



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la actividad antiespasmódica y antidiarreica
del extracto metanólico de *Agastache mexicana* ssp.
xolocotziana en modelos experimentales

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA LILIAN RAMÍREZ RAMÍREZ

MÉXICO, D.F. 2014



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MTRO. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

VOCAL: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

SECRETARIO: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

SUPLENTE: DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO

SUPLENTE: MTRA. MA. DEL ROSARIO BENÍTEZ VELÁQUEZ

EL TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE DESARROLLO DE
MEDICAMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNAM.

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA UNAM-DGAPA-PAPIIT
NO. DE PROYECTO: IN201713

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
NOMBRE Y FIRMA

ASESOR INTERNO: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
NOMBRE Y FIRMA

SUSTENTANTE: ALEJANDRA LILIAN RAMÍREZ RAMÍREZ
NOMBRE Y FIRMA

INDICE

ABREVIATURAS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE CUADROS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO.....	3
2.1 Plantas medicinales	3
2.1.1 <i>Agastache mexicana ssp. xolocotziana</i>	4
2.1.1.1 Botánica.....	4
2.1.1.2 Distribución	4
2.1.1.3 Metabolitos secundarios	5
2.1.1.4 Usos medicinales.....	6
2.2 Motilidad gastrointestinal y SNE	8
2.2.1 Sistema Nervioso Entérico.....	8
2.2.2 Desórdenes gastrointestinales	11
2.2.2.1 Tratamiento farmacológico de los espasmos intestinales	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos particulares.....	17
5. HIPÓTESIS	18
6. MATERIALES Y METODOS.....	19
6.1 Extracto metanólico de <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i>	19

6.2 Animales de experimentación.....	19
6.3 Métodos	20
6.3.1 Evaluación del efecto antiespasmódico. Modelo de íleon aislado de cobayo.....	20
6.3.1.1 Equipo	20
6.3.1.2 Preparación del tejido	20
6.3.1.3 Efecto del extracto sobre el tejido pre-contraído con KCl.	21
6.3.1.4 Efecto del extracto en el tejido estimulado químicamente con acetilcolina	22
6.3.1.5 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica	23
6.3.1.6 Determinación del posible mecanismo de acción del efecto espasmolítico de <i>A .mexicana ssp. xolocotziana</i>	23
6.3.2 Evaluación del efecto antidiarreico. Modelo de motilidad intestinal en ratón	24
6.4 Análisis de datos	25
7. RESULTADOS	26
7.1 MODELO DE ÍLEON AISLADO DE COBAYO.....	26
7.1.1 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por ACh	26
7.1.2 Efecto del extracto sobre el tejido precontraído con KCl.	29
7.1.3 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica.....	31
7.1.4 Determinación del posible mecanismo de acción del efecto antiespasmódico del extracto.....	33
7.2 MODELO DE MOTILIDAD INTESTINAL EN RATÓN.....	34

7.2.1 Efecto antidiarreico del extracto en ratón	34
8. DISCUSION DE RESULTADOS	36
8.1 Modelo de íleon aislado de cobayo	36
8.2 Modelo de motilidad intestinal en ratón	39
8.3 Análisis del posible mecanismo de acción del extracto	40
9. CONCLUSIÓN	43
10. PERSPECTIVAS	44
11. REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

A.	<i>Agastache</i>
ABC	Área Bajo la Curva
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosin Monofosfato Ciclico
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca ²⁺	Ion calcio
CE50	Concentración Efectiva 50
cm	Centímetros
CCR	Curva Concentración Respuesta
Dr.	Doctor
EE	Estimulación Eléctrica
E.E.	Error estándar
etc.	etcétera
g	gramos
GABA	Acido gamma- aminobutírico
Hz	Hertz
h	Horas
IP ₃	Trifosfato de Inositol
K ⁺	Ion Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramo
L-NAME	Metil Ester L-Nitro Arginina
m	metros
M	Molar
M.C.	Maestro en ciencias
µg	Microgramos
µM	Micromolar
mM	Milimolar

min	Minutos
mL	Mililitros
ms	Milisegundos
NaCl	Cloruro de Sodio
NAIP	Neuronas aferentes intrínsecas primarias
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintetasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIV	Péptido intestinal vasoactivo
SII	Síndrome de Intestino Irritable
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNE	Sistema Nervioso Entérico
ssp.	subespecie
V	volts

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agastache mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i> (toronjil blanco)	5
Figura 2. Algunos componentes químicos de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	6
Figura 3. Distribución de los dos plexos nerviosos (mientérico y submucoso) a lo largo del tracto gastrointestinal.....	9
Figura 4. Representación esquemática de un corte transversal del intestino.....	10
Figura 5. Curvas concentración respuesta de ACh en ausencia y presencia de varias concentraciones del extracto MeOH de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i> en íleon de cobayo.....	26
Figura 6. Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto metanólico de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i> en el íleon de cobayo precontraído con KCl [32 mM].....	29
Figura 7. Contracción inducida por estimulación eléctrica (EE) (14 volts con una frecuencia de 0.3 Hz y pulsaciones de 3 ms) en el íleon de cobayo en ausencia y en presencia del extracto MeOH de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	31
Figura 8. Efecto relajante del extracto MeOH de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i> en el íleon de cobayo en presencia de hexametonio, indometacina y L-NAME.	34
Figura 9. Porcentaje de la motilidad intestinal en ratones en ausencia y en presencia del extracto MeOH de <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	35

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Área bajo la curva (ABC) del efecto contráctil de la ACh [1×10^{-9} – 1×10^{-5} M] en presencia de extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y Papaverina en el íleon de cobayo..... 28

Cuadro 2. Concentración Efectiva 50 (CE50) del efecto contráctil inducido por ACh en presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el íleon de cobayo..... 28

Cuadro 3. Efecto relajante del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y de Papaverina en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32 mM]..... 30

Cuadro 4. Porcentaje de relajación del íleon de cobayo estimulado eléctricamente en ausencia y presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y papaverina..... 32

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes patologías ha sido ampliamente difundido alrededor de todo el mundo, debido a que es una alternativa económica, efectiva y de fácil acceso.

Las plantas medicinales son un recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional, la cual abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y regiones (The WHO, 2002). En México existe una gran diversidad de plantas medicinales con cerca de 7,000 especies útiles de un total de casi 22,000 especies de plantas con flores (Martínez-Moreno y cols, 2006).

En general se considera que los extractos de plantas medicinales son seguros (o inofensivos) porque se obtienen de la naturaleza (Canales-Martínez y cols, 2006); sin embargo esto no siempre es cierto, ya que sus efectos pueden ser muy variables e incluso producir efectos tóxicos. Además, se sabe que el efecto terapéutico de muchas plantas medicinales no ha sido comprobado científicamente, ya que en muchas ocasiones se les atribuye cierta actividad terapéutica con base en sus usos tradicionales, cuando pueden no producir ningún efecto terapéutico, incluso producir efectos tóxicos que pueden poner en riesgo la salud de los pacientes, lo que hace necesario un estudio científico que compruebe la actividad farmacológica de los extractos (Carballo y cols, 2005).

El *Agastache mexicana* es una planta medicinal muy popular en México que ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos gastrointestinales, cardiovasculares y nerviosos (Santillán-Ramírez y cols, 2008; Molina-Hernández y cols, 2000). Se conocen dos subespecies de la *Agastache mexicana*, la ssp. *mexicana*; y la ssp. *xolocotziana*, conocidos en la medicina tradicional como "toronjil morado" y "toronjil blanco", respectivamente, por el color de sus flores.

A pesar del amplio uso en la medicina tradicional que se hace de esta especie para padecimientos gastrointestinales, no existen estudios científicos que corroboren su actividad terapéutica. En el presente proyecto se propone evaluar la actividad antiespasmódica y antidiarreica del extracto metanólico de *A.mexicana* ssp. *xolocotziana* (toronjil blanco).

2. MARCO TEORICO

2.1 Plantas medicinales

Las plantas medicinales juegan un papel clave en el mantenimiento de la salud de la población de la mayor parte del mundo. Se estima que se utilizan unas 10,000 especies vegetales con este propósito (Dellacassa, 2005). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) más del 80% de la población mundial usa preparaciones botánicas para el tratamiento de algunos padecimientos (Mukherjee y cols, 2006).

El uso de plantas medicinales es una alternativa muy utilizada en poblaciones de bajos recursos; se pueden utilizar como compuestos puros obtenidos de extractos, infusiones, tinturas, partes de las plantas cortadas o pulverizadas, etc.; todos ellos con poca información científica acerca de su efectividad clínica y efectos farmacológicos (Dellacassa, 2005).

En México, la venta de plantas medicinales no está regulada, ya que se realiza libremente en los mercados, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de análisis que por lo menos asegure la autenticidad de la planta. De acuerdo con el informe de la OMS de 2002, 60% de la población mexicana utiliza plantas medicinales (THE WHO, 2002) para el tratamiento de diversos padecimientos.

Entre las plantas medicinales utilizadas en México se encuentra el *Agastache mexicana* (toronjil), el cual es utilizado en la medicina tradicional para tratar la ansiedad, el insomnio, trastornos cardiovasculares, reumatismo, dolor de estomago y afecciones gastrointestinales. (Linares y cols, 1988; Argueta y cols, 1994). También se utiliza en enfermedades culturales conocidas como "empacho", "susto" y "mal de ojo" (Argueta y cols, 1994).

2.1.1 *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*

2.1.1.1 Botánica

El género *Agastache*, pertenece a la familia *Lamiaceae*, y está conformado por cerca de 22 especies, entre las cuales se encuentra la *Agastache mexicana*. De ésta, se han identificado dos subespecies: *Agastache mexicana* ssp. *mexicana*; y ssp. *xolocotziana*, también conocidas por el color de sus flores como “toronjil morado” y “ toronjil blanco”, respectivamente (Bye y cols, 1987; Cortes-Zamora y cols, 2010).

El género *Agastache* es una hierba perenne de 40 a 60 cm (aunque algunos casos la reportan hasta de 1.5 m de altura) muy aromática al estrujarse (Santiago y cols, 2005). Las hojas son de forma ovado-lanceolada, de 4.4 a 6.3 cm de largo y 2.1 a 2.5 cm de ancho en la ssp. *mexicana*, mientras que la *xolocotziana* tiene 4.6 a 6.2 cm de largo y 1.7 a 3 cm de ancho (Santillan-Ramirez, 2008). Las flores nacen en la parte superior, junto con unas pequeñas ramas que salen en la parte alta del vástago, brotan en racimos o verticilos florales (Figura 1) (Santiago y cols, 2005).

2.1.1.2 Distribución

La *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* crece en climas templados sub-húmedos, templados húmedos y semicálidos (Chávez, 1986). Se distribuye principalmente al centro de la República Mexicana, localizándose en los siguientes estados: Hidalgo, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz y Distrito Federal (Cortes-Zamora y cols, 2010).



Figura 1. *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (toronjil blanco).

2.1.1.3 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas para realizar determinadas funciones. Algunas especies de la familia Lamiaceae tienen importancia económica por su contenido de aceites esenciales, los cuales son utilizados en la elaboración de perfumes, licores, cosméticos, detergentes, etc. Otros poseen propiedades medicinales y son recomendados en el tratamiento de problemas digestivos, afecciones hepáticas, afecciones urinarias, antiespasmódicos, etc. (Simmonds, 2001). En general, los estudios de la composición de aceites esenciales de diversas plantas han revelado la presencia de un gran número de metabolitos secundarios, siendo los más frecuentes los monoterpenos.

El análisis químico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* ha mostrado que los compuestos identificados como más abundantes del extracto metanólico son acacetina y (2-acetil)-7-O-glucosil-acacetina. Además, un análisis por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas mostraron que la pulegona, limoneno, mentona e isopulegona son los principales componentes del aceite esencial (Figura 2) (Estrada-Reyes y cols, 2004).

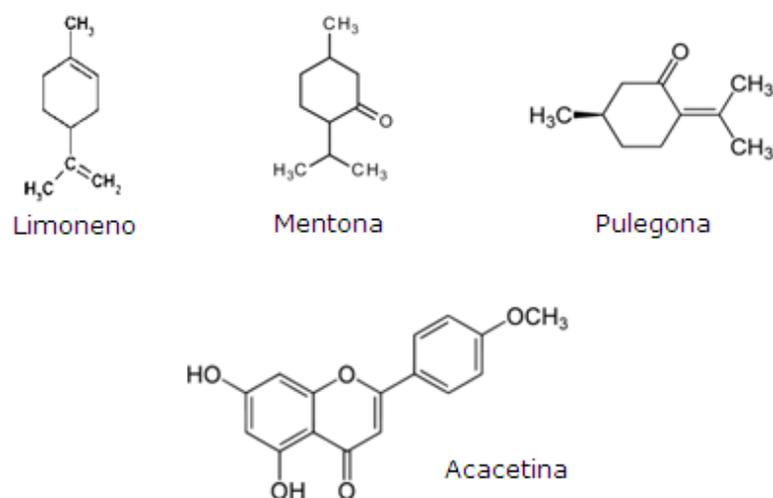


Figura 2. Algunos componentes químicos de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*.

2.1.1.4 Usos medicinales

En la medicina tradicional mexicana, la infusión de toda la planta de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* se utiliza como eupéptico, antiespasmódico, antidepresivo y para controlar los nervios; las flores se emplean para tratar la tos; y las hojas, contra picaduras de alacranes (Galindo, 1982). Puede ser hervido hasta que el agua pinte, con o sin azúcar, sólo o mezclado con otras plantas como: el toronjil morado (*Agastache mexicana* ssp. *mexicana*), hinojo/anojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), tila (*Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) o rosa de Castilla (*Rosa centifolia* L.) (Santillán-Ramírez y cols, 2008).

Existen diversos reportes del uso de esta planta medicinal que señalan su posible utilidad en el tratamiento de diversos padecimientos. Gregorio López en el siglo XVII relata que las hojas bebidas con vino y aplicadas como emplasto se usan contra picaduras de alacrán ya que mitigan el dolor y son útiles al estómago (Hernández, 1942); Alfonso Herrera describe el efecto antiespasmódico del toronjil mexicano (*A. mexicana*); Luis Cabrera cita que es antirreumático, diaforético, digitálico, eupéptico; y la Sociedad Farmacéutica de México en el siglo XIX reporta y acepta oficialmente su efectividad como antiespasmódico, diaforético, estimulante y eupéptico (Herrera, 1921).

La dos subespecies de *Agastache mexicana* en combinación con *Dracocephalum moldavica*, conocido popularmente como “toronjil azul” o “toronjil chino”, son conocidos popularmente como los “tres toronjiles” y son utilizados en la medicina tradicional para curar el “espanto” y “susto” (Linares, 1988). Entre mixes, zapotecas y totonacas se le utiliza para “mal de ojo”, dolor intestinal, empacho, cólicos menstruales, insomnio y contra la diarrea (Cano, 1997).

Estudios farmacológicos recientes han demostrado el efecto antinociceptivo del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en un modelo de dolor visceral en ratones (modelo de Writhing) (González-Trujano y cols, 2012). Estos estudios sustentan en parte su uso en la medicina tradicional para el alivio del dolor visceral; sin embargo, no se ha determinado si este efecto antinociceptivo se debe a un efecto inhibitorio sobre los espasmos intestinales, los cuales son ocasionados por una alteración sobre la motilidad intestinal.

2.2 Motilidad gastrointestinal y SNE

La motilidad gastrointestinal se produce por la contracción y relajación de las paredes intestinales con el propósito de favorecer el paso del contenido alimenticio y la absorción adecuada de nutrientes (Mazzone y cols, 2007). Esta se debe a la interacción especializada de varios elementos como el sistema nervioso entérico (SNE) y las capas de músculo liso (Romero-Trujillo, 2012).

2.2.1 Sistema Nervioso Entérico

El SNE es un complejo sistema de neuronas y células de sostén capaces de generar información, integrarla y producir una respuesta. Es una subdivisión del sistema nervioso autónomo que se encarga de controlar directamente el aparato digestivo. Está constituido aproximadamente de 80 a 100 millones de neuronas, que son una milésima parte de las que existen en el cerebro, pero mayor cantidad que las que hay en la médula espinal (Mazzone y cols, 2007). Además, es un sistema complejo, que consiste en una red neuronal capaz de actuar independientemente del sistema nervioso central, de recordar, aprender, etc.; por lo que algunos autores lo llaman el "segundo cerebro" (Mayer, 2011).

El SNE proviene de las células de la cresta neural y da origen a dos plexos nerviosos (mientérico y submucoso) que se encuentran distribuidos en ganglios a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Figura 3). En el plexo mientérico, también conocido como de Auerbach, se encuentra entre las capas del músculo circular y longitudinal, y su principal función es coordinar la motilidad intestinal (Navarro, 2002; Mazzone y cols, 2007; Mayer, 2011; Romero-Trujillo, 2012). El plexo submucoso, también conocido como de Meissner, se encuentra entre la capa interna del músculo circular y la submucosa; está más desarrollado en el intestino delgado y colon, y su principal función es regular la secreción de sustancias hacia la mucosa (Romero-Trujillo, 2012) (Figura 4).

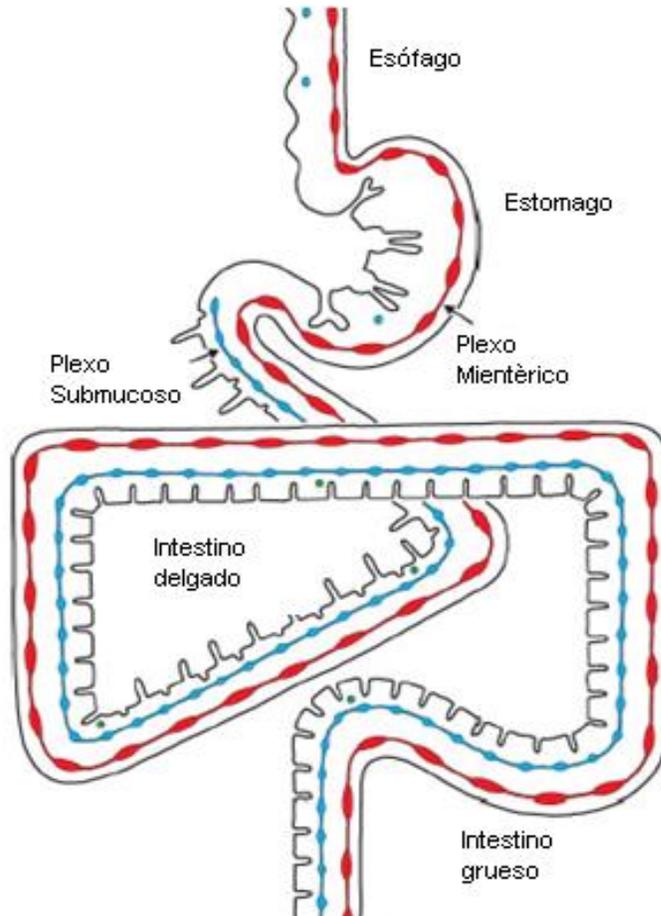


Figura 3. Distribución de los dos plexos nerviosos (mientérico y submucoso) a lo largo del tracto gastrointestinal.

La motilidad intestinal depende de la integridad del SNE y consiste en una serie de movimientos de contracción y relajación de los músculos longitudinal y circular del intestino. Estas acciones son coordinadas por las neuronas intrínsecas del plexo mientérico con el propósito de producir la propulsión del fluido y/o contenido alimenticio en dirección anal. Esta función se debe a la interacción entre las neuronas del sistema nervioso entérico (SNE), las células del músculo liso y la mucosa intestinal (Romero-Trujillo, 2012).

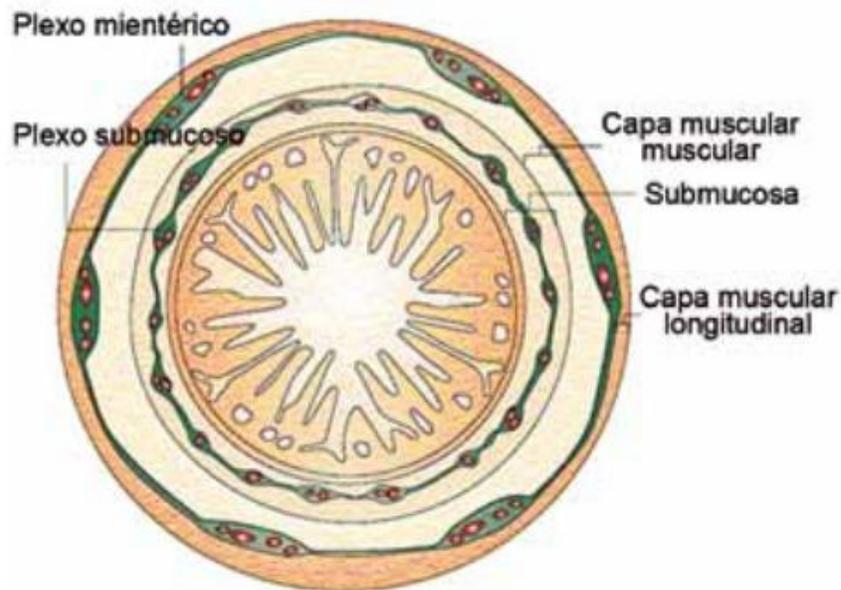


Figura 4. Representación esquemática de un corte transversal del intestino. Las neuronas del Sistema Nervioso Entérico se encuentran organizadas en ganglios nerviosos (verde) y agrupadas en dos plexos (Romero-Trujillo, 2012).

El sistema nervioso entérico contiene diversos tipos de neuronas que pueden ser clasificadas de acuerdo a su funcionalidad.

- En primer lugar se encuentran las **neuronas aferentes intrínsecas primarias** (NAIP), las cuales responden a estímulos mecánicos y químicos, regulan las funciones fisiológicas del tubo digestivo, transmitiendo la información a otras neuronas. Las NAIP se encuentran en ambos plexos nerviosos y son neuronas colinérgicas (Mazzone y cols, 2007; Mayer, 2011).
- Un segundo grupo de neuronas son las **Neuronas motoras**. Éstas inervan las capas musculares del tubo digestivo, vasos sanguíneos y glándulas. Sus cuerpos celulares se encuentran en los ganglios mientéricos, pero puede haber algunos en los ganglios submucosos. De acuerdo a su función

pueden dividirse en excitatorias e inhibitorias. Los principales neurotransmisores contenidos en las neuronas excitatorias son: acetilcolina y taquicininas (substancia P y neuroquininas); mientras que los neurotransmisores de las neuronas inhibitorias son la noradrenalina, el óxido nítrico, péptido intestinal vasoactivo (PIV), ácido gamma-aminobutírico (GABA), trifosfato de adenosina (ATP) y el monóxido de carbono (Mazzone y cols, 2007; Romero-Trujillo, 2012; Mayer, 2011).

- Por último se encuentran las **interneuronas** las cuales se clasifican en ascendentes o descendentes, de acuerdo a la dirección de las señales que emiten (oral – caudal). Se han descrito diversos tipos, siendo las ascendentes principalmente colinérgicas, se proyectan a otras neuronas mientéricas. Las descendentes tienen mayor complejidad neuroquímica; también inervan el plexo submucoso. Estas tienen la función de integrar las señales recibidas por las NAIP para después transmitir las directamente a las neuronas motoras y de esta manera regular la motilidad gastrointestinal (Navarro, 2002; Mazzone y cols, 2007; Mayer, 2011; Romero-Trujillo, 2012).

2.2.2 Desórdenes gastrointestinales

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (León-Ramírez, 2002; Hernández-Cortez y cols, 2011). Las manifestaciones clínicas más destacadas de los desórdenes gastrointestinales son los espasmos que ocasionan dolor abdominal.

Entre las enfermedades del tracto gastrointestinal que se caracterizan por espasmos intestinales se encuentra la diarrea. La diarrea es una alteración de las

heces en cuanto a volumen, fluidez o frecuencia en comparación con las condiciones fisiológicas, que se produce por la disfunción en el transporte de agua y electrolitos a nivel del intestino. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, así como un cambio en su consistencia por el incremento de agua y electrolitos contenidos en ellas. Todo esto condiciona un riesgo, que es la deshidratación y los trastornos del equilibrio hidromineral (Riverón-Corteguera, 1999) que pueden poner en riesgo la vida, especialmente en niños pequeños y personas desnutridas o inmunocomprometidas (THE WHO, 2009).

Generalmente, la diarrea es un síntoma de infección gastrointestinal que puede ser causada por una variedad de bacterias, virus y parásitos; sin embargo, también puede ser provocada por situaciones de tensión emocional o por estados nerviosos alterados.

El tratamiento de la diarrea va a depender de las causas que la generen. Por un lado es necesario diagnosticar la causa que lo originó para iniciar el tratamiento apropiado; por otro, parte importante de su tratamiento está dirigido a aliviar los síntomas que la acompañan y a corregir las complicaciones.

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los síntomas más frecuentes que acompaña a la diarrea es el dolor abdominal tipo cólico, esta manifestación es causada generalmente por espasmos intestinales. Los espasmos son una alteración sobre la motilidad intestinal que se caracterizan por la contracción involuntaria y persistente del músculo liso intestinal. Estos se pueden originar por una alteración a nivel del sistema nervioso entérico (SNE) ó en las células del músculo liso (Galambos, 1954).

Los espasmos intestinales son provocados por dos mecanismos. El principal mecanismo consiste en el desequilibrio del sistema parasimpático y de las

terminaciones colinérgicas en el intestino, lo cual provoca la secreción elevada de acetilcolina. Algunas causas que producen esto son la irritación del tracto intestinal; secreción elevada de hormonas; algún padecimiento; la presencia de agentes patógenos o toxinas; por obstrucción del tracto y; en varias ocasiones, por la predisposición de las personas a sufrir estrés nervioso (Davis, 1988).

El segundo mecanismo consiste en la presencia de sustancias que actúan directamente sobre el musculo liso, sin tener un efecto sobre terminaciones colinérgicas. Esto puede ser ocasionado por algunas sustancias o toxinas que actúan a nivel de canales de calcio (Davis, 1988).

2.2.2.1 Tratamiento farmacológico de los espasmos intestinales

Para el tratamiento de los espasmos, existe un grupo de medicamentos llamados **antiespasmódicos**. Estos medicamentos producen la relajación del musculo liso de la pared de las vísceras huecas, como el intestino, la vesícula biliar, uretra y el útero. Existen dos tipos de antiespasmódicos, los anticolinérgicos y los musculotrópicos (Davis, 1988).

Los **anticolinérgicos** son fármacos capaces de bloquear la acción de la acetilcolina sobre sus efectores autónomos y pueden dividirse en antagonistas nicotínicos y muscarínicos. Los antagonistas nicotínicos bloquean la neurotransmisión ganglionar tanto simpática como parasimpática, por lo que se acompañan de importantes efectos secundarios que los incapacita para la práctica médica. La atropina y sus derivados, al bloquear de forma competitiva los receptores muscarínicos colinérgicos, impiden la acción de la acetilcolina sobre el músculo liso y las glándulas exocrinas, por lo que inhiben la secreción salival y gástrica (Florez, 2008).

Sobre la motilidad gastrointestinal, los anticolinérgicos producen una reducción significativa del tono muscular y de la frecuencia y amplitud de las contracciones,

lo que se traduce en un enlentecimiento del tránsito intestinal. El efecto espasmolítico ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de procesos que supuestamente cursan con aumento de la contractilidad muscular, como el intestino irritable. Los anticolinérgicos más utilizados son: atropina, butilescopolamina, metilescopolamina y dicicloverina (Florez, 2008; Romero-Trujillo, 2012)

El segundo tipo de antiespasmódicos es conocido como **musculotrópicos**, estos son fármacos que relajan la musculatura lisa de la pared gastrointestinal por un mecanismo directo, es decir, no mediado por receptores de transmisores actualmente conocidos. Es posible que actúen intracelularmente, interfiriendo alguno de los procesos moleculares necesarios para producir la contracción muscular. Por ello, su actividad inhibidora es amplia, sea cual fuere el estímulo desencadenante de la contracción o espasmo, y por consiguiente más intensa que la de los fármacos estrictamente anticolinérgicos. Entre estos fármacos se encuentran la papaverina, la mebeverina, la pramiverina y la trimebutina (Lange, 2007; Florez, 2008)

Por otro lado, para el tratamiento de los espasmos intestinales inducidos específicamente por diarrea, pueden utilizarse **fármacos antidiarréicos** como: *Loperamida*, *codeína* y *difenoxilato*. Éstos son fármacos opiáceos que inhiben la motilidad intestinal por acción central y periférica al interactuar sobre receptores μ , producen un aumento del tono del esfínter anal, disminución de la motilidad y aumento de la absorción hidroelectrolítica. (Riverón, 1999; Florez, 2008)

Otras opciones terapéuticas para el tratamiento de los espasmos intestinales es el uso de extractos de plantas. Basados en su empleo en la medicina tradicional, existen estudios científicos de plantas medicinales que desenlazan en el descubrimiento de principios activos para la producción de nuevos fármacos. Este es el caso de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*, que dentro de la medicina

tradicional se utiliza para el tratamiento de algunos desordenes gastrointestinales.
(Canales-Martinez y cols, 2006)

A falta de evidencia científica que corrobore el uso de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* como antiespasmódico y antidiarreico en la medicina tradicional, se realizó esta investigación la cual pretende avalar el uso popular del Toronjil Blanco para el tratamiento de los espasmos intestinales y para la disminución de la motilidad intestinal.

3. JUSTIFICACIÓN

Agastache mexicana ssp. xolocotziana como se mencionó anteriormente, es conocida comúnmente como “toronjil blanco” y es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana sola o en combinación con otras especies para tratar distintos padecimientos. Entre sus usos más comunes reportan su efecto como antidepresivo, eupéptico, antiespasmódico, diaforético, antidiarreico y para tratar el “espanto”, entre otros (Linares y cols, 1995; Santillan-Ramirez y cols, 2008; González-Trujano y cols, 2012). Sin embargo, no existen suficientes estudios científicos que justifiquen sus diferentes efectos terapéuticos; o bien, que expliquen su mecanismo de acción ante algún padecimiento.

Estudios farmacológicos recientes han demostrado el efecto antinociceptivo del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* en ratones sometidos a dolor visceral (modelo de writhing ó estiramiento abdominal) (González-Trujano y cols, 2012), lo que sustenta su uso en la medicina tradicional para el alivio del dolor producido por espasmos intestinales. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que muestren la actividad del extracto sobre el tejido intestinal ni su posible efecto antidiarreico.

Por lo anterior, con este trabajo se pretende demostrar el efecto antiespasmódico y antidiarreico del extracto metanólico de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*. Se dispone de diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad biológica de extractos vegetales. Para el caso particular de la actividad espasmolítica o antiespasmódica, uno de los modelos más utilizados es el íleon aislado de cobayo *in vitro*; mientras que, para la evaluación de la actividad antidiarreica, se puede emplear el modelo de tránsito intestinal en ratones *in vivo* (Ruiz-Salvador, 2004).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar y evaluar la actividad antiespasmódica y antidiarreica del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* (toronjil blanco) en modelos experimentales.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo de íleon aislado de cobayo pre-contráido con cloruro de potasio.
- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo de íleon aislado de cobayo en la contracción inducida con acetilcolina.
- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo de íleon aislado de cobayo en la contracción inducida con estimulación eléctrica.
- Analizar el posible mecanismo de acción que presenta el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo de íleon aislado de cobayo utilizando diversos bloqueadores y antagonistas específicos.
- Evaluar el efecto antidiarreico del extracto metanólico de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo de motilidad intestinal en ratón, utilizando loperamida y atropina como fármacos de referencia.

5. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional la *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* es utilizada por su efecto espasmolítico y antidiarreico, entonces su extracto metanólico producirá un efecto relajante sobre el íleon de cobayo y una disminución de la motilidad intestinal en ratones.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*

El extracto utilizado para esta investigación, fue proporcionado por la Dra. María Eva González Trujano del laboratorio de Microdiálisis del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Para la preparación del extracto se siguió el siguiente procedimiento.

El material vegetal de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* se obtuvo de huertas localizadas en San José Tlacotitlan, Ozumba, Edo. de México. Se prepararon ejemplares de herbario que se identificaron por el Dr. Robert Bye y la M.C. Edelmira Linares y una muestra se depositó el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), con el número de registro 1121.

Las flores de material colectado se separaron del resto de la planta y se secaron a temperatura ambiente. Después del secado, las flores secas se molieron en un molino de mano y se colocaron en un matraz para someterlas a maceración con metanol. El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida y el extracto crudo libre de metanol se pesó para obtener el rendimiento final con respecto al peso seco del material vegetal.

6.2 Animales de experimentación

Para la evaluación del efecto espasmolítico del extracto de la planta se utilizaron cobayos macho de cepa Hartley, de 400 a 600 gramos, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de 30-80% y un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. 24 horas antes del experimento, se les retiró el alimento manteniendo el agua ad libitum.

Para la evaluación del efecto antidiarreico del extracto de la planta se utilizaron ratones macho cepa Taconic, de 25-30gramos, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de 30-80% y un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. 24 horas antes de los experimentos, se les retiró el alimento manteniendo el agua ad libitum.

6.3 Métodos

6.3.1 Evaluación del efecto antiespasmódico. Modelo de íleon aislado de cobayo

6.3.1.1 Equipo

- Polígrafo Grass Modelo RPS7C8B
- Recirculador PolyScience Modelo 73A0AA1B
- Estimulador eléctrico S88 stimulator de GRASS

6.3.1.2 Preparación del tejido

Los cobayos se sacrificaron por dislocación cervical, se realizó una incisión abdominal y se extrajeron 15 cm de íleon. El segmento extraído se colocó inmediatamente en una solución Krebs a 37°C y con burbujeo de carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) para mantener las condiciones fisiológicas. La solución Krebs se compone de NaCl [118.0 mM], NaHCO_3 [25 mM], KCl [4.7 mM], MgCl_2 [1.2 mM], NaH_2PO_4 [1.2 mM], Dextrosa [11.0 mM], CaCl_2 [2.5 mM] y colina [0.3 mM]. El tejido se limpió del tejido conectivo y del bolo alimenticio que se encontraba en el interior del mismo. Se cortaron seis anillos de 2cm cada uno y se colocaron en cámaras de órgano aislado con solución Krebs a 37°C y con burbujeo de carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). Los tejidos se fijaron a un transductor de presión, el cual se encarga de detectar la respuesta contráctil y enviarla al polígrafo. Los

tejidos se dejaron estabilizar durante 60 minutos con una tensión de 1 gramo y perfusión continua. Una vez transcurrido el tiempo de estabilización del tejido, se administró a cada segmento 0.2 mL de una solución de acetilcolina (ACh) la cual permitió tener dentro de cada cámara una concentración de $[1 \times 10^{-5} \text{ M}]$, de esta manera se determinó la viabilidad del tejido. Los tejidos que mostraron una contracción cercana a los 4.5 g son los que se utilizaron en los experimentos posteriores. Los tejidos que no cumplían con este criterio de inclusión fueron eliminados del estudio. Al terminar esta prueba se realizó el lavado del tejido el cual consiste en el cambio total de solución Krebs.

6.3.1.3 Efecto del extracto sobre el tejido pre-contraído con KCl.

En un grupo de experimentos y tras la preparación del tejido descrita anteriormente, cada segmento de tejido fue contraído con 0.2 mL de una solución de KCl [32 mM]. Se esperó a que el tejido alcanzara una meseta máxima estable que perdurara como mínimo 5 min. Una vez alcanzada la contracción estable del tejido, se adicionó a cada cámara una concentración del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* para determinar su efecto sobre el tejido pre contraído. Las concentraciones del extracto que se evaluaron fueron 10, 31.6, 100, 178 y 316 $\mu\text{g/mL}$. El tejido se lavó dos veces después de la adición de cada concentración del extracto. Después de lavar el tejido y antes de contraer nuevamente el tejido con KCl, el tejido se dejó reposar entre 15 y 20 minutos, con perfusión constante hasta que recuperó su actividad basal y se repitió el procedimiento para cada concentración (Moazedi y cols, 2007; Fatehi y cols, 2004; Ventura-Martínez y cols, 2011).

El porcentaje del efecto relajante de cada concentración del extracto sobre el tejido pre-contraído con KCl se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Relajacion} = \frac{\text{g de tensión tras la administración del extracto} \times 100}{\text{g de tensión del tejido pre - contraído con KCl [32mM]}}$$

6.3.1.4 Efecto del extracto en el tejido estimulado químicamente con acetilcolina

En otro grupo de experimentos, y tras la preparación del tejido descrita inicialmente, se realizó una curva concentración respuesta acumulativa de acetilcolina [1×10^{-9} - 1×10^{-5} M]. Al terminar la curva se lavó el tejido y se dejó estabilizar durante 20 min. Posteriormente, se administró en cada cámara una concentración del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* y se dejó incubar el tejido por 10 minutos. Después, se corrieron las curvas acumulativas de ACh en presencia del extracto para evaluar su efecto sobre la contracción inducida por ACh. Las concentraciones del extracto que se evaluaron fueron 10, 31.6, 100 y 316 $\mu\text{g/mL}$. El tejido se lavó dos veces después de la adición de cada concentración del extracto. Después de lavar el tejido y antes de incubar nuevamente el tejido con la siguiente concentración del extracto, el tejido se dejó reposar entre 15 y 20 minutos, con perfusión constante hasta que recuperó su actividad basal y se repitió el procedimiento.

La respuesta máxima obtenida con la concentración de ACh de 1×10^{-5} M en la curva control, se consideró como el 100% del efecto contráctil, y en base a este valor, se obtuvieron los porcentajes del efecto contráctil producido en las curvas en presencia del extracto [10, 31.6, 100, 316 $\mu\text{g/ml}$] (Ventura-Martínez y cols, 2011; Cechinel-Filho, 2007; Sánchez-Mendoza, 2007). Dicho efecto se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Contracción} = \frac{\text{g de tensión tras la administración del extracto} \times 100}{\text{g de tensión obtenidos por ACh } 1 \times 10^{-5} \text{ M en la curva control}}$$

6.3.1.5 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica

En un tercer grupo de experimentos, tras la preparación del tejido, descrita inicialmente, cada segmento se estimuló eléctricamente a una intensidad de 14 volts, una frecuencia de 0.3 Hz y una duración de 3 ms, utilizando un estimulador (S88 stimulator de GRASS). Al obtener la contracción máxima de cada tejido bajo estimulación eléctrica, se administró la concentración correspondiente del extracto metanólico y se dejó incubar por 10 minutos. Las concentraciones del extracto que se evaluaron fueron 10, 31.6, 100 y 316 µg/mL. El tejido se lavó después de la adición de cada concentración del extracto. Después de lavar el tejido y antes de estimularlo eléctricamente, el tejido se dejó en reposar entre 15 y 20 minutos, con perfusión constante hasta que recuperó su actividad basal y se repitió el procedimiento con la siguiente concentración del extracto (Abalo y cols, 2000).

La respuesta máxima obtenida a la estimulación eléctrica con 14 V, 0.3Hz y 3ms sin tratamiento se consideró como el 100% del efecto contráctil, y en base a este valor, se calculó el porcentaje de contracción inducida con estimulación eléctrica (EE) en presencia de las diferentes concentraciones del extracto (Ventura-Martínez y cols, 2011; Cechinel-Filho, 2007; Sánchez-Mendoza, 2007). Dicho efecto se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Contracción} = \frac{g \text{ de tensión tras la administración del extracto} \times 100}{g \text{ de tensión obtenidos por EE a 14V en la curva control}}$$

6.3.1.6 Determinación del posible mecanismo de acción del efecto espasmolítico de *A .mexicana ssp. xolocotziana*

Para tratar de averiguar el mecanismo involucrado en el efecto espasmolítico del extracto se utilizó el procedimiento del tejido pre-contraído con KCl, utilizando

diferentes bloqueadores y antagonistas de las principales vías encargadas de la contracción y relajación del músculo liso. Para esto, en otro grupo de experimentos se procedió a pre contraer el tejido con KCl y, antes de administrar la concentración del extracto a evaluar, se incubó el tejido con el bloqueador o antagonista a evaluar, con las concentraciones y tiempos que se mencionan a continuación:

- a) Hexametonio [0.5 mM] por 10 min.
- b) Indometacina [1 µM] por 15 min.
- c) L-NAME [100 µM] por 20 min.

Trascurrido el tiempo correspondiente, se adicionó la concentración de 100 µg/ml del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y se evaluó su efecto sobre el tejido pre contraído en la presencia de diversos compuestos (Ventura-Martinez y cols, 2011).

6.3.2 Evaluación del efecto antidiarreico. Modelo de motilidad intestinal en ratón

Se formaron 3 grupos de 6 ratones cada uno. Al grupo uno se le administró vehículo; al grupo 2 Loperamida (5mg/kg) (Vitali y cols, 2006) y a los grupos 3, 4, 5 y 6 las dosis de 31.6, 100, 316 y 560 mg/kg del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*, un grupo por dosis. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal excepto en Loperamida, la cual se administró vía oral.

Quince minutos después de la administración del tratamiento correspondiente, a todos los grupos experimentales se les administró 0.2ml/10g de una suspensión de 5% de carbón activado en una suspensión acuosa de goma arábica al 10%. (Mujumdar y cols, 2000). Veinte minutos después, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo cuidadosamente el tracto gastrointestinal de cada

animal desde el píloro hasta el ciego. Se determinó el recorrido que realizó el carbón activado en cada grupo experimental midiendo la distancia desde el píloro hasta la parte delantera del carbón (A), y la longitud total del intestino delgado (B). Se calculó la motilidad intestinal de cada ratón, la cual se expresará como un porcentaje: (Mujumdar y cols, 2000; Kimura y cols, 2011; Gagnon y cols, 2011).

$$\% \text{ de Motilidad intestinal} = \frac{A}{B} \times 100$$

6.4 Análisis de datos

En todos los casos los datos se expresaron como la media \pm error estándar (E.E.).

Tanto en los datos de tejido pre-contraído con KCl como en los obtenidos con estimulación eléctrica, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para determinar la diferencia entre los tratamientos y comparar el efecto de las concentraciones del extracto con respecto al control; mientras que en el caso del tejido estimulado químicamente con ACh, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido por una prueba Bonferroni. En ambos casos un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

En la prueba de motilidad intestinal, a los datos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

El análisis estadístico en todos los casos se realizó mediante el programa GraphPad InStat versión 5.0 para Windows.

7. RESULTADOS

7.1 MODELO DE ÍLEON AISLADO DE COBAYO.

Determinación del efecto antiespasmódico del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana*.

7.1.1 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por ACh

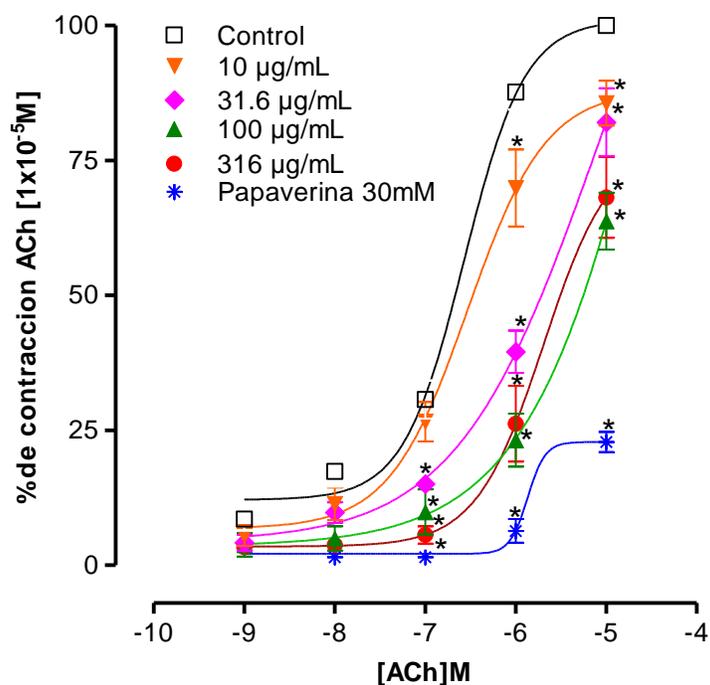


Figura 5. Curvas concentración respuesta de ACh en ausencia y presencia de varias concentraciones del extracto MeOH de *A. mexicana ssp. xolocotziana* en íleon de cobayo. Se utilizó como control positivo la papaverina (30 mM). Los resultados se muestran en % de contracción. Cada punto representa la media \pm E.E. (n=6). *p<0.05, ANOVA de dos vías, Bonferroni.

En la Figura 5 se muestran las curvas concentración respuesta acumulativas de ACh [1×10^{-9} – 1×10^{-5} M] en ausencia y presencia de distintas concentraciones de extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* [10, 31.6, 100 y 316 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y papaverina [30 mM]. El eje de las abscisas representa la concentración de la ACh en escala logarítmica; mientras que, el eje de las ordenadas representa el porcentaje de contracción inducido por ACh, calculado a partir de la respuesta máxima de ACh en la curva control.

Los resultados muestran que el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* reduce de manera concentración dependiente la contracción inducida por ACh en el íleon de cobayo. También la papaverina, que es un relajante del musculo liso utilizada comúnmente como control positivo, disminuyó la contracción inducida por la ACh hasta un 77.15 %, comprobando la capacidad del tejido para inhibir el efecto contráctil de la ACh.

Sólo las concentraciones a partir de 31.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del extracto disminuyen de manera significativa la contracción inducida por ACh a partir de la concentración de 1×10^{-7} M. Por otro lado, a concentraciones menores del extracto (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) este efecto inhibitorio sobre la contracción con ACh fue evidente a partir de la concentración de 1×10^{-6} M. Estos datos fueron obtenidos por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido por una prueba Bonferroni.

Para determinar el comportamiento del efecto contráctil de la ACh y su modificación en presencia del extracto se obtuvieron las áreas bajo la curva (ABC) de las curvas dosis respuesta a ACh con los diferentes tratamientos. Este análisis mostró que todas las concentraciones del extracto disminuyeron significativamente la contracción inducida por ACh (Cuadro 1). Por otro lado, la papaverina, utilizada como control positivo, fue capaz de inhibir casi completamente la contracción inducida por la ACh (Figura 5 y Cuadro 1) mostrando la capacidad de relajación del tejido bajo estas condiciones experimentales. El efecto inhibitorio máximo del

extracto sobre la contracción inducida por la ACh se alcanzó a la dosis de 100 µg/mL; sin embargo, esta concentración del extracto no alcanzó el efecto producido por la papaverina bajo estas condiciones experimentales.

Cuadro 1. Área bajo la curva (ABC) del efecto contráctil de la ACh [1×10^{-9} – 1×10^{-5} M] en presencia de extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y Papaverina en el íleon de cobayo.

Tratamiento	ABC del efecto contráctil
Control	190.08 ± 9.15
Extracto MeOH 10 µg/mL	153.52 ± 12.72*
Extracto MeOH 31.6 µg/mL	107.54 ± 3.83*
Extracto MeOH 100 µg/mL	71.78 ± 11.86*
Extracto MeOH 316 µg/mL	71.34 ± 9.17*
Papaverina 30mM	22.48 ± 3.32*

*ANOVA seguida de una prueba de Dunett ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Concentración Efectiva 50 (CE50) del efecto contráctil inducido por ACh en presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el íleon de cobayo.

Tratamiento	CE50 de ACh (M)
Control	$3.5 \pm 1.7 \times 10^{-7}$
Extracto MeOH 10 µg/mL	$4.3 \pm 1.1 \times 10^{-7}$
Extracto MeOH 31.6 µg/mL	$10.7 \pm 1.5 \times 10^{-7}$ *
Extracto MeOH 100 µg/mL	$36.4 \pm 10.5 \times 10^{-7}$ *
Extracto MeOH 316 µg/mL	$55.0 \pm 1.8 \times 10^{-7}$ *

*ANOVA seguida de una prueba de Dunett ($p < 0.05$)

Como se puede observar en la Figura 5, las curvas concentración respuesta a la ACh se desplazan a la derecha en presencia de las diferentes concentraciones del extracto, por lo que se realizó el análisis de los valores de la concentración Efectiva 50 (CE₅₀) de las CCR. Este análisis señala que existe una diferencia significativa en las CE₅₀ de la ACh en presencia de 31.6, 100 y 316 µg/mL del extracto en comparación con el control (ANOVA, seguida de una prueba de Dunnett, p<0.05).

7.1.2 Efecto del extracto sobre el tejido precontraído con KCl.

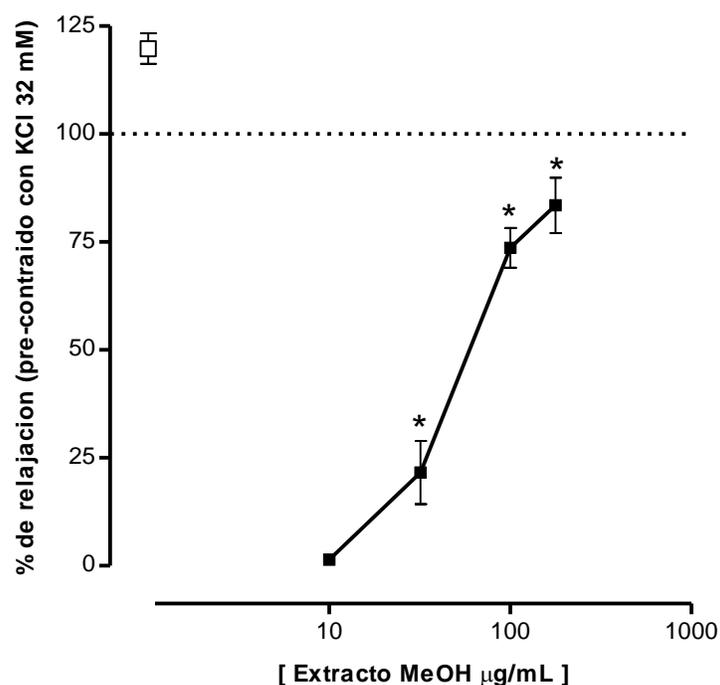


Figura 6. Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* en el íleon de cobayo precontraído con KCl [32 mM]. Cada punto representa la media ±EE. (n=6). *p<0.05, ANOVA, Dunnett.

Como se mencionó en el protocolo experimental, también se evaluó el efecto del extracto sobre el tejido precontraído con KCl (32 mM). Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 6, en donde en el eje de las abscisas tenemos la concentración del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en escala logarítmica; y, en el eje de las ordenadas, el porcentaje de relajación producido por las diferentes concentraciones del extracto en el íleon de cobayo precontraído con KCl [32 mM].

Como se muestra en la figura 6, el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* produce una relajación concentración dependiente del tejido precontraído con KCl. Las concentraciones del extracto [31.6, 100 y 178 µg/mL] muestran una diferencia significativa en el efecto relajante en comparación con el vehículo (Cuadro 3). Así mismo, la papaverina (30 mM) mostró el máximo efecto relajante sobre el tejido bajo estas condiciones experimentales (Fig. 6 y Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto relajante del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y de Papaverina en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32 mM].

Tratamiento	% Relajación
Control	1 ± 1.66
Extracto MeOH 10 µg/mL	1.41 ± 0.90
Extracto MeOH 31.6 µg/mL	21.63 ± 7.31 *
Extracto MeOH 100 µg/mL	73.63 ± 0.5 *
Extracto MeOH 178 µg/mL	83.55 ± 6.38 *
Papaverina 30mM	119.64 ± 3.48 *

*ANOVA seguida de una prueba de Dunett (p<0.05)

La papaverina, como ya se mencionó anteriormente, se utiliza como control positivo para comprobar la máxima capacidad de relajación que tiene el tejido bajo

estas condiciones experimentales. Como se puede observar en la figura 6, el efecto relajante de la papaverina es significativamente mayor en comparación con el efecto máximo del extracto; sin embargo, el efecto relajante del extracto es de casi el 85%.

7.1.3 Efecto del extracto sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica

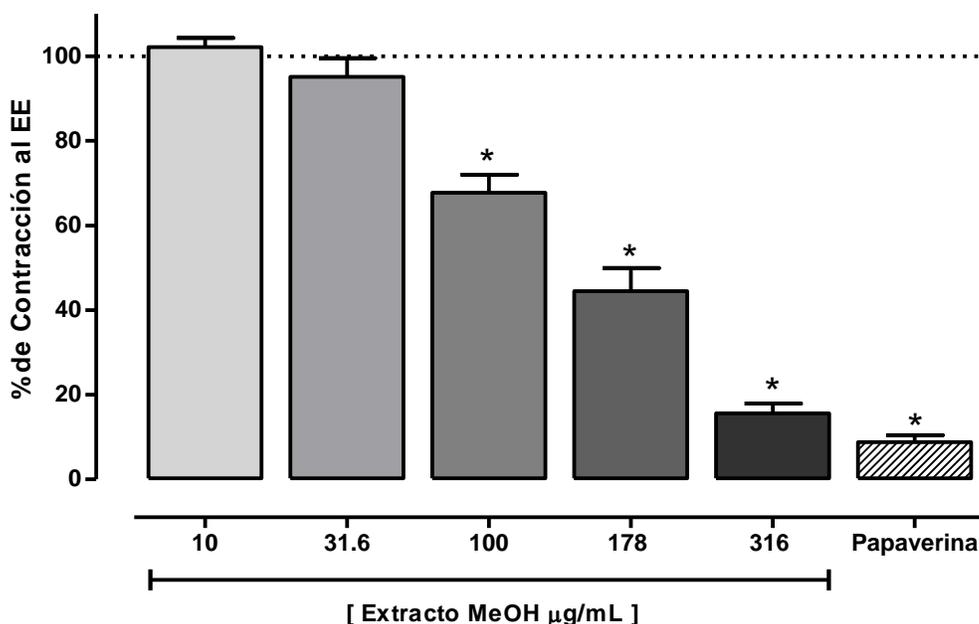


Figura 7. Contracción inducida por estimulación eléctrica (EE) (14 volts con una frecuencia de 0.3 Hz y pulsaciones de 3 ms) en el íleon de cobayo en ausencia y en presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. También se muestra el efecto de la Papaverina [30 mM], la cual se utilizó como control positivo. La línea punteada representa el 100% de la contracción inducida por el estímulo eléctrico en ausencia del extracto. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6). *p<0.05, ANOVA, Dunnett.

En la figura 7 se muestra el efecto del extracto sobre el tejido precontraído con estimulación eléctrica. En el eje de las abscisas se muestra el tratamiento evaluado y, en el eje de las ordenadas, el porcentaje de contracción inducido por estimulación eléctrica (14 volts, 0.3 Hz y 3 ms de duración) en el íleon de cobayo. La máxima contracción inducida por el estímulo eléctrico se representa como 100%.

Los resultados muestran que el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* disminuye de manera concentración-dependiente la máxima contracción inducida por el estímulo eléctrico, alcanzando significancia estadística, en comparación con el control, con las concentraciones de 100, 178 y 316 µg/mL (67.79 ± 4.26 , 44.48 ± 5.48 , 15.59 ± 2.33 % vs 100%, respectivamente, ANOVA, Dunnett, $p < 0.05$).

Cuadro 4. Porcentaje de relajación del íleon de cobayo estimulado eléctricamente en ausencia y presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y papaverina.

Tratamiento	% Relajación
Control	0
Extracto MeOH 10 µg/mL	-2.20 ± 2.17
Extracto MeOH 31.6 µg/mL	4.86 ± 4.44
Extracto MeOH 100 µg/mL	$32.21 \pm 4.26^*$
Extracto MeOH 316 µg/mL	$84.41 \pm 2.33^*$
Papaverina 30mM	$91.21 \pm 1.67^*$

*ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$)

Para determinar la capacidad de relajar al tejido estimulado eléctricamente, se utilizó nuevamente como control positivo a la papaverina [30 mM], la cual disminuyó la contracción del tejido a 15.59 ± 2.33 %.

En el cuadro 4 se muestran los porcentajes de relajación sobre la contracción inducida eléctricamente en el íleon de cobayo. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre el efecto relajante de la concentración más alta del extracto [316 µg/mL] y la papaverina (84.41 ± 2.33 vs 91.21 ± 1.67 , t de student, $p < 0.05$) bajo estas condiciones experimentales.

7.1.4 Determinación del posible mecanismo de acción del efecto antiespasmódico del extracto

Para determinar el posible mecanismo de acción involucrado en el efecto antiespasmódico del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* se utilizó el protocolo del tejido precontraído con KCl, y la concentración del extracto que indujo el máximo efecto relajante en ese protocolo experimental (100 µg/mL).

En la figura 8 se muestra en el eje de las abscisas el tratamiento evaluado y en el eje de las ordenadas el porcentaje de relajación inducido por el tratamiento respectivo sobre el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32 mM]. En esta figura se muestra el efecto del pre tratamiento con hexametonio, un bloqueador ganglionar; indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa; y L-NAME, un inhibidor de la oxido nítrico sintetasa, sobre la relajación inducida por 100 µg/mL del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana*.

Los resultados muestran que el pre tratamiento con Hexametonio (0.5 mM) e indometacina (1 µM) disminuyeron de manera significativa la relajación inducida por el extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* (65.21 ± 3.23 y 63.04 ± 7.14 vs 42.56 ± 5.15 , respectivamente, ANOVA, Dunnett, $p < 0.05$). Sin embargo, el pre tratamiento con el L-NAME [100 µM] no alteró la respuesta relajante inducida por el extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* sobre el tejido precontraído con KCl.

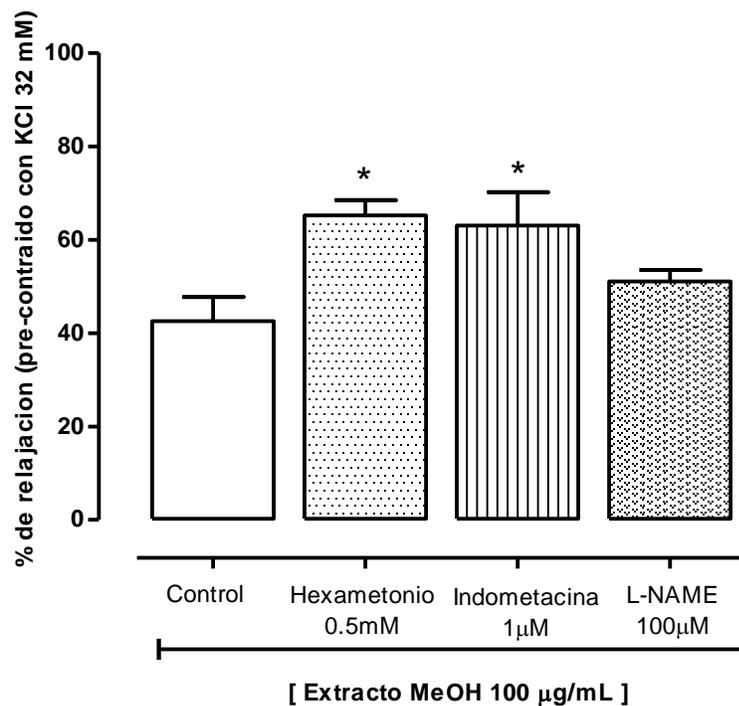


Figura 8. Efecto relajante del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en el íleon de cobayo en presencia de hexametonio, indometacina y L-NAME. Los resultados se expresan en % de relajación del tejido pre-contraído con KCl [32 mM]. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6). * $p < 0.05$, ANOVA, Dunnett.

7.2 MODELO DE MOTILIDAD INTESTINAL EN RATÓN.

7.2.1 Efecto antidiarreico del extracto en ratón

Con el propósito de determinar el efecto del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* sobre la motilidad intestinal en un animal íntegro se utilizó el modelo del desplazamiento del carbón activado, el cual ya se detalló en la metodología. En la Figura 9 se muestra el porcentaje de la motilidad intestinal en ratones con diferentes tratamientos.

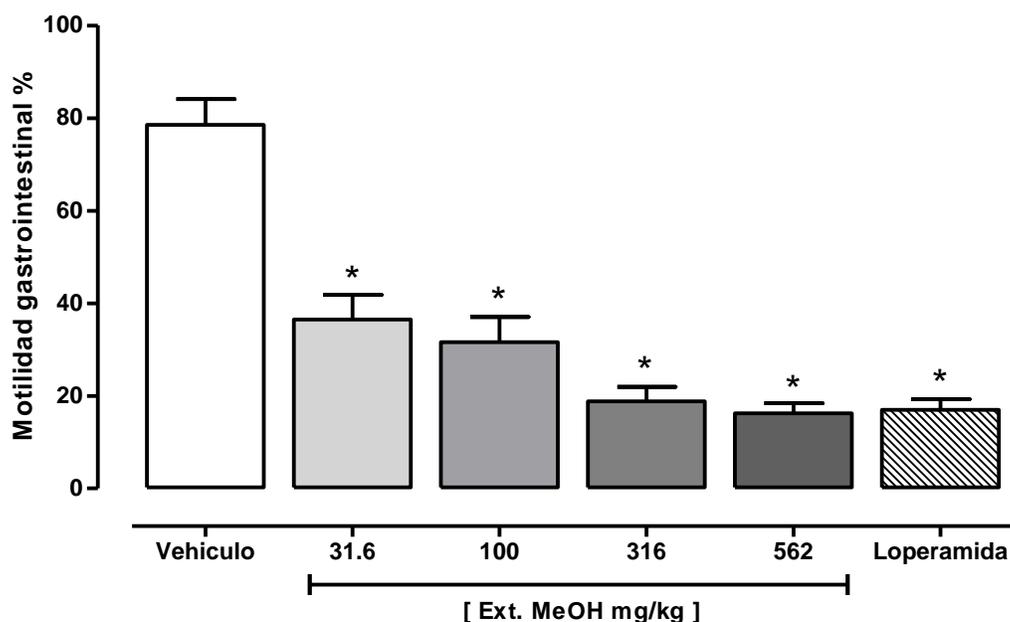


Figura 9. Porcentaje de la motilidad intestinal en ratones en ausencia y en presencia del extracto MeOH de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. También se muestra el efecto de la loperamida [5 mg/kg], la cual se utilizó como control positivo. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6). *p<0.05, ANOVA, Dunnett.

Los resultados muestran que el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* disminuyó de manera dosis dependiente la motilidad intestinal en ratones en comparación con el grupo control (vehículo). Esta disminución se produjo a partir de la dosis más baja del extracto (31.6 mg/kg) y se mantuvo con las dosis subsecuentes (100, 316 y 562 mg/kg); (36.48 \pm 6.05, 31.61 \pm 5.46, 18.79 \pm 3.13, 16.19 \pm 2.19 vs 78.52 \pm 5.6, respectivamente, p<0.05; ANOVA, Dunnett). También la loperamida, utilizada como control positivo en este modelo, disminuyó de manera significativa la motilidad intestinal en comparación con el vehículo (16.98 \pm 2.27 vs 78.52 \pm 5.6 %, t de student, p<0.05). El efecto máximo del extracto sobre la disminución en la motilidad intestinal se obtuvo con la dosis de 316 mg/kg y este efecto no mostró diferencia significativa al obtenido con el control positivo, loperamida (5 mg/kg) (18.79 \pm 3.13 vs 16.98 \pm 2.27).

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Agastache mexicana ssp. *xolocotziana* es conocida comúnmente como "toronjil blanco" y es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana sola o en combinación con otras especies para tratar distintos padecimientos. Entre sus usos más comunes reportan su efecto como antidepresivo, eupéptico, antiespasmódico, diaforético, antidiarreico y para tratar el "espanto", entre otros (Linares y cols, 1995; Santillan-Ramirez y cols, 2008; González-Trujano y cols, 2012).

En el presente estudio se desarrolló un bioensayo que muestra el efecto relajante inducido por el extracto metanólico de las inflorescencias de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* sobre la musculatura lisa del tracto gastrointestinal. Este efecto se determinó mediante el uso de dos modelos experimentales, uno *in vitro* en el íleon aislado de cobayo y otro *in vivo* en un modelo de motilidad intestinal en ratones, los cuales nos ayudaran a corroborar el efecto antiespasmódico que se le ha atribuido a esta planta en la medicina tradicional.

8.1 Modelo de íleon aislado de cobayo

En el modelo de íleon aislado de cobayo, un modelo *in vitro*, se determinó la actividad antiespasmódica del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* bajo tres protocolos experimentales y, en cada caso, el efecto del extracto se comparó con papaverina, un antiespasmódico musculotrópico bien caracterizado (Martin y cols, 1993; Paula y cols, 2003).

En el primer protocolo se utilizó como espasmógeno la acetilcolina, que es el principal neurotransmisor excitatorio responsable del aumento de la tonicidad del intestino delgado. Este neurotransmisor actúa sobre los receptores muscarínicos M₃ en las células del musculo liso. (Ehlert y cols, 1997) Los receptores M₃ están acoplados a una proteína G₀ y están asociados directamente a la respuesta contráctil del musculo liso (Sawyer y Ehlert, 1998). El mecanismo de acción de la

acetilcolina a través de los receptores M_3 se lleva a cabo de la siguiente manera: la acetilcolina al activar el receptor M_3 activa a la proteína G_0 acoplada a este receptor, produciendo la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato por la fosfolipasa C. Como producto de esta hidrólisis, se genera el segundo mensajero trifosfato de inositol (IP_3) que actúa en sus receptores que se encuentran en la membrana del retículo sarcoplásmico. Esta acción permite el incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} debido a su salida del retículo sarcoplásmico. Tras la salida del Ca^{2+} , éste se une a la calmodulina, una proteína con 4 sitios de unión a Ca^{2+} , la cual actúa como intermediario para la activación de la cinasa de miosina de cadena corta (MLCK). La MLCK lleva a cabo la fosforilación de miosina de cadena corta generando que esta se desplace entre los filamentos de actina, produciendo, finalmente, la contracción de las fibras musculares del musculo liso (Rang y Dale, 2008). Los resultados de este estudio muestran una inhibición concentración dependiente del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* sobre la contracción de acetilcolina, lo cual se interpreta como efecto antiespasmódico.

El segundo protocolo utilizado en este estudio para demostrar la actividad antiespasmódica del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* consistió en probar el efecto del extracto sobre el tejido precontraído con una solución de KCl [32 mM]. Este protocolo ha sido utilizado en diversos estudios en donde se evalúa el efecto relajante o antiespasmódico de diversos compuestos y/o extractos naturales (Fatehi y cols, 2004; Moazedi y cols, 2007; Cechinel-Filho y cols, 2007; Ventura-Martínez y cols, 2011). Éste se basa en la contracción del musculo liso como consecuencia de la despolarización membranal producida por una alta concentración de potasio (K^+). El incremento de K^+ extracelular activa un mecanismo electromecánico que induce la despolarización de la membrana, ocasionando la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula, y por consiguiente, la contracción de las fibras musculares

(Mita y cols, 2002). El efecto final se observa como una contracción sostenida, que en el caso del íleon de cobayo, se alcanza en aproximadamente 5 min y se mantiene por más de 30 min. Bajo este protocolo experimental, la administración del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* produjo un efecto relajante concentración dependiente de casi el 85%.

Finalmente, el tercer protocolo experimental utilizado en este estudio para demostrar la actividad antiespasmódica del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* consistió en probar el efecto del extracto sobre el tejido precontraído con un estímulo eléctrico. Se sabe que la estimulación eléctrica de este tejido induce la liberación de varios neurotransmisores desde las neuronas mientéricas, principalmente ACh (Bornstein y cols, 2004). Como ya se mencionó anteriormente, este neurotransmisor actúa sobre los receptores muscarínicos M₃ en las células del musculo liso, los cuales están acoplados a una proteína G₀ y están asociados directamente a la respuesta contráctil del musculo liso (Ehlert y cols, 1997; Sawyer y Ehlert, 1998; Gerthoffer, 2005). También se sabe, que la ACh actúa sobre receptores nicotínicos en las neuronas del SNE induciendo una mayor liberación de ACh. Sin embargo, además de la liberación de acetilcolina desde las neuronas mientéricas, también se liberan otros neurotransmisores de tipo inhibitorio como el óxido nítrico ó la noradrenalina. Esto explica que en general, en un tejido sano, la contracción inducida por el estímulo eléctrico es menor a la inducida por la administración exógena de ACh. Los resultados de este estudio muestran que, al igual que en el protocolo anterior, la administración del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* produjo un efecto relajante concentración dependiente de casi el 85% en el tejido estimulado eléctricamente.

En los tres protocolos utilizados en este estudio se determinó que el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* muestra un efecto espasmolítico del extracto en el íleon aislado de cobayo. En todos los casos se utilizó como control

positivo a la papaverina, un agente antiespasmódico bien caracterizado (Matin y cols, 1993; Paula y cols, 2003) que nos permitió determinar la capacidad máxima de relajación del tejido en nuestras condiciones experimentales, además de comparar su efecto con el producido por el extracto. De esta manera, se determinó que la papaverina induce una relajación de más del 100% en el tejido precontraído con KCl, y de cerca del 95% en la contracción inducida por estimulación eléctrica y por ACh; mientras que, el extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* produce un efecto relajante menor al de la papaverina en todos los casos, de cerca del 85%. Esto sugiere que, con las concentraciones utilizadas del extracto, alcanzamos el máximo efecto relajante inducido por el extracto, independientemente de la capacidad de relajación del propio tejido.

La papaverina es un alcaloide extraído del opio que induce relajación del músculo liso por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa, causando significativa elevación de los niveles AMP cíclico. La elevación intracelular de este segundo mensajero estimula la acumulación de calcio hacia almacenes intracelulares disminuyendo sus concentraciones citosólicas ocasionando la relajación del músculo liso (Sunagane y cols, 1982). También altera la respiración mitocondrial de las células por inhibición de la fosforilación oxidativa (Takeharu y cols, 1998)

8.2 Modelo de motilidad intestinal en ratón

Además de determinar el efecto espasmolítico del extracto, en este estudio también se determinó su efecto sobre el tránsito gastrointestinal en ratones. Este modelo *in vivo*, utilizado por varios autores (Yamazaki y cols, 2000), consiste en administrar carbón activado a ratones por vía intragástrica y medir la longitud del desplazamiento del carbón con y sin tratamiento. Este modelo es utilizado para determinar el efecto antidiarreico de diversas sustancias, ya que parte del tratamiento de la diarrea consiste en administrar fármacos que disminuyan la motilidad gastrointestinal. Por lo que, midiendo el tránsito gastrointestinal,

también se puede determinar el efecto de los fármacos sobre la motilidad gastrointestinal (Toso y cols, 2002).

Los resultados de este estudio muestran que el extracto metanólico de las inflorescencias de *A. mexicana ssp. xolocotziana* disminuye la motilidad intestinal en el ratón. El efecto máximo obtenido con el extracto fue similar al de la loperamida, un antidiarreico usado clínicamente por su efecto inhibitorio sobre la motilidad intestinal. La loperamida es un opioide que reduce los movimientos peristálticos e incrementan el tiempo de tránsito intestinal a través de la estimulación de los receptores mu del intestino. Esto inhibe la liberación de acetilcolina y prostaglandinas de las neuronas mientéricas disminuyendo así la contracción del musculo liso intestinal (Castañeda-Pomeda y cols, 2008)

Por otro lado, estudios farmacológicos recientes han demostrado el efecto antinociceptivo del extracto metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana* en un modelo de dolor visceral en ratones (modelo de writhing) (González-Trujano y cols, 2012). Este modelo consiste en la administración intraperitoneal de un agente irritante que induce contracciones abdominales que simulan los espasmos inducidos en situaciones de dolor visceral (Galati y cols, 1994; Yamasaki y cols, 2000)

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el efecto antinociceptivo en el modelo de dolor visceral del *A. mexicana* puede deberse a un efecto inhibitorio sobre los espasmos intestinales, los cuales son ocasionados por una alteración sobre los mecanismos que regulan la motilidad intestinal.

8.3 Análisis del posible mecanismo de acción del extracto

Una vez determinado el efecto antiespasmódico del extracto de metanólico de *A. mexicana ssp. xolocotziana*, se desarrolló un protocolo para tratar de elucidar el mecanismo responsable de este efecto. Para determinar la participación de

algunos mediadores endógenos importantes involucrados en la relajación del musculo liso producida por el extracto se utilizaron bloqueadores e inhibidores exógenos de algunas de las principales vías del mecanismo de contracción-relajación.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el efecto relajante del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* parece involucrar en parte la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas del sistema nervioso entérico, ya que el hexametonio, un bloqueador ganglionar, disminuyó parcialmente su efecto relajante. El hexametonio ha sido frecuentemente utilizado para inhibir la liberación de neurotransmisores de las neuronas entéricas de las terminales colinérgicas, entre ellos la ACh, inhibiendo así el efecto contráctil producido por la acción de este neurotransmisor sobre los receptores M3 del musculo liso (Barlow y cols, 1972; Eglen y cols, 1989).

Uno de los neurotransmisores importantes en el sistema gastrointestinal que induce relajación de la musculatura lisa es el óxido nítrico (NO). El NO es un importante mensajero intra e inter celular que se encuentra en todo el organismo y se sintetiza a partir de L-arginina por la acción de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS) (Furfine y cols, 1993). El NO activa a la guanilato ciclasa, la enzima encargada de la síntesis del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), induciendo un aumento en la concentración intracelular de GMPc. Este segundo mensajero, altera la actividad de diversas fosfodiesterasas y canales iónicos. Como resultado de esto, se inhiben las contracciones del músculo liso inducidas por el incremento de Ca^{2+} intracelular (Rang y Dale, 2008). El metil ester L-nitro arginina (L-NAME) es un inhibidor de la NOS que actúa como sustrato competitivo de la L-arginina, el sustrato natural de la NOS. De esta manera, con la administración del L-NAME se inhibe la síntesis de NO (Das y cols, 1999). Los resultados de este estudio sugieren que el efecto espasmolítico del extracto metanólico de *A.*

mexicana ssp. *xolocotziana* no se debe a la inducción de la síntesis de NO, debido a que el pre tratamiento del tejido con L-NAME no alteró el efecto espasmolítico del extracto.

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGI₂ estimulan las terminales colinérgicas de las neuronas del sistema nervioso entérico generando la liberación de acetilcolina y produciendo un aumento en la tonicidad del íleon de cobayo (Bennett y cols, 1975; Nakahaya y cols, 1984). En este estudio se utilizó un pretratamiento con indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclo-oxigenasa que bloquea la síntesis del prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (Caldas-Magalhaes y cols, 2004). Los resultados del presente estudio sugieren que las prostaglandinas participan, por lo menos de manera parcial, en el efecto antiespasmódico del Toronjil Blanco aunque los resultados no permiten discernir el mecanismo exacto de esta interacción.

En base a lo antes mencionado, se sugiere continuar con la evaluación del posible mecanismo de acción del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* utilizando bloqueadores e inhibidores de algunas otras vías involucradas en la relajación del músculo liso.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la capacidad del extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* para relajar el musculo liso del intestino delgado aislado de cobayo y para reducir la motilidad intestinal en ratón, por lo que estos resultados proporcionan evidencia científica del uso del Toronjil Blanco en la medicina tradicional para el alivio del dolor visceral provocado por espasmos intestinales, y dado el efecto que produce sobre la motilidad intestinal en el modelo *in vivo*, se puede deducir un efecto adecuado como antidiarreico.

Sin embargo, con los estudios realizados en este proyecto no fue posible determinar bajo qué mecanismo de acción produce tales efectos farmacológicos, aunque los resultados sugieren una posible participación de las prostaglandinas y de la liberación de algunos neurotransmisores del sistema nervioso entérico.

Debido a que el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes patologías ha sido ampliamente difundido alrededor de todo el mundo, es necesario continuar con estudios que nos permitan determinar científicamente su efecto farmacológico, lo que nos va a permitir hacer un uso fundamentado de las mismas, cuidando la relación dosis - efecto.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados de este proyecto, se propone continuar con los estudios para determinar bajo qué mecanismo de acción el *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* produce un efecto antiespasmódico y antidiarreico. También se propone al Toronjil Blanco como posible fuente de principios activos para el diseño de nuevos fármacos antiespasmódicos y/o antidiarreicos.

11. REFERENCIAS

1. Abalo R, Pascual D, Goicoechea C, Martin MI. Blockade by pertussis toxin of the opioid effect on guinea pig ileum. Contractility and electrophysiological neuronal recording. *Neurosc Lett*. 2000; 291: 131-134.
2. Altman DF. Drugs used in Gastrointestinal Diseases. En: Katzung BG, ed. *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th edition. LANGE. New York, USA 2001. pp: 1064-76.
3. Argueta VA, Cano L, Rodarte M. Atlas of Plants from Mexican Traditional Medicine, III. Indigenous National Institute, México, 1994; 1355-1356.
4. Barlow RB, Franks M, Pearson JDM. A comparison of the affinities of antagonists for acetylcholine receptors in the ileum, bronchial muscle and iris of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1972; 46: 300-308.
5. Barret K. Intestinal Motility. En: Barret, K. *Gastrointestinal Physiology*, Lange. California: McGrawHill; 2007. p. 153-67.
6. Bornstein JC, Cost M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogas Mot* 2004; 16: 34-38.
7. Bradshaw J, Harvey RF. Antidiarrhoeal agents: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1982; 24: 440-451.
8. Burns A, Roberts R, Bornstein JC. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin Pediatr Surg* 2009;18:196-205
9. Bye R, et al. *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxón from mexican medicinal plantas. *Phytologia*. 1987; 62: 156-163.
10. Caldas-Magalhaes PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso HJ. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fund Clin Pharmacol* 2004; 18: 539-546.

-
-
11. Canales Martínez M, et al. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botanica Mexicana*. 2006; 75: 21-43.
 12. Cano L. Flora medicinal de Veracruz. Inventario etnobotánica. Ed. Universidad Veracruzana. Xalapa, 1970.
 13. Carballo MA, Cirtada CM, Gadano AB. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*. Chile 2005; 14(002): 95-108.
 14. Castañeda-Pomeda M, Bragulat-Baur E. La diarrea del viajero. *Revista de la Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias*. 2008; 20(4): 260-268.
 15. Cechinel-Filho V, Zampirolo JA, Stulzer HK, Schlemper V. Antispasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. *Fitoterapia*. 2007; 78: 125-128.
 16. Chávez-Carpio, CY. Propagación vegetativa de toronjil morado (*Agastache mexicana* (HBK) Lint & Epling) and toronjil blanco (*Agastache* sp.) por esquejes de tallo, bajo condiciones de invernadero. [Tesis] Universidad Nacional Autónoma de México. 1986
 17. Cortés-Zamora A, Verano-Blas J. Evaluación del efecto antinociceptivo de extractos orgánicos y metabolitos activos de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* en ratones. [Tesis] Universidad Nacional Autónoma de México. 2010
 18. Das R, Kravtsov GM, Ballard HJ, Kwanet C. L-NAME inhibits Mg²⁺ induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium. *Brit J Pharmacol* 1999; 128: 493-499.
 19. Davis WM. Method of treating smooth muscle spasm. 1988.
 20. Dellacassa E. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. *Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica*. Chile 2005: 44-45.

-
-
21. Eglen RM, Michel AD, Cornett CM, Kunysz EA, Whiting RL. The interaction of hexamethonium with muscarinic receptor subtypes in vitro. *Brit J Pharmacol* 1989; 98: 499-506.
 22. Ehlert FJ, Ostrom SR, Sawyer GW. Subtypes of the Muscarinic Receptor in smooth muscle. *Life Sci* 1997; 61: 1729-1740.
 23. Esplugues JV, Piqué JM, Ponce J. *Terapéutica farmacológica de las enfermedades del aparato digestivo*. Pamplona: EUNSA, 1996.
 24. Estrada-Reyes R, Aguirre-Hernández E, García-Argáez A, Soto Hernández M, Linares E, Bye R, et al. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. México, 2004; 32: 685-694
 25. Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 321-324.
 26. Florez J. *Farmacologia Humana*. EL SELVIER 5ª ed. 2008
 27. Furfine E, Harmon MF, Paith JE, Garvey EP. Selective inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase by L-p-Nitroarginine. *Biochem* 1993; 32: 8512-8517.
 28. Gagnon J, Mayne J, Chen A, Raymond A, Woulfe J, Mbikay M, et al. PCSK2-null mice exhibit delayed intestinal motility, reduced refeeding response and altered plasma levels of several regulatory peptides. *Life Sciences*. Canada, 2011; 88: 212-217.
 29. Galambos A. Spasm in the small intestines. *Am J Dig Dis*, 1954; 21: 97-99
 30. Galati EM, Morforte MT, Kirjavainen S, Foresteri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmacol*. 1994; 40: 709-712.
 31. Galindo Y. (1982). Estudio farmacológico de algunas plantas medicinales reportadas popularmente por la población mexicana para el tratamiento de

-
-
- padecimientos cardiovasculares. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales (ENEP) Iztacala, UNAM.
32. Gerthoffer WT. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G549-G853.
 33. González-Trujano ME, González-Ramírez A, Pellicer F, López-Muñoz FJ. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. México, 2012; 142: 700–705.
 34. Heanue T, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:466-79.
 35. Herrera AL. La biología en México durante un siglo. Ed. Universidad de Michigan. Michigan. 1921. 503pp.
 36. Kimura Yoshiyuki, Sumiyoshi Maho. Effects of *Swertia japonica* extract and its main compound swertiamarin on gastric emptying and gastrointestinal motility in mice. *Fitoterapia*. Japan, 2011; 82: 827–833.
 37. Linares E, Flores B, Bye R. Selection of Medicinal Plants of Mexico. Limusa, México, 1988, 1–125.
 38. Martínez Moreno D, Alvarado Flores R, Mendoza Cruz M, Basurto Peña F. Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 2006; 79: 79-87.
 39. Mayer E. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12:453-65.
 40. Mazzone A, Farrugia G. Evolving Concepts in the Cellular Control of Gastrointestinal Motility *Neurogastroenterology and Enteric Sciences*. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36:499–513.

-
-
41. Martin ML, Diaz MT, Montero MJ, Prieto P, Roman LS. Antispasmodic activity of benzyloquinoline alkaloids analogous to papaverine. *Plana Med* 1993; 59: 63-67.
 42. Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J* 2002; 364: 431-440.
 43. Moazedi AA, Mirzaie DN, Seyyednejad SM, Zadkarami MR, Amirzargar A. Spasmolytic Effect of *Petroselinum crispum* (Parsley) on rat's Ileum at different calcium chloride concentrations. *Pakistan J Biol Sci.* 2007; 10: 4036-4042
 44. Molina-Hernández M, Tellez-Alcantara P, Martínez E. Agastache mexicana may produce angiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine. México,* 2000;7(3): 199-203
 45. Mujumdar AM, Upadhye AS, Misar AV. Studies on antidiarrhoeal activity of *Jatropha curcus* root extract in albino mice. *Journal of Ethnopharmacology. India,* 2000; 70: 183-187.
 46. Mukherjee P K, Wahile A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. *J Ethnopharmacology* 2006;103:25-35.
 47. Navarro X. Fisiología del Sistema Nervioso Autónomo. *Rev Neurol* 2002;35(6): 62-553.
 48. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra 2002.
 49. Paula AC, Hayashi LS, Freitas JC. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Yahi) Griseb (Convolvulaceae). *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 105-112.
 50. Perusquia M, Mendoza S, Bye Robert, Linares E, Mata R. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology. México,* 1995; 46: 63-69

-
-
51. Randa M, Yasser M, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal: the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16(26):3239-48.
 52. Rang HP, Dale M. *Pharmacology*. Churchill Livingstone Elsevier, 6th edition, Edinburgo, 2008.
 53. Riverón-Corteguera RL. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cubana Pediatr* 1999;71(2):86-115
 54. Romero-Trujillo JO. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex* 2012; 33(4):207-214
 55. Ruiz-Salvador AK, Paz-Naranjo J, García-Milián AJ, Sebazco-Pernas C, Carrazana -Lee A, Pereira-Relis E. Actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis* L. en modelos experimentales. *Rev Cubana Plant Med.* 2004; 9(3): 297-299
 56. Sánchez-Mendoza ME, Torres G, Arrieta J, Aguilar A, Castillo-Henkel C, Navarrete A. Mechanism of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111:142-147.
 57. Santiago R, Rojas I, Arvisu G, Muños D, Pérez D, Sucilla M. Caracterización del potencial fitotóxico de *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint et Epling. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Simón Bolívar. Año 4, Numero 4. 2005.
 58. Santillán-Ramírez MA, López-Villafranco E, Aguilar-Rodríguez S, Aguilar-Contreras. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *Xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* México 2008; 79: 513- 524.
 59. Sawyer GW, Ehlert FJ. Contractile Roles of the M2 and M3 Muscarinic Receptors in the Guinea Pig Colon. *Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 269-277.
 60. Simmonds, M. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* 2001; 56: 245-252

-
-
61. Sunagane N, Uruno T, Kubota K. Mechanism of relaxant action of papaverine. Effect on caffeine-induced contraction of guinea pig taenia coli. *Jpn J Pharmacol.* 1982; 32(5):785-93.
 62. Takeharu K, Kazumasa S, Shinjiro N, Norimoto U. The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. *European Journal of Pharmacology.* 1998; 355: 149–157.
 63. The WHO. Estrategia para prevenir y tratar la diarrea. The WHO. Ginebra, Octubre 2009.
 64. Toso RE, Skliar MI, Verna E. Modelo experimental para evaluar el Tránsito Gastrointestinal en ratones. *Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias U.N.L.* 2002; 44-48.
 65. Toso RE, Toribio MS, Mengelle P, Boeris MA. Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastro protectora y antiespasmódica. *InVet. Argentina,* 2007; 9(1): 145-151
 66. Ventura-Martínez R, Rivero-Osorno O, Gómez Claudia, González-Trujano ME. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology.* Mexico, 2011; 137: 1528– 1532.
 67. The WHO. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva. World Health Organization, 2002.
 68. Yamasaki T, Matsushita Y, Kawashima K, Someya M, Nikajima Y, Kurashige T. Evaluation of the pharmacological activity of extracts from Amomi semen on the gastrointestinal tracts. *J ethnopharmacol.* 2000; 71: 331-335.