre-contraídos con carbacol 1  $\mu$ M, el porcentaje de relajación máximo y potencia de cada uno de ellos fue calculado.



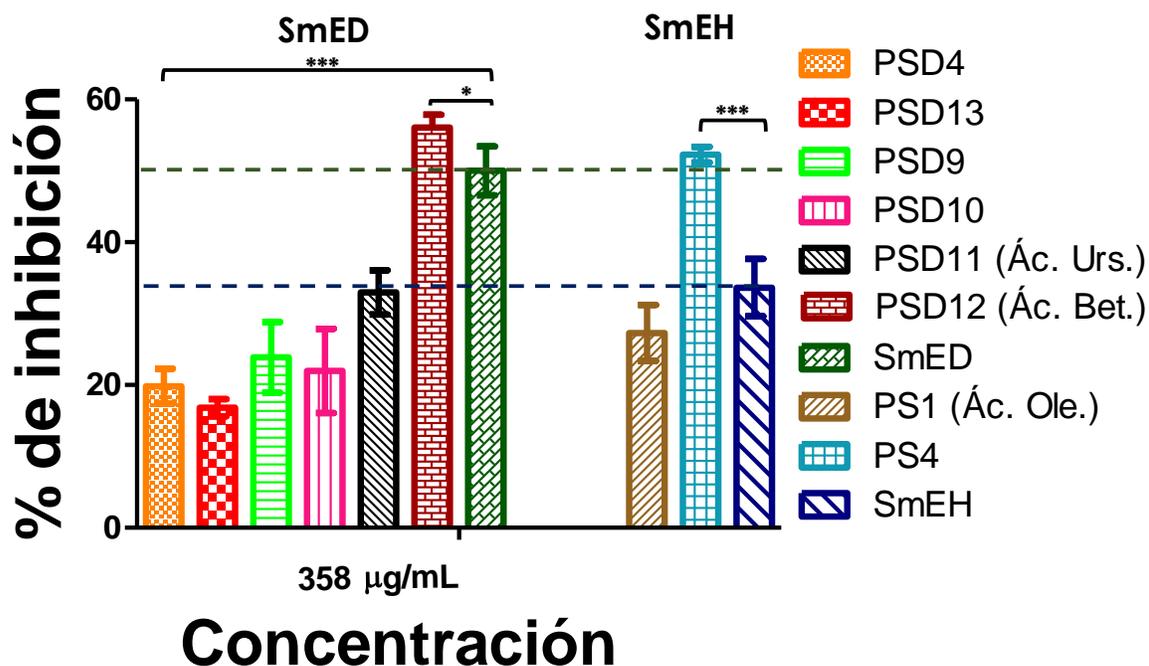
**Figura 33** Curva concentración respuesta del efecto relajante de los extractos: hexánico, diclorometánico y metanólico sobre anillos de tráquea aislados de rata

**Tabla 6** Comparación de efecto máximo y potencia de los extractos: hexánico, diclorometánico y metanólico de la especie en estudio

Extracto	EFEECTO MÁX (%)	POTENCIA (µg/mL)	POTENCIA RELATIVA
SmEH	68.5 ± 7.88	364.8	5.22
SmED	104.9 ± 2.52	358	5.15
SmEm	48.6 ± 3.8	NA	NA
Teofilina	92.7 ± 0.94	69.23	

En la figura 33 se muestra la curva de concentración respuesta de los extractos obtenidos, siendo el extracto diclorometánico (SmED) el que obtuvo un porcentaje mayor de relajación ( $104.9 \pm 2.52\%$ ) seguido por el hexánico (SmEH) ( $68.5 \pm 7.88\%$ ) y el metanólico (SmEM) ( $48.6 \pm 3.8\%$ ); cabe resaltar que SmED logro obtener un efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) mayor que el de la Teofilina, control utilizado, y los tres extractos mostraron efectos dependientes de la concentración (tabla 6). De estas curvas se calculó de manera matemática la concentración efectiva cincuenta ( $CE_{50}$ ) en cada uno de los casos.

De manera siguiente se realizaron evaluaciones en el modelo *ex vivo* de anillos de tráquea aislados de rata de los precipitados obtenidos en mayor rendimiento a partir de SmEH y SmED, en este caso se evaluaron a la concentración efectiva cincuenta de SmED ( $358 \mu\text{g/mL}$ ) extracto que resulto ser más activo, los resultados se ven expresados en la figura 34 en donde se puede apreciar que el precipitado PS4 obtenido a partir de SmEH, presento un porcentaje de inhibición de la contracción mayor ( $52.27 \pm 1.09\%$ ) y estadísticamente significativo ( $***P < 0.001$ ), en comparación con el extracto integro ( $33.64 \pm 4.03 \%$ ), con lo que respecta al extracto diclorometánico, el compuesto obtenido y del que se sospecha que es Ácido betulínico presento un porcentaje de inhibición mayor ( $56.09 \pm 1.75\%$ ), en comparación al extracto integro de donde fue obtenido ( $51.03 \pm 3.41\%$ ) en este último caso la diferencia estadísticamente significativa menor ( $*P < 0.05$ ). Con lo que respecta al resto de los precipitados evaluados, todos obtuvieron porcentajes de inhibición iguales o menores al ( $33.64 \pm 4.03 \%$ ); el del precipitado PS1, del que se cree que se trata del Ácido oleanólico fue de ( $27.29 \pm 3.92 \%$ ); y el del precipitado PSD11 del que se cree que se trata del Ácido ursólico fue de ( $32.97 \pm 3.12 \%$ ).



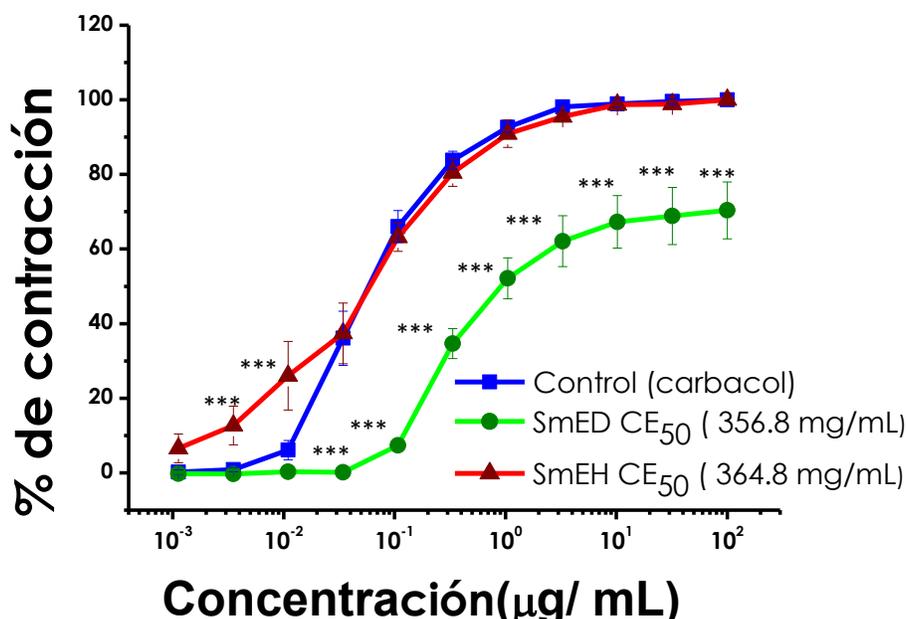
**Figura 34** Porcentaje de inhibición del efecto contráctil de diversos precipitados sobre anillos de tráquea. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media de cada grupo ( $n = 4$ ). ANADEVa de una vía, prueba *post hoc* Dunnett (\* $P < 0.05$  y \*\*\*  $P < 0.001$ ).

### 7.3 Determinación del mecanismo de acción del extracto hexánico de *Salvia mexicana*, así como de dos de los precipitados obtenidos.

Posterior a la evaluación farmacológica de los precipitados obtenidos y a la obtención de las curvas de concentración- respuesta de los extractos, apreciamos de manera gráfica el comportamiento relajante de cada uno de ellos, y debido a que en estudios previos se ha estudiado el mecanismo de acción del extracto diclorometánico se procedió a la determinación del posible mecanismo de acción implicado en la actividad relajante en anillos de tráquea aislados de rata del extracto hexánico, para hacer una posible comparación entre ambos; así como de la obtención de mecanismo de acción preliminar de los dos precipitados con mayor porcentaje inhibitorio de la contracción.

### 7.3.1 Participación de los receptores muscarínicos

Con el objetivo de conocer si el efecto relajante del extracto SmEH está relacionado con el antagonismo de los receptores muscarínicos ( $M_3$ ) presentes en la tráquea (Cazzola *et al.*, 2012), y de esta forma evitar la contracción inducida por este medio, se realizaron curvas concentración-respuesta con carbacol, en el cual se incubó previamente la  $CE_{50}$  de 364.8  $\mu\text{g/mL}$  del extracto, y se comparó la respuesta en presencia y ausencia de éste.



**Figura 13** Curva concentración respuesta del efecto contráctil de carbacol sobre anillos de tráquea aislados de rata en ausencia y presencia de SmED y SmEH.

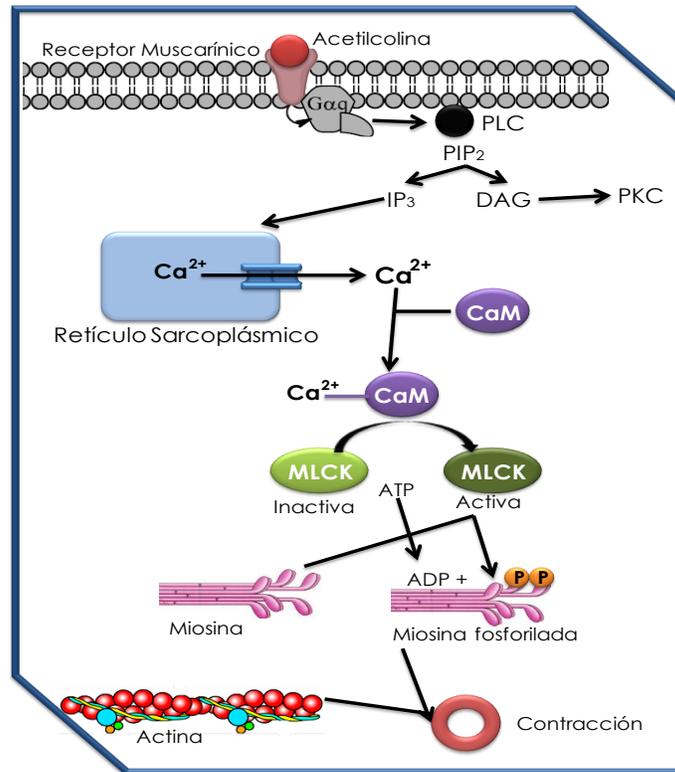
ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs control).

En la figura 35, se observa que SmEH no produce un cambio estadísticamente significativo en la contracción inducida con carbacol, el cual es un agonista de los receptores muscarínicos, se utilizaron diferentes concentraciones de este (0.0061 a 547.6  $\mu\text{M}$ ) de forma acumulativa, esto nos indica que SmEH no actúa sobre estos receptores.

En condiciones normales, el carbacol (análogo de acetilcolina), se une a dichos receptores, lo cual genera una serie de señales que llevarán a la contracción de la musculatura lisa, proceso detallado en la figura 36. Caso contrario, SmED en estudios anteriores, se descubrió que a partir de la concentración de 17.94  $\mu\text{M}$  (Montesinos Vique, 2016), existe

## Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

un desplazamiento significativo de la curva hacia la derecha y una disminución significativa de la eficacia en la contracción inducida por carbacol.



**Figura 36** Mecanismo de acción de los receptores muscarínicos

El agonista endógeno de dichos receptores es la acetilcolina, una vez que esta molécula se une a estos receptores metabotrópicos se generan una serie de señales que llevara a que la subunidad alfa de la proteína G acoplada al receptor, se desprenda, esta a su vez regulara positivamente la actividad de la enzima, fosfolipasa C, dicha enzima se encarga de biotrasnformar PIP<sub>3</sub> a IP<sub>3</sub>y DAG, este IP<sub>3</sub> generado se une a su receptor específico en la membrana del retículo sarcoplásmico, lo cual generara la liberación de calcio de este compartimento, dicho ion una vez que esté en el medio intracelular, formara un complejo calcio-calmodulina, y llevara a la activación de la miosincinasa de cadena ligera, dicha enzima y en presencia de ATP, se encargara de fosforilar las cabezas ligeras de miosina y una vez que pasa esto la miosina formara un enlace entrecruzado con la actina y se generara la contracción. (Matera & Cazzola, 2016)

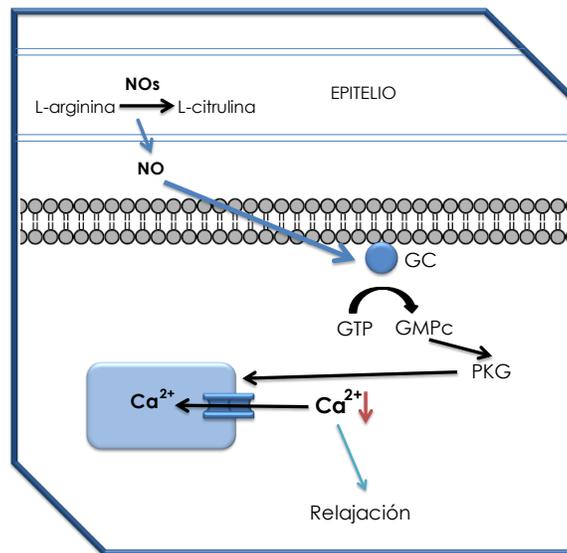
Lo que nos indica que SmED posiblemente actúa como un antagonista no competitivo de los receptores muscarínicos, el cual podría deberse a una unión alostérica al receptor (Matera & Cazzola, 2016), por otro lado, es probable que el efecto antagonista también pueda ser provocado por un antagonismo “no competitivo funcional” derivado de la interacción del extracto en el proceso de señalización posterior a la interacción del carbacol con el receptor (Zaagsma Johan *et al.*, 2006).

De esta forma se puede decir que con lo que respecta a receptores muscarínicos SmEH presenta un comportamiento diferente al reportado previamente de SmED lo cual era de esperarse debido a que la composición metabólica de ambos es distinta.

Así, es posible que los componentes bioactivos del extracto SmEH podrían actuar como bloqueadores de canales de calcio extracelular, como inhibidores de la formación del complejo calcio-CaM, aumentando las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc, como agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, entre otros (FJ Ehlert, 2003). Los estudios que a continuación se discuten permitirán establecer el potencial mecanismo de acción del extracto y en algunos de los casos se compara con SmED que ya se ha descrito con anterioridad.

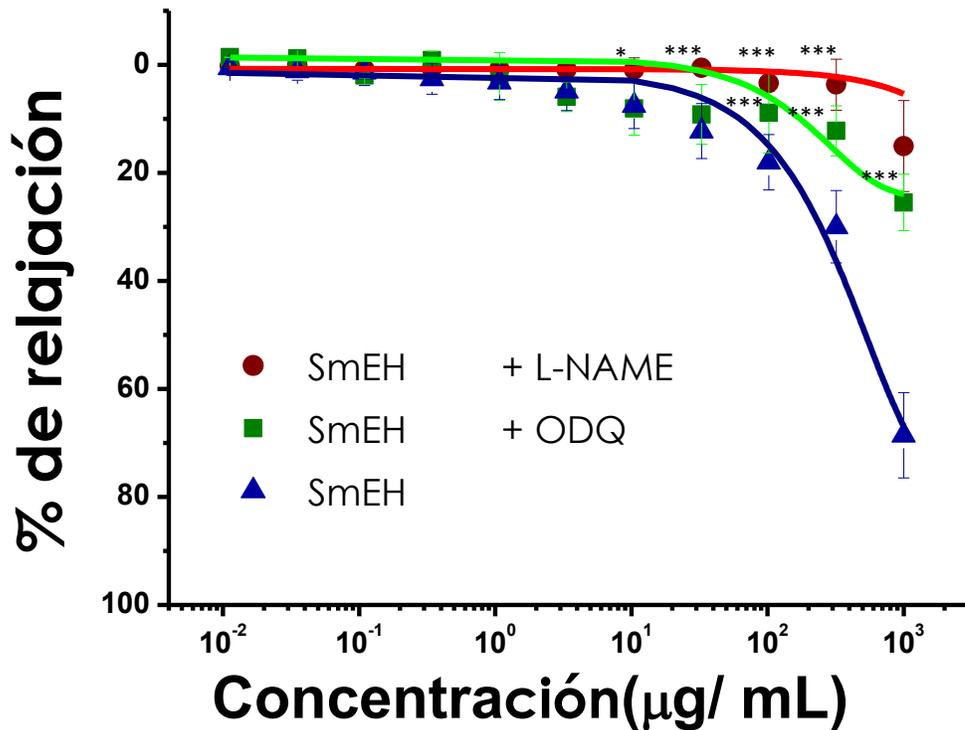
### 7.3.4 Participación de la vía NO-GMPC e inhibición de la enzima Guanilato ciclasa

Para determinar si SmEH actúa mediante la producción de óxido nítrico seguido de un aumento intracelular de GMPC, se realizaron curvas concentración-respuesta incubando L-NAME y ODQ de manera separada (Vieira *et al.*, 2013). En condiciones normales, la L-arginina es oxidada a L-citrulina en el endotelio mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), liberándose de este proceso óxido nítrico (NO) (Maarsingh *et al.*, 2006). El NO entra al medio intracelular mediante transporte facilitado de las células del músculo liso, activando la guanilato ciclasa, enzima encargada de la ciclación de GTP a GMPC, lo que ocasiona un aumento de las concentraciones intracelulares de GMPC, el cual activa a PKG, y por consiguiente relajando la musculatura lisa (Perez-Zoghbi *et al.*, 2010).



**Figura 37** Mecanismo de acción de la vía NO-GMPC

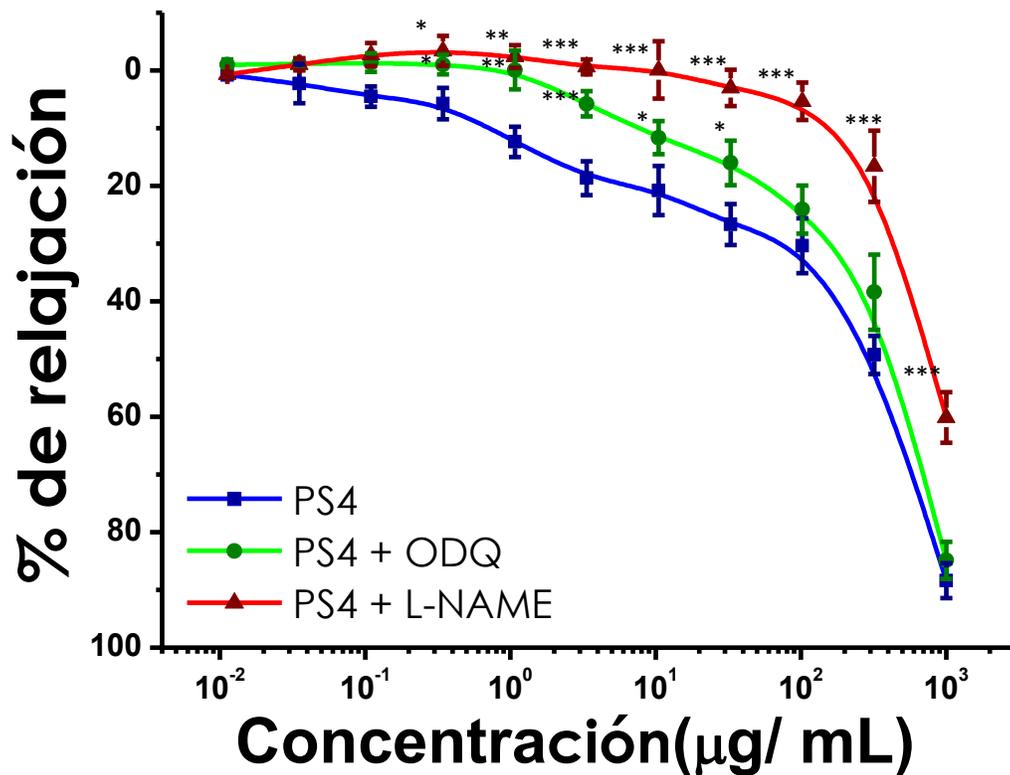
En este sentido se incubó L-NAME, el cual es un análogo de la L-arginina, inhibiendo la oxidación de este y por consecuencia impidiendo la liberación de NO; como se observa en la figura 38, la curva de respuesta ante la adición de SmEH se opuso en gran manera y estadísticamente significativa a la actividad relajante de la curva control obtenido en ausencia del inhibidor de NOS, indicándonos que el extracto está actuando fuertemente en esta vía y que su mecanismo de acción es dependiente al óxido nítrico (González de Alfonso *et al.*, 2010).



**Figura 38** Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*P<0.001; \*P<0.01; \*P<0.05 vs control).

Por otra parte se incubó ODQ, el cual es un inhibidor de la enzima guanilato ciclasa, la cual impide la ciclación de GTP a GMPc; tras la elaboración de las curvas concentración-respuesta, representados en la figura 38, se aprecia un desplazamiento significativo hacia la derecha a partir de la concentración (0.01099 µg/mL) y sin alcanzar la relajación máxima obtenida sin este inhibidor, lo cual nos indica que la disminución de GMPc está relacionado con un decremento del efecto relajante de SmEH. Por lo observado en ambos ensayos, se puede decir que el extracto está actuando fuertemente mediante la vía de NO/GMPc (González de Alfonso *et al.*, 2010).

Con base en los resultados de la actividad de SmEH sobre la vía NO-GMPC e inhibición de la enzima Guanilato ciclasa, se decidió evaluar el precipitado PS4 (obtenido a partir de dicho extracto), se realizaron curvas concentración-respuesta incubando L-NAME y ODQ de manera separada, de esta manera impidiendo la liberación de NO e inhibiendo la enzima guanilato ciclasa, ya sea el caso; obtenido de este ensayo los resultados presentados en la figura 39, como se puede apreciar, la curva obtenida de PS4 en presencia de ODQ presenta un desplazamiento estadísticamente significativo a la derecha en el rango de concentración de 0.343 a 32.76  $\mu\text{g/mL}$ , esto nos indica que en presencia de un antagonista de la enzima guanilato ciclasa, ocurre una disminución de la potencia, sin embargo se alcanzan efectos máximos muy parecidos, lo cual sugiere que la participación por esta vía es prácticamente nula.



**Figura 39** Curva concentración respuesta del efecto relajante de PS4 sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs control).

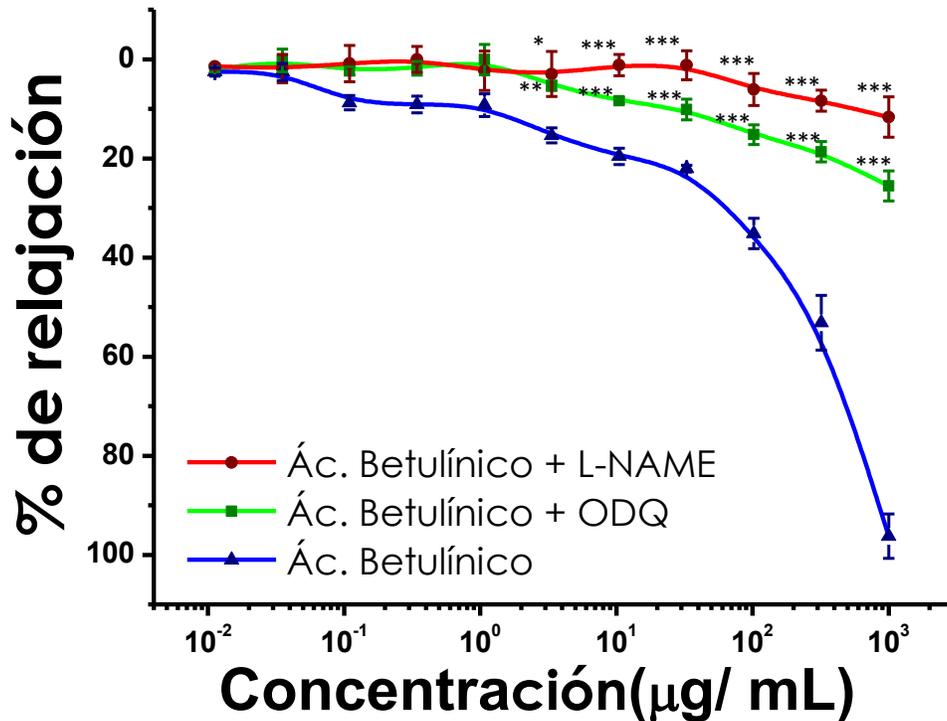
Sin embargo cuando se incubó L-NAME (análogo de la L-arginina, el cual actúa como falso sustrato de la NOs y por consecuencia no ocurre la liberación de NO), ocurre una oposición a la relajación estadísticamente significativa a partir de la concentración 0.343 µg/mL, además de una disminución del efecto máximo alcanzado aproximadamente en un 19.87%, esto nos sugiere que PS4 presenta un mecanismo ligeramente dependiente de NO (González de Alfonso *et al.*, 2010).

Realizando una comparación de los comportamientos observados en SmEH y PS4, no se observan tendencias parecidas tanto con ODQ y/o L-NAME, lo cual nos sugiere que PS4 no es el responsable de la actividad mostrada por el extracto íntegro en esta vía, es posible que alguno de los demás componentes bioactivos del extracto SmEH, sea el que presente un mecanismo fuertemente ligado a la vía NO-GMPC e inhibición de la enzima Guanilato ciclasa.

Por otro lado, estudios previos en los que se estudió el mecanismo de acción de SmED, se observó (Figura 4), que el extracto actúa de manera parcial mediante la vía de NO/GMPC (Montesinos Vique, 2016). Y debido a que en el fraccionamiento de este, se sospecha la presencia de Ácido Oleanólico, Ácido Ursólico y Ácido Betulínico; se decidió evaluar este último en esta vía, ya que en los ensayos de inhibición de la contracción, presentó un porcentaje de inhibición mayor ( $56.09 \pm 1.75\%$ ), en comparación al extracto íntegro de donde fue obtenido ( $51.03 \pm 3.41\%$ ), además de que en estudios previos Estrado-Soto *et al.*, (2012), propone que el Ácido betulínico, induce la relajación en anillos de aorta torácica de rata, mediante un mecanismo dependiente de endotelio, en el que se involucra principalmente la producción de NO.

Con base en lo anterior, se realizaron curvas concentración-respuesta del Ácido betulínico incubando L-NAME y ODQ de manera separada (figura 40), donde se observó una oposición estadísticamente significativa de la actividad relajante a partir de la concentración 1.073 µg/mL, la cual fue sostenida durante todo el ensayo, por ende disminuye de igual forma el porcentaje de relajación máximo en los anillos de tráquea aislada de rata, siendo este de  $25.54 \pm 3.02\%$  cuando se incubó L-NAME y  $11.65 \pm 4.10\%$  en el caso de ODQ; realizando una comparación con el extracto íntegro cuyo efecto máximo fue de  $96.22 \pm 4.71\%$ ; esto nos indica que el posible mecanismo de acción del Ácido betulínico está estrechamente relacionado con la producción de NO y la activación subsecuente de la enzima Guanilato ciclasa, caso parecido al que ocurre en anillos de aorta torácica de rata descrito por Estrado-Soto *et al.*, (2012); en otro trabajo Fu-JY *et al.*, (2011) propone que el

Ácido Betulínico puede provocar una relajación dependiente de la concentración en anillos aórticos de rata, previamente contraídos con fenilefrina, proponiendo que esta actividad puede estar mediada por la reducción del estrés oxidativo y producción de Óxido nítrico.



**Figura 40** Curva concentración respuesta del efecto relajante del Ácido Betulínico sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de ODQ y L-NAME. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*P<0.001; \*\*P<0.01; \*P<0.05 vs control).

El óxido nítrico (NO) es una molécula de estructura atómica simple, y tiene un papel elemental en la regulación de múltiples funciones biológicas como son: la relajación vascular, la agregación plaquetaria, la neurotransmisión o la oxidación mitocondrial (Badimón Lina & Salas Eduardo, 2006).

En las vías aéreas, el NO se sintetiza en las células endoteliales y epiteliales, así como en algunas células inflamatorias de la mucosa, por ejemplo: mastocitos y macrófagos. Es producido por la enzima Óxido nítrico sintasa, cuando esta produce el aminoácido L-citrulina, liberando NO, un radical libre altamente inestable que reacciona con derivados

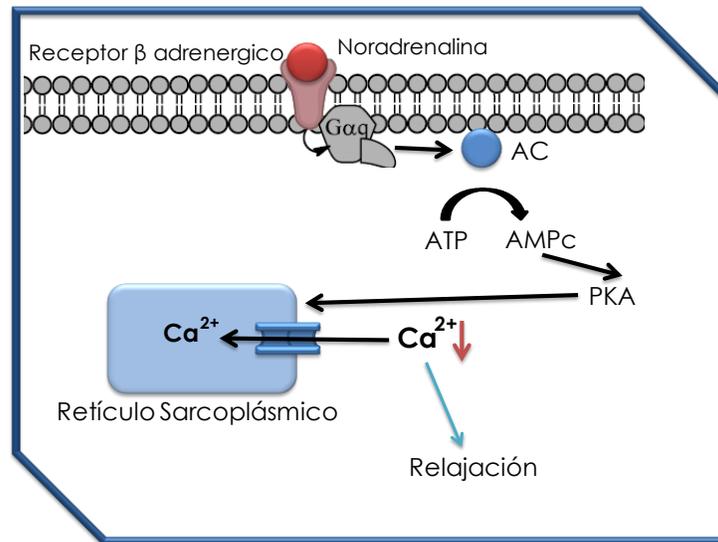


**Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas**

lipídicos, nitrogenados o acuosos de las estructuras celulares cercanas. La función fisiológica del NO en las vías aéreas, se estima que podría ser debida a su capacidad como neurotransmisor de los nervios no-adrenérgicos, no-colinérgicos actuando como broncodilatador endógeno (Diego Damiá *et al.*, 2010). En este sentido el Ácido betulínico, así como el extracto SmEH, podrían ser buenos objetos de estudio, con la finalidad buscar una posible aplicación como coadyuvantes en manejo y/o control del asma.

### 7.3.5 Bloqueo de receptores $\beta$ adrenérgicos

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos están acoplados a la proteína G, cuando son estimulados se desprende la subunidad alfa de dicha proteína y activa a la enzima adenilciclasa, aumentando las concentraciones intracelulares de AMPc obtenido a partir de la ciclación de AMP, activándose PKA y produciendo una recaptura del calcio intracelular, ocurriendo así la relajación del músculo liso (Cazzola *et al.*, 2012).



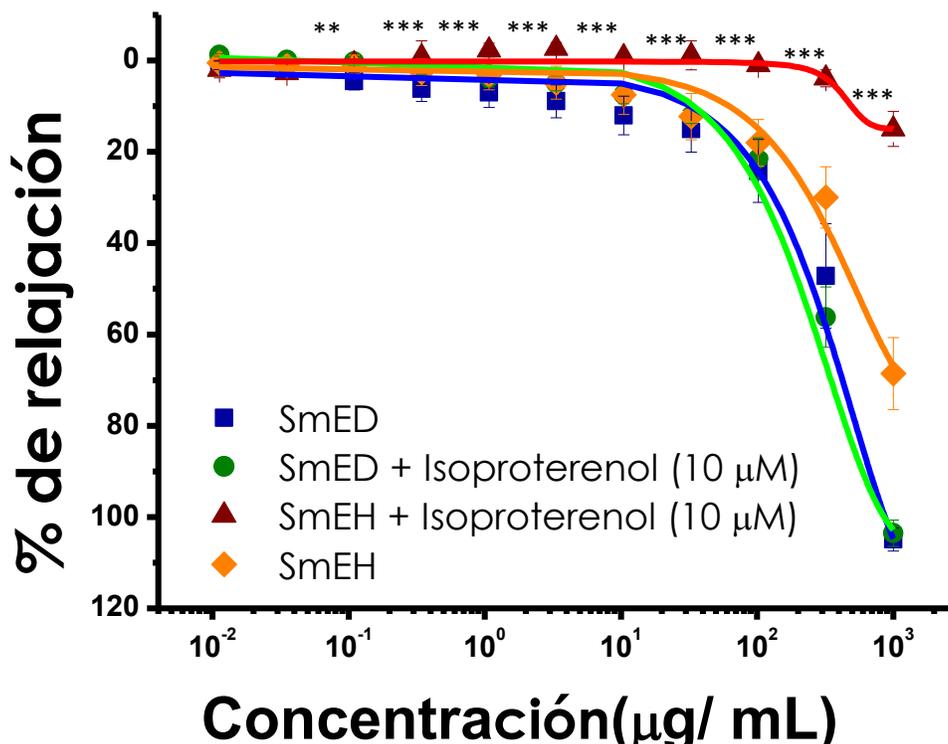
**Figura 41** Mecanismo de acción de los receptores  $\beta$  adrenérgicos

Con la finalidad de conocer si SmEH actúa mediante la unión a receptores  $\beta$  adrenérgicos se preincubó isoproterenol 10  $\mu$ M, el cual es un agonista de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, y como se aprecia en la figura 42, SmEH pierde casi completamente y de manera estadísticamente significativa su actividad relajante, comparando con la actividad en ausencia de isoproterenol, este comportamiento nos podría indicar que SmEH está actuando fuertemente sobre estos receptores, este fenómeno se puede explicar debido a los mecanismos de defensa celular que se desencadenan ante la gran sobre estimulación y sobreocupación de dichos receptores.

Estudios recientes, sobre todo en receptores de membrana han demostrado que la unión de un agonista con un receptor que origina una respuesta celular, puede, si la activación es frecuente y continua, producir cambios en el tipo de unión química ligando receptor, en el

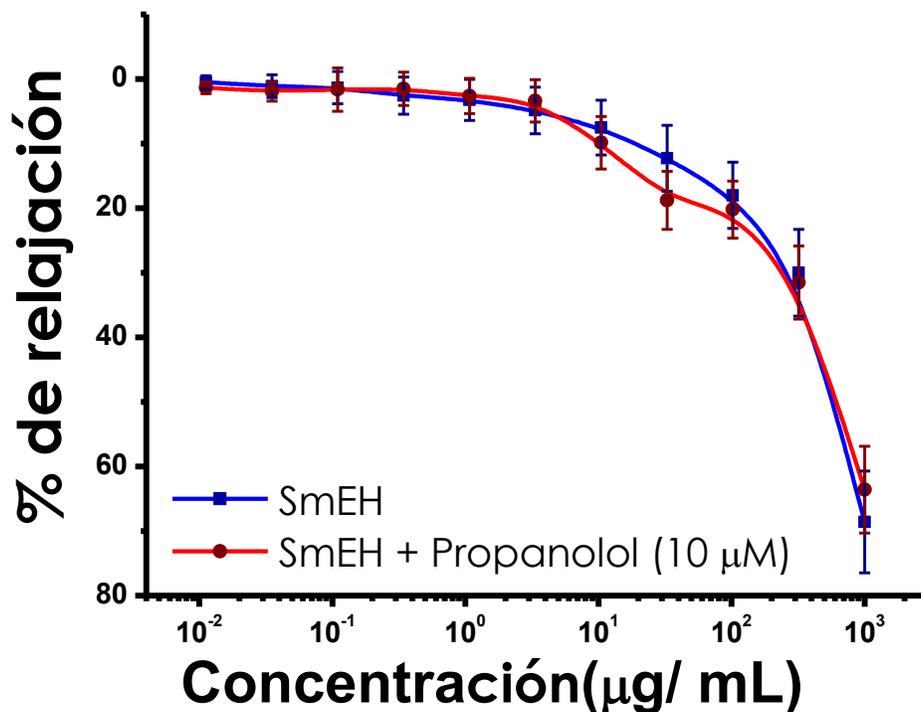
número de receptores disponibles y en la afinidad del agonista con el receptor como consecuencia, dichos cambios producen un estado de desensibilización conocido por sus siglas en inglés como “down regulation” que modula la respuesta celular ante la sobreestimulación y sobreocupación de receptores.

Recientemente se han demostrado que los receptor beta pierde progresivamente sus sensibilidad en un proceso de regulación ante la presencia persistente de un agonista, porque sufre una fosforilación por la acción de dos cinasas: la proteína cinasa C y una cinasa modulada por el AMPc (proteína cinasa A), de esta manera en el propio proceso de activación del receptor beta se genera AMPc intracelular, el que a su vez induce dicha cinasa específica, que fosforila al receptor y determina una pérdida de su sensibilidad. Un mecanismo similar ocurre con la proteína cinasa C. Este proceso de “down regulation” por pérdida progresiva de la afinidad de los receptores por los agonistas específicos está bien demostrado en exposiciones prolongadas con estimulantes betaadrenérgicos en las vías aéreas respiratorias (down regulation de la acción broncodilatadora).



**Figura 42** Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH y SmED sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Isoproterenol. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de *tukey* para muestras desequilibradas (\*\*\*) $P < 0.001$  vs control).

Para corroborar el comportamiento presentado por el extracto hexánico se propuso otro ensayo, realizando modificaciones al protocolo previo, en lugar de incubar 10  $\mu$ M de Isoproterenol, se siguió el protocolo descrito por Sanchez-Recilla *et al.*,(2017), en el cual se pre-incuba Propanolol a una concentración de 10  $\mu$ M, se utiliza esta molécula, debido a que su principal actividad biológica es antagonizar de manera no selectiva los receptores  $\beta$  adrenérgicos, obteniendo los resultados presentados en la figura 43; donde se puede apreciar que la curva de relajación del extracto en la que se pre incubo Propanolol, presenta un comportamiento parecido al del control, y sin diferencia estadísticamente significativa, sugiriéndonos que posiblemente SmEH está actuando, como un agonista alostérico de dicho receptor, en este sentido, el extracto se une a un sitio diferente al que se une el Propanolol, es por eso que su actividad farmacológica no se ve afectada por la presencia de este antagonista.



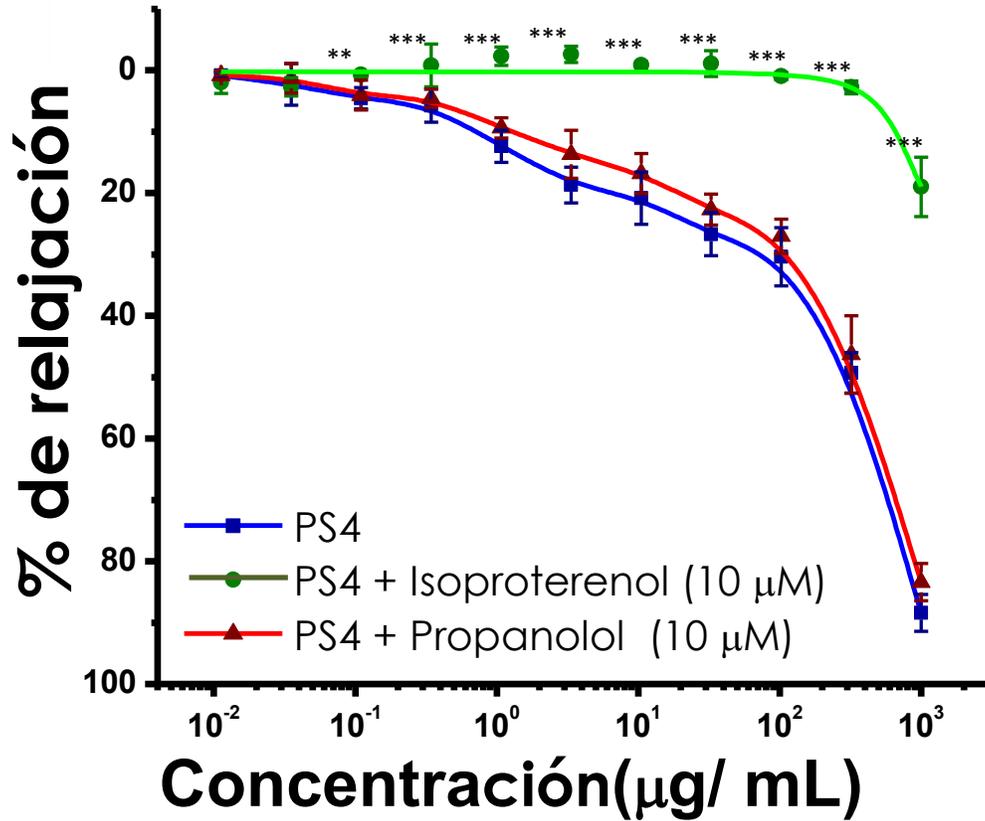
**Figura 43** Curva concentración respuesta del efecto relajante de SmEH sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Propanolol. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*P<0.001 vs control).

Por otro lado con lo que respecta a SmED, se ha demostrado en estudios previos que en ausencia y presencia de isoproterenol presenta un efecto máximo de relajación parecido en ambos casos, y sin diferencia estadísticamente significativa, lo que nos indica que este extracto no está actuando por la activación de estos receptores, sugiriéndonos que posiblemente actúa por otra vía y dejando en evidencia nuevamente que ambos extractos presentan mecanismos de acción muy opuestos, al igual como se apreció en la vía de los receptores muscarínicos.

Con base en los resultados de la actividad de SmEH sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos, se decidió evaluar el precipitado PS4 (obtenido a partir de dicho extracto), utilizando tanto Isoproterenol y Propanolol 10  $\mu$ M, obtenido de este proceso los resultados presentados en la figura 29; cómo se puede apreciar, PS4 en presencia de Isoproterenol pierde casi completamente y de manera estadísticamente significativa su actividad relajante, comparando con la actividad en ausencia de isoproterenol, este comportamiento nos podría indicar que el precipitado está actuando fuertemente sobre estos receptores, debido a que pierde casi completamente su actividad cuando estos se encuentran desensibilizados, proceso explicado anteriormente.

De manera siguiente se procedió a realizar el experimento en el que se incubó Propanolol a una concentración de 10  $\mu$ M para corroborar los resultados obtenidos (figura 44), debido a que se sospecha que PS4 tiene una fuerte actividad sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos, se esperaba que en presencia de un antagonista de estos receptores, como es el Propanolol, PS4 pierda su actividad farmacológica, fenómeno que no ocurrió, ya que tanto la curva de relajación control, así en la que se incubó el antagonista, presentaron tendencias parecidas y sin diferencia estadísticamente significativa, lo que sugiere que posiblemente, PS4 esté actuando sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos en un sitio alostérico, al que se une Propanolol.

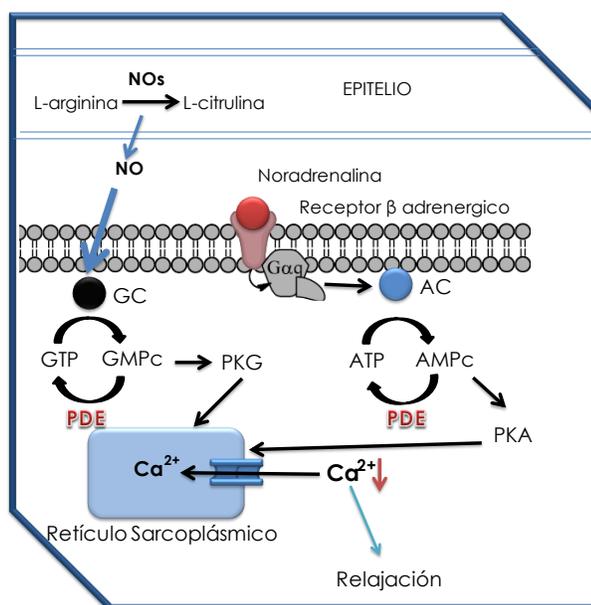
Realizando una comparación de los comportamientos observados en SmEH y PS4, se observa que ambos presentan tendencias parecidas tanto con Propanolol e Isoproterenol, lo cual nos sugiere que PS4 es el responsable de la actividad mostrada por el extracto íntegro sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos.



**Figura 44** Curva concentración respuesta del efecto relajante de PS4 sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia de Isoproterenol y Propanolol. ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* HSD de tukey para muestras desequilibradas (\*\*P<0.001 vs control).

### 7.3.6 Inhibición de fosfodiesterasas

Para apreciar si el extracto está participando a nivel de la inhibición de fosfodiesterasas, enzimas cuya función principal es hidrolizar los nucleótidos cíclicos intracelulares, principalmente AMPc y GMPc (Barnes, 2013); si esta enzima es inhibida la concentración intracelular de ambos nucleótidos aumenta y por consiguiente ocurre una activación de fosfoquinasas (PKA y PPG), las cuales llevarán a la disminución del calcio intracelular y por lo tanto a una relajación en las células del músculo liso respiratorio (Sulaiman *et al.*, 2016).

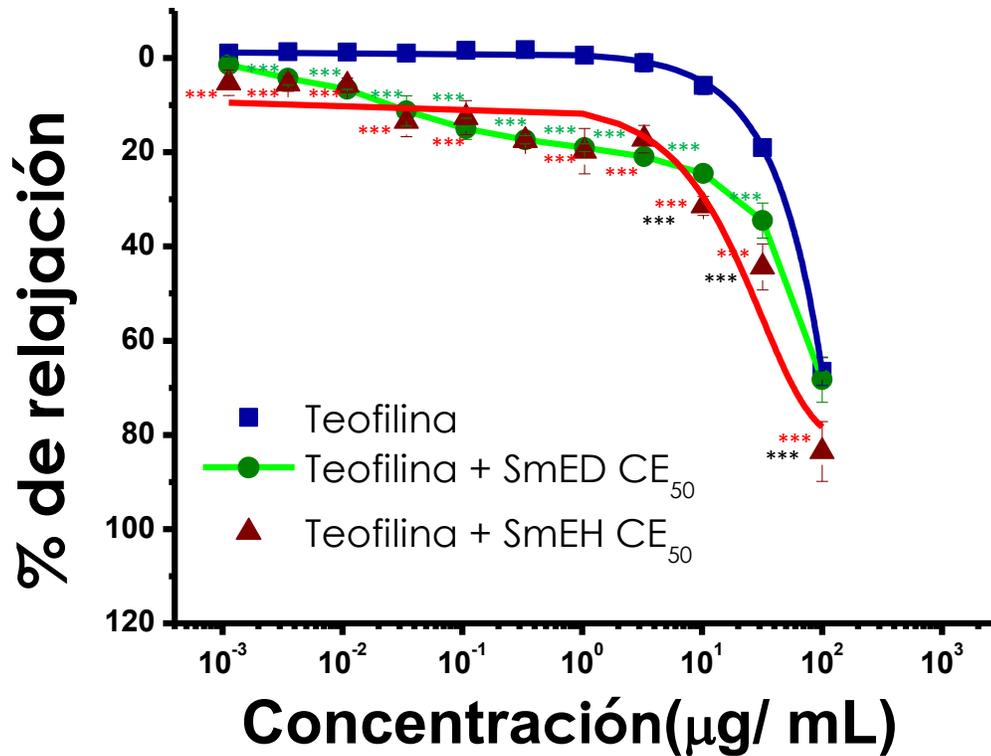


**Figura 45** Mecanismo de acción de las fosfodiesterasas.

Con base a esto se construyeron curvas de relajación con teofilina (inhibidor no selectivo de fosfodiesterasas) en ausencia y presencia de SmEH (figura 46), logrando apreciar un aumento de la potencia estadísticamente significativa a partir de la primera concentración lo que nos indica que ocurre una inhibición no competitiva, lo que incrementa la acumulación de los mensajeros cíclicos intracelulares a través de la inhibición de fosfodiesterasas y generando relajación, este experimento nos sirve para corroborar los resultados obtenidos anteriormente, en los que apreciamos que SmEH tiene un fuerte actividad sobre los receptores beta adrenérgicos y en la vía del NO y GMPc.

Caso contrario a los resultados obtenidos anteriormente de SmED, en los que se aprecia aumento de la potencia estadísticamente significativa a partir de la concentración (32 µg/mL), sin embargo, en ambos casos se obtuvo el mismo efecto máximo, posiblemente

atribuible a que este extracto tiene una participación nula en los receptores  $\beta$  adrenérgicos y una ligera participación en la vía NO-GMPc.



**Figura 46** Curva concentración respuesta del efecto relajante de teofilina sobre anillos de tráquea aislados de rata en presencia y ausencia de SmEH y SmED.

ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Bonferroni (\*\*\*) $P < 0.001$  vs control).



# CONCLUSIÓN

## 8. Conclusiones

El mecanismo de acción de SmED y SmEH resultaron ser completamente distintos, mientras el primero tiene una fuerte participación en canales de calcio dependientes de voltaje y una ligera participación en receptores muscarínicos, el extracto hexánico participa fuertemente en la vía de los receptores B adrenérgicos, además de que se demostró que de igual forma necesita de óxido nítrico y de la guanilato ciclasa para ejercer su actividad relajante; esta diferencia en mecanismos de acción es debido a que ambos extractos presentan composición metabólica diferente; de los dos precipitados que se evaluaron PS4 resulto ser el responsable de la actividad sobre los receptores beta adrenérgicos mostrada por SmEH, mientras que el ácido betulínico (PSD12) mostro una fuerte participación en la vía del óxido nítrico y guanilato ciclasa. La importancia de estudio de este trabajo radica en la búsqueda de candidatos idóneo que presenten una actividad biológica importante sobre las vías aéreas, para de esta forma ofrecer alternativas y posterior a esto el posible desarrollo de un fármaco para la terapia en asma y/o enfermedades asociadas.



# PERSPECTIVAS

## 9. Perspectivas

- Evaluar el efecto antiasmático de SmED y SmEH en un modelo *in vivo* de asma alérgica en cobayo.
- Determinar el efecto toxicológico agudo y subagudo de los compuestos más activos.
- Realizar un fraccionamiento cromatográfico de SmEH
- Realizar estudios vaso relajantes de los extractos SmED y SmEH.



# REFERENCIAS

## 10. Referencias bibliográficas

- Anwarul , H., Abdul, J., Muhammad , N., & Kashif, M. (2004). Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders. *Life Science*, 76, 3089–3105.
- Badimón Lina & Salas Eduardo. (2006). Líneas de investigación en el uso terapéutico del óxido nítrico. *Rev Esp Cardiol Supl.* 6(A), 51-8.
- Barnes , P. (2013). Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188, 725-747.
- Bazan Perkins, B., González Avila, G., Sandoval, C., Sommer, B., Vadillo Gonzalez, S., Ramos, C., et al. (2016). Interstitial collagen turnover during airway remodeling in acute and chronic experimental asthma. *Exp Ther Med*, 1419–1427.
- Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I., (2007). The allergic cascade: review of the most important molecules in. *Immunology letters*, 113(1), 6-18.
- Cazzola, M., Page, C., Calzetta, L., Matera, M., & Sibley, D. (2012). Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Pharmacological Reviews*, 64, 450-504.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. (2015). *EncicloVida*. Recuperado el 2015 de Septiembre de 13, de <http://www.enciclovida.mx/especies/6028228>
- del Río Navarro, B. E., Hidalgo Castro, E. M., & Sierra Monge, J. J. (2009). Asma. *Boletín Medico Hospital Infantil Mexico*, 66.
- Dennis Kasper, A. F. (2016). *HARRISON Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Diego Damiá, Alfredo de (2010). Nitric Oxide in Asthma: What Good Does It Do?. *Archivos de bronconeumología*, 46(4),157-212.

- Emily L. Whitson, Cheryl L. Thomas, Curtis J. Henrich, Thomas J. Sayers, James B. McMahon, & Tawnya C. McKee. (2011). Clrodane Diterpenes from *Casearia arguta* that Act as Synergistic TRAIL Sensitizers. *J Nat Prod.*, 73, 2013–2018.
- Estrada Soto, Hernández Abreu *et al.* (2012), Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia*, 83,1023–1029
- FJ, E. (2003). Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sciences*, 74, 355–366.
- Galli SJ, T. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454 (7203), 445-454.
- García Sancho, C. (2012). Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de de 40 años o más de las Ciudad de México: estudio de base poblacional. *Salud Publica*, 54, 425-432.
- Global Initiative for Asthma. (2016). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de <http://www.ginasthma.org/>
- Global Initiative for Asthma. (2016). *Pocket guide for asthma management and prevention*. Obtenido de [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
- González de Alfonzo, R., Lippo de Becemberg, I., Alfonzo, M., & Placeres-Uray, F. (2010). Soluble Guanylyl Cyclase Is Reduced in Airway Smooth Muscle Cells From a Murine Model of Allergic Asthma. *World Allergy Organ J.*, 3(12), 271–276.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiología médica* (Edición 12 ed.). ElSevier.
- Haick, J. &. (2016). Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7. *Pharmacology and Therapeutics*, 165, 14–25.
- Holcomb S. (2004). Asthma Update. *Dimensions of Critical Care Nursing*, 23 (3), 101-108.

- Instituto Nacional Indigenista. (2009). *Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2015, de Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chamiso&id=7151>
- Karol MH. (1994). Animal models of occupational asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 7(3), 555-568.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2013). *Farmacología Básica y Clínica* (Edición 12 ed.). Mc. Graw-Hill.
- Ma Y, Zhang JX, Liu YN, Ge A , & Zha WJ . (2016). Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway. *Free Radic Biol Med.*, 101, 163-175.
- Maarsingh, H., Leusink, J., Zaagsma, J., & Meurs, H. (2006). Role of the L-citrulline/L-arginine cycle in iNANC nerve-mediated nitric oxide production and airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *European Journal of Pharmacology*, 546, 171-176.
- Matera , M. G., & Cazzola, M. (2016). Muscarinic Receptor Antagonists. *Handb Exp Pharmacol.*, 1-22.
- Medzhitov Ruslan. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.
- Monroy Ortiz , C., & Castillo España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Montesinos Vique, A. R. (2016). Tesis de licenciatura “Caracterización farmacológica de *Casearia arguta*, *Magnolia dealbata* y *Salvia mexicana* en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata”.
- Norlaily Mohd Ali, Swee Keong Yeap, Wan Yong Ho, Boon Kee Beh, Sheau Wei Tan, & Soon Guan Tan. (2012). The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. *J Biomed Biotechnol.*, 2012, 9.

- Oh JH, K. L. (2010). Anti-inflammatory effect of 4-O-methylhonokiol, compound isolated from *Magnolia officinalis* through inhibition of NF-kappaB. *Chem Biol Interact*, 180, 506-514.
- OMS. (2016). *Organizacion Mundial de la Salud*. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/>
- Perez-Zoghbi, J., Bai, Y., & Sanderson, M. (2010). Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation decreasing the frequency of agonist-induced Ca. *The Journal of General Physiology*, 153, 247–259.
- Pierre, O., Annaig, O., Imane, B., Tunon de Lara, J.-M., Marthan, R., & Berger, P. (2011). Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacology & Therapeutics*, 130, 325-337.
- Pretolani M, Vargaftig BB. (1996). Role of eosinophil mobilization and activation experimental airway inflammation and bronchopulmonary hyperreactivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 796, 72-81.
- Pulendran B, A. D. (2012). New paradigms in type 2 immunity. *Science*, 337(6093), 431-435.
- Ramos Barbón D. (2007). Asma, de la biología a la clínica. *Archive of Bronconeumology*, 43(2), 3-14.
- Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. (2008). The guinea pig as an animal model for asthma. *Current drug targets*, 9(6), 452-465.
- Robinson D. (2004). The role of the mast cell in asthma: Induction of airway hypersensitivity by interaction with smooth muscle. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (1), 58-65.
- Saladin, K. S. (2012). *ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA*. Georgia College & State University: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V.
- Saponara S, Carosati E, Mugnai P, Sgaragli G, & Fusi F. (2011). The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Ca(v) 1.2 channels. *Br J Pharmacol.*, 164, 1684–1697.

- Secretaria de Salud. (2015). *Dirección General de Epidemiología*. Recuperado el 1 de agosto de 2016, de [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/incidencia\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/incidencia_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf)
- Secretaria de Salud. (2015). *Dirección General de Epidemiología*. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad\\_grupo\\_edad\\_entidad\\_federativa/054.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/incidencia/enfermedad_grupo_edad_entidad_federativa/054.pdf)
- Sienra-Monge, J. J., del Río-Navarro, B., & Baeza-Bacab, M. (s.f.). Asma. *Salud Pública Méx*, 64-70.
- Sulaiman, I., Woei, L., Liong, S., & Stanslas, J. (2016). Molecularly targeted therapies for asthma: Current development, challenges and and potential clinical translation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 40, 52-68.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología* (13ª edición ed.). Panamericana.
- UNAM. (2009). *Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana* . Recuperado el 3 de Septiembre de 2015, de Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chamiso&id=7151>
- Vega, L. (2003). *Magnolia dealbata*. *Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana*.
- Vieira, A., Coelho, L., R. Insuela, D., Carvalho, V., dos Santos, M., Silva, P., y otros. (2013). Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway. *PLoS ONE*, 8, e71759.
- Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et. (2003). Airway remodeling in asthma. *Chest*, 123(3 Suppl), 417S-422S.
- Viktor Rempel, Alexander Fuchs, Sonja Hinz, Tadeusz Karcz, Matthias Lehr, Uwe Koetter, y otros. (2012). Magnolia Extract, Magnolol, and Metabolites: Activation of



Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas

Cannabinoid CB2 Receptors and Blockade of the Related GPR55. *ACS Med Chem Lett.*, 4, 41–45.

Webb, R. C. (2003). SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. *American Physiological Society*, 27, 201-206.

Xia, L., Guo, Q., Tu, P., & Chai, X. (2015). The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological. *Phytochemistry Reviews*, 14, 99–135.

Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. (2006). How Much Do We Know about Atopic Asthma: Where Are We Now? *Cellular and Molecular Immunology*, 3(5), Cellular and Molecular Immunology.

Zaagsma, J., Gosens, R., Meurs, H., & Halayko, A. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respiratory Research*, 7, 73



**Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas**

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Alexis Raynet Montesinos Vique

**Título de la tesis:** "Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas"

**Grado a obtener:**

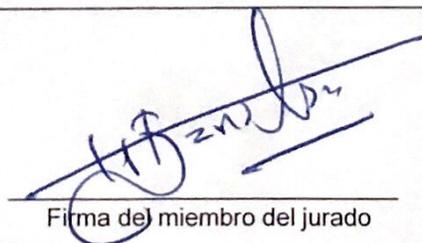
Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Germán Bernal Fernández La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

30/05/2019  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Alexis Raynet Montesinos Vique

**Título de la tesis:** "Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Angélica Flores Flores La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Firma del miembro del jurado

30-mayo-2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Alexis Raynet Montesinos Vique

**Título de la tesis:** "Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Ismael León Rivera La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

31 Mayo 2019  
\_\_\_\_\_  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Alexis Raynet Montesinos Vique

**Título de la tesis:** "Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas"

**Grado a obtener:**

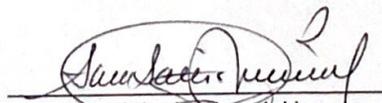
Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

30-05-2019  
Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Alexis Raynet Montesinos Vique

**Título de la tesis:** "Caracterización química y farmacológica de *Salvia mexicana* en la contractilidad del músculo liso de las vías aéreas"

\_\_\_\_\_

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

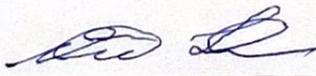
Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

31 mayo 2019  
Fecha