

T
536

90914



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE LA ACTIVIDAD
ANTIASMÁTICA DE *Argemone platyceras***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. JACQUELINA FERNÁNDEZ VARGAS

Directores de Tesis
Dra. María Guadalupe Campos Lara
Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesor
Dr. Héctor Ponce Monter

México D. F.

2005

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA SE ENCUENTRA EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y CUENTA CON APOYO BAJO EL CONVENIO PFP-20-93.

AGRADEZCO AL CONACYT POR LA BECA ECONÓMICA, CON REGISTRO 130304, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

LA INVESTIGACIÓN DE ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA, COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y EN EL LABORATORIO 2-5 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó el día 9 de diciembre del 2005:

Jacqueline Fernández Vargas

Comité Tutorial:

Cotutora: Dra. María Guadalupe Campos Lara

Cotutor: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesor: Dr. Héctor Ponce Monter

Vocal: Dra. Mariana Meckes Fisher

Vocal: Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda



The image shows five handwritten signatures, each written on a horizontal line. The signatures are: 1. Dra. María Guadalupe Campos Lara (top), 2. Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar, 3. Dr. Héctor Ponce Monter, 4. Dra. Mariana Meckes Fisher, and 5. Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda (bottom). The signatures are written in black ink and are somewhat stylized and overlapping.

Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana y al Instituto Mexicano del Seguro Social por haberme brindado la oportunidad de obtener el doctorado.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis Dra. María Guadalupe Campos Lara, por su dedicación y esfuerzo para el éxito de este trabajo.

Doy las gracias al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su apoyo en el desarrollo de la parte fitoquímica de este trabajo.

Al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar por sus enseñanzas y comentarios en la realización de este trabajo de tesis.

De especial manera al Dr. Héctor Ponce Monter por su orientación y observaciones acertadas en el desarrollo del presente trabajo.

De manera especial agradezco la participación de la Dra. Mariana Meckes Fisher y el Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda en la revisión de la tesis.

Mi más sincera gratitud a la Dra. Martha Oropeza por su paciencia y comentarios acertados.

Dedicatorias:

Al creador del universo

*La sabiduría consiste en saber que se sabe lo que se sabe
y saber que no se sabe lo que no se sabe.*

Proverbio chino

A mis padres:

Ascención Fernández Torres
Lucila Vargas Campos

A mis hermanos:

Lupita, César, Raquel y Gaby

A mis amigos

I N D I C E

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. ANTECEDENTES	8
1. ASMA	8
A. Definición del asma	8
B. Diagnóstico y clasificación del asma	11
C. Epidemiología del asma	14
D. Fisiopatología del asma	15
a) Obstrucción de las vías aéreas	15
b) Espasmo del músculo de las vías aéreas	15
c) Edema de la mucosa de las vías aéreas	16
d) Hipersecreción de moco	16
e) Inflamación de las vías aéreas	17
f) Remodelación irreversible de las vías aéreas	18
g) Hiperreactividad de las vías aéreas	19
E. Tratamiento farmacológico del asma	19
F. Medicina tradicional y asma	25
2. <i>Argemone platyceras</i> Link & Otto	26
II. JUSTIFICACIÓN	30
III. HIPÓTESIS	31
IV. OBJETIVO GENERAL	31
1. Objetivos particulares	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS	32
1. Fitoquímica	32
A. Colecta y clasificación botánica	32
B. Preparación de extractos	32
C. Fraccionamiento químico	32
D. Purificación y caracterización de los compuestos	34

2. Experimentos farmacológicos	35
A. Animales	35
B. Procedimiento de sensibilización	35
C. Obtención del tejido traqueal	36
D. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos y fracciones	36
E. Evaluación del efecto antiespasmódico	37
F. Evaluación del efecto antialérgico	37
G. Evaluación del efecto antiinflamatorio	38
3. Análisis estadístico	38
VI. RESULTADOS	39
1. Efecto antiespasmódico	39
A. Extractos	39
B. Fracciones primarias	40
C. Fracciones secundarias	42
2. Efecto antialérgico	44
A. Extractos	44
B. Fracciones secundarias	47
3. Efecto antiinflamatorio	49
4. Fraccionamiento químico	51
A. Purificación e identificación de los compuestos	52
VII. DISCUSIÓN	61
VIII. CONCLUSIONES	65
IX. REFERENCIAS	66
X. ARTICULO PUBLICADO	70

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en placa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
E _{máx}	Respuesta máxima
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOH	Etanol
FAP	Factor activador de plaquetas
FcεRI	Receptor para Ig E
FEP	Flujo espiratorio máximo
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado del primer segundo
FVC	Capacidad vital espiratoria forzada
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear de enlace múltiple
IgE	Inmunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IR	Espectro de infrarrojo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
MeOH	Metanol
pD ₂	Logaritmo negativo de la dosis efectiva 50
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
SSF	Solución salina fisiológica
TMS	Tetrametil silano
UV	Espectro de ultravioleta

RESUMEN

La investigación actual del asma se enfoca principalmente al estudio del proceso inflamatorio y remodelación de las vías aéreas. Los leucotrienos son parte fundamental en el proceso de remodelación de las vías aéreas debido a sus efectos directos sobre las células del músculo liso, eosinófilos, células epiteliales y otros tipos celulares. El desarrollo y comercialización de antagonistas e inhibidores de la síntesis de leucotrienos constituyen un gran acontecimiento, como corresponde al arribo de una nueva clase de agentes terapéuticos. Estos fármacos hacen posible un enfoque totalmente novedoso para el tratamiento de la inflamación por inhibición selectiva de los efectos de los leucotrienos. Por otro lado, en la medicina tradicional mexicana es una práctica común la utilización de infusiones o decocciones de plantas para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias como el asma, en particular *Argemone platyceras* Link & Otto (Papaveraceae). Los objetivos del presente estudio fueron investigar las propiedades farmacológicas antiasmáticas de *A. platyceras* en la tráquea de cobayo e identificar los principios activos a través de un fraccionamiento biodirigido. El extracto metanólico de las flores (30 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produjo un desplazamiento de la curva concentración-respuesta a carbacol hacia la derecha respecto al control; a las concentraciones de 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió la E_{max} a histamina. El extracto metanólico de las hojas disminuyó los valores de pD_2 en la respuesta a carbacol a las tres concentraciones probadas, pero no la respuesta a histamina. El extracto metanólico de las flores y hojas de *A. platyceras* en ausencia y presencia de indometacina inhibieron la respuesta contráctil a ovoalbúmina en la tráquea de cobayos sensibilizados. Se obtuvieron tres fracciones del extracto metanólico de las hojas de *A. platyceras*: diclorometano, AcOEt y agua. Solo la fracción de AcOEt (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disminuyó de manera significativa el valor de pD_2 en la respuesta contráctil inducida por carbacol. El fraccionamiento de esta fase produjo siete fracciones secundarias. Únicamente las fracciones 6 y 7 inhibieron la respuesta contráctil inducida por carbacol. A la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la fracción 6 fue más potente que la fracción 7 para inhibir la respuesta contráctil inducida por carbacol ($P < 0.05$), por lo que se eligió la fracción 6 para análisis posteriores. La fracción 6 inhibió la respuesta contráctil en el reto antigénico. En ausencia (10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.01$) y en presencia (a todas las concentraciones ensayadas, $P < 0.001$) de indometacina la fracción 6 inhibió significativamente la respuesta contráctil a ovoalbúmina. La fracción 6 (1, 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produjo un desplazamiento de la curva concentración-respuesta hacia la derecha respecto del control y disminuyó la respuesta a LTD_4 . Esta fracción inhibió completamente esta respuesta a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fracción 6 fue macerada con AcOEt del cual se obtuvo una goma de color naranja amorfa que fue identificada por datos espectroscópicos como el flavonoide glucosilado isoquercitrina. La fracción 7 fue macerada con AcOEt y se obtuvo un polvo amarillo que fue identificado como rutina. Estos resultados demuestran que *A. platyceras* tiene compuestos con propiedades antiasmáticas.

ABSTRACT

Present asthma research is focused on chronic inflammation and remodelling of airways. Leukotrienes take part in the remodelling process due to their direct effects on smooth muscle cells, eosinophils, epithelial cells, and other cell types. Leukotriene antagonists constitute a totally novel focus for processing inflammation by selective inhibition leukotriene effects. In the Mexican traditional medicine is a common practice the utilization of plant infusions or decoctions for the treatment of respiratory ailments and affections. The aims of the present study were to investigate the pharmacological antiasthmatic properties of *Argemone platyceras* Link & Otto (Papaveraceae) in guinea pig airways, and to identify the active principles through bioassay-guided fractionation. The methanol extract of the flowers produced a significant concentration-dependent rightward shift of the carbachol-induced response (10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.01$). In the histamine-induced response only E_{max} decreased when tissues were incubated with 30 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The methanol extract of the leaves diminished pD_2 values of the carbachol-induced response (10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and did not modify the histamine-induced response. The methanol extract of flowers and leaves of *A. platyceras* inhibited the contractile response to ovalbumin either in absence or presence of indomethacin in tracheae from sensitized guinea pigs. Three fractions were obtained from the leaf methanol extract: ethyl acetate (EtOAc), dichloromethane and water fractions. Only the EtOAc phase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of leaves and flowers significantly decreased pD_2 of the contractile response induced by carbachol. The fractionation of EtOAc fractions from the leaves rendered seven secondary fractions. Only fractions 6 and 7 inhibited the contractile response induced by carbachol. Fraction 6 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.05$) was more potent than fraction 7 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to inhibit the carbachol-induced response. Hence, fraction 6 was selected for further analysis. Fraction 6 significantly inhibited the contractile response to ovalbumin of tracheae from sensitized guinea pigs in absence (10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.01$) and in presence of indomethacin (3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.001$). Incubation with fraction 6 (1, 3 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produced a concentration-dependent rightward displacement and E_{max} decrease of contractile response to LTD_4 . This fraction inhibited completely the contractile response to LTD_4 at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Fraction 6 was macerated with EtOAc obtaining an amorphous orange gum which was identified by its spectroscopic data as the glycosilated flavonoid isoquercitrin. Fraction 7 was macerated with EtOAc obtaining a yellow powder (116 mg) which was identified as the glycosilated flavonoid rutin. These results support the notion that *A. platyceras* contains compounds with anti-asthmatic properties.

I. ANTECEDENTES

1. ASMA

A. Definición del asma

El asma es una enfermedad inflamatoria caracterizada por hiperreactividad, inflamación, obstrucción y remodelación de las vías aéreas (Figura 1). Los factores que provocan el asma son alérgenos de diversos tipos (polen, ácaros, etc.) que inducen la liberación de mediadores de la inflamación de los mastocitos bronquiales, macrófagos y células epiteliales. Se han identificado dos etapas de la reacción desencadenada por estos factores: la fase inicial y la fase tardía. La fase inicial comienza a partir de la exposición al alérgeno y dura aproximadamente 90 minutos. La fase tardía comienza de 3 a 10 horas después de la exposición y puede durar hasta varios días (Holcomb, 2004).

Durante la fase inicial, los mediadores son liberados de los mastocitos bronquiales para comenzar un proceso inflamatorio local. La reacción clásica de hipersensibilidad de tipo I en asma aguda o en la respuesta inicial a un alérgeno se inicia cuando éste se une a la IgE y éstos al receptor FcεRI del mastocito, provocando la liberación de histamina, triptasas, quimasa, heparina y síntesis de mediadores lipídicos, como LTC₄ y PGD₂, participantes en la broncoconstricción, edema y reclutamiento de células inflamatorias (Figura 1) (Robinson, 2004). Varios estudios han descrito otras funciones para la histamina en la activación de células inflamatorias, dendríticas y células T. Los mastocitos expresan receptores CysLT1 y CysLT2 y su equilibrio es regulado diferencialmente por IL-4 e IL-5 (Robinson, 2004).

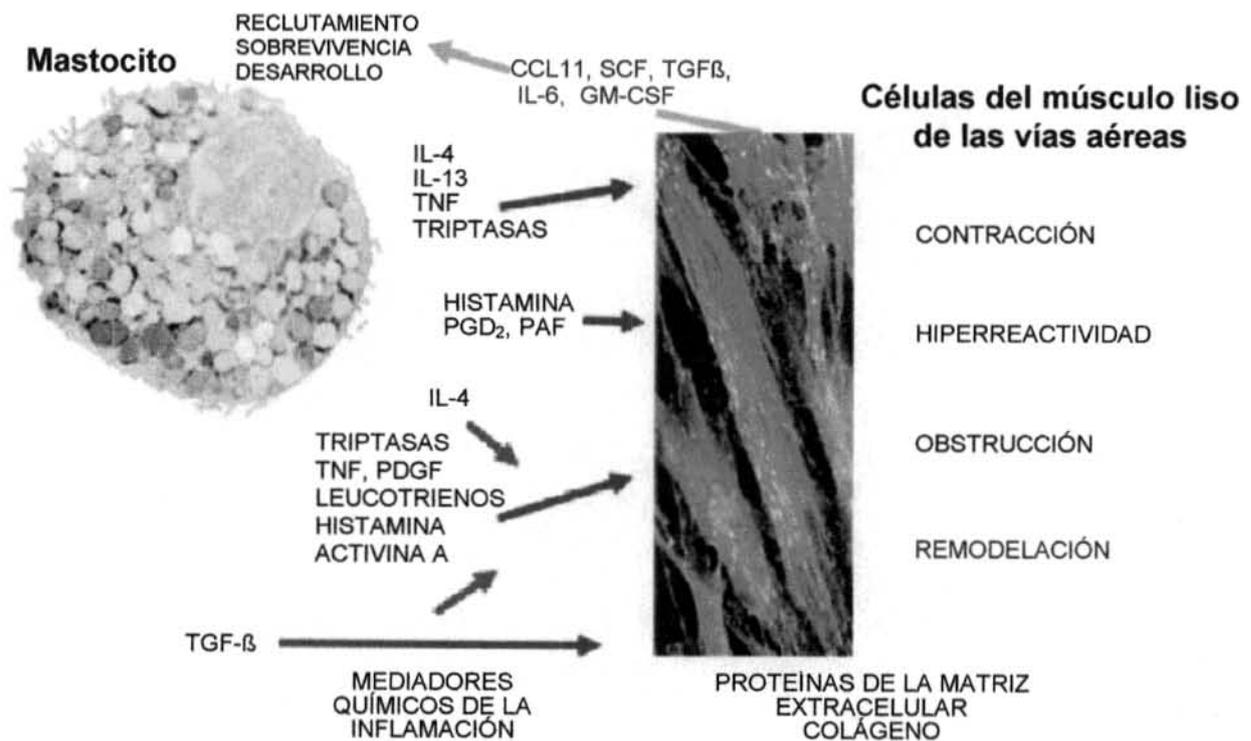


Figura 1. Interacción del mastocito con las células del músculo liso de las vías aéreas de humano. Estas últimas inducen la producción de células madre (SCF), citocinas y quimiocinas, actúan en el reclutamiento y supervivencia del mastocito, y producen mediadores que contraen al músculo liso de las vías aéreas. La potenciación de la respuesta de contracción produce proliferación de las células musculares y modifica el músculo liso a un fenotipo alterado por proteínas de la matriz extracelular y colágeno, lo que provoca la remodelación de las vías aéreas (tomado de Robinson, 2004).

Recientemente se han descrito los receptores BLT (para LTB_4) en los mastocitos que median el reclutamiento de las células T $CD8^+$ y el receptor CrT_{H2} para PGD_2 se expresa selectivamente en células T del tipo T_{H2} ; así, en el asma los mastocitos pueden interactuar con las células T a través de histamina, leucotrienos y PGD_2 (Robinson, 2004).

La histamina liberada provoca vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, contracción de músculo liso bronquial e intestinal y aumento en la producción de moco. Los leucotrienos a su vez son responsables de la broncoconstricción, aumento de la permeabilidad de vénulas postcapilares, incremento de la secreción de moco en los bronquios y quimiotaxis de eosinófilos. Otros mediadores de la inflamación como: bradicinina y serotonina también provocan permeabilidad vascular y la broncoconstricción. Además de producir tos, todos estos cambios llevan al edema y la constricción de las vías aéreas (Holcomb, 2004).

La fase tardía empieza a desarrollarse cuando los componentes celulares (incluyendo eosinófilos, neutrófilos y macrófagos) se activan para moverse en las vías aéreas. El complemento aumenta la permeabilidad vascular, produce vasodilatación, causa desgranulación de los mastocitos y basófilos y aumenta el metabolismo celular del ácido araquidónico. El complemento liberado de los macrófagos, es conocido como anafilatoxina. Los factores del complemento que se sabe que participan en la respuesta anafiláctica son C_3 y C_{3a} (Holcomb, 2004).

Los linfocitos T son atraídos a las vías respiratorias durante la fase tardía para ayudar a la producción de interleucinas que atraen a las células inflamatorias, especialmente eosinófilos, los cuales llegan al lumen bronquial produciendo inflamación. La obstrucción de las vías aéreas es estimulada por el proceso inflamatorio que se manifiesta en edema, incremento en la producción de moco, contracción del músculo liso e hipertrofia. Durante la fase tardía, las vías aéreas también desarrollan hiperreactividad (Holcomb, 2004).

B. Diagnóstico y clasificación del asma

En general, el cuadro clínico que sugiere asma se caracteriza por su peculiar presentación episódica, con periodos de remisión en los que el paciente está totalmente libre de síntomas. Afecta a ambos sexos, se presenta en cualquier época de la vida y puede iniciarse abruptamente o de manera insidiosa, de manera que no existe un patrón bien definido en su presentación (Mintz, 2004).

El diagnóstico clínico del asma debe considerar la predisposición genética y los síntomas clínicos, por ejemplo, el grado de alteración de la función pulmonar (Tabla I). Al diagnosticar el asma, se deben descartar otros padecimientos que pudieran provocar los mismos síntomas. La severidad de la enfermedad se determina evaluando la función pulmonar (Tabla II), y la necesidad de medicamento de rescate (Mintz, 2004).

Existen varios factores que pueden complicar la evaluación de la severidad del asma. Primero, la clasificación de la enfermedad se basa en los síntomas que el paciente tuvo antes de empezar el tratamiento. Una vez que el tratamiento ha iniciado, la clasificación se dificulta. Segundo, el asma es una enfermedad variable los pacientes no permanecen en la misma categoría, pasan constantemente de una a otra. Y tercero, los mismos pacientes a menudo subestiman sus síntomas. Por esto, los pacientes frecuentemente son clasificados incorrectamente (Mintz, 2004).

Tabla I. Diagnóstico del asma en niños y adultos

Síntomas episódicos de obstrucción del flujo aéreo

Disnea

Opresión torácica

Tos (empeora por la noche)

Los síntomas se presentan o empeoran en la noche, despertando al paciente.

Los síntomas se presentan o empeoran con el ejercicio, infecciones virales, cambios de temperatura, emociones fuertes, menstruación, la presencia de animales, ácaros, moho, humo, polen o químicos.

Sibilancias

Obstrucción de las vías aéreas por lo menos parcialmente reversible

Variación diurna en FEP en más del 20 % por 1 ó 2 semanas.

Aumento por lo menos del 12% y 200 mL en FEV₁ después del uso de un broncodilatador.

Reducción en FEV₁ y ratio FEV₁/FVC usando espirometría (indica obstrucción)

FEP= Flujo espiratorio máximo

FEV₁= Volumen espiratorio forzado del primer segundo = cantidad de aire que un sujeto exhala un segundo después de realizar una espiración forzada a partir de su máximo esfuerzo y de los pulmones completamente llenos de aire.

FVC= Capacidad vital espiratoria forzada.

(Tomado de Mintz et al., 2004)

Tabla II. Clasificación de la severidad del asma

Tipo de asma*	Síntomas**	Síntomas nocturnos	Función pulmonar
Leve intermitente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas ≤ 2 veces a la semana • Asintomático y FEP o FEP normal entre exacerbaciones • Exacerbaciones breves (de pocas horas a pocos días); la intensidad puede variar 	≤ 2 veces al mes	<ul style="list-style-type: none"> • FEV₁ o FEP 80% del predicho. • FEP variable $<20\%$
Leve persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas >2 veces a la semana pero <1 veces al día • Exacerbaciones pueden afectar la actividad 	>2 veces al mes	<ul style="list-style-type: none"> • FEV₁ o FEP 80% del predicho. • FEP variable 20-30%
Moderada persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas diarios • Uso diario de agonista β_2-adrenérgico inhalado • Exacerbaciones con efecto en la actividad • Exacerbaciones 2 veces a la semana. 	>1 vez por semana	<ul style="list-style-type: none"> • FEV₁ o FEP $>60\%$ - $<80\%$ del predicho. • FEP variable $>30\%$
Severa persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas constantes • Actividad física limitada • Exacerbaciones frecuentes 	Frecuentemente	<ul style="list-style-type: none"> • FEV₁ o FEP $\leq 60\%$ del predicho. • FEP variable $>30\%$

*La presencia de una de las características de severidad es suficiente para colocar al paciente en esa categoría. Las características descritas en esta figura son generales y pueden superponerse por la variabilidad del asma. La clasificación de un paciente puede variar en el tiempo.

**Los pacientes en cualquier nivel de la clasificación pueden tener exacerbaciones leves, moderadas o severas. En el asma intermitente los pacientes pueden experimentar exacerbaciones severas separadas por largos períodos de función pulmonar normal y sin síntomas. Tomado de Murphy et al, 1997.

C. Epidemiología del asma

En las pasadas tres décadas ha habido un aumento espectacular en la prevalencia del asma y alergias, especialmente en los países con estilo de vida occidental. En el estudio ISSAC (*International Study on Asthma and Allergies in Childhood*) en el año 2003, se observó que los países con mayor prevalencia de asma fueron Australia, Nueva Zelanda y Gran Bretaña. En estos países más del 20% de los niños de 13-14 años presentaron síntomas de asma. En contraste, en África Central, Europa Central y Oriental, y en China menos del 5% de los niños presentaron síntomas de la enfermedad. Por otro lado, la ECRHS (*European Community Respiratory Health Survey*) ha revelado cifras similares de asma e hiperreactividad bronquial en adultos (Holgate, 2004). Mientras estas diferencias en la presencia de la enfermedad pueden ser parcialmente atribuidas a factores genéticos, se ha visto que algunos de los países con mayor número de asmáticos, reciben grandes migraciones. Esto sugiere que los factores ambientales juegan un papel crítico en la etiología del asma y otras enfermedades alérgicas. Por otra parte, los estudios de prevalencia que utilizan metodologías similares indican que en un intervalo de 10-25 años la enfermedad ha aumentado progresivamente en niños, adolescentes y adultos (Holgate, 2004).

Desde hace años, el área metropolitana de la Ciudad de México tiene graves problemas de contaminación atmosférica, lo cual ha contribuido al aumento en el número de casos de asma en nuestro país (Romieu et al., 1995). En los servicios de urgencia de hospitales de segundo nivel, las crisis agudas de asma son causa principal de hospitalización. La prevalencia de asma aguda se reporta entre 36.6 y 56.5 casos por mil pacientes pediátricos atendidos (Ceballos et al., 2004).

Las tasas de morbilidad y mortalidad nacional también se han incrementado. En la actualidad el asma se ubica entre el primer y el tercer lugar de las causas de internamiento en los hospitales generales, mientras que Instituto Mexicano del Seguro Social ocupa el tercer lugar. En los últimos años las tasas de mortalidad y morbilidad han aumentado de 3.24 a 12.7 y de 0.34 a 1.23 por cada 100 000 derechohabientes pediátricos respectivamente (Ceballos et al., 2004).

D. Fisiopatología del asma

a) Obstrucción de las vías aéreas

Los síntomas clínicos y la fisiopatología del asma se deben a obstrucción de las vías aéreas que puede ser intermitente, persistente y/o progresiva, o no reversible. La obstrucción del flujo de aire puede ser el resultado de múltiples factores estructurales y/o fisiológicos que contribuyen colectiva o individualmente a estrechar las vías aéreas. La contribución precisa de cada uno de estos factores varía entre los pacientes asmáticos y guarda relación con las diversas manifestaciones clínicas que presenta cada paciente, con la severidad de la enfermedad y con la respuesta terapéutica a los fármacos administrados (Lemanske y Busse, 2003).

b) Espasmo del músculo de las vías aéreas

Una de las características típicas del asma es la hiperreactividad de las vías aéreas que puede ser desencadenada por varios estímulos, provocando la respuesta contráctil que conduce a un estrechamiento excesivo de las vías aéreas y en consecuencia a la obstrucción aguda de flujo de aire (Lemanske y Busse, 2003).

En el espasmo del músculo liso bronquial producido por reactividad excesiva participan muchos factores que regulan o contribuyen al tono muscular. Entre ellos varias células residentes (mastocitos, macrófagos alveolares, epitelio y endotelio) y células inflamatorias circulantes (eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, basófilos y, posiblemente, plaquetas) que secretan una variedad de mediadores como histamina, leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 y LTE_4), PGD_2 y el PAF que, por sí mismos, inducen contracción en el músculo liso bronquial (Lemanske y Busse, 2003).

El músculo liso de las vías aéreas tiene también un control neural pues es innervado vagalmente. Ya sea por activación directa de este nervio o por mecanismos reflejos se secreta acetilcolina que contrae al músculo bronquial. Existen también otros neuroreguladores como la sustancia P y algunas neurocininas que pueden influir en el tono del músculo liso de las vías aéreas (Lemanske y Busse, 2003).

c) Edema de la mucosa de las vías aéreas

Muchos de los mediadores que provocan la contracción del músculo liso bronquial, como histamina, leucotrienos y bradicinina pueden aumentar la permeabilidad de la membrana y causar edema de la mucosa. Estos cambios contribuyen también a la obstrucción del flujo de las vías aéreas (Lemanske y Busse, 2003).

d) Hipersecreción de moco

Una de las características del asma severa es la sobreproducción de moco; éste puede estrechar mecánicamente el lumen de las vías aéreas y, en el asma severa, formar tapones sólidos. El tapón de moco en las vías aéreas puede presentarse en casos severos, en ataques prolongados de asma o en pacientes con asma crónica. El resultado es un rearrreglo del lumen de las vías aéreas (Lemanske y Busse, 2003).

e) Inflamación de las vías aéreas

La inflamación de las vías aéreas es una característica típica del asma y contribuye a la obstrucción del flujo de aire, a la hiperreactividad bronquial y a la iniciación del proceso de remodelación. El patrón de inflamación varía considerablemente con la severidad y cronicidad de la enfermedad, depende de la etapa de evolución de la enfermedad: aguda, crónica o remodelación, y puede determinar la receptividad del paciente al tratamiento (Barnes, 2004a).

Los tejidos de personas que mueren por asma muestran un patrón inflamatorio de las vías aéreas: descamación epitelial, taponamiento mucoso de los bronquios y bronquiolos segmentales, depósito de colágeno bajo la membrana basal, edema de la submucosa, infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y eosinófilos), e hipertrofia e hiperplasia del músculo liso (Lemanske y Busse, 2003).

Muchos tipos celulares contribuyen a la inflamación de las vías aéreas en el asma: mastocitos, linfocitos T_H2 que liberan citocinas proinflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13, las que a su vez participarán en el reclutamiento y activación de eosinófilos. Los linfocitos y las células epiteliales pueden generar quimiocinas, como RANTES y eotaxina que parecen ser esenciales para el reclutamiento de eosinófilos. Otro paso crítico en este proceso es la activación de proteínas de adhesión endotelial, especialmente las de la superfamilia de la inmunoglobulina, ICAM-1 y VCAM-1. Estas proteínas pueden combinarse con receptores específicos en las células inflamatorias para inducir la diapedesis hacia las vías aéreas (Schmidt et al., 2000; Lemanske y Busse, 2003).

f) Remodelación irreversible de las vías aéreas

Evidencias recientes han mostrado que algunos pacientes con asma presentan obstrucción irreversible del flujo aéreo como consecuencia de la remodelación de las vías aéreas, lo cual representa un proceso de daño-reparación del tejido. Se han identificado varios componentes de este proceso de remodelación, por ejemplo, hipertrofia de músculo liso de las vías aéreas, hiperplasia de las glándulas de moco y células de copa, angiogénesis (hiperplasia vascular) y depósito de colágeno en las vías aéreas. Estos cambios histológicos parecen ser permanentes pues no se revierten con el tratamiento (Lemanske y Busse, 2003).

Aunque las consecuencias de la remodelación de las vías aéreas son evidentes, los procesos implicados en su regulación todavía no están bien definidos. El proceso parece estar bajo el control de mediadores distintos a los implicados en la respuesta inflamatoria aguda. Por ejemplo, la generación y presencia de factores del crecimiento parecen ser más críticas en la remodelación pues inducen la mayoría de los cambios estructurales observados en las vías aéreas (Larché et al., 2003).

Así, la transición para la remodelación en la inflamación alérgica implica la participación de factores de crecimiento del músculo liso, depósito de colágeno, proliferación de vasos sanguíneos e hiperplasia de la glándula de moco. En conjunto, estos datos proporcionan un panorama del asma que comienza con una respuesta inflamatoria celular aguda que puede evolucionar a un proceso crónico y dar lugar a cambios estructurales en las vías aéreas y exacerbar la hiperreactividad y la obstrucción del flujo de aire en las vías aéreas (Larché et al., 2003).

g) Hiperreactividad de las vías aéreas

Una de las características típicas del asma es la hiperreactividad de las vías aéreas a una gran variedad de sustancias inhaladas que, aunadas a la exposición al aire frío, ejercicio, sustancias irritantes e hiperventilación, exacerban los síntomas bronquiales. Entre los factores que contribuyen a la hiperreactividad bronquial en el asma, se han descrito algunos polimorfismos genéticos, las características histológicas de las vías aéreas (por ejemplo, edema, hipertrofia del músculo liso y depósito de colágeno), la edad del paciente y la hora del día (noche o día) (Schmidt et al., 2000).

Cuando la hiperreactividad de las vías aéreas se manifiesta en la infancia, puede ser un factor de riesgo para el desarrollo del asma. Una prueba positiva a un reto con metacolina es diagnóstica de hiperreactividad en pacientes atópicos, con fibrosis cística u otras enfermedades pulmonares crónicas e incluso en individuos sanos; la hiperreactividad puede desarrollarse pocas semanas después de una infección viral respiratoria (Schmidt et al., 2000).

E. Tratamiento farmacológico del asma

En el tratamiento del asma, a pesar de disponer de fármacos que en algunos casos resultan muy efectivos, hay casos en los que los medicamentos no controlan los síntomas. Estos pacientes pueden presentar exacerbaciones que pueden complicarse al grado de requerir atención hospitalaria (Barnes, 2004b). Actualmente se ha modificado el manejo del asma. Existen múltiples estudios que demuestran el beneficio del uso de los lineamientos establecidos en las Guías Internacionales de Diagnóstico y Tratamiento del Asma (Murphy et al., 1997).

A continuación se mencionan los fármacos utilizados actualmente para la terapia del asma (Tabla III). 1) Glucocorticoides, por su poderosa acción antiinflamatoria. 2) Cromoglicato y nedocromil como antiinflamatorios no-esteroides. 3) Agonistas β -adrérgicos, para la broncodilatación. 4) Teofilina y sus derivados, para el broncoespasmo y la inflamación. 5) Antagonistas e inhibidores de la síntesis de leucotrienos, como broncodilatadores y antiinflamatorios (Figura 2). 6) Anticolinérgicos que se utilizan también como broncodilatadores, aunque éstos son menos eficaces que los agonistas β -adrérgicos (Murphy et al., 1997).

Estos tratamientos tienen una eficacia limitada que se ha relacionado con la gran variabilidad en la respuesta individual de los pacientes. Esta variabilidad puede deberse a diferencias en la tolerancia al tratamiento, la severidad, tipo y recurrencia de la enfermedad, la exposición al ambiente, la dieta, la interacción del tratamiento con otros fármacos, y a características biológicas individuales, tales como la edad, el estado nutricional, la función hepática y renal (Pignatti, 2004). El resultado es la urgente necesidad de encontrar mejores alternativas terapéuticas para el asma y por eso se estudian nuevos fármacos, algunos de los cuales se resumen en la Tabla IV. Como parte de esta búsqueda existen algunas opciones en la medicina alternativa y complementaria que incluyen el uso de homeopatía, yoga, acupuntura y plantas medicinales (Markham y Wilkinson, 2004).

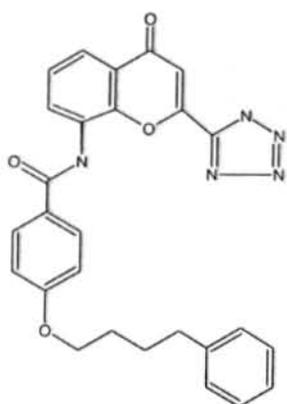
Tabla III. Fármacos utilizados en el tratamiento del asma

Medicamento	Indicaciones y Mecanismos	Efectos adversos	Recomendaciones terapéuticas
<p>Corticosteroides (Glucocorticoides)</p> <p>Inhalados</p> <p>Dipropionato de beclometasona Budesonida Flunisolida Propionato de fluticasona Acetonido de triamcinolona</p>	<p><i>Indicaciones</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Prevención de los síntomas a largo plazo; supresión y control de la inflamación. • Reducción de la necesidad de corticosteroides orales <p><i>Mecanismos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatorio. Inhibe la producción de citocinas, activación de proteínas de adhesión y activación y migración celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Tos, disnea, candidiasis oral. • En altas dosis, los efectos sistémicos pueden ocurrir, aunque los estudios no son concluyentes, el significado clínico de estos efectos no ha sido establecido (insuficiencia renal, osteoporosis, supresión del crecimiento y fragilidad capilar) 	<ul style="list-style-type: none"> • La limpieza de la boca después de la inhalación disminuye los efectos secundarios y la absorción sistémica. • Dexametasona no se incluye porque se absorbe altamente y tiene efectos represivos secundarios a largo plazo
<p>Orales</p> <p>Metilprednisolona Prednisolona Prednisona</p>	<p><i>Indicaciones</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Para corto plazo (3–10 días) En caso de ataque: para obtener un rápido control del asma persistente. • Para la prevención a largo plazo de síntomas en el asma severa persistente. <p><i>Mecanismos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El mismo que los inhalados. 	<ul style="list-style-type: none"> • A corto plazo: anomalías en el metabolismo de la glucosa, aumento de apetito, retención de líquidos, aumento de peso, cambios de humor, hipertensión, úlcera péptica y raramente necrosis de fémur. • A largo plazo: supresión del eje suprarrenal, supresión del crecimiento, fragilidad dérmica, hipertensión, diabetes, síndrome de Cushing, cataratas, debilidad muscular y, en casos raros, daño del sistema inmune. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar dosis efectiva más baja. Para el uso a largo plazo, alternar en el día, por la mañana produce menos toxicidad. Si se requieren dosis diarias, un estudio muestra una mejor eficacia sin ningún aumento en la supresión suprarrenal cuando se administra a las 3 de la tarde en lugar de la mañana.
<p>Cromolín sódico y Nedocromil Orales</p>	<p><i>Indicaciones</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Prevención de los síntomas a largo plazo. • Tratamiento preventivo para antes de la exposición al ejercicio o al alérgeno conocido. <p><i>Mecanismos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatorio. Bloquean la fase inicial y tardía de la reacción alérgica. Inhiben la respuesta aguda al ejercicio, frío, aire seco, y SO₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Del 15 al 20 por ciento de los pacientes se quejan del sabor desagradable del nedocromil. 	<ul style="list-style-type: none"> • La respuesta terapéutica al cromolín y el nedocromil a menudo ocurre dentro de 2 semanas, pero a las 4-6 semanas son necesarias pruebas para determinar el máximo beneficio.

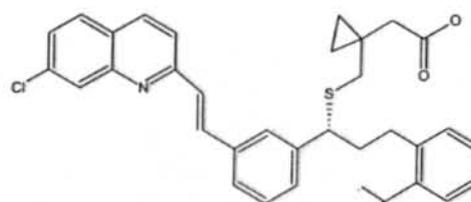
Medicamento	Indicaciones y Mecanismos	Efectos adversos	Recomendaciones terapéuticas
Agonistas β_2-adrenérgicos Inhalado Salmeterol	<i>Indicaciones</i> <ul style="list-style-type: none"> • Prevención de los síntomas a largo plazo, especialmente los síntomas nocturnos, como terapia antiinflamatoria. • Prevención del broncoespasmo inducido por ejercicio. <i>Mecanismos</i> <ul style="list-style-type: none"> • Broncodilatadores. Relajación de músculo liso. • In vitro, inhibe la liberación de mediadores del mastocito, disminuye la permeabilidad vascular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taquicardia, temblor del músculo esquelético e hipocalcemia. • Un efecto broncoprotector disminuido puede ocurrir dentro de 1 semana de terapia crónica. El significado clínico no se ha establecido. 	<ul style="list-style-type: none"> • No usar para tratar síntomas agudos. • No debe ser utilizado en lugar de la terapia antiinflamatoria. • Puede proporcionar mejor control de los síntomas si se añade a corticosteroide inhalado • Albuterol: agonista β_2-adrenérgico de acción tardía con larga duración y menos efectos secundarios que los agentes orales
Metilxantinas Orales Teofilina	<i>Indicaciones</i> <ul style="list-style-type: none"> • Control a largo plazo y prevención de síntomas nocturnos. <i>Mecanismos</i> <ul style="list-style-type: none"> • Broncodilatador. Relajación del músculo liso. • Puede afectar la infiltración de eosinófilos en la mucosa bronquial y disminuye el número de linfocitos T en el epitelio bronquial. • Aumenta la contractilidad del diafragma. 	<ul style="list-style-type: none"> • A dosis tóxicas: taquicardia, náusea y vómito, estimulación del sistema nervioso central, dolor de cabeza, hematemesis, hiperglicemia e hipocalcemia. • A dosis terapéuticas: insomnio, malestar gástrico, úlcera o reflujo, hiperactividad en algunos niños, dificultad de orinar en pacientes con prostatismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mantener las concentraciones del suero en un estado constante entre 5 y 15 mg/mL. • No se recomienda generalmente para exacerbaciones. Es obligatorio registrar las concentraciones en el suero.
Modificadores de leucotrienos Orales: Zafirlukast Zileuton	<i>Indicaciones</i> <ul style="list-style-type: none"> • Control y prevención de los síntomas a largo plazo en asma persistente. <i>Mecanismo</i> <ul style="list-style-type: none"> • Antagonista del receptor de leucotrieno: Inhibidor competitivo selectivo de los receptores de LTD₄ y LTE₄. <i>Indicaciones</i> <ul style="list-style-type: none"> • Control y prevención de los síntomas a largo plazo en asma persistente. <i>Mecanismo</i> <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor de la 5 lipooxigenasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo un caso de efecto adverso específico a la fecha. • Hay un caso reportado de hepatitis reversible e hiperbilirubinemia; altas concentraciones pueden causar deterioro del hígado. <p>Se ha reportado aumento de enzimas del hígado Los informes de hepatitis reversible e hiperbilirubinemia son limitados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La administración con comida disminuye biodisponibilidad; tomar 1 o 2 horas después de la comida. • Inhibe el metabolismo de warfarina y aumenta el tiempo de protombina; es inhibidor competitivo de la isozima hepática CYP2C9. Inhibe la CYP3A4 que puede inhibir metabolismo de terfenadina, warfarina y teofilina. Monitoreo de enzimas hepáticas

(Tomado de Murphy et al, 1997)

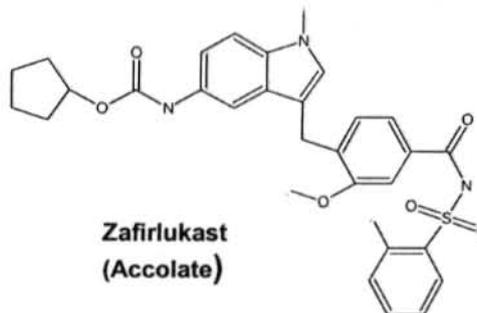
Antagonistas selectivos



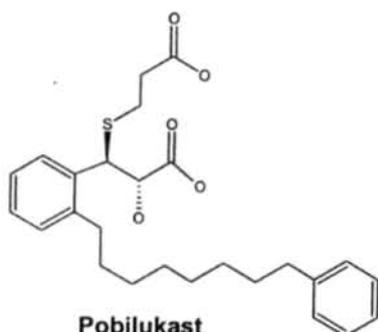
**Pranlukast
(Ultair)**



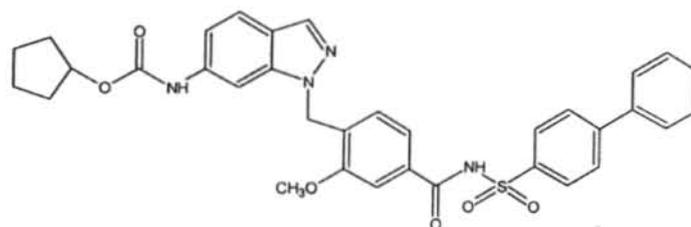
**Montelukast
(Singular)**



**Zafirlukast
(Accolate)**

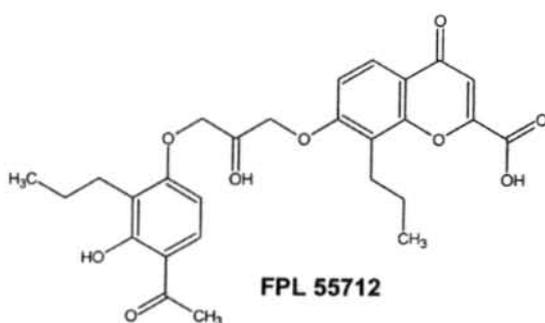


Pobilukast

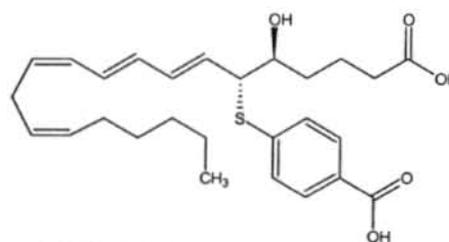


ICI 198615

Antagonistas no selectivos



FPL 55712



BAY u9773

Figura 2. Compuestos antagonistas de leucotrienos

Tabla IV. Fármacos propuestos como nuevos agentes antiasmáticos

Agentes	Mecanismo	Efectos adversos	Referencia
Metotrexato	Antiinflamatorio	Salpullido, hepatotóxico, dolor abdominal, náusea, diarrea, estomatitis, dolor de cabeza.	Davies et al., 2000
Troleandomicina	Efecto sinérgico cuando se administra con corticosteroides orales.	Aumento de peso, retención de líquidos, intolerancia a la glucosa, aumento de los niveles de colesterol y hepatotoxicidad.	Moss, 1995
Compuestos de oro	Agente inmunomodulador. Disminuye el nivel de prostaglandinas y leucotrienos.	Diarrea, prurito, citopenia, ulcera bucal, proteinuria y síndrome nefrótico de Frank.	Niven y Argyros, 2003
Ciclosporina	Inmunomodulador, disminuye la síntesis y liberación de los mediadores inflamatorios de los mastocitos y basófilos.	Nefrotoxicidad dependiendo de la dosis, temblor, hirsutismo, hipertensión, hiperplasia y complicaciones con infecciones.	Niven y Argyros, 2003
Gammaglobulina intravenosa (IVIG)	Disminuye los niveles de IgE, inhibe la activación de linfocitos y la producción de IL-2 e IL-4.	Dolor de cabeza y náusea.	Niven y Argyros, 2003
Heparina inhalada	Inhibe la activación de linfocitos, quimiotaxis de neutrófilos, crecimiento del músculo liso y reduce la activación del complemento.	Ningún efecto adverso asociado.	Niven y Argyros, 2003
Anti-IL-5	Reducción de eosinófilos en esputo y sangre.	Ningún efecto adverso asociado.	Boushey, 2003
7Anticuerpo Monoclonal IgE	El anti-IgE previene la unión del IgE a los mastocitos y basófilos.	Benéfico solo en el tratamiento de asma alérgica.	Rosenwasser et al., 2003
Inhibidores de Triptasa	Reduce el número de eosinófilos y niveles de IL-4 e IL-5 en el lavado bronquial.	Efectos modestos ante un reto antigénico y ningún efecto en la hiperreactividad bronquial.	Boushey, 2003

F. Medicina tradicional y asma

Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que se han empleado en la medicina tradicional mexicana desde tiempos precolombinos. Las comunidades indígenas utilizan diferentes preparaciones a base de plantas para tratar un gran número de enfermedades, entre ellas el asma.

En la actualidad la aplicación de técnicas más exactas y sensibles en los estudios con plantas ha contribuido de manera notable al análisis biológico y químico de las mismas (Fabricant y Farnsworth, 2001). Se estima que en nuestro planeta existen alrededor de 500 000 especies de plantas superiores. De éstas, solo 6% han sido evaluadas biológicamente y aproximadamente el 15% han sido sometidas a estudios químicos.

Una parte esencial de la medicina tradicional, en casi todas las culturas es la preparación de infusiones o decocciones de plantas y hongos que se utilizan para prevenir y tratar las enfermedades. Los fármacos y suplementos derivados de plantas tienen un mercado importante en la mayoría de los países, inclusive en los industrializados (Linde et al., 2001).

Numerosos compuestos aislados de las plantas han sido evaluados en modelos experimentales y en ensayos clínicos. Muchos de ellos parecen ofrecer beneficios bioquímicos y fisiológicos, pero sólo algunos han demostrado propiedades antiasmáticas específicas (Tabla V) (Hyland, 2003).

México cuenta con una gran diversidad florística. Las plantas medicinales son recursos terapéuticos que se han empleado en la medicina tradicional mexicana desde tiempos precolombinos. La etnobotánica estudia la interacción entre el hombre y las plantas a lo largo del tiempo y en diferentes ambientes, nos informa acerca del conocimiento popular sobre herbolaria, y por eso sienta las bases para las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas (Aguilar et al., 1994).

El potencial de las plantas medicinales de nuestro país ha sido poco explorado como posible fuente de nuevos fármacos antiasmáticos. Entre las plantas que se han utilizado en nuestra medicina tradicional para tratar el asma se encuentran: *Cymbopetalum penduliflorum*, *Heliotropium curassavicum*, *Pithecellobium albicaule*, *Malvaviscus arboreus*, *Eucalyptus globulus*, *Polypodium polypodioides*, *Datura discolor*, *Solandra grandiflora*, *Argemone mexicana*, *Argemone ochroleuca* y *Argemone platyceras* (Argueta et al., 1994).

En particular la especie *Argemone platyceras* es utilizada por las comunidades mazahuas y otomíes del estado de México. Un té preparado con el botón de la flor, se utiliza para el tratamiento de pulmonía y bronquitis, también se usa para tratar el catarro, dolor de cabeza, de pulmón o de pecho y para problemas dermatológicos (Aguilar et al., 1994).

2. *Argemone platyceras* Link & Otto

Argemone platyceras Link & Otto (Papaveraceae) se conoce popularmente como chicalota, cachilota, carlota, espina blanca y chayotero (Figura 3); se localiza en los estados de México, Hidalgo, Michoacán y Tlaxcala (Argueta et al., 1994). Mide de

30 cm a 1 m de altura, puede ser anual o durar más de 2 años; las hojas son de color verde blanquizco con hendiduras y terminan en una espina fina; las flores son vistosas y de color blanco al amarillo pálido; el fruto es grande, espinoso y con semillas negras y savia amarilla. Habita en clima templado, entre 1200 y 2400 msnm, se asocia a pastizal, bosques de encino y pino (Aguilar et al., 1994).

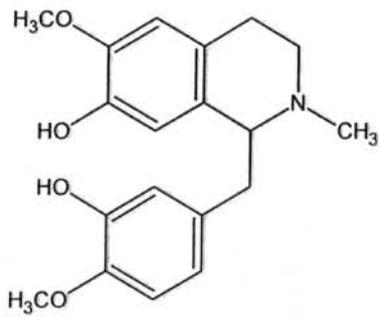
En la especie *A. platyceras* se han detectado varios alcaloides como reticulina, munitagina, argemonina, metilargemonina, norargemonina, platycerina, O-metilplatycerina y N-metosal de platycerina (Atta-ur-Rahman, 1994) (Figura 4). Sin embargo, ni esta especie ni sus alcaloides han sido objeto de investigación biológica.



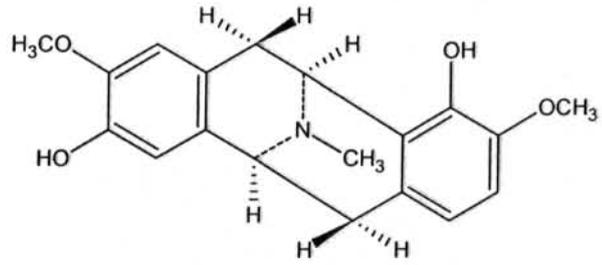
Figura 3. *Argemone platyceras* Link & Otto

Tabla V. Plantas de las que se han obtenido compuestos con actividad antiasmática

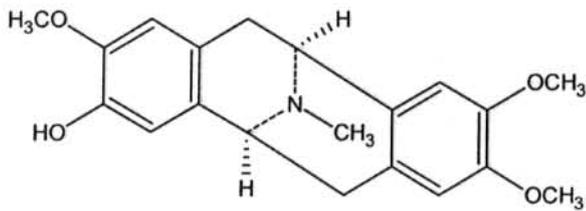
Especie	Compuestos	Acción biológica (efecto)	Referencia
Acanthaceae <i>Adhatoda vasica</i> Ness.	Vasicinona (Alcaloide)	Broncolítico, Inhibidor de la síntesis de leucotrienos	Dorsch y Wagner, 1991
Araliaceae <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer.	Ginsenósidos	Antialérgicos	Choo et al., 2003
Asteraceae <i>Egletes viscosa</i> Less.	Ternatina (Flavonoide)	Antiinflamatorio	Souza et al., 1992
Asteraceae <i>Artemisia scoparia</i> Waidst.	Scoparona (Coumarina)	Relajante del músculo liso traqueal	Fang et al., 2003
Asteraceae <i>Petasites formosanus</i> Kitamura.	S-petasina, S-isopetasina (Sesquiterpenos)	Relajante del músculo liso traqueal.	Ko et al., 2001
Buddlejaceae <i>Buddleja madagascariensis</i> Lamk.	Mimengósido B (Saponina)	Acción expectorante	Emam et al., 1997
Burseraceae <i>Boswellia serrata</i> L.	Ácido Boswellico	Inhibidor de la 5- lipooxigenasa	Miller, 2001
Fabaceae <i>Desmodium adscendens</i> (Sw) D.C.	β -feniletilaminas y tetrahidroisoquinolinas (Alcaloides)	Inhibidor de la síntesis de prostaglandinas	Addy, 1992
Ginkgonaceae <i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgólidos (Terpenos)	Antiinflamatorio	Huntley y Ernst, 2000
Labiatae <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.	Baicalina (Flavonoide)	Antialérgico Antiinflamatorio	Liaw et al., 1999
Liliaceae <i>Allium cepa</i> L.	Cepaenos	Inhibidor de la 5- lipooxigenasa	Dorsch y Wagner, 1991
Magnoliaceae <i>Magnolia obovata</i> Thunb.	Magnolol Honokiol (Compuestos fenólicos)	Antiinflamatorio Relajante del músculo liso traqueal	Ko et al., 2003
Malpighiaceae <i>Galphimia glauca</i> Cav.	Ácido Tetragalloilquinico	Antialérgico	Neszmelyi et al., 1993.
Rubiaceae <i>Clerodendrum petasites</i> S. Moore.	Hispidulina (Flavonoide)	Antiespasmódico	Hazekamp et al., 2001



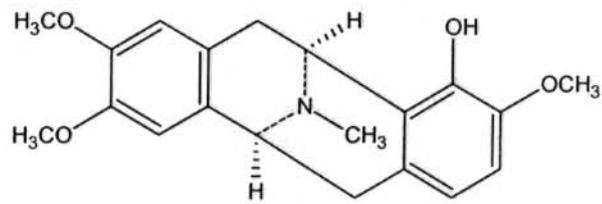
(+),(-),(±)-reticulina



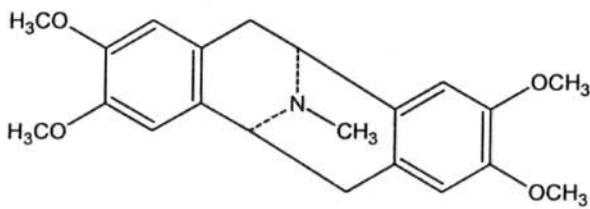
(-),(±)-munitagina



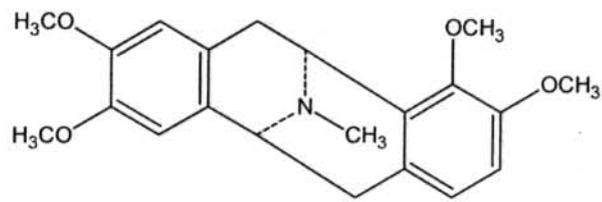
(+),(-),(±)-norargemonina



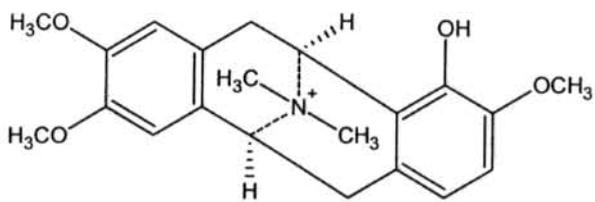
(-),(±)-platycerina



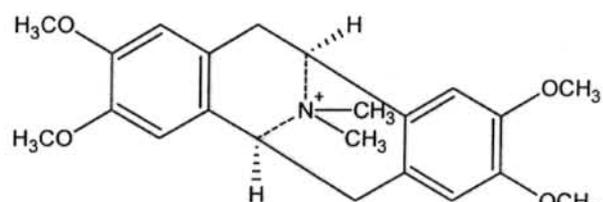
(+),(-),(±)-(N-metilpavina)argemonina



O-metilplatycerina



N-metosal de platycerina



(-)-N-metilargemonina

Figura 4. Alcaloides de *Argemone platyceras* Link & Otto (Atta-ur-Rahman, 1994).

II. JUSTIFICACIÓN

La identificación de algunos procesos involucrados en la respuesta inflamatoria en el asma ha llevado al conocimiento de nuevos blancos farmacológicos, éste es el caso de los leucotrienos que participan en la inflamación, hiperreactividad y obstrucción de las vías aéreas y consecuentemente, en su remodelación. Se ha demostrado que los antagonistas del receptor de leucotrienos pueden inhibir estos procesos.

La búsqueda de agentes que inhiban los procesos en que participan estos mediadores puede ser la clave para un mejor control del asma. En este sentido las plantas constituyen una fuente inagotable de nuevas estructuras moleculares que pueden ser de gran utilidad para el control del asma.

Se ha establecido la importancia de profundizar en el conocimiento del potencial terapéutico antiasmático de las plantas en nuestro país, para esto se deben realizar estudios sistemáticos que permitan conocer la composición química y evaluar la actividad farmacológica de extractos y compuestos obtenidos de las plantas de interés.

Argemone platyceras se ha utilizado para tratar algunos síntomas del asma por lo que nos propusimos valorar las propiedades antiespasmódicas, antialérgicas y antiinflamatorias de la especie en un modelo experimental de asma. Este estudio contribuirá al conocimiento de las propiedades medicinales de esta especie botánica, que constituye un recurso natural de México, y se sumará a los esfuerzos de búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el control de la enfermedad.

III. HIPOTESIS

Argemone platyceras, contiene compuestos que tienen efectos antiespasmódicos, antialérgicos y antiinflamatorios sobre el músculo liso de tráquea de cobayo como modelo experimental de asma.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos antiespasmódicos, antialérgicos y antiinflamatorios de los extractos y fracciones obtenidos de *Argemone platyceras* sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo

1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Valorar las propiedades de extractos y fracciones de las hojas y las flores de *Argemone platyceras* como:

- a) Agentes antiespasmódicos sobre la contracción inducida por carbacol e histamina en el músculo liso de tráquea de cobayo.
- b) Agentes antialérgicos sobre la contracción inducida por ovoalbúmina en el músculo liso de tráquea de cobayos previamente sensibilizados por un reto antigénico con ovoalbúmina.
- c) Agentes antiinflamatorios sobre la contracción inducida por LTD₄ en el músculo liso de tráquea de cobayo.

2. Aislar y caracterizar los principios activos responsables de la actividad biológica.

V. MATERIAL Y METODOS

1. Fitoquímica

A. Colecta y clasificación botánica

El material vegetal fue colectado en el verano del 2000 en el poblado de Santa María que se encuentra en la carretera Federal Toluca-Cuernavaca. La planta fue identificada como *Argemone platyceras* Link & Otto en el Herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras. Un ejemplar quedó depositado con el número de registro 14496.

B. Preparación de extractos

El extracto de las hojas de *Argemone platyceras* se preparó con 500 g del material vegetal limpio, seco y molido, vía maceración a temperatura ambiente con 2 litros de metanol (MeOH), durante 48 h. Para el extracto metanólico de las flores se utilizaron 700 g de material y 2.5 litros de MeOH. Los extractos fueron filtrados y el disolvente se eliminó con un rotavapor Büchi R-205. Este procedimiento se realizó, tres veces para cada extracto.

C. Fraccionamiento químico

El extracto metanólico de las hojas (5.6 g) disuelto en 30 mL de MeOH se sometió a partición líquido-líquido; con agua, diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt). El volumen obtenido fue el siguiente: 50 mL de la fracción acuosa, 170 mL de CH_2Cl_2 y 150 mL de AcOEt. Los solventes se evaporaron por destilación a presión reducida, y la fracción acuosa se liofilizó. Así se obtuvieron las fracciones primarias.

Para separar los compuestos de la fracción de AcOEt de la hojas de *Argemone platyceras*, se realizó una cromatografía en placa preparativa. Para ello se aplicaron 108.6 mg de la fracción de AcOEt en un cromatofolio de sílica gel (Merck) de 2 mm de espesor de 20 x 20 cm, utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol (3:1). Por este procedimiento se obtuvieron 7 fracciones secundarias (F₂), que de mayor a menor polaridad se designaron con números consecutivos del 1 al 7 (Figura 5)

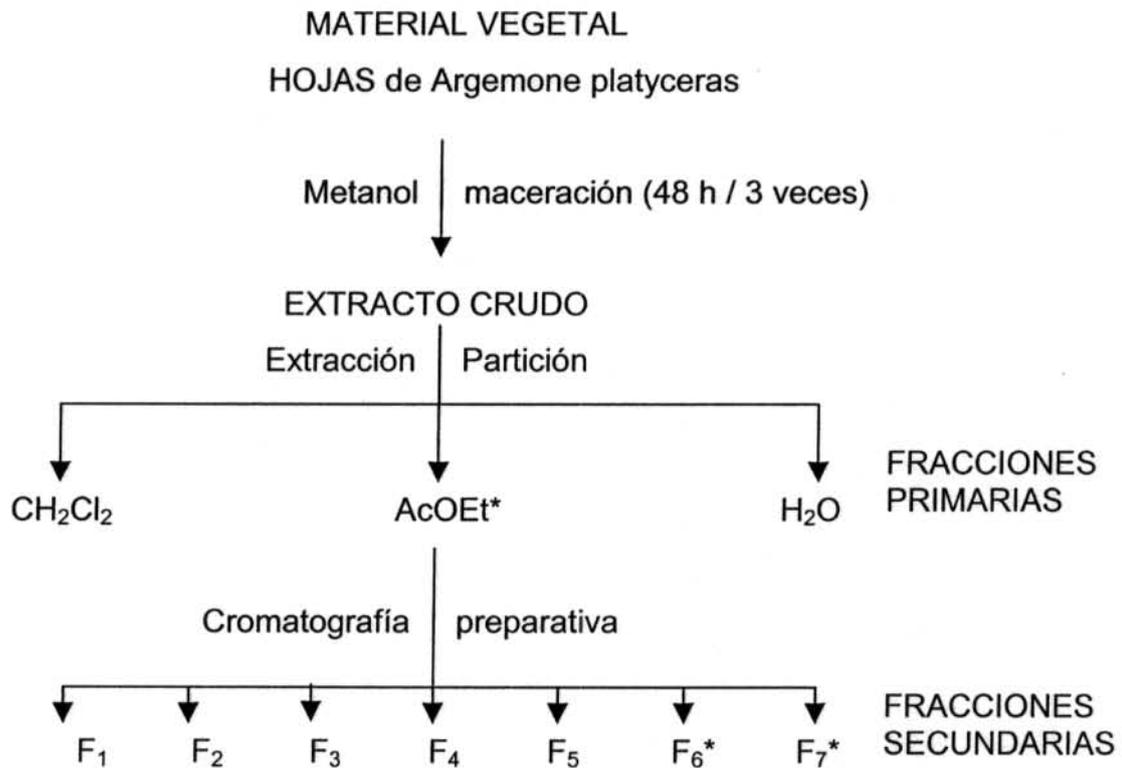


Figura 5. Procedimiento de fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *Argemone platyceras*. *Fracciones con actividad biológica.

Para mejorar el rendimiento de estas fracciones se realizó una CC. Se preadsorbió la fracción de AcOEt (2 g) en celita 1:3. Como fase estacionaria se utilizó sílica gel 1:20 (sílica gel 60, 0.2-0.50, Merck); se eluyó cambiando gradualmente la polaridad con una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH en diferentes proporciones. Se obtuvieron 176 fracciones, de las cuales las fracciones 123 a 125 contenían la fracción 6, y las fracciones 139-148 y 149-155 correspondían a la fracción 7.

Las fracciones 6 y 7 se sometieron a una CCF eluida con CH₂Cl₂:MeOH (80:20) y revelada con sulfato cérico. Esto permitió determinar que en cada fracción teníamos un solo compuesto, por lo que se procedió a su purificación.

D. Purificación y caracterización de los compuestos

Los compuestos presentes en las fracciones 6 y 7 se purificaron mediante CC. Utilizando como fase estacionaria Diaion HP-20 (1:4) y como sistema de elución MeOH (100%) y AcOEt (100%). Así se eliminó la mayoría de impurezas y se procedió a la caracterización de los compuestos presentes en las fracciones.

Los compuestos presentes en estas fracciones se determinaron por CCF en cromatofolios (Merck) de 0.25 mm de espesor GF₂₅₄ (con indicador fluorescente al UV), como fase móvil se utilizó el sistema de elución CHCl₃-MeOH (3:1). Para visualizar los compuestos en las fracciones activas se utilizó luz ultravioleta de una lámpara UVGL-25 a 365 y 254 nm, y reacciones de coloración con sulfato cérico amoniacal y tricloruro de aluminio (agentes cromogénicos). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns.

Para caracterizar los compuestos se utilizó resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C), espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE), espectros de infrarrojo y ultravioleta. Para la RMN-¹H se utilizó un espectrofotómetro Varian (Unity 300) de 300 MHz y Varian Gemini 2000 de 200 MHz, utilizando como solvente metanol deuterado y tetrametil silano como referencia interna. Los espectros de RMN-¹³C se determinaron en un equipo Varian Gemini XR-300 a 75 mHz. Para los espectros de IR se utilizaron los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX. Los espectros de UV se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer 552. La EMIE se realizó en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B y el espectrómetro de ionización de masa por electrospray se obtuvo en un espectrómetro Quattro II, Micromass (UK).

2. Experimentos farmacológicos

A. Animales

En el estudio se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley criados en condiciones convencionales y con peso de 400-500 g. Los animales se dividieron en dos grupos: 1) animales sensibilizados con ovoalbúmina y 2) animales no tratados.

B. Procedimiento de sensibilización

Los cobayos recibieron 120 µg/mL de ovoalbúmina + 2 mg de hidróxido de aluminio disueltos en 2 mL de SSF, 1mL se administró por vía i.p. y 1 mL por vía s.c., este fue considerado como día 1 de tratamiento. En el día 8 los animales fueron expuestos durante 7 minutos a un aerosol generado a partir de una solución de 3 µg/mL de ovoalbúmina en SSF. El día 15 los animales fueron expuestos durante 3 minutos a

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ovoalbúmina en SSF. Los aerosoles se generaron en un nebulizador Aspen, el diámetro de partícula fue de 1-7 μm , y el flujo de 0.6 mL/min.

C. Obtención del tejido traqueal

Los cobayos (sensibilizados y no sensibilizados) se anestesiaron con pentobarbital sódico (95 mg/Kg) vía i.p. Se disecó la tráquea cuidando de no exponerla a la sangre y se limpió de tejido conectivo. Se obtuvieron preparaciones cilíndricas de cuatro anillos cartilaginosos cada una que se colocaron en baños para órganos aislados con 5 mL de Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB) con la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, CaCl_2 2.5 y glucosa 11. Los tejidos se mantuvieron a 37°C con burbujeo continuo con 5% CO_2 -95% O_2 , pH=7.4.

La tensión isométrica se registró con un polígrafo Grass modelo 7B vía un transductor de tensión FTO3C (Grass Instruments). Los tejidos se estabilizaron a 1g de tensión durante 60 minutos, cada 15 minutos se lavaron con solución fresca, y se les aplicaron dos estímulos eléctricos (16 Hz, 100 mV, 10 ms, durante 10 s). Al final del período de estabilización los tejidos se estimularon con una solución de potasio 60 mM preparada a partir de RKB por sustitución equimolar de KCl por NaCl, así se valoraron la viabilidad y reproducibilidad de la respuesta tisular y se seleccionaron para el estudio aquellos tejidos que tuvieron dos respuestas consecutivas similares.

D. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos y fracciones

Para valorar la posible toxicidad de los extractos o fracciones se observó la respuesta a KCl 60 mM después de 30 min de incubación con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos o fracciones. Una respuesta similar a la obtenida durante la selección de

los tejidos (antes de la incubación) fue considerada como indicadora de que los compuestos a ensayar no eran tóxicos.

E. Evaluación del efecto antiespasmódico

Se utilizaron anillos de tráquea aislados de cobayos no sensibilizados. Los tejidos seleccionados se incubaron, durante 30 min, con 10, 30 o 100 µg/mL de los extractos, las fracciones primarias o las fracciones secundarias de *A. platyceras*. A continuación se agregaron al baño de incubación concentraciones acumulativas de carbacol (1×10^{-8} a 1×10^{-5} M) o histamina (1×10^{-6} a 1×10^{-4} M), cada 5 minutos se agregó una nueva dosis. El control se incubó con un volumen equivalente de vehículo, DMSO:EtOH (3:2); el volumen total del solvente que se agregó al baño fue de 0.05%, el cual se sabe que es inocuo para el tejido. Cada anillo de tráquea se utilizó para una sola curva concentración-respuesta.

F. Evaluación del efecto antialérgico

A los 25 días de sensibilización, se disecaron los anillos de tráquea para montarlos en baños de tejidos aislados en las condiciones antes descritas. Tras el período de estabilización, los tejidos se incubaron con extracto de flores (1, 3, 10 µg/mL), extracto de hojas (3, 10, 30 µg/mL), fracción 6 (3, 10, 30 µg/mL) o vehículo (20 µL).

A los 30 min se realizó un reto antigénico único adicionando 3.74 µg/mL de ovoalbúmina (OA) y la respuesta se registró durante 60 minutos. Para descartar la posible participación de los productos de la ciclooxigenasa en la respuesta a ovoalbúmina se realizó una serie idéntica de experimentos en presencia de

indometacina (1×10^{-6} M). Solamente las fracciones que previamente habían mostrado actividad antiespasmódica fueron evaluadas en este ensayo.

G. Evaluación del efecto antiinflamatorio

Se realizaron curvas concentración-respuesta a LTD₄ en preparaciones de tráquea de animales no sensibilizados. Todos los experimentos se realizaron en presencia de indometacina (1×10^{-6} M). Para evitar la conversión de LTD₄ a LTE₄, los tejidos se incubaron con cisteína 6 mM (inhibidor de la aminopeptidasa) durante treinta minutos; a continuación se agregaron al baño de incubación 0.3, 1.0, 3.0 o 10 µg/mL de la fracción 6 o 20 µL de vehículo o 0.1 µg/mL de zafirlukast que se utilizó como control positivo de antagonista de LTD₄, éstos se incubaron durante 30 minutos más. Al final de la incubación, se realizaron curvas acumulativas a LTD₄ (1×10^{-11} a 1×10^{-8} M). La fracción 6 se seleccionó para esta evaluación porque previamente había mostrado actividad antiespasmódica y antialérgica.

3. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar de la media de 4 a 5 determinaciones. La respuesta inducida por KCl 60 mM se considera la respuesta máxima; las respuestas inducidas por carbacol, histamina y LTD₄ se expresan como porcentaje de la misma. La respuesta máxima (E_{max}) y el logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pD_2) se calcularon por regresión lineal en base a la curva concentración-respuesta mediante el programa Sigma Plot versión 7. Los resultados se analizaron por análisis de varianza de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Una $P < 0.05$ se consideró significativa (Tallarida et al., 1988).

VI. RESULTADOS

1. Efecto antiespasmódico

A. Extractos

Los extractos metanólicos de la flor (30 y 100 µg/mL) y la hoja (10, 30 y 100 µg/mL) desplazaron a la derecha la curva concentración-respuesta a carbacol, como lo demuestra la disminución (P indicada en la tabla) en los valores pD₂ (Tabla VI). En cambio, la respuesta máxima no fue alterada por ninguno de los extractos.

Por otra parte, el extracto de la flor (30 y 100 µg/mL) disminuyó significativamente la respuesta máxima a histamina, sin modificar los valores pD₂ (Tabla VI). El extracto de hoja no tuvo efecto sobre esta respuesta.

Tabla VI. Respuesta inducida por carbacol e histamina en la tráquea aislada de cobayo en presencia de los extractos metanólicos de las hojas y las flores de *Argemone platyceras*

Extracto		Carbacol		Histamina
(µg/mL)	pD ₂	E _{máx} (%)	pD ₂	E _{máx} (%)
Flores				
Control (n=4)	6.90 ± .06	208 ± 11	5.83 ± .23	105 ± 16
10 (n=4)	6.75 ± .06	101 ± 5	5.45 ± .02	65 ± 12
30 (n=4)	6.39 ± .01*	143 ± 11	5.08 ± .28	42 ± 8*
100 (n=4)	6.41 ± .13*	131 ± 9	4.61 ± .47	28 ± 8*
Hojas				
Control (n=5)	7.13 ± .06	150 ± 9	4.81 ± .43	112 ± 80
10 (n=4)	6.82 ± .02*	145 ± 6	5.10 ± .21	117 ± 10
30 (n=4)	6.53 ± .10**	141 ± 3	4.56 ± .28	100 ± 20
100 (n=4)	6.23 ± .03**	158 ± 7	4.72 ± .33	62 ± 50

Los datos representan el promedio ± E. E. (n=4-5)
*P<0.05, **P<0.001 en comparación con el control.

B. Fracciones primarias

Cuando se analizó el efecto de las fracciones de diclorometano, AcOEt y agua, observamos que solamente la fracción AcOEt (100 µg/mL) obtenida de ambos extractos produjo una disminución significativa ($P < 0.01$) en los valores pD_2 de la respuesta a carbacol y que no hubo efecto sobre la respuesta máxima (Tabla VII, Figura 6). No se muestran los datos de las fracciones de diclorometano y agua que fueron inactivas. Se descartaron las fracciones de diclorometano y agua y se seleccionó la fracción AcOEt para continuar el análisis .

Tabla VII. Efecto de la fracción de acetato de etilo de la flor y la hoja de *A. platyceras* sobre la respuesta inducida por carbacol en el músculo liso de la tráquea de cobayo

Tratamiento (µg/mL)	pD_2	E_{max} (%)
Fracción AcOEt de la flor		
Control	7.29 ± .08	110 ± 6
10	7.07 ± .02	100 ± 1
30	6.77 ± .09	105 ± 4
100	6.59 ± .06**	101 ± 1
Fracción AcOEt de la hoja		
Control	7.09 ± .09	115 ± 9
10	6.80 ± .15	120 ± 13
30	6.51 ± .09	109 ± 5
100	6.05 ± .08**	99 ± 10

Los datos son el promedio ± E. E. (n=4)

** $P < 0.01$ comparado con el control.

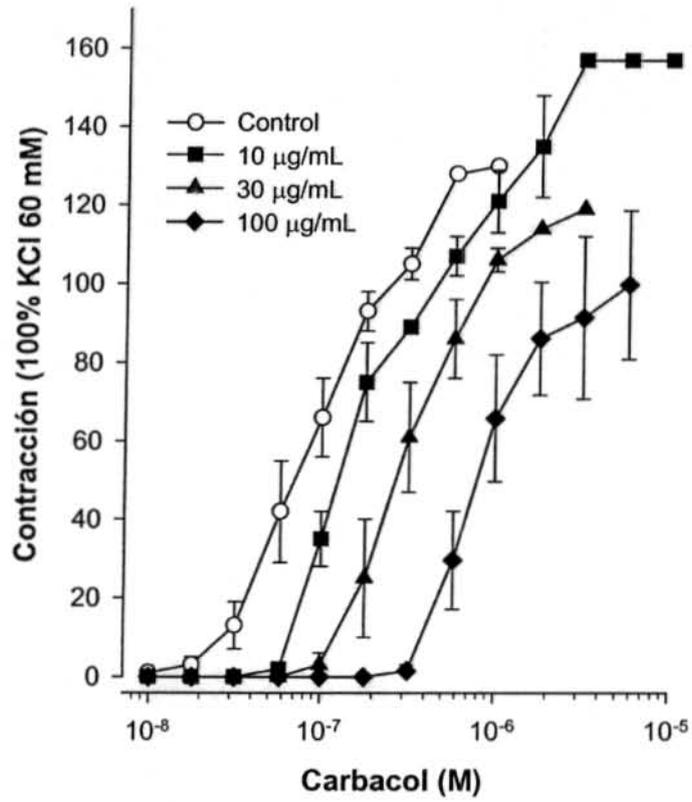


Figura 6. Efecto de la fracción de acetato de etilo de la **HOJA** de *Argemone platyceras* sobre la respuesta inducida por carbacol en tráquea de cobayo. Cada uno de los puntos representa el promedio + E.E. (n= 4).

C. Fracciones secundarias

Observamos que solamente las fracciones 6 y 7 disminuyeron los valores pD_2 de la respuesta a carbacol y que la fracción 6 tuvo mayor efecto que la fracción 7 ($P < 0.05$).

No hubo efecto sobre la respuesta máxima (Tabla VIII, Figura 7).

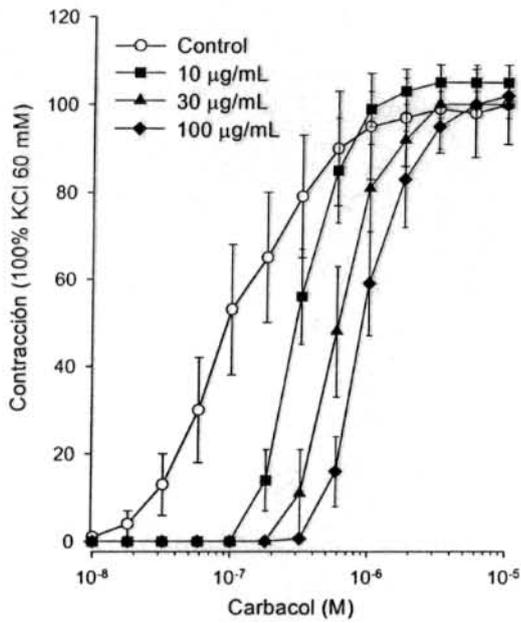
Tabla VIII. Efecto de las fracciones secundarias activas de *A. platyceras* sobre la respuesta contráctil inducida por carbacol en el músculo liso de tráquea de cobayo

Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	pD_2	E_{max} (%)
Fracción 6		
Control	$6.93 \pm .16$	100 ± 6
10	$6.47 \pm .07$	105 ± 4
30	$6.20 \pm .08$	100 ± 3
100	$6.00 \pm .07^{**}$	101 ± 3
Fracción 7		
Control	$7.35 \pm .05$	110 ± 4
10	$7.17 \pm .06$	105 ± 3
30	$7.05 \pm .04$	104 ± 3
100	$6.83 \pm .08^*$	108 ± 9

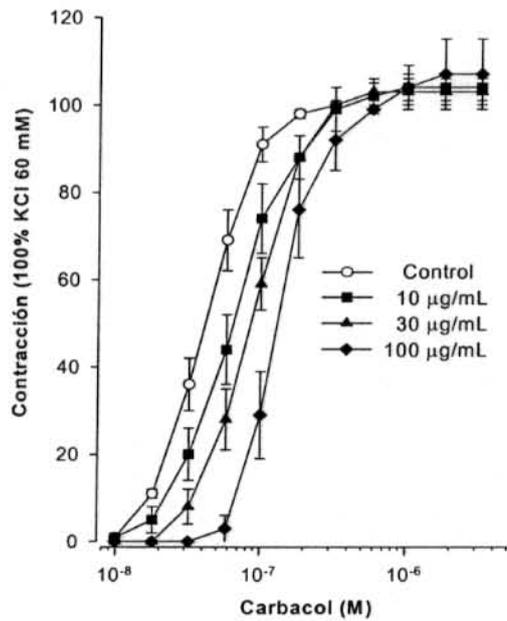
Los datos son el promedio \pm E. E. (n=4)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparado con el control.

* $P < 0.05$ comparado con la fracción 7 (100 $\mu\text{g/mL}$).



Fracción 6



Fracción 7

Figura 7. Efecto de las fracciones 6 y 7 aisladas de la fracción de acetato de etilo de las **HOJAS** de *Argemone platyceras* sobre las curvas concentración respuesta producidas por carbacol en tráquea de cobayo. Cada uno de los puntos representa el promedio \pm E.E. (n= 4).

2. Efecto antialérgico

A. Extractos

La respuesta al reto antigénico con ovoalbúmina en animales sensibilizados se caracteriza por tener dos fases, la inicial en que se presentan contracciones fásicas durante los primeros diez minutos y la tardía en que la contracción es sostenida. En los controles se observó este patrón de respuesta que disminuyó transcurrido el tiempo de registro. Así se verificó que los animales estaban sensibilizados.

En ausencia de indometacina el extracto metanólico de la flor de *A. platyceras* (3 y 10 $\mu\text{g/mL}$) inhibió la respuesta tardía al reto antigénico con ovoalbúmina en el músculo liso de tráquea aislada de cobayos sensibilizados, entre 10 y 40 min (Figura 8, panel superior). En presencia de indometacina el extracto de la flor (10 $\mu\text{g/mL}$) inhibió la respuesta temprana y tardía al reto antigénico con ovoalbúmina en el músculo liso de tráquea aislada de cobayos sensibilizados (Figura 8, panel inferior). El nivel de significancia se indica en la figura.

Por otra parte, el extracto metanólico de la hoja de *A. platyceras* (30 $\mu\text{g/mL}$), en ausencia de indometacina disminuyó las respuestas temprana y tardía a ovoalbúmina, en tráqueas aisladas de cobayos sensibilizados (Figura 9, panel superior). En presencia de indometacina el extracto de la hoja (30 $\mu\text{g/mL}$) disminuyó la respuesta tardía, a partir de los 40 min, al reto antigénico con ovoalbúmina en tráqueas aisladas de cobayos sensibilizados (Figura 9, panel inferior). La significancia estadística se indica en la figura.

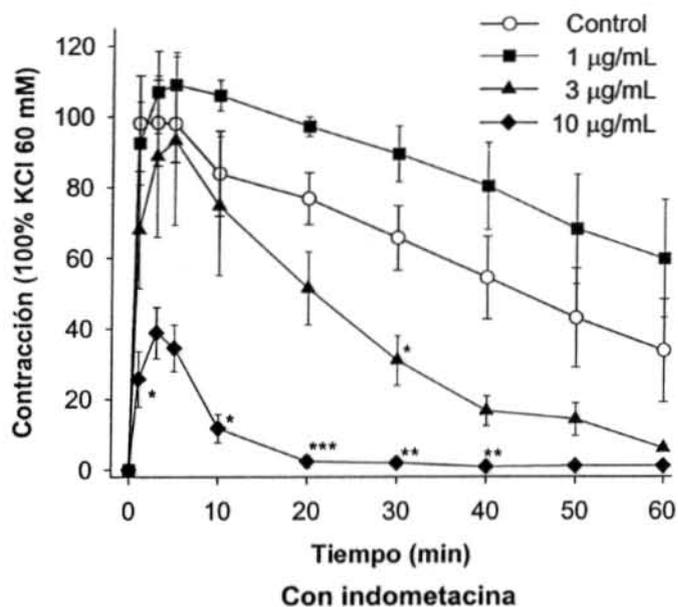
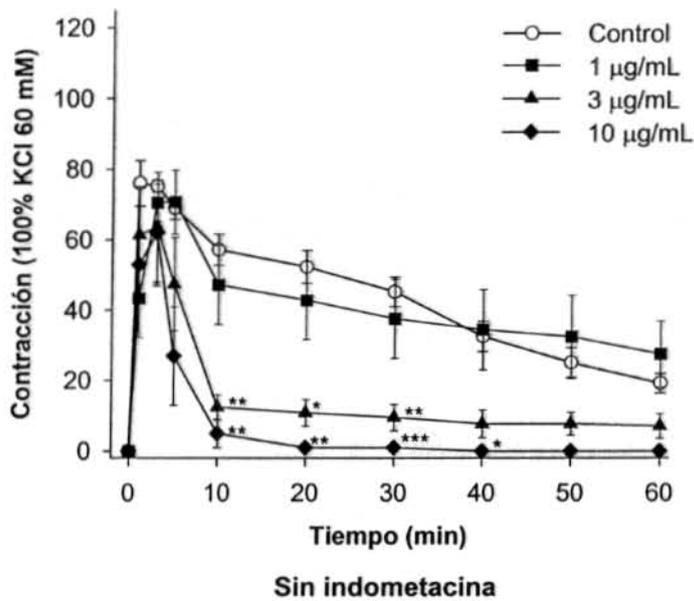


Figura 8. Curso temporal de la respuesta contráctil inducida por ovoalbúmina en el tejido traqueal de cobayo sensibilizado, e incubado en un medio sin y con indometacina durante 60 min con extracto metanólico de **FLOR** de *Argemone platyceras*. Cada uno de los puntos representa el promedio \pm E.E. (n= 4). *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 comparado con el control.

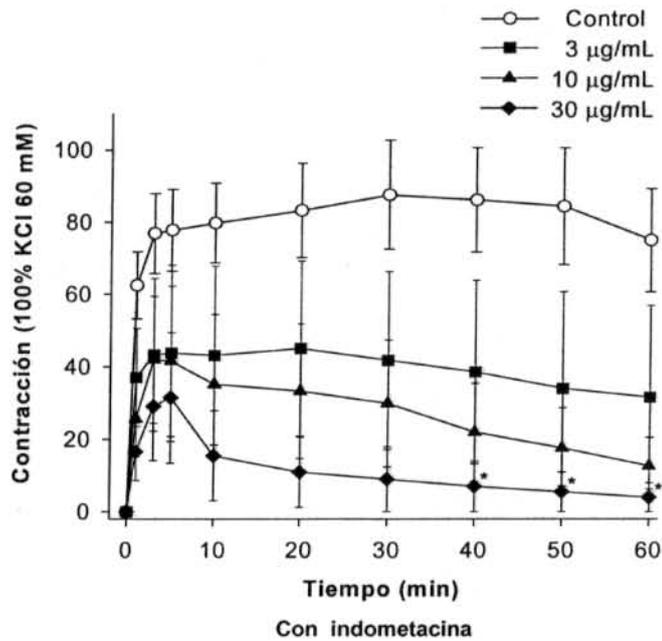
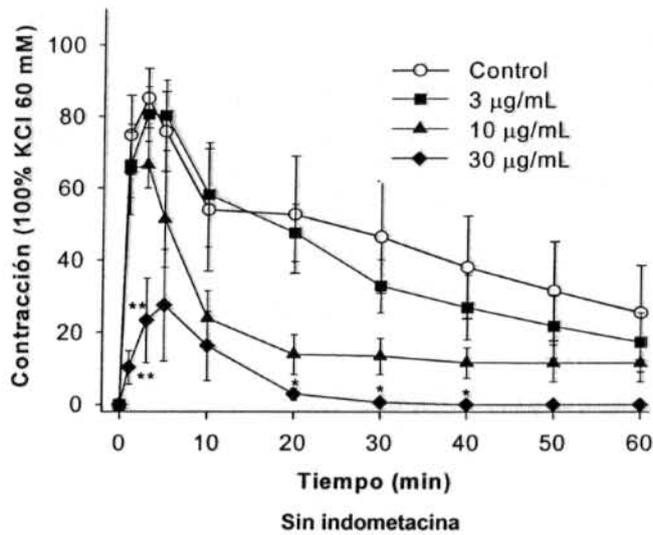


Figura 9. Curso temporal de la respuesta contráctil inducida por ovoalbúmina en el tejido traqueal de cobayo sensibilizado, e incubado en un medio sin y con indometacina durante 60 minutos con el extracto metanólico de **HOJA** de *Argemone platyceras*. (n=4). Cada uno de los puntos representa el promedio \pm E.E. (n= 4). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparado con el control.

B. Fracciones secundarias

Se analizó el posible efecto antialérgico de la fracción 6 que fue la que presentó el mayor efecto antiespasmódico sobre la respuesta inducida por carbacol en músculo liso de tráquea de cobayo no sensibilizado.

La fracción 6 obtenida de la fracción de AcOEt del extracto de hoja de *A. platyceras* (10 y 30 $\mu\text{g/mL}$), en ausencia de indometacina inhibió la respuesta temprana y la respuesta tardía (10 a 40 min) al reto antigénico con ovoalbúmina en tráqueas aisladas de cobayos sensibilizados (Figura 10, panel superior). La inhibición inducida por la menor concentración del extracto (3 $\mu\text{g/mL}$) sólo fue significativa a los 20 min. La significancia estadística se señala en la figura.

En presencia de indometacina, todas las concentraciones ensayadas de la fracción 6 de hoja de AcOEt (3, 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$) inhibieron la respuesta al reto antigénico con ovoalbúmina en tráqueas aisladas de cobayos sensibilizados. La inhibición de la fase temprana no alcanzó significancia estadística, en contraste, la inhibición de la respuesta tardía fue muy significativa ($P < 0.001$) (Figura 10, panel inferior)

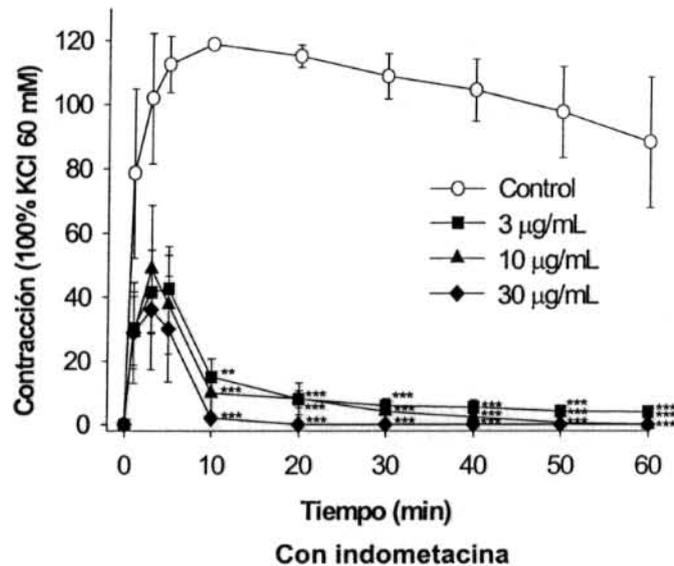
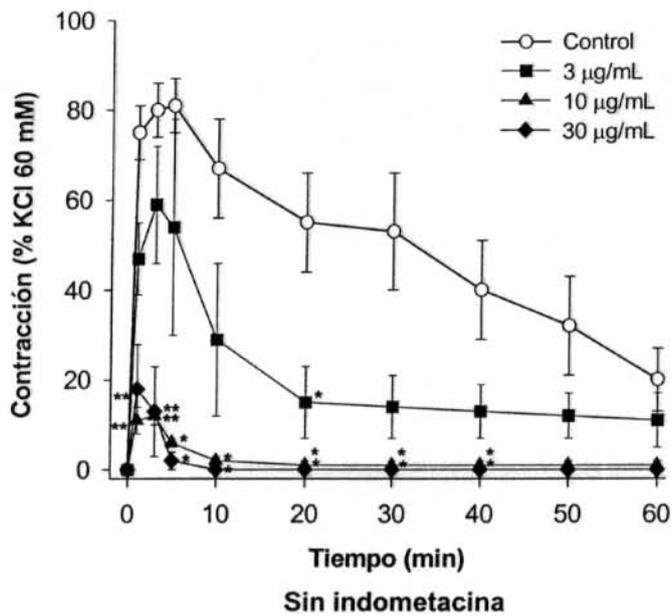


Figura 10. Curso temporal de la respuesta contráctil inducida por ovoalbúmina en el tejido traqueal de cobayo sensibilizado e incubado, en un medio sin y con indometacina durante 60 minutos con la **fracción 6** de *Argemone platyceras*. Cada uno de los puntos representa el promedio \pm E.E. (n= 4)..

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control.

3. Efecto antiinflamatorio

La fracción 6 obtenida de la fracción de AcOEt de hoja de *A. platyceras* fue seleccionada para analizar el efecto antiinflamatorio por su capacidad de inhibir la contracción inducida por LTD₄ en músculo liso de tráquea de cobayos no sensibilizados.

La fracción 6 (1, 3 y 10 µg/mL) produjo un desplazamiento de la curva hacia la derecha respecto del control y una disminución de la E_{máx} similar a la inducida por zafirlukast (0.1 µg/mL), que fue el control positivo. La mayor concentración de la fracción 6 (10 µg/mL) inhibió totalmente la respuesta contráctil (Tabla IX, Figura 11).

Tabla IX. Efecto de la fracción 6 sobre la respuesta contráctil del músculo liso de la tráquea de cobayo inducida por LTD₄

Tratamiento (µg/mL)	pD ₂	E _{max} (%)
Control	8.70 ± .05	93 ± 8
Fracción 6		
0.3	8.86 ± .04	68 ± 9
1	7.20 ± .50*	50 ± 6
3	7.01 ± .25**	33 ± 13*
10	0***	0***
Zafirlukast		
0.1	6.52 ± .29***	16 ± 5*

Los datos representan el promedio ± E. E. (n=4-5)

*P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 vs. el control.

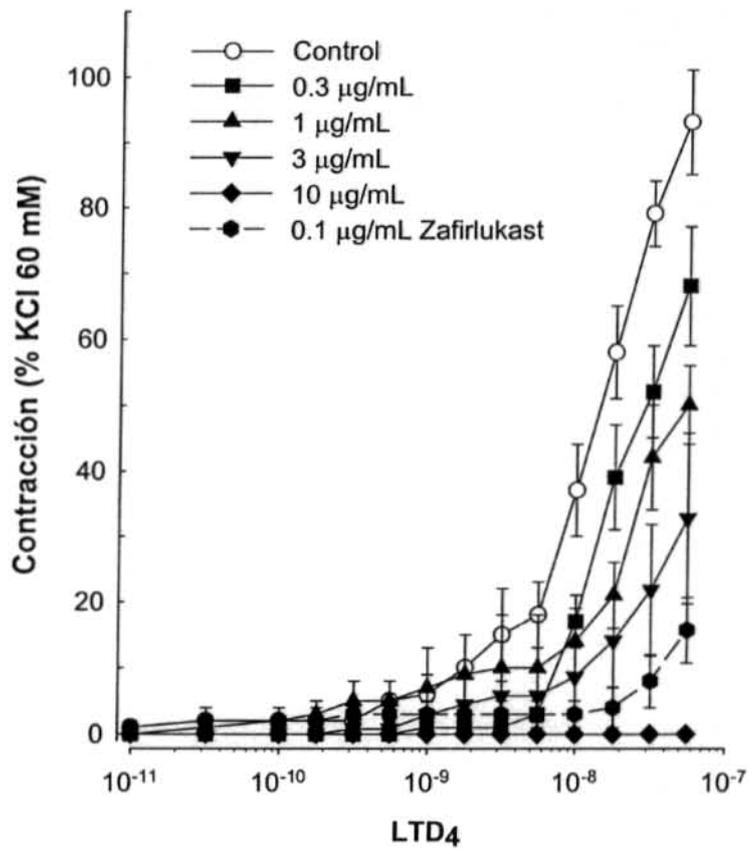


Figura 11. Efecto de la **fracción 6** de *A. platyceras* sobre la respuesta inducida por LTD₄ en tráquea de cobayo. Cada uno de los puntos representa el promedio ± E.E. (n =4-5).

4. Fraccionamiento químico

Se obtuvieron 131.51 g de extracto metanólico de las flores de *A. platyceras*, lo cual representa un rendimiento del 18.7%. Del extracto metanólico íntegro se tomaron 6.41 g y se disolvieron en 30 mL de MeOH; se procedió a fraccionarlo mediante una extracción por partición, utilizando disolventes con diferente polaridad: CH₂Cl₂, AcOEt y agua, en diferentes proporciones.

El rendimiento de las fracciones primarias obtenidas por partición fue el siguiente: 1.60 g (24.9%) de CH₂Cl₂, de 0.17 g (2.6%) de AcOEt, y 0.60 (9.3%) de la fracción acuosa.

Del extracto metanólico de las hojas se obtuvieron 88.4 g, equivalentes a un rendimiento de 14.7 %. El rendimiento de las fracciones primarias obtenidas por partición del extracto metanólico de las hojas, fue el siguiente: 1.12 g (20.0%) para CH₂Cl₂, 0.13 g (2.3%) para AcOEt y 1.55 g (27.6%) para la fracción acuosa.

Para aislar los compuestos de la fracción activa de AcOEt de hoja de *A. platyceras*, se aplicaron diferentes pruebas químicas de coloración que permitieron detectar la presencia de flavonoides y alcaloides. Posteriormente se realizó una cromatografía en placa preparativa, de donde se obtuvieron 7 fracciones secundarias, que se designaron con números consecutivos del 1 al 7.

A. Purificación e identificación de los compuestos aislados

De la fracción 6, que mostró efecto antiespasmódico, antialérgico y antiinflamatorio se obtuvo la isoquercitrina ($C_{21}H_{20}O_{12}$) (Figura 12) en forma de un polvo café con un punto de fusión 224° - $227^{\circ}C$, su peso molecular en el espectro de masas fue de 464; los datos obtenidos del espectro de RMN^1H (Tabla X), $RMN^{13}C$ y correlación heteronuclear de enlace múltiple HMBC (Tabla XI) coincidieron con los descritos en la literatura (Markham et al., 1978; Price y Rhodes , 1997; Lin et al., 1999).

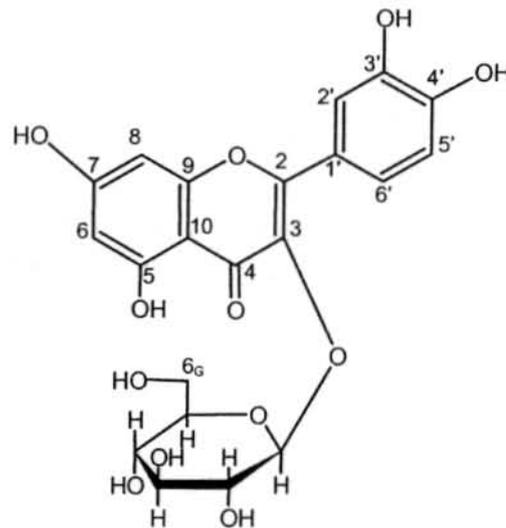


Figura 12. Estructura de la isoquercitrina

Por otra parte, de la fracción 7 se aisló la rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) (Figura 13) en forma de un polvo amarillo con un punto de fusión 184° - $188^{\circ}C$, su peso molecular en el espectro de masas fue de 610; los datos del espectro de RMN^1H (Tabla X, Espectro 1), $RMN^{13}C$ (Espectro 2), HMBC (Tabla XI), DEPT (Espectro 3), Cosy (Espectro 4) y Hetcor (Espectro 5) confirmaron esta estructura, y coinciden con lo reportado previamente (Batterham y Hight, 1964 y Lin et al., 2000).

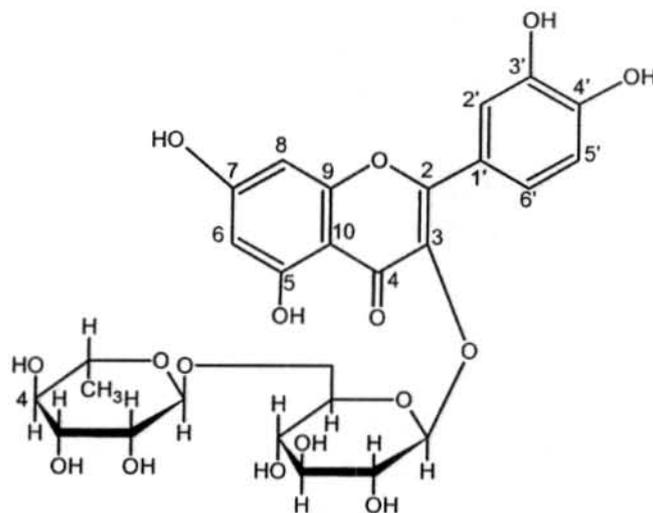


Figura 13. Estructura de la rutina

Tabla X. Datos de RMN ¹H de Isoquercitrina y rutina

¹ H	ISOQUERCITRINA (F6)	RUTINA (F7)
	ppm	ppm
	6.20 d(J= 1.4)	6.40 d(J= 2.0)
6	6.39 d(J= 1.4)	6.21 d(J= 2.0)
8	7.71 d(J= 2.1)	7.67 d(J= 2.1)
2'	6.87 d(J= 8.5)	6.87 d(J= 8.5)
5'	7.58 dd(J= 8.5, 2.1)	7.63 dd(J= 8.5, 2.1)
6'	5.23 d(J= 2.3)	5.10 d(J= 8.1)
G ₁	3.48 t(J= 9.5, 8.2)	3.48 dd(J= 9.0, 8.1)
G ₂	3.43 t(J= 9.5, 8.5)	3.42 d(J= 4.2)
G ₃	3.35 t(J= 9.8, 8.5)	3.27 s
G ₄	3.22 ddd(J= 9.8, 5.4, 2.3)	3.33 s
G ₅	3.71 d(J= 11.9, 2.3)	3.80 d(J= 10.6)
Ga ₆	3.57 d(J= 11.9, 5.4)	3.39 d(J= 4.2)
Gb ₆		4.52 d(J= 1.5)
R ₁		3.63 dd(J= 3.4, 1.5)
R ₂		3.53 dd(J= 9.6, 3.4)
R ₃		3.28 s
R ₄		3.45 d(J= 3.4)
R ₅		1.12 d(J= 6.2)
CH ₃		

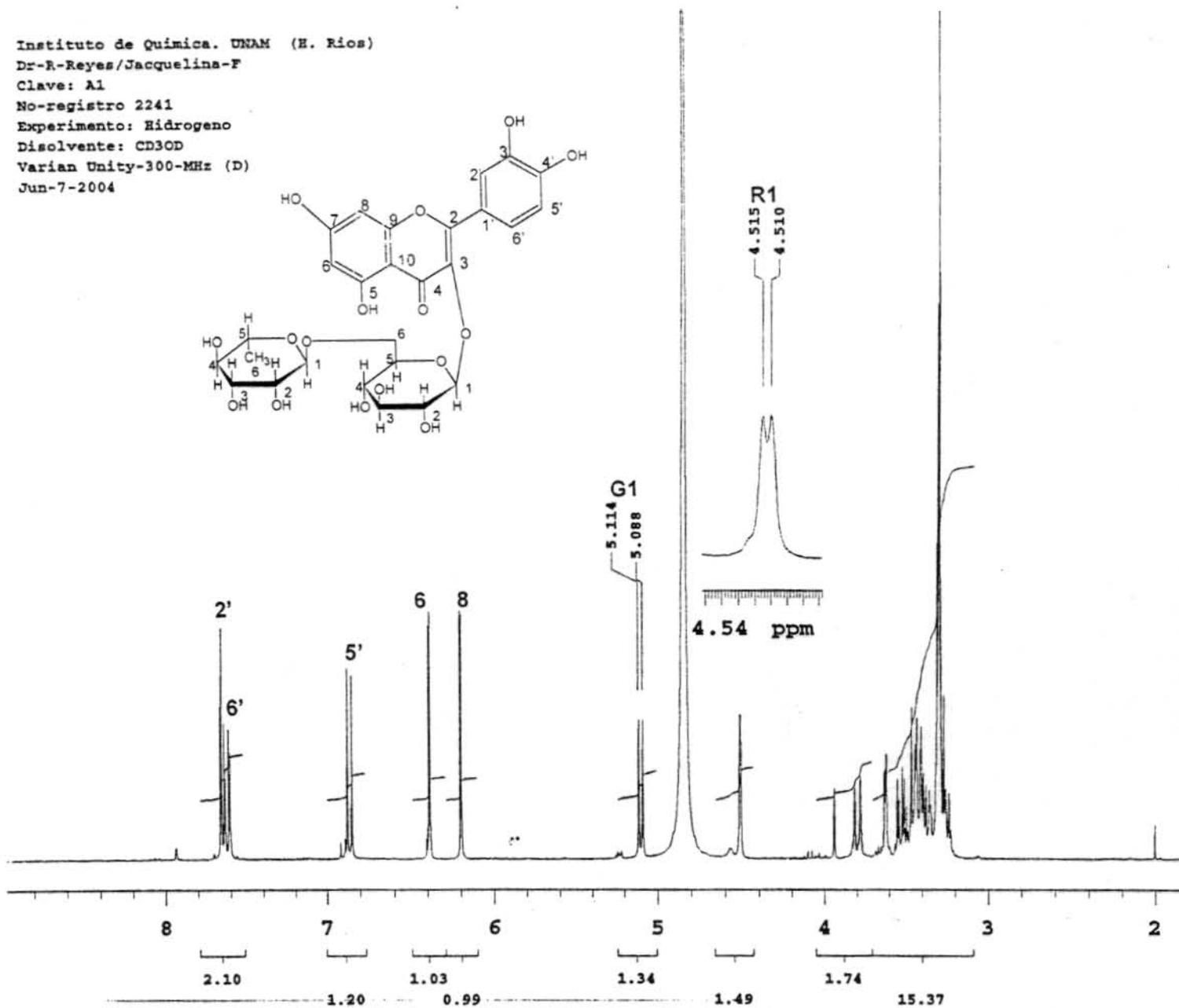
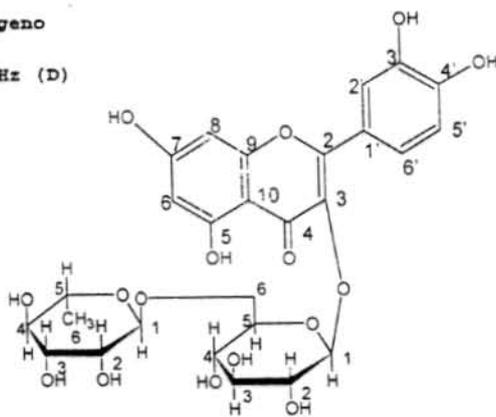
G= glucosa, R= ramnosa. La señal química en referencia a TMS.

Tabla XI. Datos de RMN ¹³C de Isoquercitrina y rutina

	ISOQUECITRINA (F6)		RUTINA (F7)	
	pm	HBMC	pm	HBMC
2	159.1	2'(³ J), 6'(³ J)	166.1	2'(³ J), 6'(³ J)
3	135.7	G ₁ (³ J)	104.8	G ₁ (³ J)
4	179.6		179.5	
5	163.2	6(² J)	163.1	6(² J)
6	100.0	8(³ J)	130.5	
7	166.1	8(² J), 6(² J)	159.5	8(² J), 6(² J)
8	94.8	6(³ J)	95.0	6(³ J)
9	158.6	8(² J)	158.6	8(² J)
10	105.8	8(³ J), 6(³ J)	105.7	8(³ J), 6(³ J)
1'	123.2	2'(² J), 5'(³ J)	123.2	2'(² J), 5'(³ J)
2'	117.1	6'(³ J)	117.8	6'(³ J)
3'	146.0	2'(² J), 5'(³ J)	145.9	2'(² J), 5'(³ J)
4'	150.0	2'(³ J), 6'(³ J), 5'(² J)	149.9	2'(³ J), 6'(³ J), 5'(² J)
5'	116.1		116.2	
6'	123.3	2'(³ J)	123.7	2'(³ J)
G ₁	104.4	G ₂ (² J)	100.1	8(³ J)
G ₂	75.8	G ₃ (² J)	78.3	G ₂ (² J), G ₄ (² J)
G ₃	78.2	G ₂ (² J), G ₄ (² J)	77.3	Gb ₆ (² J), G ₄ (² J)
G ₄	71.3	G ₃ (² J)	72.3	R ₁ (³ J), R ₂ (² J)
G ₅	78.5	G ₄ (² J)	75.8	G ₃ (² J)
G ₆	62.7		68.7	R ₁ (³ J)
R ₁			102.5	Ga ₆ (³ J)
R ₂			72.25	R ₁ (² J)
R ₃			71.5	G ₃ (² J)
R ₄			74.0	R ₂ (³ J), R ₃ (² J), R ₆ (³ J)
R ₅			69.8	R ₁ (³ J), R ₄ (² J), R ₆ (² J)
CH ₃			18.0	

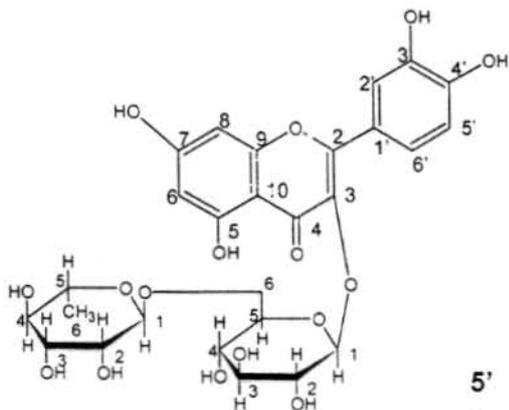
G= glucosa, R= ramnosa. Señal química con referencia a TMS.
³J, y ²J indican acoplamiento ¹³C-¹H a 2 y 3 enlaces respectivamente.

Instituto de Química. UNAM (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes/Jacqueline-F
 Clave: A1
 No-registro 2241
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CD3OD
 Varian Unity-300-MHz (D)
 Jun-7-2004



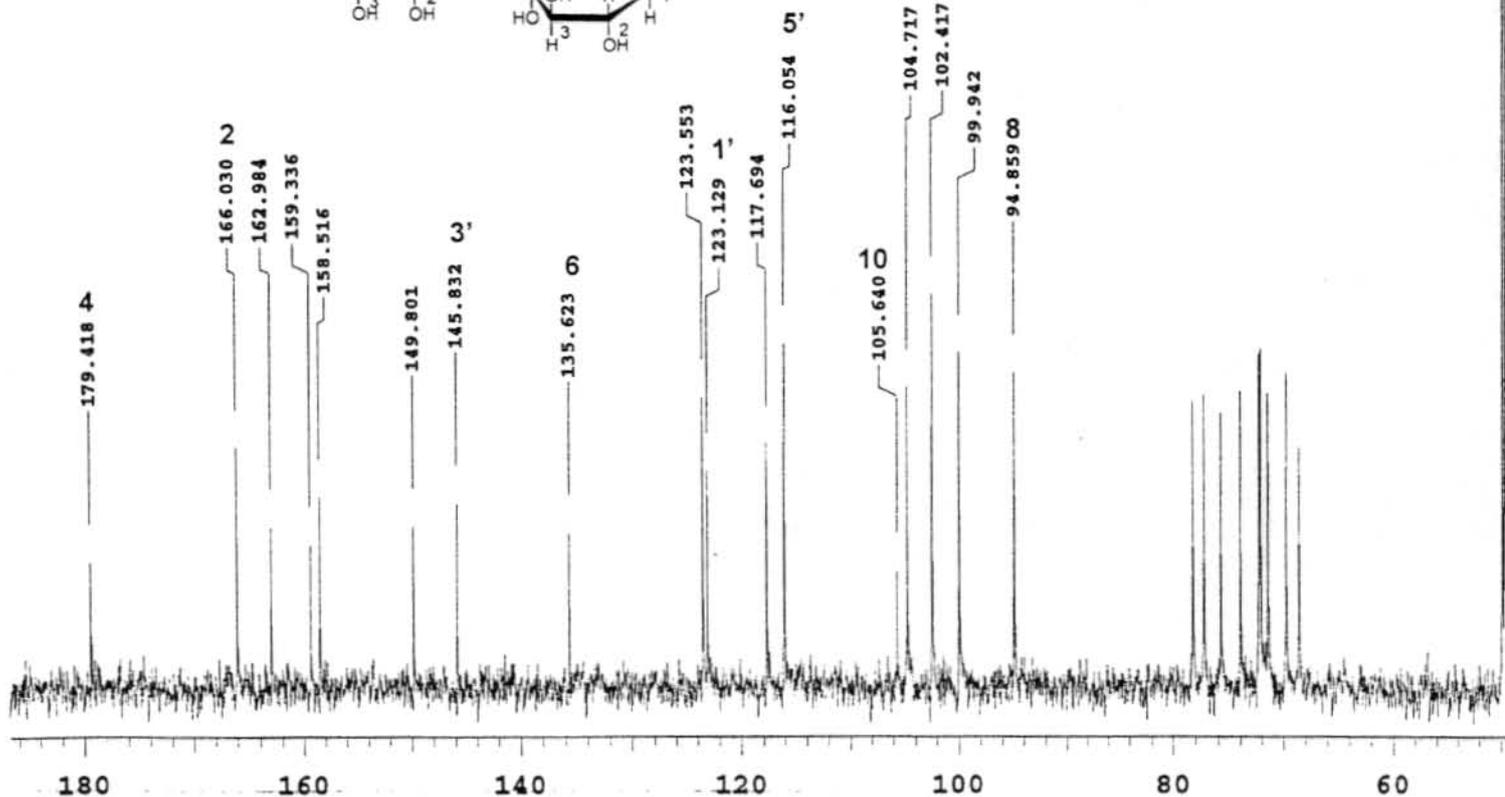
Espectro 1. RMN-¹H de la rutina

Instituto de Quimica. UNAM (H. Rios)
 Dr-R-Reyes/Jacqueline-F
 Clave: A1
 No-Registro 2241
 Experimento: C13
 Solvent: CD3OD
 VARIAN-UNITY 75 MHz
 Jun-7-2004



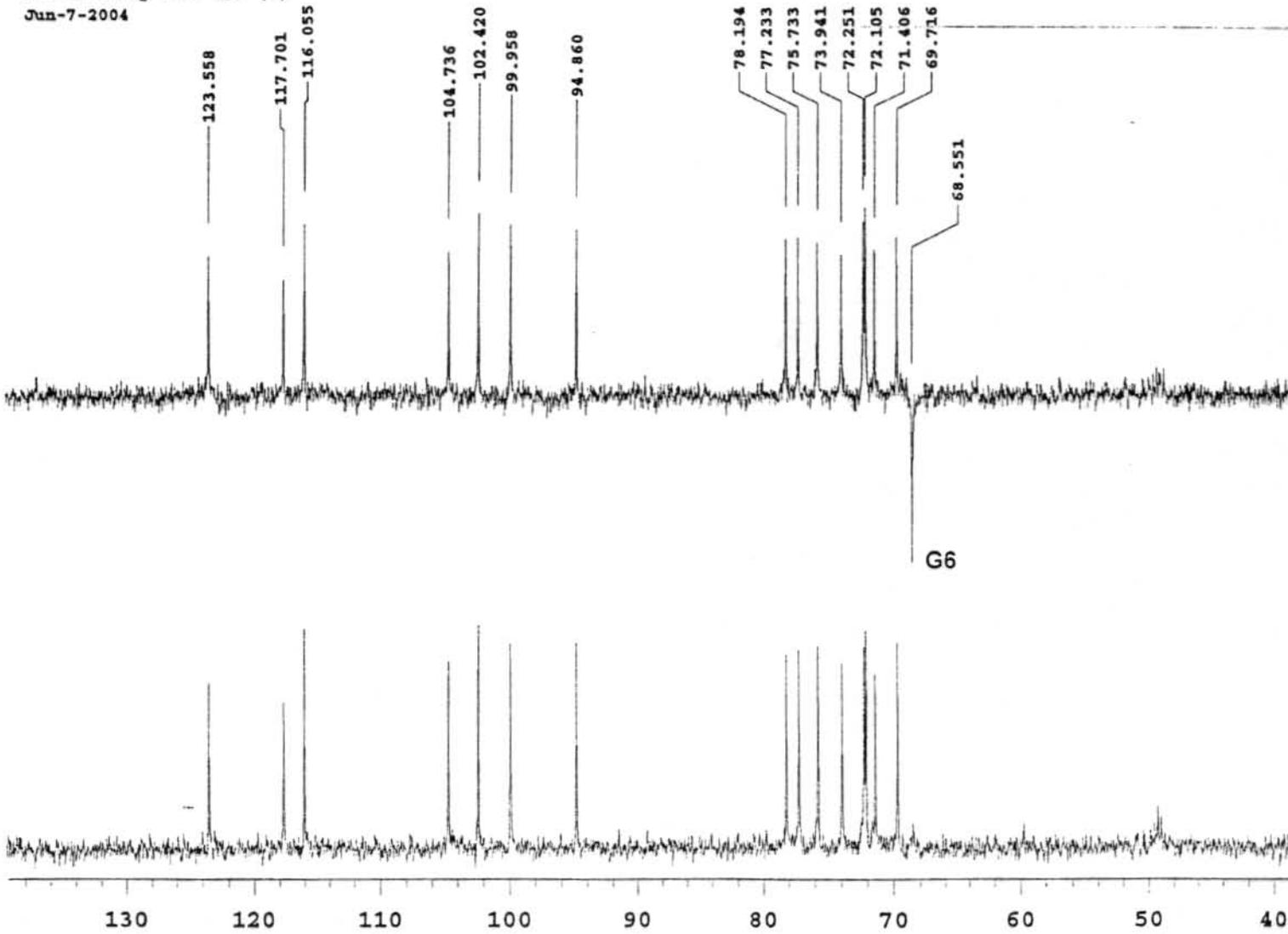
78.191
 77.224
 75.730
 73.943
 72.244
 72.098
 71.394
 69.710
 68.553

G2
 G5
 G4
 R5
 G6



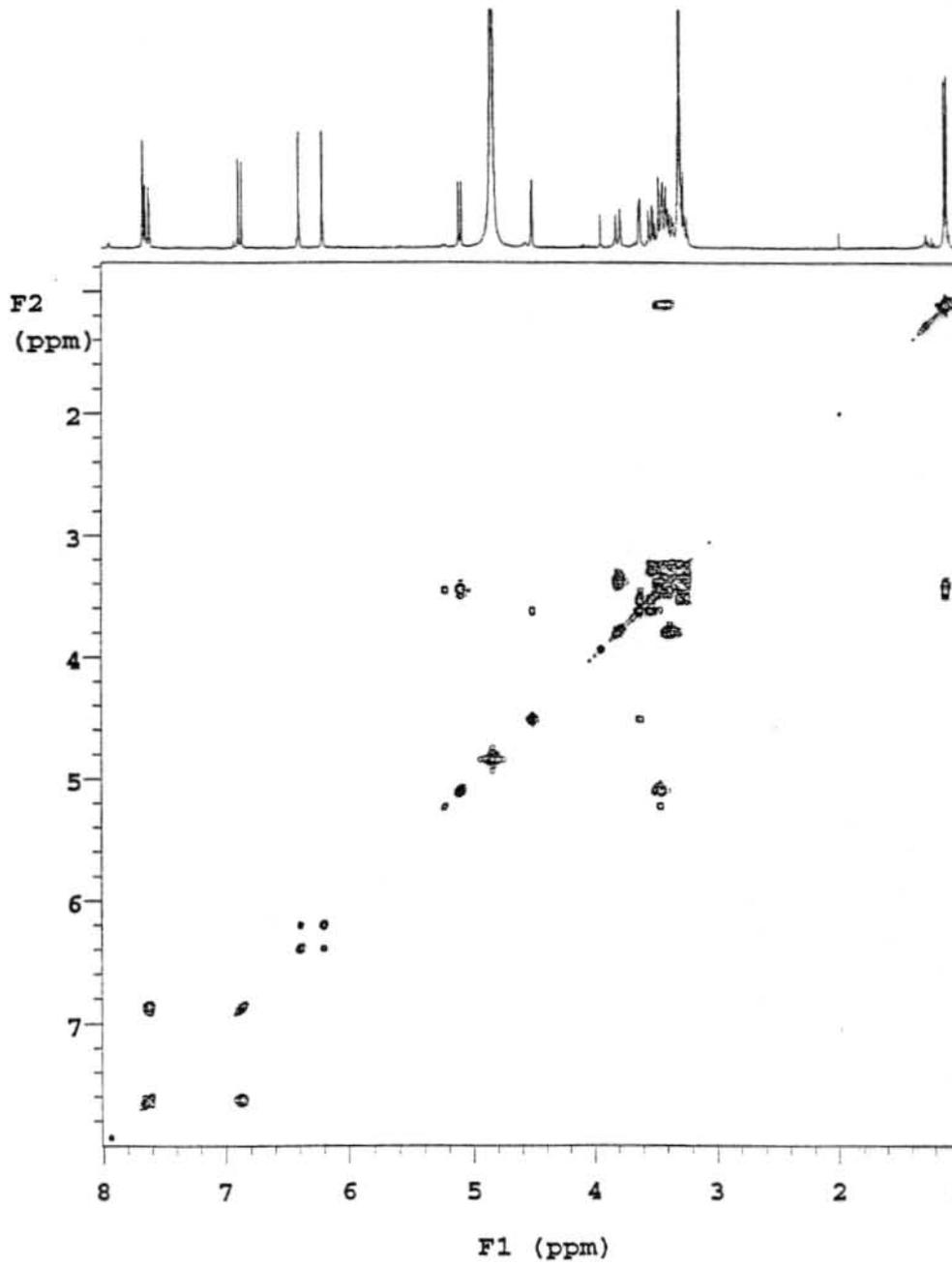
Espectro 2. RMN-¹³C de la rutina

Instituto de Quimica. UNAM (H. Rios)
Dr-R-Reyes/Jacqueline-F
Clave: A1
No-Orden 2241
experimento: DEPT
Varian Unity 75.4 MHz (D)
Jun-7-2004



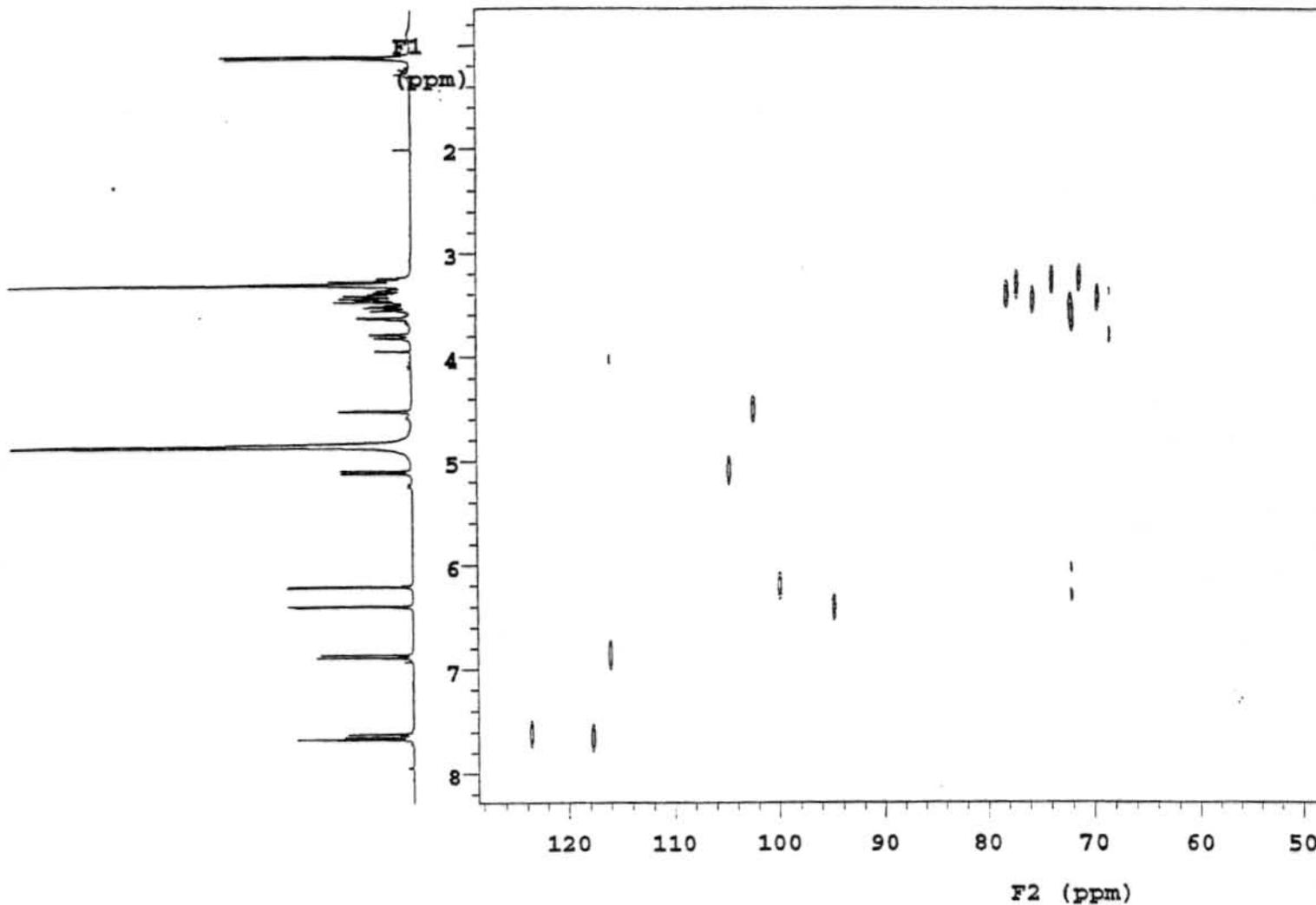
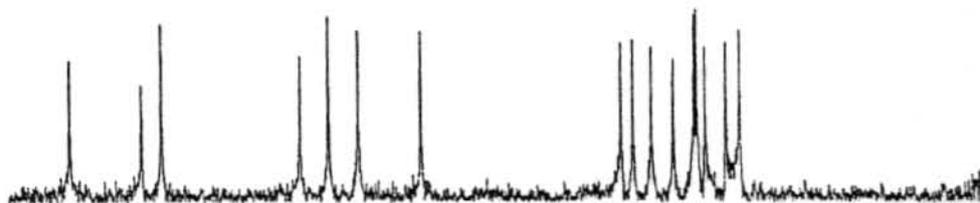
Espectro 3. DEPT de la rutina

Instituto de Quimica. UNAM (H. Rios)
Dr-R-Reyes/Jacqueline-F
Clave: A1
No-registro 2241
Experimento: Cosy
Disolvente: CD3OD
Varian Unity-300-MHz (D)
Jun-7-2004



Espectro 4. Cosy de la rutina

Instituto de Quimica. UNAM (E. Rios)
Dr-R-Reyes/Jacqueline-F
Clave: A1
No-Registro 2241
Experimento: Hetcor
Solvent: CD3OD
VARIAN-UNITY 75 MHz
Jun-7-2004



Espectro 5. Hetcor de la rutina

VII. DISCUSIÓN

El músculo liso de las vías aéreas tiene propiedades y funciones que lo involucran en la patogénesis del asma. Experimenta cambios en sus propiedades contráctiles en respuesta a mediadores tales como histamina, cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), PGD₂ y PAF, los cuales contribuyen a la inflamación, hiperreactividad, obstrucción y consecuentemente a la remodelación de las vías aéreas.

Los extractos metanólicos de las hojas y flores de *A. platyceras* produjeron una inhibición de la respuesta contráctil inducida por carbacol y por un reto antigénico con ovoalbúmina en la tráquea de cobayo. Al realizar el fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas se obtuvieron las fracciones 6 y 7 que contenían los flavonoides: isoquercitrina y rutina, respectivamente.

Este tipo de compuestos ha sido detectados en otras especies, como *Humulus lupulus* (Bhandari, 1964), *Psidium guajava* (Lozoya et al., 1994), *Conyza filaginoides* (Mata et al., 1997), *Theobroma cacao* (Sánchez -Rabaneda et al., 2003) e *Hypericum perforatum* (Zou et al., 2004), pero no se habían reportado en *A. platyceras*.

Las diferentes concentraciones del extracto metanólico de las hojas, la fracción de AcOEt (Figura 6) y sus fracciones 6 y 7 (Figura 7) inhibieron la respuesta contráctil inducida por carbacol, efecto que se hizo evidente por un desplazamiento paralelo hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta de las diferentes concentraciones del extracto respecto al control. Este tipo de desplazamiento concuerda con el de un antagonista competitivo (Tallarida et al., 1988), y sugiere un efecto anticolinérgico, y una posible interacción de la fracción 6 (isoquercitrina) con

los receptores de tipo muscarínico M_3 presentes en el músculo liso de la tráquea de cobayo. Las investigaciones más recientes indican que la acetilcolina puede modular la contracción, proliferación y expresión de proteínas contráctiles del músculo liso de las vías aéreas; induciendo la remodelación de las mismas; de ahí que se afirme que los anticolinérgicos pueden inhibir el progreso de estos procesos (Gosens, 2004).

Se ha observado que la isoquercitrina y la rutina, compuestos presentes en las fracciones 6 y 7 respectivamente, inhiben la respuesta contráctil inducida por carbacol en el íleon de rata y de cobayo (Mata et al, 1997; Lozoya et al., 1994). Otros estudios han reportado actividad relajante en el músculo liso de aorta torácica de rata (Ajay et al., 2003), y actividad antiinflamatoria en diferentes modelos experimentales (Calixto et al., 2003; Morikawa et al., 2003).

En el presente estudio se seleccionó la fracción 6 para evaluar el efecto antialérgico sobre el reto antigénico con ovoalbúmina en animales previamente sensibilizados y el efecto antiinflamatorio sobre la contracción inducida por LTD_4 pues fue la fracción que presentó mayor efecto antiespasmódico sobre la contracción inducida por carbacol en el músculo liso de tráquea de cobayo (Tabla VIII).

Al evaluar el efecto antialérgico de la fracción 6 sobre el reto antigénico con ovoalbúmina (modelo experimental de asma) se encontró que, en presencia de indometacina, inhibe de manera significativa la respuesta tónica o tardía. Se sabe que en este tipo de análisis, la respuesta contráctil del músculo liso de la tráquea de cobayo es mediada principalmente por los productos de la lipooxigenasa, esencialmente los leucotrienos (Addy y Burka 1988, 1990). Así, los inhibidores de la



5-lipooxigenasa y los antagonistas de los receptores de los leucotrienos inhiben la fase tardía o tónica (Yamada et al, 1992). Estos datos sugieren que la fracción 6 puede ejercer su efecto inhibitorio por esta vía y por eso decidimos evaluar su actividad sobre la contracción inducida por LTD₄ en el músculo liso de tráquea de cobayo y compararla con el efecto del antagonista zafirlukast. La respuesta contráctil de la fracción 6 (3 µg/mL) fue similar a la del zafirlukast (0.1 µg/mL), pero a la concentración de 10 µg/mL, la respuesta contráctil de la fracción 6 inhibió totalmente la respuesta a LTD₄. Este resultado sugiere que la Isoquercitrina que es el compuesto presente en mayor proporción (95%) en la fracción 6 puede actuar como un antagonista del receptor de LTD₄ del músculo liso de las vías aéreas.

La descripción de los mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria en el asma ha llevado a la identificación de nuevos blancos para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el asma. Este es el caso de los leucotrienos, que en la actualidad se han identificado como potentes agentes broncoconstrictores que participan en el aumento de la hiperreactividad bronquial y en la remodelación de las vías aéreas asociadas al asma.

Un estudio reciente en un modelo murino de asma mostró que los antagonistas del receptor de leucotrienos pueden inhibir la remodelación, la movilización y desgranulación de eosinófilos, la liberación de citocinas, la hiperplasia y el aumento en la secreción de glándulas mucosas, la hiperplasia de las células del músculo liso, el depósito de colágeno y la fibrosis pulmonar (Holgate et al., 2003).

Los flavonoides son compuestos a los que se les han atribuido diversas acciones y que tienen características de agentes antioxidantes (Calixto et al., 2003). La isoquercitrina de la fracción 6 puede actuar como antiinflamatorio, a través de la inhibición del efecto de los leucotrienos, y modificar la progresión de la enfermedad.

El hecho de que la fracción 6 modifique la respuesta contráctil inducida tanto por carbacol como por LTD₄ sugiere una interacción con los receptores de tipo muscarínico M₃ y con los receptores CysLT de los leucotrienos. Esto es relevante ya que una misma molécula puede controlar el asma actuando simultáneamente en dos niveles, lo que se traduce en que su actividad sea antiinflamatoria y broncodilatadora.

Actualmente el tratamiento del asma tiene un enfoque dual que busca administrar al paciente diferentes combinaciones de medicamentos que controlen la inflamación y el broncoespasmo. Para esto los médicos indican generalmente combinaciones de glucocorticoides y agonistas β -adrenérgicos, antagonistas de leucotrienos y antihistamínicos; o glucocorticoides y antagonistas de leucotrienos (Currie et al., 2005). Así, compuestos con propiedades anticolinérgicas y antiinflamatorias, como es el caso de la isoquercitrina, pueden ser de gran utilidad para el manejo adecuado de los síntomas del asma ya que pueden inhibir el proceso de remodelación de las vías aéreas.

Nuestros datos, finalmente, presentan la primera evidencia farmacológica de la acción de compuestos aislados de *A. platyceras* en un modelo experimental de asma. Esperamos que estos hallazgos promuevan futuras investigaciones de fuentes naturales mexicanas para la búsqueda de nuevos fármacos antiasmáticos.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los extractos metanólicos de las flores y hojas de *Argemone platyceras* tuvieron actividad antiespasmódica observada por su efecto anticolinérgico.
2. Los extractos metanólicos de las flores y hojas de *Argemone platyceras* mostraron actividad antialérgica observada por su efecto inhibidor de la respuesta al reto antigénico con ovoalbúmina en el músculo de la tráquea de cobayo.
3. El fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de las hojas de *Argemone platyceras* condujo al aislamiento y caracterización de dos compuestos: isoquercitrina y rutina.
4. La isoquercitrina mostró su efecto antiespasmódico, antialérgico y antiinflamatorio al inhibir la respuesta del músculo liso de tráquea de cobayo a carbacol, al reto antigénico con ovoalbúmina y a LTD₄, respectivamente.
5. Este trabajo demuestra que *Argemone platyceras* contiene fracciones y compuestos con actividad anticolinérgica y antileucotrieno D₄.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Addy M. E., Burka J. F. 1988. Effect of *Desmodium adscendens* fractions on antigen- and arachidonic acid-induced contractions of guinea pig airways. *Can J Physiol Pharmacol*; 66:820-825.
2. Addy M. E., Burka J.F. 1990. Effect of *Desmodium adscendens* fractions 3 on contractions of respiratory smooth muscle. *J Ethnopharmacol*; 29:325-335.
3. Addy M. E. 1992. Some secondary plant metabolites in *Desmodium adscendens* and their effects on arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 47:85-91.
4. Aguilar A., Argueta V. A., Cano L. 1994. Instituto Nacional Indigenista. Flora Medicinal Indígena de México. Vol. II, 1ª. ed. Instituto Nacional Indigenista (INI), México.
5. Ajay M., Gilani A.U., Mustafa M.R., 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*; 74: 603-612.
6. Argueta, V. A., Cano L., Gallardo V M. C., Jiménez A. R., Ballesteros M. M., Torres M. G., González H. A., Rodarte M. E. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Ed. Instituto Nacional Indigenista (INI), México.
7. Atta-ur-Rahman. 1994. Handbook of Natural Products Data. Isoquinoline Alkaloids (vol 3), ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
8. Barnes^a P. J. 2004. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc*; 1:345-351.
9. Barnes^b P. J. 2004. The size of the problem of managing asthma. *Respir Med*; 98 Suppl B: S4-8.
10. Batterham T. J., Hight R. J. 1964. Nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids. *Aus J Chem*; 17: 428-439.
11. Bhandari P. R. 1964. Identification of flavonoids in hops (*Humulus lupulus* Linne) by thin-layer chromatography. *J Chromatogr*, 16, 130-135.
12. Boushey H. A. 2003. New and exploratory therapies for asthma. *Chest*; 123:439S-445S.
13. Calixto J. B., Otuki M. F., Santos A.R. 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. *Planta Med*; 69, 973-983.
14. Ceballos M. Z., Peralta B. M., Sandoval J. L., Contla J. H. 2004. Costo directo de la atención por crisis aguda de asma en el servicio de urgencia pediátrica. *Rev Alerg Mex*; 51,134-148.
15. Currie G.P., Lee D.K., Wilson A. M. 2005. Effects of dual therapy with corticosteroids plus long acting β_2 -agonists in asthma. *Respiratory Medicine. Eur J Pharmacol*; Article in press
16. Choo M. K., Park E. Y., Han M. J., Kim D. H. 2003. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides. *Planta Med*; 69, 518-522.

17. Davies H., Olson L., Gibson P. 2000. Methotrexate as a steroid sparing agent for asthma in adults. *Cochrane Database Syst Rev*;CD000391.
18. Dorsch W., Wagner H. 1991. New antiasthmatic drugs from traditional medicine? *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 94, 262-265.
19. Emam A.M., Moussa A. M., Faure R., Elias R, Balansard G. 1997. Isolation of mimengoside B, a triterpenoid saponin from *Buddleja madagascariensis*. *J Ethnopharmacol*; 58, 215-217.
20. Fabricant D. S., Farnsworth N. R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drugs discovery. *Environ Health Perspect*; 109, 69-75.
21. Fang Y., Li Z., Watanabe Y. 2003. Pharmacokinetics of a novel anti-asthmatic, scoparone, in the rabbit serum assessed by a simple HPLC method. *J Ethnopharmacol*; 86, 127-130.
22. Gosens R., Zaagsma J., Bromharr M. G. Nelemans A., Meurs H. 2004. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling?. *Eur J Pharmacol*; 500, 193-201.
23. Hazekamp A., Verpoorte R., Panthong A. 2001. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. *J Ethnopharmacol*; 78, 45-49.
24. Holcomb S., 2004. Asthma Update. *Dimens Crit Care Nurs*; 23, 101-108.
25. Holgate S. T., Peters-Golden M., Panettieri R. A., Henderson W. R. 2003. Roles of cysteinyl leukotrienes in airways inflammation, smooth muscle function and remodeling. *J Allergy Clin Immunol*; 111, S18-36.
26. Holgate S. T. 2004. The epidemic of asthma and allergy. *J R Soc Med*; 97, 103-110.
27. Huntley A., Ernst E. 2000. Herbal medicines for asthma: a systematic review. *Thorax*; 55, 925-929.
28. Hyland M. R. 2003. Methodology for the scientific evaluation of complementary and alternative medicine. *Complement Ther Med*; 11, 146-153.
29. Ko C. H., Chen H. H., Lin Y. L. Chan M. H. 2003. Inhibition of smooth muscle contraction by magnolol and honokiol in porcine. *Planta Med*; 69, 532-536.
30. Ko W. C., Lei C.B., Lin Y.L., Chen C. F. 2001. Mechanisms of relaxant action of S-petasin and S-isopetasin, sesquiterpenes of *Petasites formosanus*, in isolated guinea pig trachea. *Planta Med*; 67, 224-229.
31. Larche M., Robinson D. S., Kay A. B., 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 111, :450-463.
32. Lemanske R. F., Busse W. W. 2003. Asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 111, S502-519.
33. Liaw J., Gau Y.Y., Chao Y.C. 1999. Effect of baicalin on tracheal permeability in ovalbumin (OA)-sensitized guinea pigs. *Pharm Res*; 16, 1653-1657.

34. Lin J., Lin Y., 1999. Flavonoid from leaves of *Loranthus laoi* (Chao) Kiu. *J Food Drug Anal*; 7, 185-190.
35. Lin Y., Kuo Y., Shiao M., Chen C., Ou J. 2000. Flavonoids glycosides from *Terminalia catappa* L. *J Chin Chem Soc*; 47, 253-256.
36. Linde K., Riet G., Hondras M., Vickers A., Saller R., Melchart D. 2001. Systematic reviews of complementary therapies- an annotated bibliography. Part 2: Herbal Medicine. *BMC Complement Altern Med*; 1:5.
37. Lozoya X., Meckes M., Abou-Zaid M., Tortoriello J., Nozzolillo C., Arnason J. T.. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch Med Res*; 25, 11-15.
38. Markham K. R., Ternai B., Stanley R., Geiger H., Mabry T. J. 1978. Carbon-13 NMR Studies of flavonoids-III. *Tetrahedron*; 34, 1389-1397.
39. Markham AW, Wilkinson JM. 2004. Complementary and alternative medicines (CAM) in the management of asthma: an examination of the evidence. *J Asthma*; 41, 131-139.
40. Mata R., Rojas A., Acevedo A., Estrada S., Calzada F., Rojas F., Bye R., Linares E. 1997. Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Med*; 63, 31-35.
41. Miller A. L. 2001. The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. *Altern Med Rev*; 6, 20-47.
42. Mintz M. 2004. Asthma update: part I: diagnosis, monitoring, and prevention of disease progression. *Am Fam Physician*; 70, 893-898.
43. Morikawa K., Nonaka M., Narahara M., Torii I., Kawaguchi K., Yoshikawa T., Kumazawa Y., Morikawa S. 2003. Inhibitory effect of quercetrin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci*; 74, 709-721.
44. Moss R.B. 1995. Alternative pharmacotherapies for steroid-dependent asthma. *Chest*; 107, 817-825.
45. Murphy S., Bleecker E. R., Boushey H. Sonia A. B., Busse W., Clark N., Eigen H., Ford J., Janson S., Kelly H. W., Lemanske R. F., Lopez C. C., Martinez F., Nelson H. S., Nowak R., Gergen P. J., Petsonk E. L., Platts-Mills T. A., Shapiro G. G., Stoloff S., Weiss K. editors. 1997. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Asthma Education and Prevention Program. II, Bethesda, Md: *National Institutes of Health*. 1-150.
46. Neszmelyi A., Kreher B., Muller A., Dorsch W., Wagner H. 1993. Tetragalloylquinic acid, the major antiasthmatic principle of *Galphimia glauca*. *Planta Med*; 59, 164-167.
47. Niven AS, Argyros G. 2003. Alternate treatments in asthma. *Chest*; 123, 1254-1265
48. Pignatti P. F. 2004. Trends in pharmacogenomics of drugs used in the treatment of asthma. *Pharmacol Res*. 2004; 49, 343-349.

49. Price K. R., Rhodes M. J. 1997. Analysis of the Major Flavonol Glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis *J Sci. Food Agric*; 74, 331-339.
50. Robinson D. S. The role of the mast cell in asthma: Induction of airway hypersensitivity by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114, 58-65.
51. Romieu I., Meneses F., Sienra-Monge J. J., Huerta J, Ruiz Velasco S., White M. C., Etzel R. A., Hernandez-Avila M. 1995. Effects of urban air pollutants on emergency visits for childhood asthma in Mexico City. *Am J Epidemiol*; 141, 546-553.
52. Rosenwasser L.J., Busse W. W., Lizambri R. G., Olejnik T.A., Totoritis M. C. 2003. Allergic asthma and an anti-CD23 mAb (IDEC-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*; 112, 563-570.
53. Schmidt D., Rabe K. 2000, Immune mechanisms of smooth muscle hyperreactivity in asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 105, 673-682.
54. Sánchez-Rabaneda F., Jauregui O., Casals I., Andres-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventos R. M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom*; 38, 35-42.
55. Souza M. F., Rao V.S., Silveira E. R. 1992. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. *Braz J Med Biol Res*; 25, 1029-1032.
56. Tallarida, R. J., Raffa, R. B., McGonigle, P. 1988. Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, New York, New York.
57. Yamada N., Kadowaki S., Umezu K. 1992. Development of an animal model of late asthmatic response in guinea pigs and effects of anti-asthmatic drugs. *Prostaglandins*; 43, 507-21.
58. Zou Y., Lu Y., Wei D. 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem*; 52, 5032-5039.

Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D₄-induced contraction in guinea-pig airways

Jacqueline Fernandez ^{a,1}, Ricardo Reyes ^b, Hector Ponce ^c, Martha Oropeza ^a,
Marie-Rose VanCalsteren ^d, Christopher Jankowski ^d, Maria G. Campos ^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mexico

^d Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, NB, Canada

Received 21 July 2005; received in revised form 16 August 2005; accepted 29 August 2005

Available online 3 October 2005

Abstract

Argemone platyceras is used in Mexico as a remedy for cough, bronchitis and pneumonia. The present study was performed to investigate the pharmacological anti-asthmatic properties of *Argemone platyceras* on airways and to identify its active principles. Methanol extracts of leaves and flowers, subsequent organic and aqueous extraction phases, and silica gel chromatography fractions were assayed on the carbachol-induced response, and/or on ovalbumin antigenic challenge, and on leukotriene D₄-induced response of tracheae from sensitized and non-sensitized guinea-pigs. Methanol extracts, ethyl-acetate phase, and its fractions 6 and 7 inhibited the carbachol-induced contractile response. Isoquercitrin and rutin were the main compounds found in fractions 6 and 7 respectively. Isoquercitrin (fraction 6) abolished the response to ovalbumin, and decreased the contractile response to leukotriene D₄. Because of its effect on carbachol-induced contractile response, on the late-phase response to ovalbumin, and on leukotriene D₄-induced contractile response, isoquercitrin might be highly useful in treatment of asthma.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Isoquercitrin; Rutin; Asthma; Carbachol; *Argemone platyceras*; Antigen challenge; Anti-asthmatic properties; Anti-leukotriene action

1. Introduction

Asthma is a disease of the airways with an underlying inflammatory component. The prevalence and healthcare burden of asthma are rising and it is predicted that this rise will continue throughout the current century (Belvisi et al., 2004). Recent asthma research is focused on chronic inflammation and remodeling of the airways as manifested by airway thickening, airway smooth muscle hypertrophy, subepithelial fibrosis and matrix protein deposition, epithelial cell damage and hy-

perplasia of goblet cells, infiltration of eosinophils in epithelium and submucosa, and cytokine production.

Cysteinyl leukotrienes (C₄, D₄, and E₄) can be generated by eosinophils, mast cells and alveolar macrophages. The actions of cysteinyl leukotrienes are mainly due to interaction with the cysteinyl leukotriene-1 receptor, which can lead to airway smooth muscle contraction, leukocyte chemotaxis, and vascular permeability increase (Lemanske and Busse, 2003). Cysteinyl leukotrienes may take part in the asthmatic remodeling process by their direct effects on smooth muscle cells, eosinophils, epithelial cells, and likely other cell types (Hui and Funk, 2002).

Leukotriene production is increased in asthma, and blood eosinophils from asthmatic patients synthesize 5- to 10-fold greater amounts of leukotrienes than those from normal subjects. Studies in guinea pigs suggest that these mediators can potentiate the release of acetylcholine and tachykinins from vagal nerve endings and capsaicin-sensitive afferent C fibers, respectively (Salvi et al., 2001). Therefore it is expected that

* Corresponding author. Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Calle San Francisco 350, Col. del Valle, 03100 México D.F., México. Tel.: +52 55 5627 6900x21368; fax: +52 55 57 61 09 52.

E-mail address: mcamposl@cis.gob.mx (M.G. Campos).

¹ JF accomplished her Ph.D. studies in the Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapala, Mexico City.

Table 1
Carrachol- and histamine-induced response of isolated guinea-pig tracheae in the presence of methanol extracts of *A. platyceras*

Extract ($\mu\text{g/ml}$)	Carrachol		Histamine	
	pD ₂	Maximal response (%)	pD ₂	Maximal response (%)
Flowers				
Control	6.90±0.06	208±11	5.83±0.23	105±16
10	6.75±0.06	101±5	5.45±0.02	65±12
30	6.39±0.01 ^a	143±11	5.08±0.28	42±8 ^a
100	6.41±0.13 ^a	131±9	4.61±0.47	28±8 ^a
Leaves				
Control	7.13±0.06	150±9	4.81±0.43	112±80
10	6.82±0.02 ^a	145±6	5.10±0.21	117±10
30	6.53±0.10 ^b	141±3	4.56±0.28	100±20
100	6.23±0.03 ^b	158±7	4.72±0.33	62±50

Data are mean±S.E.M. ($n=4-5$). ^a $P<0.05$, ^b $P<0.001$ as compared with control group.

1.2; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2.5, and glucose 11. This solution was maintained at 37 °C, pH 7.4 and bubbled with 5% CO₂–95% O₂. Isometric tension was recorded by means of a Grass polygraph model 7B via a Grass FT03C transducer. Tissues were placed under a resting tension of 1 g (maintained throughout the experiments) and allowed to equilibrate for 60 min; during this time, tissues were washed with fresh Krebs bicarbonate solution at 15-min intervals. To further standardize tissue responses, two consecutive electric stimuli (16 Hz, 100 mV, 10 ms for 10 s) were applied. At the end of the equilibration period, tissues were stimulated twice with 60 mM KCl. Only tissues with two similar consecutive responses to KCl were included in the study.

Cumulative concentration-response curves to the agonists carrachol (1×10^{-8} – 1×10^{-6} M) and histamine (1×10^{-6} – 1×10^{-4} M) were constructed (Van Rossum, 1963). Extracts, phases and fractions of leaves and flowers of *A. platyceras* (10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$) or the vehicle were added 30 min prior to the first dose of agonist. Extracts, phases and fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide:ethanol (5:2) in such a way that final vehicle concentration in the organ bath was $\leq 0.15\%$, which proved to be innocuous. Only one concentration-response curve was obtained from each tissue. At the end of experiments, a maximally effective concentration of KCl (60 mM) was added to each bath to assess tissue viability.

2.4. Antigen challenge experiments

One group of animals was sensitized at day 0 with 120 μg of ovalbumin mixed with 2 mg Al(OH)₃ dissolved in 2 ml of saline solution which were administered i.p. and s.c. (1 ml each way). On day 8, guinea pigs were exposed to an aerosol generated from a solution of 3 mg/ml ovalbumin in saline delivered by an ASPEN nebulizer (particle diameter 1–7 μm , flow 0.6 ml/min) for 7 min. On day 15, animals were exposed (aerosol) to 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ovalbumin in saline solution for 3 min. On day 25, animals were killed and tracheae were obtained and processed as described. Tracheae were pre-incubated with extracts, phases or fractions of *A. platyceras* flower (1, 3, and 10 $\mu\text{g/ml}$) or leaf (3,

10, and 30 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle during 30 min; then, tissues were challenged with 3.74 $\mu\text{g/ml}$ ovalbumin and responses recorded over 60 min. To distinguish the contribution of cyclooxygenase products to contractile response, a series of experiments was carried out in the absence or in the presence of 1×10^{-6} M indomethacin, previously added to the Krebs bicarbonate solution.

2.5. Anti-leukotriene effects

Because fraction 6 completely inhibited late response to ovalbumin, which is caused primarily by leukotrienes (Yamada et al., 1992), the likely antileukotriene effect of this fraction was investigated. For this, cumulative concentration-response curves for leukotriene D₄ (1×10^{-11} to 1×10^{-7} M) in guinea-pig tracheal rings were constructed in presence of indomethacin (1×10^{-6} M). To inhibit conversion of leukotriene D₄ into leukotriene E₄, tissues were incubated with 6 mM cysteine (inhibitor of amino peptidase); subsequently, fraction 6 was added 30 min before elaboration of the cumulative concentration-response curve to leukotriene D₄. A positive anti-

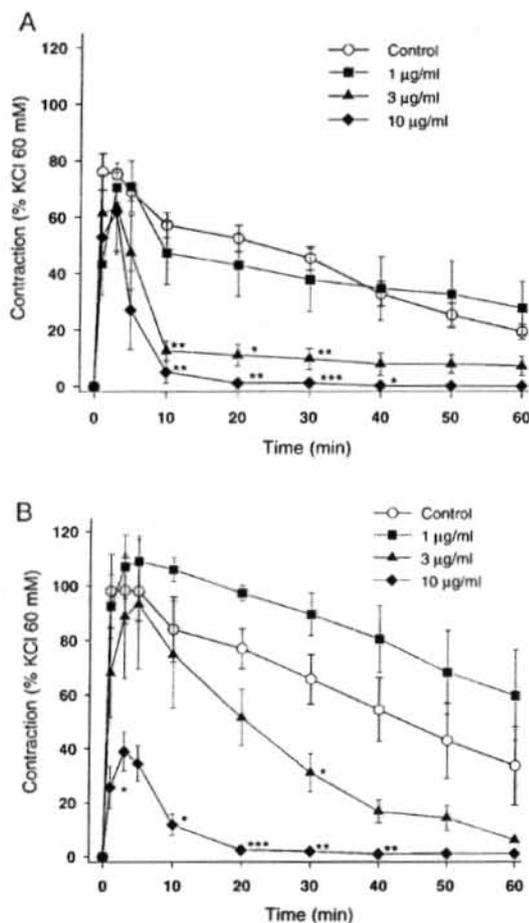


Fig. 1. Temporal course of the contractile response induced by antigen (ovalbumin) in tracheae from sensitized guinea pigs after 30-min incubation with methanol extract of the flower of *Argemone platyceras* in the absence (A) or presence (B) of indomethacin. Each point represents mean value±S.E.M. (vertical lines) of four experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

ml) significantly inhibited both early and late phases (3–40 min) of the contractile response to ovalbumin (Fig. 1B) (P values as in Fig. 1).

Regarding the leaf methanol extract, in the absence of indomethacin 30 $\mu\text{g/ml}$ decreased early and late response to ovalbumin ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) (Fig. 2A). In the presence of indomethacin, only the highest concentration of the leaf extract (30 $\mu\text{g/ml}$) significantly inhibited contractile response to ovalbumin from 40 min onward ($P < 0.05$) (Fig. 2B). As methanol extracts from flowers and leaves did not display any effect on the pD_2 values of histamine-induced response, further experiments on histamine response were discarded.

3.3. Effects of ethyl-acetate phase on agonist experiments

Three extraction phases were obtained from methanol extract of *A. platyceras* leaves and flowers: ethyl-acetate; dichloromethane, and water phases. Only the ethyl-acetate phase (100 $\mu\text{g/ml}$) of leaves and flowers significantly decreased pD_2 of contractile response induced by carbachol ($P < 0.01$) (Table 2).

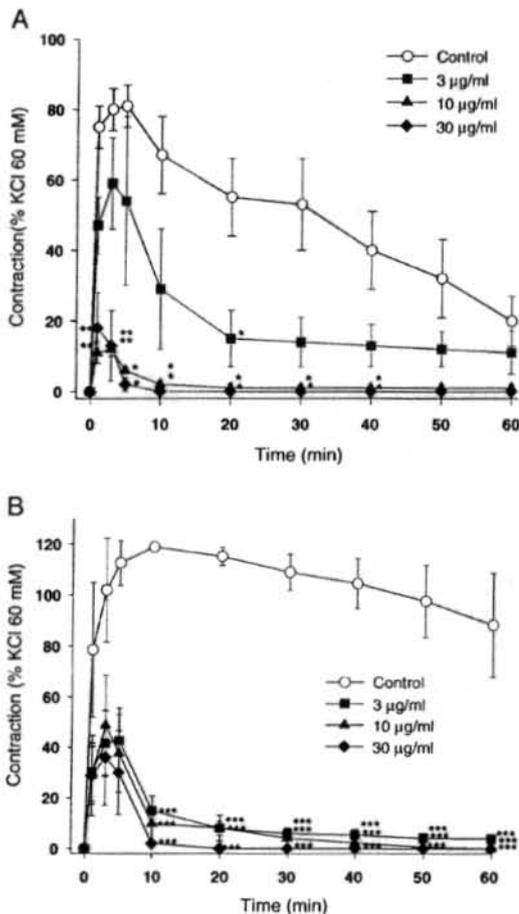


Fig. 3. Temporal course of the contractile response induced by antigen (ovalbumin) in tracheae from sensitized guinea pigs after 30-min incubation with fraction 6 in the absence (A) or presence (B) of indomethacin. Each point represents mean value \pm S.E.M. (vertical lines) of four experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

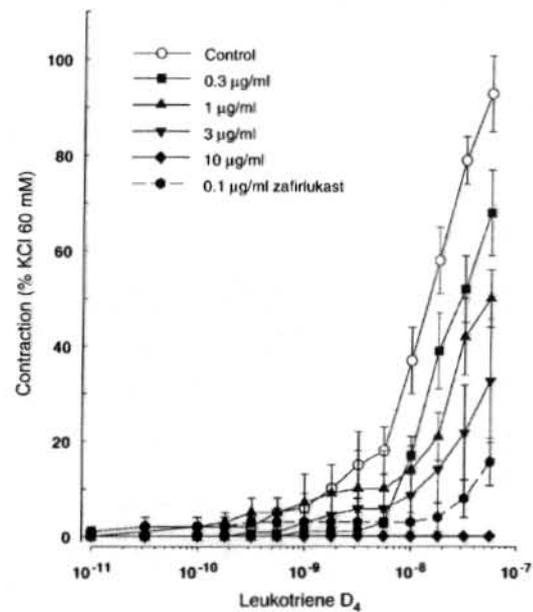


Fig. 4. Effect of fraction 6 and zafirlukast on concentration-response curves produced by leukotriene D_4 in the presence of indomethacin in guinea-pig isolated tracheae. Results are expressed as percentage of response to 60 mM KCl and are mean \pm S.E.M. (vertical lines) of four observations. P values as indicated in Table 3.

3.4. Effects of fractions on agonist experiments

The fractionation of the ethyl-acetate phase from leaves and flowers rendered seven fractions on column chromatography. Only fractions 6 and 7 (100 $\mu\text{g/ml}$) inhibited contractile response induced by carbachol, response in guinea-pig tracheal rings, but fraction 6 was more potent than fraction 7 ($P < 0.05$) (Table 2). Therefore, fraction 6 was selected for further analysis.

3.5. Effects of fractions on antigen challenge experiments

Fraction 6 inhibited contractile response to ovalbumin of tracheae from sensitized guinea pigs similarly to the whole methanol-extract effect. Whereas in the absence of indomethacin, fraction 6 (10 and 30 $\mu\text{g/ml}$) significantly inhibited both phases of contractile response to ovalbumin (Fig. 3A, P values indicated in figure), in the presence of indomethacin fraction 6 significantly inhibited contractile response to ovalbumin at all concentrations assayed ($P < 0.001$) (Fig. 3B).

Table 3

Leukotriene D_4 -induced response of isolated guinea-pig tracheae in the presence of fraction 6 of *A. platyceras*

Fraction 6 ($\mu\text{g/ml}$)	pD_2	Maximal response (%)
Control	8.70 ± 0.05	93 ± 8
0.3	8.86 ± 0.04	68 ± 9
1	7.20 ± 0.50^a	50 ± 6
3	7.01 ± 0.25^b	33 ± 13^a
10	0^c	0^c
Zafirlukast (0.1)	6.52 ± 0.29^c	16 ± 5^a

Data are means \pm S.E.M. ($n = 4-5$).

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, and ^c $P < 0.001$ as compared with control group.

powder, mp 182–184 °C (reported 184–188 °C, Bhandari, 1964); UV (methanol) λ_{\max} 358, 303, 209 nm; ESI-MS m/z 610 [M]⁺, 609(100), 301(40); [¹H]-NMR (methanol, 75 MHz) (Table 4); [¹³C]-NMR (methanol, 300 MHz) (Table 5).

3.8. Assessment of cytotoxicity

To evaluate cytotoxicity of the extraction phases and chromatography fractions of *A. platyceras* (100 µg/ml), contractile responses of guinea-pig tracheae to 60 mM KCl at the end of incubation were compared with those recorded prior to incubation. No change was observed.

4. Discussion

The present data show the following:

- 1) Methanol extracts of flowers and leaves of *A. platyceras* as well as ethyl-acetate phase, and subsequent fractions 6 and 7 displaced concentration–response curves to carbachol in a parallel rightward manner in tracheae isolated from non-sensitized guinea pigs.
- 2) Fraction 6 abolished response to antigen challenge with ovalbumin in tracheae from sensitized guinea pigs, and caused a decrease of both pD₂ and maximal response values of leukotriene D₄-induced response in tracheae from non-sensitized animals.
- 3) Isoquercitrin and rutin are the main glycosylated flavonoids identified in fractions 6 and 7, respectively.

Isoquercitrin and rutin have not been reported previously in *A. platyceras*, but have been found in other species such as *Humulus lupulus* (Bhandari, 1964), *Psidium guajava* (Lozoya et al., 1994), *Conyza filaginoides* (Mata et al., 1997), *Theobroma cacao* (Sanchez-Rabaneda et al., 2003), *Hypericum perforatum* (Zou et al., 2004).

The present data on inhibitory actions of fractions 6 and 7 on carbachol-induced response of guinea-pig tracheae are in agreement with previous results showing that isoquercitrin and rutin are able to inhibit carbachol-induced contractile response in isolated rat and guinea-pig ileum (Mata et al., 1997; Lozoya et al., 1994). Other studies have reported vasorelaxant effects on isolated rat thoracic aorta (Ajay et al., 2003), as well as anti-inflammatory activity in different experimental models (Calixto et al., 2003; Morikawa et al., 2003). The fraction 6-induced inhibition of carbachol response in tracheae from guinea pigs suggests a likely interaction between isoquercitrin and muscarinic (M₃) receptors.

Antigen-challenge guinea-pig model has proved to be a good asthma model as it displays some similarities with human asthma in response to several contractile and relaxant substances (Campos and Church, 1992). Allergen challenge causes bronchoconstriction characterized by early and late phases, the latter associated with the lipoxygenase pathway and leukotrienes.

Cysteinyl leukotrienes play a central role in promotion of airway inflammation and modulation of airway smooth muscle

cell function (Holgate et al., 2003), and are implicated in bronchoconstriction induced by antigen challenge and in specific bronchial hyperreactivity in both intrinsic and extrinsic asthma (Breschi et al., 2002).

In the allergic asthma model assayed, fraction 6 completely inhibited late response induced by antigen challenge, suggesting that this fraction exerts its effect mainly on the late inflammatory reaction which involves leukotriene release. Tracheae were incubated with indomethacin to avoid contribution of cyclooxygenase products to contractile response and make leukotrienes the main contractile mediators in the late response. When compared with the effect of zafirlukast, fraction 6 displayed similar activity on antigen response late phase. However, zafirlukast, a well known cysteinyl leukotriene receptor antagonist, inhibits both early and late phases of antigen-induced bronchoconstriction as well as decreases airway sensitivity to methacholine (Aharony, 1998). The selective and total inhibition of fraction 6 (10 µg/ml) on concentration–response curve to leukotriene-D₄, as well as the relative potency between zafirlukast (0.1 µg/ml) and fraction 6 (3 µg/ml) might be related to an interaction of isoquercitrin with leukotriene-D₄ receptors. Due to the dual effect on carbachol-and leukotriene-induced responses, fraction 6 might be useful in treatment of asthma, and the reputation of *Argemone platyceras* as an anti-asthmatic remedy seems to be justified.

Our data present the first pharmacological evidence of the action of compounds isolated from *Argemone platyceras* on an allergic asthma model. Further investigations on natural sources for anti-asthmatic drugs should be encouraged.

Acknowledgments

We are grateful to CONACyT-Mexico for providing a graduate scholarship to Jacqueline Fernandez Vargas, and for project funding No. 3476M; to Jaime Tortoriello, MD, Ph.D., for the kind gift of plant material, and to Rocio Patiño Maya, Luis Velasco Ibarra, and Javier Perez Flores for recording IR, UV, and first NMR, and EM spectra.

References

- Aharony, D., 1998. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, S214–S219.
- Ajay, M., Gilani, A.U., Mustafa, M.R., 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 74, 603–612.
- Atta-ur-Rahman, 1994. Handbook of natural products data. Isoquinoline Alkaloids, vol. 3. Elsevier, London, p. 154.
- Batterham, T.J., Hight, R.J., 1964. Nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids. *Aust. J. Chem.* 17, 428–439.
- Belvisi, M.G., Hele, D.J., Birrell, M.A., 2004. New advances and potential therapies for the treatment of asthma. *BioDrugs* 18, 211–223.
- Bhandari, P.R., 1964. Identification of flavonoids in hops (*Humulus lupulus linne*) by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 16, 130–135.
- Breschi, A.M., Martinotti, E., Apostoliti, F., Nieri, P., 2002. Protective effect of silymarin in antigen challenge- and histamine-induced bronchoconstriction in vivo guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 437, 91–95.