

Actividad relajante de *Hyptis suaveolens* en anillos aislados de tráquea de cobayo

Relaxant activity of *Hyptis suaveolens* on isolated rings of guinea pig trachea

—
Jesús Arrieta Valencia¹ • jearrval@yahoo.com.mx
ORCID: 000-0003-2928-744X

Héctor Jonathan Reyes Cortés² • johnreyesct@gmail.com
ORCID: 0009-0009-7751-1216

Leticia Cruz Antonio² • letycruza@yahoo.com.mx
ORCID: 0000-0001-8812-9711

Yaraset López Lorenzo³ • yarlop_2310@outlook.com
ORCID: 0000-0002-3886-2955

María Elena Sánchez Mendoza¹ • mesmendoza@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-4689-6757

1 ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
CIUDAD DE MÉXICO. MÉXICO

2 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO. CIUDAD DE MÉXICO. MÉXICO

3 INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
CHIAPAS. SUCHIAPA, CHIAPAS.



Para citar este artículo:

Arrieta Valencia, J., Reyes Cortés, H. J., Cruz Antonio, L., López Lorenzo, Y., & Sánchez Mendoza, M. E. Actividad relajante de *Hyptis suaveolens* en anillos aislados de tráquea de cobayo. *Espacio I+D, Innovación más Desarrollo*, 12(34). <https://doi.org/10.31644/IMASD.34.2023.a02>

RESUMEN

El asma es una enfermedad crónica cuya sintomatología incluye la dificultad respiratoria, que se debe a la restricción del flujo de aire. Esto se atribuye a la contracción del músculo liso bronquial por diversos mediadores inflamatorios. Desafortunadamente, en la mayoría de los pacientes las terapias existentes no han logrado un control adecuado de la sintomatología, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas opciones. *Hyptis suaveolens* es utilizada en el estado de Chiapas, México, para tratar el asma, sin embargo, esta actividad no ha sido corroborada científicamente. Por lo que el objetivo de la presente contribución fue determinar la actividad relajante de *Hyptis suaveolens* en el modelo de anillos aislados de tráquea de cobayo. Los extractos de hexano, diclorometano y metanol de la planta se prepararon por maceración. El extracto de mayor actividad se separó por cromatografía en columna para encontrar la fracción más activa. Se determinó la participación de los receptores β_2 adrenérgicos y muscarínicos, mediante curvas concentración-respuesta a partir de los siguientes tratamientos: la subfracción activa de *Hyptis suaveolens* (56-177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e isoproterenol (3-170 μM) en ausencia y presencia de propranolol (0.3 μM), y carbacol (1×10^{-16} -0.01 M) en ausencia y presencia de la subfracción activa (100 y 177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o de atropina (0.3 y 3 μM). El extracto de diclorometano fue el más activo ($p < 0.05$), y su subfracción más activa (F_4') tuvo una CE_{50} de $91.19 \pm 1.83 \mu\text{g}/\text{mL}$. El efecto relajante de F_4' no fue inhibido por propranolol. F_4' se comportó como un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos ($p < 0.01$). En conclusión, *Hyptis suaveolens* ejerce actividad relajante sobre anillos aislados de tráquea de cobayo. Una subfracción activa del extracto de diclorometano actuó como antagonista competitivo sobre los receptores muscarínicos, pero los receptores β_2 adrenérgicos no participaron en su mecanismo de acción.

Palabras clave:

Hyptis suaveolens; asma; actividad relajante; plantas medicinales; tráquea de cobayo.

— Abstract—

Asthma is a chronic disease that leads to difficulty in breathing due to the restriction of airflow. This is attributed to the contraction of bronchial smooth muscle tissue by diverse inflammatory mediators. Since existing therapies have not achieved adequate control of the symptomology of most patients, new options are needed. *Hyptis suaveolens* is used in the State of Chiapas, Mexico, to treat asthma, but its activity has not been corroborated scientifically. The aim of the current contribution was to determine the muscle relaxant activity of *Hyptis suaveolens* in the model of rings isolated from guinea pig trachea. The hexane, dichloromethane, and methanol extracts of the plant were prepared by maceration. The extract with the greatest activity was separated by column chromatography to find the most active fraction. The participation of β_2 adrenergic and muscarinic receptors was determined by constructing concentration-response curves from the following treatments: the active subfraction of *Hyptis suaveolens* (56-177 $\mu\text{g}/\text{mL}$), isoproterenol (3-170 μM) in the absence and presence of propranolol (0.3 μM), and carbachol (1×10^{-16} -0.01 M) in the absence and presence of the active subfraction (100 y 177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or of atropine (0.3 y 3 μM). The dichloromethane extract was the most active ($p < 0.05$), and its most active subfraction (F4') showed an EC_{50} of $91.19 \pm 1.83 \mu\text{g}/\text{mL}$. The relaxant effect of F4' was not inhibited by propranolol. F4' behaved as a competitive antagonist of muscarinic receptors ($p < 0.01$). In conclusion, *Hyptis suaveolens* exerts a muscle relaxant activity on rings isolated from guinea pig trachea. An active subfraction of the dichloromethane extract acted as a competitive antagonist on muscarinic receptors, but β_2 adrenergic receptors did not participate in its mechanism of action.

Keywords:

Hyptis suaveolens; asthma; relaxant activity; medicinal plants; guinea pig trachea.

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias que afecta aproximadamente a 300 millones de personas a nivel mundial y se considera que para el 2025 otros 100 millones de personas la padezcan (Taur y Patil, 2011). En México, se estima que 7.0% de la población sufre de asma, lo que significa que 8.5 millones de habitantes la padecen (Arteaga-Badillo *et al.*, 2020). La sintomatología de esta enfermedad incluye: tos, sibilancias, opresión torácica y dificultad respiratoria (WHO, 2023). En esta última se encuentran involucrados diversos mediadores inflamatorios que provocan la contracción del músculo liso de la vía aérea, que restringe el flujo de aire y evita un correcto intercambio gaseoso de O₂ y CO₂ en la sangre (Arteaga-Badillo *et al.*, 2020). Se considera que el estrechamiento excesivo de las vías respiratorias es la causa principal de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad.

Las exacerbaciones conducen a la hospitalización, la pérdida de días de trabajo y a la discapacidad (Dowell *et al.*, 2014). Actualmente los fármacos utilizados en el manejo del asma se dividen en dos grupos, los de acción broncodilatadora (agonistas β₂ adrenérgicos, anticolinérgicos y metilxantinas) que consiguen una mejoría sintomática relajando la musculatura lisa de las vías respiratorias y los antiinflamatorios (corticosteroides, antileucotrienos y cromonas) (Arteaga-Badillo *et al.*, 2020). Aunque se suelen utilizar diferentes esquemas farmacológicos para controlar y reducir los síntomas, desafortunadamente la terapia actual carece de un éxito satisfactorio debido a que los síntomas pueden reaparecer cuando se interrumpen los tratamientos y a los efectos adversos que se presentan (Taur y Patil, 2011). Algunos estudios indican que más del 50% de los pacientes asmáticos no están controlados (Arteaga-Badillo *et al.*, 2020), por lo que los pacientes buscan medicina complementaria y alternativa para tratar su asma (Taur y Patil, 2011), dentro de ellas se ha considerado el empleo de agentes inmunomoduladores y la herbolaria (Arteaga-Badillo *et al.*, 2020). Se sabe que algunas plantas medicinales son capaces de relajar el músculo liso de las vías respiratorias mejorando el flujo de aire (Águila *et al.*, 2015), lo que se manifiesta en un alivio en la sintomatología de los pacientes.

En México, en el estado de Chiapas, se utiliza la planta *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) Poit., para tratar diferentes enfermedades, entre ellas el asma. La planta es conocida de manera local con los nombres de chía, confitura, y hierba de burro. Entre las actividades farmacológicas que han sido atribuidas y comprobadas experimentalmente para *Hyptis suaveolens* se encuentran: la actividad antiinflamatoria, antinociceptiva, anticancerígena, antihiper glucémica y antiulcerosa, (Santos *et al.*, 2007; Vera-Arzave *et al.*, 2012; Bayala *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2021), sin embargo, no existía evidencia científica para el tratamiento del asma. Por lo que, el objetivo

de la presente contribución fue determinar la actividad relajante de *Hyptis suaveolens* en el músculo liso de anillos de tráquea aislada de cobayo.

METODOLOGÍA

Material vegetal

La planta *Hyptis suaveolens* se recolectó en el municipio de Copainalá (Chiapas, México) durante el mes de agosto de 2018 y un ejemplar fue depositado en el herbario CHIP para su identificación. El herbario CHIP pertenece a la Secretaría de Medio Ambiente, Vivienda e Historia Natural, de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. El número de registro asignado fue 27939.

Preparación de extractos y fraccionamiento cromatográfico

Las partes aéreas (tallos y hojas) de *Hyptis suaveolens* fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente y posteriormente pulverizadas. A continuación, se siguieron los pasos que caracterizan un estudio biodirigido (Cornejo-Báez *et al.*, 2020). Se utilizaron 20 kilos de la planta que fueron extraídos mediante el proceso de maceración utilizando los disolventes de hexano, diclorometano y metanol en orden creciente de polaridad (Sharma y Gupta, 2015). El material vegetal estuvo en contacto con cada disolvente durante tres días, transcurrido ese tiempo los disolventes de la maceración se filtraron y se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador (Sharma y Gupta, 2015), y el proceso se repitió 3 veces con cada disolvente. Al finalizar la extracción se obtuvieron rendimientos de 2.5, 2.3, y 5.6%, de cada extracto respectivamente. Debido a que el extracto más activo fue el de diclorometano (440 g), este se separó por cromatografía en columna (Cornejo-Báez *et al.*, 2020) empacada con sílica gel y se obtuvieron 5 fracciones. Para la fase móvil se utilizaron mezclas de los disolventes de hexano/acetato de etilo en proporciones de 9:1 (F1), 7:3 (F2), y 5:5 (F3), así como los disolventes de acetato de etilo (F4) y metanol (F5). Los rendimientos obtenidos de dichas fracciones fueron de 22, 21,17, 21, y 18%, respectivamente. La F4 fue la más activa, por lo que 80.5 g de esta se separaron por cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyentes mezclas de los disolventes (Sharma y Gupta, 2015) de hexano/acetato de etilo en polaridad creciente: 9:1 (F1'), 8:2 (F2'), 7:3 (F3'), y 5:5 (F4'), obteniéndose rendimientos de 26, 29, 33 y 1.7%, respectivamente.

Experimentos farmacológicos

Animales

Se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley de un peso corporal entre 300 y 450 g. Todos los procedimientos se realizaron conforme a la regulación Nacional existente para el cuidado y experimentación con animales de laboratorio (SAGARPA.NOM-062-ZOO-1999) y el estudio obtuvo la aprobación del comité interno CICUAL, de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional con el código asignado de: CICUAL-08/4-12-2017.

Fármacos

Los fármacos utilizados (cloruro de acetilcolina, carbacol, isoproterenol, propranolol, y atropina) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones con agua destilada fueron preparadas el mismo día en que se realizaron los ensayos biológicos.

Extractos, fracciones y subfracciones

Los extractos, fracciones, y subfracciones, fueron suspendidos en Tween 80 (0.05%) con agua destilada y preparados el mismo día que fueron evaluados (Arrieta *et al.*, 2018).

Preparación de la tráquea

Los cobayos fueron sacrificados al administrarles una sobredosis de pentobarbital (95 mg/kg) vía intraperitoneal. Posteriormente, de forma inmediata se realizó la disección de la tráquea y se limpió del tejido adherido. En todo momento la tráquea se mantuvo en una solución de Krebs la cual estuvo constituida por (mM): NaCl (118), NaHCO₃ (25.0), glucosa (11), KCl (4.7), CaCl₂·2H₂O (2.2), KH₂PO₄ (1.2) y MgSO₄·7H₂O (1.2), a un pH de 7.4, a temperatura de 37 °C y aireada de manera constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. De cada tráquea de cobayo se obtuvieron 8 anillos, los cuales se colocaron en cámaras de órgano aislado con un volumen de 10 mL. Los anillos se sujetaron entre dos ganchos insertados en el lumen, uno estuvo fijado en las cámaras y el otro a un transductor de fuerza Biopac TSD 125C que registró la tensión isométrica en un polígrafo Biopac MP150. Cada anillo se ajustó a una tensión de 2 g y se permitió reposar por 30 minutos. Posteriormente se determinó la viabilidad del tejido aplicando una solución de 30 μM de acetilcolina. A continuación, se realizaron lavados con solución de Krebs cada 15 minutos durante una hora, para después proceder a realizar los experimentos

correspondientes (Arrieta *et al.*, 2018). Los valores fueron digitalizados y analizados por medio de un software de adquisición de datos (Acknowledge 4.0).

Evaluación de la actividad relajante de *Hyptis suaveolens*

El tejido se contrajo con carbacol (3 μM) y cuando se alcanzó una meseta se aplicaron diferentes concentraciones en orden creciente de los extractos (17.7, 31.6, 56.2, 100, 177 y 316 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fracciones (75, 100, 133, 177, 237 y 316 $\mu\text{g}/\text{mL}$), subfracciones (56-177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo, cada 7 minutos, de acuerdo con el experimento correspondiente (Arrieta *et al.*, 2018). En todos los casos se consideró como 100% la contracción máxima inducida por carbacol.

Evaluación de la participación de los receptores β_2 adrenérgicos

Los anillos de la tráquea se incubaron con una solución de propranolol (0.3 μM) o vehículo, durante 15 minutos. Posteriormente se contrajo con carbacol (3 μM) hasta alcanzar una meseta (15 minutos) y después se adicionaron concentraciones crecientes cada 7 minutos de la subfracción activa F4' (56, 75, 100, 133 y 177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o isoproterenol (3 -170 μM) que se utilizó como fármaco de referencia, en experimentos independientes (Arrieta *et al.*, 2018). Se consideró como 100% la contracción máxima inducida por carbacol en ausencia de propranolol.

Evaluación de la participación de los receptores muscarínicos

Los anillos se incubaron con atropina (0.3 y 3 μM), subfracción activa F4' (100 y 177 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo durante 15 minutos en experimentos independientes. Posteriormente se aplicaron cada 7 minutos concentraciones crecientes de carbacol (1×10^{-16} - 0.01 M). Se consideró como 100% la contracción máxima alcanzada por carbacol en ausencia de atropina o de F4' (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

Análisis estadístico

Los resultados se reportan como la media \pm EEM de al menos seis experimentos. Los valores de CE_{30} y CE_{50} se calcularon por regresión lineal (Talladira, 2000). Para comparar la diferencia entre dos determinaciones se utilizó la prueba t de student y para las diferencias entre varias determinaciones se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de Dunnett. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si el valor de p fue menor de 0.05.

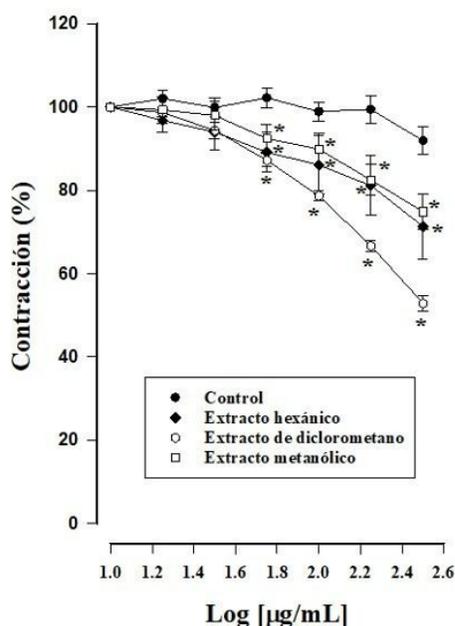
RESULTADOS

Evaluación de la actividad relajante de Hyptis suaveolens

Las curvas acumulativas concentración-respuesta de los extractos de hexano, diclorometano y metanol se presentan en la Figura 1. En ella, se puede apreciar que los extractos relajaron el tejido de forma dependiente de la concentración y el extracto más activo fue el de diclorometano que alcanzó un valor de máxima relajación de $47.16 \pm 1.93\%$ a la concentración de $316 \mu\text{g/mL}$ y se obtuvo un valor de CE_{30} de $138.07 \mu\text{g/mL}$.

En el fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto de diclorometano se obtuvieron 5 fracciones, la primera fue inactiva (F1) en cambio el resto de las fracciones (F2-F5) mostraron un efecto relajante dependiente de la concentración. Entre las fracciones activas destaca la fracción F4 como la más eficaz y potente (Tabla 1).

Posteriormente, la fracción F4 (acetato de etilo) se separó en un segundo fraccionamiento, del que se obtuvieron 4 subfracciones, la de mayor actividad relajante fue la F4' que se obtuvo con una mezcla de Hexano/AcOEt 5:5. Al compararla con la F4 de la cual provenía, se evidencia claramente que con el fraccionamiento cromatográfico se obtuvo una subfracción con igual eficacia ya que ambas relajaron casi al 100%, como se observa en la Figura 2, aunque lo hicieron a diferentes concentraciones.



Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de seis evaluaciones. * Representa la respuesta que fue estadísticamente diferente (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett, $p < 0.05$) comparada con el grupo control.

Figura 1. Efecto relajante de los extractos de *Hyptis suaveolens* sobre el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo contraídos con carbacol ($3 \mu\text{M}$)

Tabla 1

Valores de máximo efecto relajante (Em_{\max}) y CE_{30} de las fracciones del extracto de diclorometano de *Hyptis suaveolens* en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo contraídos con carbacol ($3 \mu M$)

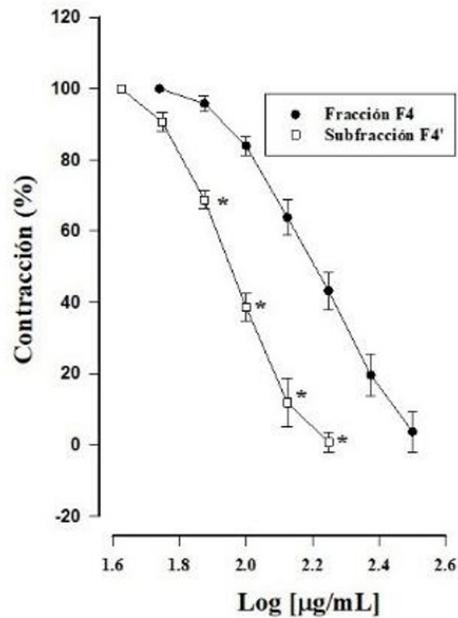
Tratamiento	Em_{\max} (%) \pm EEM	CE_{30} ($\mu g/mL$) \pm EEM
Control	3.07 \pm 3.98	-
F1	14.41 \pm 5.13	-
F2	*64.17 \pm 4.92	**191.66 \pm 10.53
F3	*61.9 \pm 4.44	**156.78 \pm 4.93
F4	*96.37 \pm 5.66	114.08 \pm 3.44
F5	*50.49 \pm 4.73	**225.01 \pm 16.73

* Representa la diferencia significativa comparada con el grupo control (ANOVA, seguido de la prueba de Dunnett, $p < 0.05$) y ** la diferencia respecto a la CE_{30} de la fracción F4 (ANOVA, seguido de la prueba de Dunnett, $p < 0.05$).

En cuanto a potencia se encontró que F4' es más potente que F4 como se observa en los valores de CE_{50} (Tabla 2). Para determinar la complejidad de la subfracción F4' se realizó una cromatografía en capa fina en la que se detectaron 3 compuestos, lo cual sugiere la presencia de más de un compuesto responsable de la actividad relajante de esta subfracción.

Evaluación de la participación de los receptores β_2 adrenérgicos

La subfracción F4' produjo un efecto relajante que no se inhibió por la presencia de propranolol, lo cual indica que en la relajación producida por F4' no está involucrada la activación de los receptores β_2 adrenérgicos (Figura 3A). En cambio, para el fármaco de referencia isoproterenol (agonista de los receptores β -adrenérgicos), su efecto relajante se inhibió en su totalidad por la presencia de propranolol (Figura 3B).



Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de seis evaluaciones. * Representa la respuesta que fue estadísticamente diferente entre los grupos (t de student, $p < 0.05$).

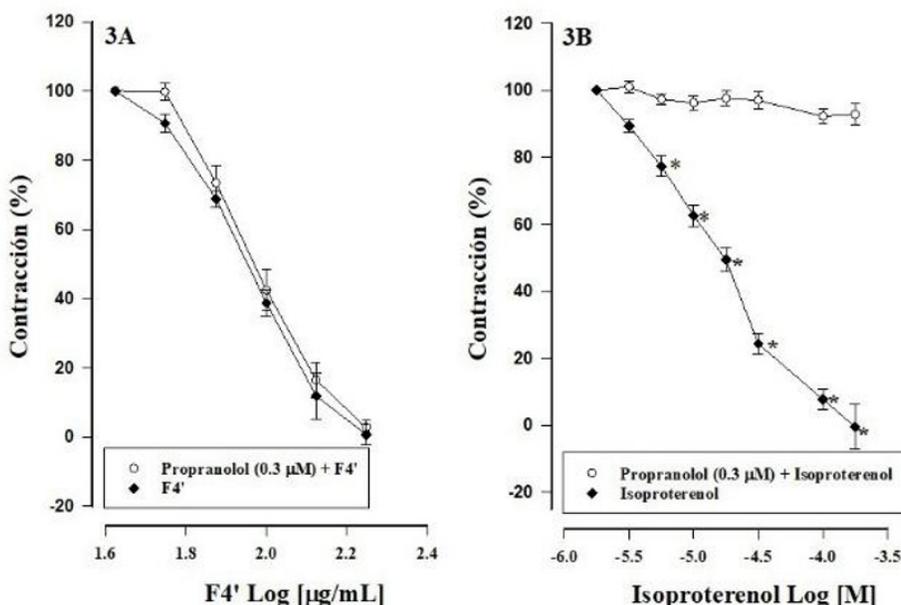
Figura 2. Efecto relajante de la fracción F4 y la subfracción F4' sobre el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo contraídos con carbacol (3 μ M)

Tabla 2

Valores de máximo efecto relajante ($E_{m\acute{a}x}$) y CE_{50} de la fracción F4 y subfracción F4' en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo contraídos con carbacol (3 μ M)

Fracciones	$E_{m\acute{a}x}$ (%) \pm EEM	CE_{50} (μ g/mL) \pm EEM
F4 (Acetato de etilo)	96.37 \pm 5.66	151.47 \pm 3.91
F4' (Hexano/AcOEt 5:5)	99.33 \pm 2.90	*91.19 \pm 1.83

* Representa la diferencia significativa entre los grupos (t de student, $*p \leq 0.001$).



Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de seis evaluaciones. * Representa la respuesta que fue estadísticamente diferente entre los grupos (t de student, $p < 0.05$).

Figura 3. Efecto relajante (A) de la subfracción F4'e (B) isoproterenol sobre el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo contraídos con carbacol (3 μM), ambos en ausencia y presencia de propranolol

Evaluación de la participación de los receptores muscarínicos

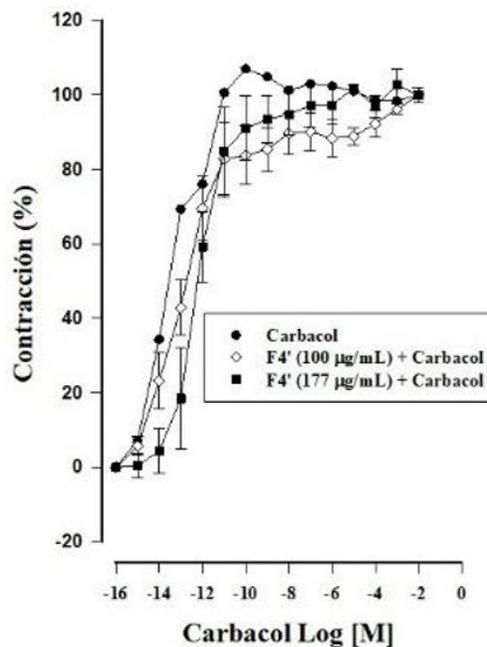
Las curvas concentración-respuesta de carbacol en presencia de las concentraciones de 100 y 177 $\mu\text{g/mL}$ de la subfracción F4' se desplazaron hacia la derecha respecto a la curva de carbacol (Figura 4), lo que indica que se modificó la potencia como se reafirma con los valores de CE_{50} (Tabla 3). No obstante, la presencia de F4' no modificó el efecto de contracción máxima obtenido con carbacol (Figura 4), lo cual refleja un comportamiento de tipo antagonista competitivo sobre los receptores muscarínicos, donde se ve modificada la potencia, pero no la eficacia. Como fármaco de referencia se utilizó atropina (un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos), que de igual forma provocó un desplazamiento hacia la derecha en las curvas concentración-respuesta contráctil de carbacol en las que estuvo presente (Figura 5). Los valores de CE_{50} se muestran en la Tabla 4, donde se puede observar que la atropina disminuyó la potencia de carbacol.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de *Hyptis suaveolens* proporcionan un sustento científico al uso tradicional de esta planta para tratar el asma, ya que se ha

reportado que los productos naturales capaces de relajar el músculo liso de las vías respiratorias suelen mejorar el flujo de aire y se consideran como tratamientos alternativos para tratar a pacientes asmáticos (Águila *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha reportado que *Hyptis suaveolens* ejerce un efecto antiinflamatorio en un modelo *in vivo* (Misrha, 2021). Considerando que los pacientes con asma presentan niveles elevados de IgE que desencadena reacciones inflamatorias (incluyendo la liberación de mediadores como histamina, prostaglandinas y leucotrienos) que conllevan a la contracción del músculo liso de las vías respiratorias (Taur y Patil, 2011), la contribución de *Hyptis suaveolens* podría ser importante ya que puede actuar como antiinflamatoria y también relajar el músculo liso de las vías respiratorias.

En el estudio biodirigido de *Hyptis suaveolens* se encontró la mayor actividad en el extracto de diclorometano y del fraccionamiento cromatográfico del mismo, se obtuvieron 4 fracciones activas (F2-F5), lo cual indica que en dicho extracto podemos encontrar más de un compuesto con actividad relajante.



Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de seis experimentos.

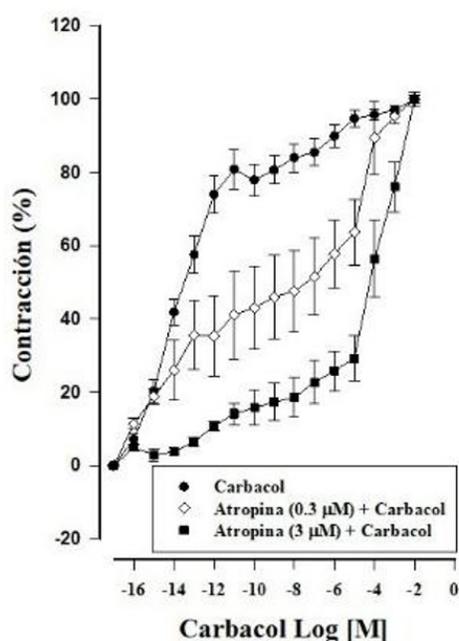
Figura 4. Efecto de la subfracción F4' sobre las contracciones acumulativas inducidas por carbacol en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo

Tabla 3

Valores de CE_{50} de carbacol en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo en ausencia y en presencia de la subfracción F4'

Tratamiento	CE_{50} (M) \pm EEM
Carbacol	$2.27 \times 10^{-15} \pm 2.86 \times 10^{-15}$
F4' (100 μ g/mL) + Carbacol	* $2.29 \times 10^{-13} \pm 3.53 \times 10^{-13}$
F4' (177 μ g/mL) + Carbacol	* $1.92 \times 10^{-12} \pm 2.61 \times 10^{-12}$

* Representa la diferencia significativa comparada con el grupo tratado exclusivamente con carbacol (ANOVA, seguido de la prueba de Dunnett, $p \leq 0.01$).



Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de seis experimentos.

Figura 5. Efecto de la atropina sobre las contracciones acumulativas de carbacol en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo

Tabla 4

Valores de CE_{50} de carbacol en el músculo liso de anillos de tráquea de cobayo en ausencia y presencia de atropina

Tratamiento	CE_{50} (M) \pm EEM
Carbacol	$2.79 \times 10^{-13} \pm 1.56 \times 10^{-13}$
Atropina 0.3 μ M + Carbacol	* $1.050 \times 10^{-08} \pm 1.1 \times 10^{-08}$
Atropina 3 μ M + Carbacol	* 0.0078 ± 0.0136

* Representa la diferencia significativa comparada con el grupo tratado exclusivamente con carbacol (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett, $p \leq 0.01$).

Del fraccionamiento de F₄, que fue la fracción más activa se obtuvieron 4 subfracciones, de las cuales la F₄' fue la que presentó actividad relajante. La cromatografía en capa fina de F₄' sugiere que está constituida por al menos 3 compuestos, por lo que sería relevante que en estudios posteriores se pudieran aislar y evaluar dichos compuestos para determinar si la relajación se debe a uno o más de ellos o incluso a la combinación de los mismos y finalmente se podría proceder a la identificación del o los compuestos que resulten activos.

Por otro lado, se sabe que el músculo liso de las vías aéreas puede relajarse cuando se activan directamente mecanismos de relajación (a través de la estimulación de AMPc, GMPc, inhibiendo la degradación de nucleótidos cíclicos y/o modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana celular) o mediante la inhibición del efecto de agonistas contráctiles (como acetilcolina y leucotrienos, etc.) (Thirstrup, 2000). En este estudio se exploró dos posibles mecanismos de acción relajante de la subfracción activa F₄', el primero de ellos fue la participación de los receptores β_2 -adrenérgicos. Estos receptores están acoplados a proteínas Gs y al ser activados estimulan la enzima adenilil ciclasa, que cataliza la formación del segundo mensajero AMPc que conlleva a la activación de la proteína cinasa A (PKA) que a su vez fosforila varias proteínas, incluidas las cinasas de la cadena ligera de miosina. Cuando esta última es fosforilada, disminuye su afinidad por Ca²⁺/calmodulina lo que da como resultado en última instancia la relajación del músculo liso (Barisione *et al.*, 2010; Alkawadri *et al.*, 2022). Para ello, se realizaron curvas de relajación de la subfracción F₄' en ausencia y en presencia de propranolol (antagonista de los receptores β -adrenérgicos) y se encontró que las curvas de relajación no se modificaron. Por lo tanto, se descarta la participación de estos receptores en el mecanismo de acción de F₄', caso contrario sucedió con el fármaco de referencia isoproterenol (agonista β -adrenérgico) cuyo efecto se inhibió por la presencia de propranolol.

El segundo mecanismo a estudiar fue la acción sobre los receptores muscarínicos ya que estos están involucrados en el control del tono y diámetro del músculo liso de las vías respiratorias. En el músculo liso se encuentran los receptores M₂ y M₃. La participación de los M₂ es diversa, se ha reportado que inhiben la relajación provocada por los receptores β -adrenérgicos al inhibir la actividad de la enzima adenilil ciclasa, pero también se ha encontrado evidencia de su papel contráctil cuando los receptores muscarínicos M₃ están bloqueados (Soukup *et al.*, 2017; Alkawadri *et al.*, 2022). Mientras que los receptores M₃ son los principales subtipos involucrados en la respuesta contráctil en el músculo liso (Soukup *et al.*, 2017), y esta se desencadena cuando el agonista se une a dichos receptores, lo que conlleva a la activación de una proteína Gq que se une a la enzima fosfolipasa C (PLC β), que genera los segundos mensajeros IP₃ y DAG los cuales contribuyen a la contracción del músculo liso (Soukup *et al.*, 2017). Se construyeron curvas contráctiles de carbacol

en ausencia y en presencia de dos concentraciones de la subfracción F₄' en experimentos independientes y como fármaco de referencia se utilizó atropina que es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos. Las curvas contráctiles de carbacol en presencia de F₄', presentaron características típicas de un comportamiento de tipo antagonista competitivo, lo que significa que F₄' disminuyó la potencia de carbacol pero mantuvo su eficacia. A menor potencia se necesita mayor cantidad de fármaco (carbacol) para alcanzar el efecto que se obtiene en ausencia de F₄' y se puede asumir que el carbacol y F₄' compiten por el mismo sitio de unión en el receptor muscarínico M₃ (Blumenthal, 2019). Actualmente en el tratamiento del asma se utilizan fármacos anticolinérgicos de acción corta (ipratropium y oxitropium) y de acción larga (tiotropium), y un enfoque vigente en el desarrollo de nuevos fármacos anticolinérgicos para el asma es diseñar compuestos con acción prolongada sobre los receptores muscarínicos M₃ y menos efecto sobre los M₂ (Soukup *et al.*, 2017). Por lo que sería importante que en estudios posteriores se identifiquen los compuestos responsables de la actividad de F₄' y se evalúen de manera individual para determinar si continúan teniendo el mismo comportamiento o incrementan el efecto antagonista. De igual manera sería importante continuar explorando otros mecanismos de acción para contribuir al sustento científico del uso de esta planta medicinal.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que *Hyptis suaveolens* produce relajación del músculo liso de tráquea de cobayo, con lo cual puede contribuir a la mejoría de la sintomatología de los pacientes asmáticos. Se logró identificar una subfracción activa en cuyo mecanismo de acción se descarta la implicación de los receptores β_2 -adrenérgicos y se encontró que actúa como un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos.

REFERENCIAS

- Águila, L.,** Ruedlinger, J., Mansilla, K., Ordenes, J., Salvatici, R., de Campos, R. R., & Romero, F. (2015). Relaxant effects of a hydroalcoholic extract of *Ruta graveolens* on isolated rat tracheal rings. *Biological research*, 48(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0017-8>
- Alkawadri, T.,** Wong, P. Y., Fong, Z., Lundy, F. T., McGarvey, L. P., Hollywood, M. A., Thornbury, K. D., & Sergeant, G. P. (2022). M2 Muscarinic Receptor-Dependent Contractions of Airway Smooth Muscle are Inhibited by Activation of β -Adrenoceptors. *Function (Oxford, England)*, 3(6), zqac050. <https://doi.org/10.1093/function/zqac050>
- Arrieta, J.,** López-Lorenzo, Y., Gómez-Patiño, M.B., Sánchez-Mendoza, Y., & Sánchez-Mendoza, M.E. (2018). Relaxant effects of *Peperomia hispidula* (Sw.) A. Dietr. on isolated rat tracheal rings. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17 (6): 610 – 618.
- Arteaga-Badillo, D.A.,** Portillo-Reyes, J., Vargas-Mendoza, N., Morales-González, J.A., Izquierdo-Vega, J.A., Sánchez-Gutiérrez, M., Álvarez-González, I., Morales-González, Á., Madrigal-Bujaidar, E., & Madrigal-Santillán, E. (2020). Asthma: New Integrative Treatment Strategies for the Next Decades. *Medicina (Kaunas)*, 56(9):438. <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/9/438>
- Barisone, G.,** Baroffio, M., Crimi, E., & Brusasco, V. (2010). Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(4), 1016–1044. <https://doi.org/10.3390/ph3041016>
- Bayala, B.,** Nadembega, C., Guenné, S., Buñay, J., Mahoukèdè Zohoncon, T., Wendkuuni Djigma, F., Yonli, A., Baron, S., Figueredo, G., A Lobaccaro, J. M., & Simpoire, J. (2020). Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Essential Oil on Prostate and Cervical Cancers Cells. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 23(9), 1184–1192. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.1184.1192>
- Blumenthal, D.K.** (2019). Farmacodinámica, mecanismos moleculares de la acción de los fármacos. En Brunton, L.L., Dandan, R.H., Knollmann, B.C. (Eds.), *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (13^a ed., pp. 34-36) Mc Graw Hill Education.
- Cornejo-Báez, A. A.,** Peña-Rodríguez, L. M., Álvarez-Zapata, R., Vázquez-Hernández, M., & Sánchez-Medina, A. (2020). Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products. *Drug discovery today*, 25(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.016>

- Dowell, M. L., Lavoie, T. L., Solway, J., & Krishnan, R. (2014).** Airway smooth muscle: a potential target for asthma therapy. *Current opinion in pulmonary medicine*, 20(1), 66–72. <https://doi.org/10.1097/MCP.000000000000011>
- Mishra, P., Sohrab, S., & Mishra, S. K. (2021).** A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Future journal of pharmaceutical sciences*, 7(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00219-1>
- SAGARPA.** Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C., & Navarrete, A. (2008).** Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of Argemone ochroleuca Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60(2), 229–236. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.2.0012>
- Santos, T. C., Marques, M. S., Menezes, I. A., Dias, K. S., Silva, A. B., Mello, I. C., Carvalho, A. C., Cavalcanti, S. C., Antonioli, A. R., & Marçal, R. M. (2007).** Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia*, 78(5), 333–336. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.006>
- Sharma, S. B., & Gupta, R. (2015).** Drug development from natural resource: a systematic approach. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(1), 52–57. <https://doi.org/10.2174/138955751501150224160518>
- Soukup, O., Winder, M., Killi, U. K., Wsol, V., Jun, D., Kuca, K., & Tobin, G. (2017).** Acetylcholinesterase Inhibitors and Drugs Acting on Muscarinic Receptors- Potential Crosstalk of Cholinergic Mechanisms During Pharmacological Treatment. *Current neuropharmacology*, 15(4), 637–653. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160607212615>
- Tallarida, R. (2000)** Drug synergism and dose-effect data analysis. *Chapman & Hall/CRC, USA*, pp 21–39.
- Taur, D.J., & Patil, R.Y. (2011).** Some medicinal plants with antiasthmatic potential: a current status. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(5), 413-418. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614196/pdf/apjtb-01-05-413.pdf>
- Thirstrup, S. (2000).** Control of airway smooth muscle tone: II-pharmacology of relaxation. *Respiratory medicine*, 94(6), 519–528. <https://doi.org/10.1053/rmed.1999.0738>
- Vera-Arzave, C., Antonio, L. C., Arrieta, J., Cruz-Hernández, G., Velasquez-Mendez, A. M., Reyes-Ramírez, A., & Sánchez-Mendoza, M. E. (2012).** Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(8), 8917–8927. <https://doi.org/10.3390/molecules17088917>
- WHO (World Health Organization).** 2023. *Asthma*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>