

Informe de Conclusion

“Apoyo en actividades relacionadas con la evaluación del efecto antiasmático de extractos de plantas medicinales en modelos animales ex vivo e in vivo”

Alumno: Giovanni Daniel Pecina Jiménez

No. Matricula: 2183029121

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

Asesor Externo: Dra. Angélica Flores Flores

Cédula de Doctorado: 11760801



V.B Asesor externo

Asesor interno: Dra. Liliana Hernández Vázquez

No. Económico: 27790



V.B Asesor interno

Lugar de realización:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Laboratorio de Inmunofarmacología

F. Inicio: 23/10/2023

F. de finalización: 26/04/2024

Introducción

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER), es un organismo público adscrito al Sector Salud del país, que forma parte de los Institutos Nacionales de Salud, siendo así una institución que brinda servicios de atención médica, docencia e investigación biomédica especializada en enfermedades del aparato respiratorio. Como institución, su misión consiste en mejorar la salud respiratoria de los individuos y las comunidades a través de la investigación, la formación de recursos humanos y de la atención médica especializada; mientras que su visión se enfoca en convertir el Instituto en una entidad nacional normativa en salud respiratoria y el principal sitio de enseñanza, investigación, promoción y atención de alta especialidad, con competitividad nacional e internacional. El INER prioriza la investigación, prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades respiratorias para mejorar la salud respiratoria de la población mexicana. El Servicio Social se realizó en el Laboratorio de Inmunofarmacología de esta institución, para aplicar los conocimientos y habilidades adquiridos a la evaluación química y farmacológica de compuestos de uso terapéutico, así como para la construcción y desarrollo de habilidades, además de participar en equipos interdisciplinarios que colaboren a la solución de problemas de salud en el país, en este caso para el asma.

Aporte a la sociedad

Las enfermedades respiratorias en México representan un desafío significativo para la salud pública en el país, siendo esta una de las principales causas de morbilidad y mortalidad que existen. Estas enfermedades afectan a un número considerable de la población mexicana debido a varios factores de riesgo que predisponen a la aparición de estos padecimientos, ya sea desde la presencia de contaminación en el aire, la exposición prolongada a distintos alérgenos, o también la falta de acceso a una atención médica adecuada dando como resultado la prevalencia y agravamiento de dichas afectaciones. (Pérez, 2018)

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias que involucra la participación de diversas células y componentes, dando lugar a episodios recurrentes caracterizados por tos (principalmente nocturna), sibilancias, dificultad para respirar, entre otros síntomas que suelen estar asociados con una obstrucción bronquial siendo resueltas mediante tratamientos (Del Río et al, 2011). Según la Secretaria de Salud Publica en México (2023), alrededor de 8.5 millones de habitantes viven con asma, que hasta antes de la aparición de la pandemia de COVID-19, esta ocupaba el primer lugar en términos de atención en el Servicio de Urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. La administración de medicamentos mediante la vía inhalatoria es la elección preferida para el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) debido a sus numerosas ventajas, siendo el principal eje para el desarrollo tecnológico de inhaladores y fármacos aerosolizables (Plaza & Giner, 2015). La acetilcolina es un neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático que desempeña un papel central en la fisiopatología de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, influyendo en la contracción de los músculos bronquiales. Esto ha desencadenado un interés en los receptores muscarínicos como posibles objetivos terapéuticos para tratar afecciones como el asma, siendo los anticolinérgicos compuestos que actúan como antagonistas de los receptores muscarínicos, inhibiendo competitivamente a los receptores M1, M2 y M3 (Gosens & Gross, 2018).

Objetivos

- **Objetivo general**

Contribuir en la evaluación *ex vivo* del efecto antiasmático de distintas plantas medicinales en modelos animales dentro del laboratorio de Inmunofarmacología.

- **Objetivos específicos**

- 1) Realizar una revisión bibliográfica acerca de la repercusión del asma sobre la salud pública a nivel nacional e internacional y los distintos tratamientos que este posee.
- 2) Realizar técnicas cualitativas para la identificación de los distintos metabolitos presentes en las plantas medicinales.
- 3) Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos generados de las diferentes plantas medicinales.
- 4) Transmitir a través de seminarios las distintas aplicaciones de la farmacognosia, así como ciertos métodos y estrategias para la extracción de compuestos orgánicos.

Metodología

- ***Preparación de los extractos orgánicos***

Para la obtención de los extractos orgánicos se realizará la recolecta de las distintas plantas, el material se desinfectará y se secará a temperatura ambiente a la sombra. Posteriormente, se pulverizará en un molino eléctrico hasta obtener el material vegetal pulverizado el cual se pesará fresco y seco para obtener los rendimientos de estos. Se colocará el material vegetal en un frasco y se someterá a un proceso de macerado utilizando un primer disolvente poco polar cubriendo toda la planta y se medirá el volumen utilizado, se dejarán pasar 72h y posteriormente se filtrará el disolvente utilizado y se repetirá por triplicado el macerado y filtrado, este procedimiento se replicó con los disolventes de mediana polaridad y alta polaridad. Finalmente, los 3 filtrados se llevan a sequedad mediante un rotaevaporador a presión reducida.

- ***Evaluación del efecto traqueo relajante en un modelo ex vivo en tráquea aislada de cobayo y rata***

Obtención de la tráquea

Los roedores serán sacrificados por una sobredosis de pentobarbital y posteriormente se realizará una disección a nivel del cuello con la finalidad de aislar la tráquea de cobayo. A continuación, la tráquea se limpiará del tejido conectivo adyacente, adipocitos y mucosidad. Se cortan 6 a 8 anillos de aproximadamente 3 mm de longitud los cuales son colocados en una cámara de órgano aislado con 10 ml de solución Krebs (NaCl, glucosa, NaHCO₃, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, EDTA, CaCl₂) constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂ y CO₂ 95:5 y mantenida una temperatura de 37°C y a un PH de 7.4

Sistema de registro

Para determinar el efecto relajante de las muestras de prueba y controles se utilizará un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. En este tipo de sistema los anillos de la tráquea se ajustan a la parte inferior de la cámara de incubación y a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT 03 el cual está conectado a un sistema Biopac 160.

● ***Pruebas fitoquímicas***

Para identificar de manera cualitativa los metabolitos responsables de la relajación se recurrirá continuamente a la cromatografía en capa fina, en donde se eluyen los diferentes extractos orgánicos de corteza y de fruto por separado. Se buscará una fase móvil en la que se observe la mejor resolución de las muestras y posteriormente serán revelados en el UV de onda corta y de onda larga.

Asimismo, se realizarán distintas técnicas colorimétricas para la observación de los distintos metabolitos presentes en cada extracto:

Prueba de Cloruro Férrico (FeCl₃) para fenoles

Para la detección de fenoles presentes en los distintos extractos, se hará uso de la prueba de cloruro férrico. Se disuelve una pequeña cantidad de muestra en etanol y se le agrega de 2-3 gotas de FeCl₃ al 2.5%. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo, azul, verde o violeta.

Prueba de Cumarinas

Las muestras se disuelven en 1-2 ml de una solución alcalinas, provocando la aparición de color amarillo. Posteriormente se acidula la solución gota a gota, mostrando una desaparición del color si hay presencia de cumarinas.

Prueba de Ácido sulfúrico

Se disuelve 1 mg de los extractos en 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. La aparición de distintas coloraciones da a demostrar la presencia de distintos metabolitos.

Prueba de Molish

Para la determinación de azúcares, se coloca en un tubo de ensayo 1 mg de muestra y se disuelve en 1 ml de metanol; posteriormente, se añade cuidadosamente 1 ml de H₂SO₄ por las paredes, observándose la aparición de un anillo coloreado en la interfase si es positiva.

Prueba de Permanganato de Potasio (KMnO₄)

Esta prueba demuestra la presencia de insaturaciones / dobles enlaces en la muestra. Se coloca en un tubo de ensayo una pequeña cantidad de la muestra y se disuelve en 1 ml de agua, agregando después una gota de KMnO₄ al 2%. Si hay una coloración o precipitado café, la prueba se considera positiva.

● **Prueba de Actividad Antioxidante (Método DPPH)**

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizará el método de DPPH, donde se tomará 200µl de una muestra del extracto a analizar (al igual que de ácido ascórbico), a concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 µg/ml, y se colocarán en placa de Elisa por triplicado. Posteriormente, se pondrán 240µL de solución DPPH para el blanco y agregar 40µL de dicha solución a cada uno de los pocillos con la muestra a analizar; al final, se dejará reposar por 30 minutos y se medirá la absorbancia a 517nm.

Actividades realizadas

Se realizó una revisión bibliográfica sobre enfermedades respiratorias como el asma, con la finalidad de comprender los aspectos clínicos y fisiológicos de esta patología así como conocer su incidencia de morbilidad y mortalidad en México. La revisión fue realizada utilizando PubMed, se revisaron 15 artículos científicos publicados entre los años 2012 - 2023, donde se abordaban las características fisiopatológicas de la enfermedad en el sistema respiratorio y los factores que complican dicha patología, así como los regímenes farmacológicos actuales y los acercamientos del uso de productos naturales como tratamientos complementarios al asma.

Primero se generaron los diferentes extractos orgánicos mediante maceración poniendo en contacto el material vegetal con los diferentes disolventes (hexano, diclorometano y metanol) cada 72 horas se filtró y se concentró eliminando el disolvente esto se hizo por triplicado y posteriormente se cambio de disolvente. Se obtuvieron los diferentes extractos ya secos se participó en la evaluación del efecto traqueorelajante de los extractos hexánico, diclorometanólico y metanólico de la planta *Carya illinoensis*, así como de *Diente de León*, *Laurel*, *Higo* y *Hierba del sapo*, comparándolos con el efecto de la *Teofilina* como control positivo, ya que esta última es un relajante de las vías respiratorias esto se hizo en un modelo ex vivo de órganos aislados en condiciones fisiológicas se aisló la tráquea de la rata se colocaron anillos de tráquea de rata en cámaras que contenían 10 ml de solución de krebs para mantener al tejido en condiciones homeostáticas, posteriormente se adicionó carbacol un agonista contráctil del músculo liso de vías aéreas y cuando alcanzó la contracción máxima se evaluaron los diferentes extractos para conocer su efecto relajante de la musculatura lisa de la tráquea. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación para determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos , para ello se empleó el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), utilizando ácido ascórbico como control positivo a distintas concentraciones.

Se puso en práctica la realización de cromatografía en capa fina para cada uno de los productos obtenidos. Esto con el fin de poder observar y diferenciar los distintos

metabolitos presentes en cada material vegetal, y así poder estimar el efecto obtenido mediante el conocimiento del efecto de cada metabolito. Así mismo, se realizaron distintas pruebas cualitativas para la detección de los metabolitos de cada planta, con el objetivo de poder distinguir de mejor manera su composición.

Se impartió un seminario sobre distintas definiciones de farmacodinamia, así como su aplicación en la obtención de resultados para medir efecto y potencia de un fármaco, además de determinar la diferencia entre dosis y concentración en la respuesta biológica.

Por último, se realizaron discusiones grupales acerca de diversos artículos de divulgación, principalmente casos clínicos, y sus distintas aportaciones a la investigación; esto con el fin de desarrollar un pensamiento crítico acerca de la ética laboral en el laboratorio y la normatividad necesaria en el mismo para un correcto abordaje de las actividades realizadas.

Vínculo de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación del plan de estudios

El perfil de egresado de la Licenciatura de QFB proveniente de la UAM Xochimilco se caracteriza por desarrollar una formación con base a los problemas de salud que existen en México y el correcto abordaje en su investigación; es así que la participación en el laboratorio de Inmunofarmacología del INER ofrece la capacitación en distintas técnicas y métodos utilizados para la obtención y evaluación de distintos extractos de origen natural como precursores a nuevos tratamientos complementarios que ayuden en la mejoría de la sintomatología proveniente de una de las principales afectaciones del país como lo es el asma.

Las actividades realizadas en el Laboratorio de Inmunofarmacología del INER implicó enfrentar desafíos científicos y técnicos, lo que fomenta el desarrollo de habilidades analíticas, capacidad de resolución de problemas y pensamiento crítico. Además, la experiencia en este entorno promueve la colaboración, el trabajo en equipo y el desarrollo de habilidades interpersonales, aspectos esenciales para el éxito en la profesión de QFB. En el entorno de laboratorio y en relación con las actividades desarrolladas durante el período de Servicio Social, se aplicaron los conocimientos adquiridos durante las Unidades de Enseñanza Aprendizaje:

- Obtención de compuestos orgánicos de interés farmacéutico (módulo V)
- Los fármacos como modificadores de funciones biológicas y prevención (módulo VII)
- Control de la propagación microbiana, se abordan temas específicos relacionados con los productos naturales, la farmacología e inmunología (Módulo X).

Metas alcanzadas

En el período de Servicio Social, se logró aplicar de manera efectiva el conocimiento teórico obtenido en cada una de las Unidades de Enseñanza Aprendizaje; se adquirieron y fortalecieron las habilidades técnicas esenciales que forman una parte integral en la formación de un egresado de la carrera de QFB, la cual es prevista en el plan de estudios de la licenciatura. Así mismo, se desarrollaron nuevas capacidades relacionadas al entorno profesional y su correcto abordaje en el área de laboratorio, donde es necesario estar informado acerca de los distintos avances y desafíos a los que se enfrenta un profesional de la salud para el desarrollo de nuevos fármacos y terapias médicas que contribuyan a resolver problemas de salud en el país mejorando las capacidades de pensamiento crítico, resolución de problemas y habilidades experimentales como uso y manejo de animales, modelos *ex vivo*, cálculos farmacéuticos y ética en la investigación.

La realización de seminarios, el análisis de diversos artículos y la participación activa dentro de los varios eventos informativos de la institución, fomentan la divulgación científica sobre los temas de salud más importantes en México y en el mundo, proporcionando una educación continua acerca de las distintas problemáticas a las que nos enfrentaremos como nuevos profesionistas y su correcto abordaje. Todas estas iniciativas contribuyen para poder expandir nuestra comprensión al proporcionar un espacio valioso para la actualización de información.

En cuanto a lo individual, el formar parte de una dinámica laboral, así como las distintas interacciones dentro de un laboratorio multidisciplinario, permite ampliar el uso y desarrollo de distintas habilidades personales que van desde la comunicación, el trabajo en equipo, etc. Esto ya que, al formar parte en una comunidad de trabajo, es necesario llevar a cabo una convivencia grupal, así como un buen manejo de hábitos y el cumplimiento de la normatividad, para obtener un buen desempeño de actividades.

Conclusiones

Las evaluaciones preclínicas son de gran importancia en el área de investigación ya que son los precursores que informan si hay viabilidad de utilizar algún fármaco, extracto o desarrollo de una molécula bioactiva para una enfermedad crónico-degenerativa o una enfermedad no transmisible como el asma. La actividad biológica que pueden tener los extractos de productos naturales es debido a la cantidad de metabolitos presentes en el material vegetal, y que pueden recuperarse para poder ser evaluados en modelos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de animales, dando como resultado la estimación de los posibles efectos benéficos para la salud y así, obtener alternativas terapéuticas en aquellos padecimientos como el asma, donde es necesario un tratamiento efectivo para mejorar la calidad de vida.

Es así como se colaboró en la evaluación *ex-vivo* del efecto antiasmático de distintas plantas para su futuro potencial benéfico, obteniendo que el extracto diclorometánico de hoja de higo y hoja de laurel presentaron una gran relajación en los anillos traqueales, siendo estos los mejores para un posible tratamiento a futuro, donde será necesario llevar a cabo el aislamiento y caracterización de las moléculas responsables de la actividad observada.

Por último, el trabajo realizado como parte del servicio social en el Laboratorio de Inmunofarmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", fue un periodo enriquecedor para una formación personal y laboral como egresado de QFB de la UAM - Unidad Xochimilco. Esto debido a que fue necesaria la aplicación de distintos conocimientos obtenidos durante el periodo académico, así como el uso de las distintas habilidades personales para el desarrollo de nuevos hábitos y obtener así, una preparación en las capacidades profesionales necesarias al enfrentar nuevos retos en la salud nacional.

Bibliografía

- 1.** Del Río Navarro, B. E., Eslava, A. B., & Monge, J. J. L. S. (2011). Relación de la obesidad con el asma y la función pulmonar. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68(3). <http://scielo.unam.mx/pdf/bmim/v68n3/v68n3a2.pdf>
- 2.** García-Sancho, C., Fernández-Plata, R., Martínez-Briseño, D., Franco-Marina, F., & Pérez-Padilla, J. R. (2012). Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la Ciudad de México: estudio de base poblacional. *Salud Publica De Mexico*, 54(4), 425-432. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342012000400013>
- 3.** Gosens, R., & Gross, N. J. (2018). The mode of action of anticholinergics in asthma. *The European respiratory journal*, 52(4), 1701247 <https://doi.org/10.1183/13993003.01247-2017>
- 4.** Pérez, J. R. (2018). Muertes respiratorias en México, 2015. *Neumol Cir Torax*, 77(3). <https://www.scielo.org.mx/pdf/nct/v77n3/0028-3746-nct-77-03-198.pdf>
- 5.** Plaza, V., & Donaire, J. G. (2016). Terapia inhalada en el asma. *Medicina Clínica*, 146(7), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2015.09.021>