



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la actividad espasmolítica del extracto etanólico
de la *Annona diversifolia* Saff, una planta de uso medicinal en
México, en un modelo *in vitro*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JUAN ANTONIO GABRIEL JIMÉNEZ GASCA



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Dra. María Eva González Trujano

SECRETARIO: Dra. Rosa Ventura Martínez

1er. SUPLENTE: Dra. Isabel Del Carmen Rivero Cruz

2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA FACULTAD DE MEDICINA UNAM.

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA UNAM.

CLAVE DEL PROYECTO: IN201713

NOMBRE DEL PROYECTO: Estudio del efecto neuroprotector de extractos de *Annona diversifolia* Saff y *Tilia americana* variedad mexicana en la isquemia neuronal inducida en el modelo de íleon de cobayo.

AGRADEZCO A LA DGAPA-UNAM LA BECA RECIBIDA.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. GUADALUPE ESTHER ÁNGELES LÓPEZ

SUSTENTANTE:

JUAN ANTONIO GABRIEL JIMÉNEZ GASCA

DEDICATORIA

A MI MADRE MARÍA TERESA GASCA GARCÍA, QUE SIEMPRE ME ACOMPAÑA Y EN TODO SENTIDO ME GUÍA HACIENDO QUE ME ESFUERCE Y NUNCA ME CONFORME CON NADA, PORQUE NADA ES IMPOSIBLE. TAMBIÉN A MI PADRE JUAN JOSÉ JIMÉNEZ ZÚÑIGA, QUIEN YA NO ME VIO CONCLUIR LA LICENCIATURA, PERO EN CUALQUIER LUGAR DONDE ESTE, SE QUE ESTÁ FELIZ DE LO QUE ME INCULCO Y LE AGRADEZCO CADA ENSEÑANZA.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Plantas medicinales	2
2.2. Familia Annonaceae.....	3
2.2.1. <i>Annona diversifolia</i> Safford (<i>A. diversifolia</i> Saff.)	4
2.2.1.1. Botánica	4
2.2.1.2. Distribución.....	6
2.2.1.3. Análisis fitoquímico.....	6
2.2.1.4. Usos en la medicina tradicional y estudios farmacológicos.....	7
2.3. Sistema Nervioso Entérico (SNE).....	9
2.3.1. Neuronas entéricas	9
2.3.2. Motilidad intestinal.....	13
2.3.3. Espasmos intestinales	13
2.4. Fármacos con actividad espasmolítica	14
2.5. Modelo “ <i>in vitro</i> ” para evaluar efecto espasmolítico.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos particulares.....	19

6. METODOLOGÍA.....	20
6.1. Material vegetal.....	20
6.2. Extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff.....	20
6.3. Animales.....	21
6.4. Modelo <i>in vitro</i> de íleon aislado de cobayo.....	21
6.4.1. Preparación de los tejidos.....	21
6.4.2. Evaluación de la relajación del extracto en tejido precontraído con Cloruro de potasio (KCl).....	22
6.4.3. Evaluación de la relajación del extracto en el tejido precontraído con estimulación eléctrica (E.E.)	23
6.4.4. Evaluación del efecto relajante del extracto en la contracción inducida con Acetilcolina (ACh).....	24
6.4.5. Evaluación del daño al músculo liso a través de la respuesta con Cloruro de Bario (BaCl ₂).....	24
6.5. Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS	26
7.1. Efecto relajante producido por el extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. en íleon de cobayo precontraído con KCl.....	26
7.2. Efecto relajante producido por el extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. en íleon de cobayo precontraído con (E.E.)	30
7.3. Alteración del efecto contráctil inducido por ACh del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. en íleon de cobayo.....	32
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>A. diversifolia</i> Saff.	5
Figura 2. (a) Flor y, (b) fruto de <i>A. diversifolia</i> Saff.	5
Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de <i>A. diversifolia</i> Saff.	8
Figura 4. Organización del Sistema Nervioso Entérico (SNE).....	10
Figura 5. Interacción entre el aparato neural y muscular en el intestino (peristalsis).	12
Figura 6. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por el KCl en el íleon aislado de cobayo y el efecto del extracto evaluado sobre el tejido precontraído	26
Figura 7. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por el KCl en el íleon aislado de cobayo y el efecto relajante de la papaverina, un control positivo en este modelo.	27
Figura 8. Curva concentración respuesta (CCR) del efecto relajante del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. en el íleon de cobayo precontraído con KCl.	28
Figura 9. Respuesta contráctil a BaCl ₂ en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de <i>A. diversifolia</i> Saff. sobre el íleon aislado de cobayo precontraído con KCl.	29
Figura 10. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por E.E. en el íleon aislado de cobayo y el efecto de diferentes concentraciones del extracto EtOH de <i>A. diversifolia</i>	30
Figura 11. CCR del efecto relajante del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff en íleon de cobayo precontraído con E.E.....	31
Figura 12. Respuesta contráctil a BaCl ₂ en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de <i>A. diversifolia</i> Saff. sobre el íleon aislado de cobayo precontraído con E.E.	32
Figura 13. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la CCR acumulativa de ACh en el íleon aislado de cobayo.	33

Figura 14. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la CCR acumulativa de ACh en presencia del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff en el íleon aislado de cobayo.....	33
Figura 15. CCR de ACh en ausencia y en presencia del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. y papaverina, como control positivo, en el íleon de cobayo.	34
Figura 16. Efecto máximo (Emáx) de ACh [1×10^{-5} M] en ausencia y en presencia del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> Saff. y papaverina, como control positivo, en el íleon de cobayo.	35
Figura 17. Respuesta contráctil a BaCl ₂ en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de <i>A. diversifolia</i> Saff. sobre el íleon aislado de cobayo contraído con ACh.	36
Figura 18. Canales de Calcio tipo L dependientes de voltaje y su efecto sobre la respuesta contráctil.	38
Figura 19. Síntesis y liberación de ACh en las neuronas entéricas.....	40
Figura 20. Contracción inducida por ACh producida por la activación de los receptores M ₃ en el íleon de cobayo..	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Área Bajo la Curva (ABC) y CE ₅₀ de ACh obtenidas de las CCR de ACh en íleon de cobayo en presencia del extracto EtOH de <i>A. diversifolia</i> Saff.....	35
--	----

ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva
ACh	Acetilcolina
ANADEVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosin Trifosfato
Ca ²⁺	Ion Calcio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CCR	Curva Concentración Respuesta
CE ₅₀	Concentración Efectiva 50
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAG	Diacilglicerol
DL ₅₀	Dosis Letal 50
E. E.	Estimulación Eléctrica
E.E.M.	Error Estándar de la Media
Emáx	Efecto Máximo
EtOH	Etanol
g	Gramos
GABA _A	Receptor A de Ácido Gamma Amino butírico
h	Horas
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol Trifosfato
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramo

μg	Microgramo
M	Molar
MgCl_2	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
MLC	Cadena Ligera de Miosina
MLCK	Cinasa de la Cadena Ligera de Miosina
mM	Milimolar
ms	Milésimas de Segundo
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO_3	Bicarbonato de Sodio
NAIP	Neuronas Aferentes Intrínsecas Primarias
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaH_2PO_4	Fosfato de Sodio Monobásico
NO	Óxido Nítrico
NOM	Norma Oficial Mexicana
O_2	Oxígeno
PDE	Fosfodiesterasa
PIP_2	Fosfatidilinositol difosfato
PKA	Protein Cinasa A
PKC	Protein Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
TGI	Tracto Gastrointestinal

VEH

Vehículo

VIP

Péptido Intestinal Vasoactivo

1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre productos naturales está comúnmente relacionada al desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos con el propósito de ofrecer alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversos padecimientos.

En la medicina tradicional, como en la medicina complementaria alternativa el uso de las plantas es común (OMS, 2002). Se estima que del 70 al 80 % de la población mundial, principalmente en países en vías de desarrollo, utilizan las plantas medicinales para la atención primaria en los sistemas de salud (Rokaya y cols., 2014). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que el uso de las plantas medicinales en la atención primaria debe estar sustentada en bases científicas que demuestren su seguridad y efectividad para su administración en humanos.

La *Annona diversifolia* Saff. (*A. diversifolia*), comúnmente conocida como “ilama”, es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar diarrea, catarro, tos, algunas parasitosis (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2008) y cólicos (Carballo y cols., 2010). En estudios controlados con animales de laboratorio se ha demostrado el efecto anticonvulsivo (González-Trujano y cols., 2006a) y antinociceptivo (Carballo y cols., 2010) de alguno de sus extractos; sin embargo, no hay evidencia en cuanto al efecto espasmolítico a pesar de su uso para el alivio de los cólicos intestinales.

En este trabajo se evaluó la actividad espasmolítica del extracto etanólico de la *A. diversifolia* Saff., utilizando el modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo (Ventura-Martínez y cols., 2011). Este modelo se basa en que el íleon, que es la porción del intestino delgado que posee un gran número de neuronas entéricas, controla la contracción y relajación del músculo liso intestinal a través de la liberación de varios neurotransmisores. El estudio de la actividad espasmolítica producida por los extractos de especies vegetales medicinales a través de este modelo aporta una base científica que permite validar su uso como antiespasmódico en la medicina tradicional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Plantas medicinales

Muchos de los medicamentos que actualmente se utilizan en la clínica fueron desarrollados a partir de las plantas medicinales; por lo que su estudio y el conocimiento acerca de su uso en la medicina tradicional, tiene un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos. En México, su posición geográfica le proporciona una gran riqueza en plantas (considerando que debe tener más de 30,000 especies), lo cual lo coloca como un país con una gran riqueza en la medicina herbolaria (Heinrich y cols., 2014).

En distintos países, la medicina tradicional y/o la medicina complementaria alternativa, representan alternativas utilizadas en la práctica de la medicina. La primera se refiere a la medicina que se origina por el conocimiento etnomédico de una región y es utilizada en la misma; mientras que, en la segunda, la medicina originaria de una región, se utiliza en los países industrializados de distintas regiones del mundo (OMS, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el uso de la plantas medicinales con fines terapéuticos en la atención primaria ya que define a la medicina tradicional como “prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades” (OMS, 2002). Su uso terapéutico está sujeto al sustento científico con el que cuente cada especie, ya que a través de éste se puede conocer la seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos (Kasilo y Nikiema, 2014).

La fitoterapia se basa en el uso de extractos vegetales que, en algunos casos, producen un mayor efecto terapéutico que un principio activo puro (Sánchez y cols., 2000); sin embargo, en la mayoría de los casos, se carece de

estudios científicos que sustenten su seguridad (Carballo y cols., 2005; García y cols., 2009b).

2.2. Familia Annonaceae

La familia Annonaceae se encuentra distribuida en las áreas tropicales de América, África y Asia, la cual se compone de cerca de 2,500 especies en 140 géneros (Andrés-Agustin, 2011). En México, de acuerdo a la Red Mundial de información sobre Biodiversidad, hay 62 especies de 14 géneros que se encuentran distribuidas en Chiapas, Guerrero, Yucatán, Michoacán y Morelos principalmente. En Chiapas se encuentran 12 especies de *Annonas*, ubicándolo como el estado con mayor abundancia y diversidad en especies de este género (Estrada-Reyes y cols., 2011). Las especies más estudiadas en nuestro país son: *Annona cherimola*, *A. diversifolia*, *A. reticulata* y *A. muricata* (Andrés-Agustin, 2011).

El género *Annona* es utilizado por los indígenas y campesinos por sus propiedades antidiarreicas, anticatarral, antitusígena y para tratar ectoparasitosis por piojos y chinches (Luna-Cazares y González-Esquinca, 2008). Para su uso medicinal se utilizan principalmente las ramas, hojas, corteza, fruto y semillas; a éstas últimas comúnmente se les atribuye las propiedades tóxicas que presenta la *A. cherimola* (Estrada-Reyes y cols., 2011). Las hojas de la *A. cherimola* (chirimoya) y *A. muricata* (guanábana) se utilizan popularmente para tratar la diarrea, y la disentería, entre otros problemas gastrointestinales (Argueta y cols., 2009). La infusión de las hojas de *A. reticulata* se utiliza en Tabasco para tratar dolores estomacales e intestinales, y para el alivio del “enlechado”; el cual consiste en una diarrea fétida producida en el lactante (Argueta y cols., 2009).

Con la tradición etnobotánica donde se hace uso de las hojas, de las ramas y de los frutos (Luna-Cazares y González-Esquinca, 2008) y aunado al hecho de que las especies del género *Annona* se caracterizan por sintetizar acetogeninas, derivados lipídicos (policétidos) y alcaloides principalmente del tipo bencil-

isoquinolicos con actividad en el Sistema Nervioso Central (SNC). Todo lo anterior hace de las especies pertenecientes a este género objetos iniciales de estudio para la obtención de posibles fármacos (Estrada-Reyes y cols., 2011).

Existen estudios previos donde se reporta la actividad ansiolítica del extracto hexánico de las hojas de *A. cherimolia*, indicando que la actividad farmacológica es sobre los receptores GABA_A (López-Rubalcava y cols., 2006). La actividad antiparasitaria (contra ectoparásitos) del género ha sido estudiada con los extractos orgánicos de las hojas y las semillas de *A. squamosa*, utilizando estos extractos para preparar cremas anti piojos (Tiangda y cols., 2000). Para esta misma especie, el efecto tóxico se estudio en los ojos y piel de conejos aplicando extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad, con lo cual se demostró que el extracto con mayor toxicidad fue el obtenido con éter, mientras que; el extracto etanólico solo mostró toxicidad aplicado en los ojos pero no sobre la piel de los animales de experimentación (Sookvanichisilp y cols., 2006). La actividad antidiarreica se estudio sobre el tránsito intestinal en ratones y sobre la actividad espontánea del yeyuno de conejo con el extracto metanólico de la corteza de *A. senegalensis* (Suleiman y cols., 2007; Okoye y cols., 2012).

2.2.1. *Annona diversifolia* Safford (*A. diversifolia* Saff.)

2.2.1.1. Botánica

La *Annona diversifolia* es un árbol frutal con una altura promedio de 4 metros (Figura 1), que puede alcanzar hasta 8.5 m (Julian-Loaeza y cols., 2011). Posee hojas de 2.7 a 5 cm de ancho que presentan diferentes formas (obovada, elíptica y ovada); siendo esta variedad de formas lo que da su denominación “diversifolia”. Su flor tiene tres pétalos externos de longitud variable (Ballesteros y cols., 2006), que pueden ser de un color amarillo con rosa a un color café con púrpura (Figura 2a). El fruto puede pesar desde 500 a 900 g y es de forma

ovalada con una superficie rugosa y protuberante (Figura 2b). Cada árbol puede producir en promedio 50 frutos por año (Julián-Loeza y cols., 2011; Santos-Sánchez y cols., 2011).



Figura 1. Árbol de *A. diversifolia* Saff. (Ballesteros y cols., 2006).

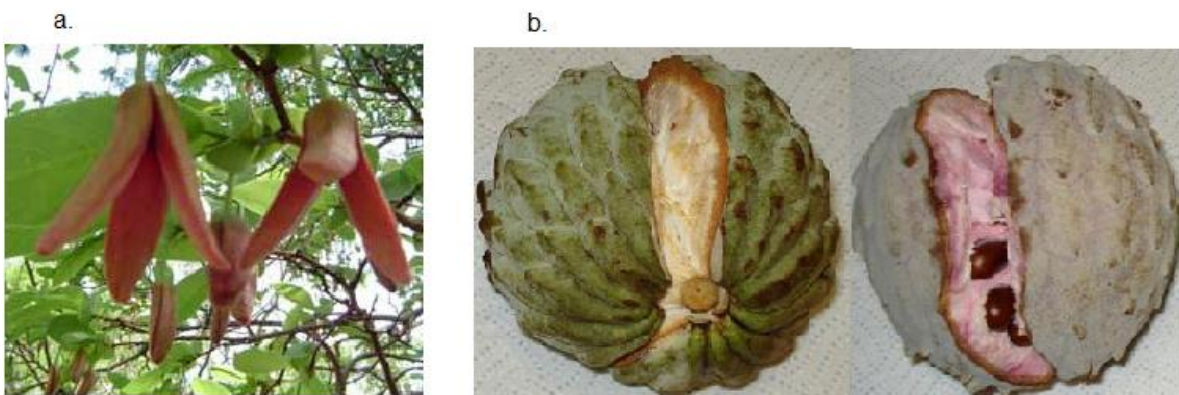


Figura 2. (a) Flor (Ballesteros y cols., 2006) y, (b) fruto de *A. diversifolia* Saff. (Julián-Loeza y cols., 2011).

2.2.1.2. Distribución

La *Annona diversifolia* es una especie de gran importancia económica debido a que su fruto se comercializa por su sabor agradable, alto contenido de pulpa y su valor nutricional, ya que es fuente de fibra y minerales como zinc y potasio (Julián-Loeza y cols., 2011). Es endémica del sureste de México, Guatemala y El Salvador (Julián-Loeza y cols., 2011). En México, en los estados de Colima, Guerrero y México, es comúnmente conocida con el nombre de “ilama”, “ilama zapote”, “ilamazapotl”, “izlama”, “hilama” o “zapote de vieja”; mientras que, en la región de Tehuantepec y en Yucatán, es conocida como “papusa”, “papauce” o “anona blanca” (Carballo y cols., 2010).

2.2.1.3. Análisis fitoquímico

En el análisis fitoquímico del extracto etanólico de *A. diversifolia* utilizando cromatografía en capa fina se identificó la presencia de flavonoides, triterpenos y alcaloides (Carballo y cols., 2010).

Los flavonoides identificados hasta el momento, a través de estudios de HPLC a partir del extracto acuoso de las hojas de la planta, son la **rutina** y la **isoquercitrina** (Brindis y cols., 2013). En las semillas de *A. diversifolia* se identificaron y aislaron dos acetogeninas, **laherradurina** y **cherimolina-2** (Schile-Guzman y cols., 2009). También se ha identificado un alcaloide, la **liriodenina** (Figura 3), obtenido de extractos procedentes del tallo y la raíz en las fases tempranas de desarrollo del árbol (Chacón y González-Esquinca, 2012) (Figura 3).

Otro de los metabolitos secundarios aislados en esta especie es la **palmitona**, una cetona alifática (Figura 3), la cual se aisló a través de estudios biodirigidos partiendo del efecto ansiolítico (González-Trujano y cols., 2006a) y anticonvulsivo (González-Trujano y cols., 2001; González-Trujano y cols., 2006b) demostrados por la fracción hexánica obtenido de las hojas de la planta. La

identificación de su estructura química se realizó a través de espectro de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (González-Trujano y cols., 2001).

2.2.1.4. Usos en la medicina tradicional y estudios farmacológicos

Existen reportes que indican que el fruto inmaduro de la *A. diversifolia* se utiliza para tratar diarreas; la corteza asada para tratar luxaciones (Luna-Cazares y González-Esquinca, 2008); y, las hojas para tratar convulsiones (González-Trujano y cols., 2001), para el alivio de los cólicos intestinales, como anticatarral y como antiinflamatorio (Carballo y cols., 2010).

Diversos reportes científicos han demostrado la actividad anticonvulsiva, ansiolítica (González-Trujano y cols., 2001; González-Trujano y cols., 2006a) y antinociceptiva (Carballo y cols., 2010) del extracto etanólico obtenido de las hojas. También se demostró que este extracto en un modelo de isquemia intestinal no presentó actividad neuroprotectora en neuronas mientéricas del íleon de cobayo (Angeles-López y cols., 2013).

Por otro lado, también se ha demostrado el efecto farmacológico de diversos metabolitos aislados de la planta. La palmitona demostró efecto ansiolítico (González-Trujano y cols., 2006a); flavonoides como la rutina y la isoquercitrina mostraron un efecto inhibitorio sobre la α -glucosidasa, enzima encargada de liberar a la glucosa proveniente de los alimentos en el estómago; sugiriendo una actividad como antidiabético (Brindis y cols., 2013); el alcaloide liriodenina ha mostrado efecto antimicótico y antiprotozoario en experimentos *in vitro* (Wirasathien y cols., 2006); así como actividad antimuscarínica en la tráquea de perros y en el íleon de cobayo (Lin y cols., 1994).

También, las acetogeninas, laherradurina y cherimolina-2, han mostrado efecto citotóxico y antitumoral sobre líneas de células cancerígenas en un modelo *in vitro* (Schile-Guzman y cols., 2009; González-Esquinca y cols., 2014).

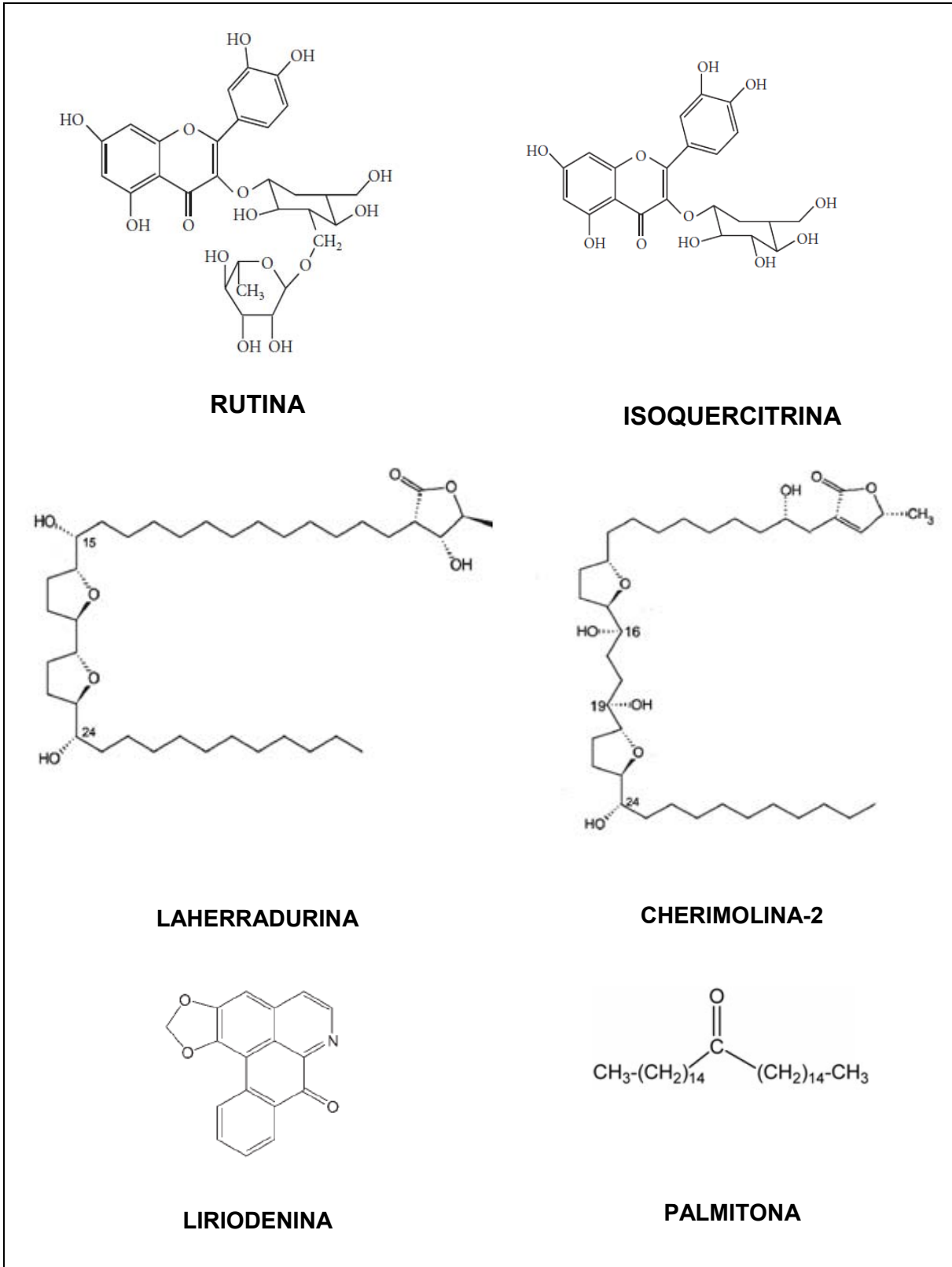


Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de *A. diversifolia* Saff. (Brindis y cols., 2013; Schile-Guzman y cols., 2009; Chacón y González-Esquinca, 2012).

2.3. Sistema Nervioso Entérico (SNE)

El SNE se encuentra constituido por dos plexos nerviosos (Figura 4), el plexo mientérico o de Auerbach, que se encuentra entre las capas musculares longitudinal y circular; y el plexo submucoso o de Meissner que se encuentra entre la capa del músculo circular y la mucosa gastrointestinal (Furness y Costa, 1980; Epstein y cols., 1996). Las neuronas que componen el SNE se encuentran en ganglios nerviosos que forman redes neuronales y se encargan de la motilidad del intestino delgado, entre otras funciones.

La mayor parte de las neuronas involucradas en las funciones motoras del intestino se encuentran localizadas en el plexo mientérico y proporcionan inervación motora a las capas longitudinales y circulares del músculo intestinal (Furness y Costa, 1980; Epstein y cols., 1996); mientras que, el plexo submucoso se encarga principalmente de las secreciones del intestino y del flujo sanguíneo (Costa y cols., 2000).

2.3.1. Neuronas entéricas

Las neuronas entéricas se pueden clasificar de acuerdo a su ubicación, neuroquímica, morfología, proyecciones, conexiones y/o función. De acuerdo a su función se clasifican como sigue (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

Neuronas aferentes intrínseca primarias (NAIP). Están presentes tanto en el plexo mientérico como en el submucoso conformando el 30 % y el 14 % de las neuronas de los plexos, respectivamente. Pueden responder a distintos tipos de estímulos y proyectan de manera local (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

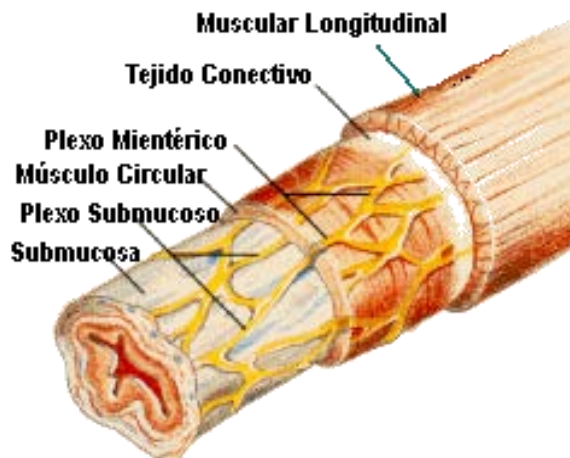


Figura 4. Organización del Sistema Nervioso Entérico (SNE)

Neuronas motoras excitadoras. Reciben la entrada sináptica rápida mediada por receptores nicotínicos a través de las neuronas aferentes primarias locales y de las interneuronas ascendentes y descendentes. Estas proyectan a la musculatura circular donde utilizan acetilcolina y taquicininas como neurotransmisores que actúan directamente sobre el músculo liso (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

Neuronas motoras inhibitoras (musculatura circular). Estas neuronas hacen sinapsis con las neuronas aferentes por receptores nicotínicos y a través de la vía no colinérgica de las neuronas descendentes. Las neuronas inhibitoras proyectan hacia la musculatura circular donde utilizan varios mecanismos de transmisión inhibitoria, incluyendo óxido nítrico (NO), adenosin trifosfato (ATP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

Neuronas motoras de músculo longitudinal. Son pequeñas neuronas con proyecciones cortas hacia el músculo longitudinal que reciben sinapsis de las neuronas aferentes primarias y de las vías ascendentes y descendentes.

Interneuronas. Estas se pueden clasificar en ascendentes y descendentes. Las ascendentes inducen movimientos en dirección oral; mientras que, las descendentes en dirección caudal. La función básica de las interneuronas es integrar la respuesta producida por las NAIP hacia las motoneuronas, también generar redes de conexión con las motoneuronas ya sean excitadoras o inhibitoras (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

Neuronas secretomotoras y vasomotoras. En el plexo mientérico se encuentran en poca proporción conformando solo el 2 %, la mitad son colinérgicas y las otras contienen (VIP). Mientras que en el plexo submucoso representan el 32 % colinérgicas y el 42 % no colinérgicas de las células nerviosas (Costa y cols., 2000; Brookes, 2001).

Todas las neuronas entéricas se encuentran distribuidas a lo largo del intestino, de forma que constituyen redes superpuestas continuas con las vías entéricas. Así, pequeños anillos de músculo circular pueden considerarse como módulos funcionales independientes (Costa y cols., 2000); por lo que los movimientos del intestino (peristalsis) son el resultado de la interacción del aparato neural y el aparato muscular (Figura 5).

Como se observa en la Figura 5, esta interacción implica una serie de reflejos locales a través de las vías aferentes (Ψ). Cada uno con una contracción intestinal seguida de un estímulo de relajación. La estimulación puede ser química o mecánica debida a la distensión de la luz intestinal. La peristalsis se inicia por las vías ascendentes con la actividad de las NIAP (\circ), estas pasan la señal a las interneuronas ascendentes colinérgicas (\square), se interconectan con las neuronas motoras excitadoras (Δ), lo cual provoca contracción principalmente por la liberación de ACh. Después, por la vía descendente actuarán las interneuronas descendentes (\square) hacia las neuronas inhibitoras (Δ) provocando relajación (Modificado de Epstein y cols., 1996).

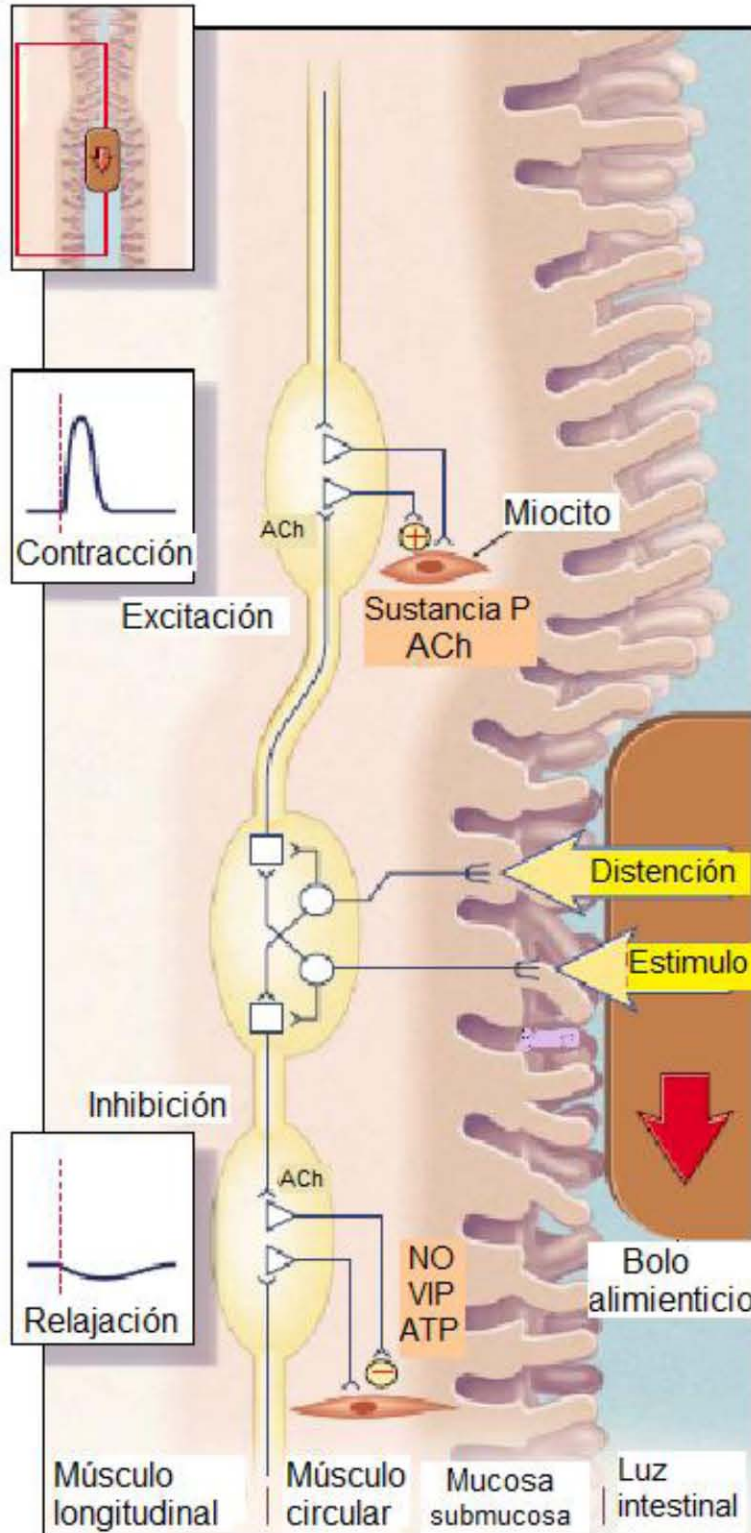


Figura 5. Interacción entre el aparato neural y muscular en el intestino (peristalsis). (Modificado de Epstein y cols., 1996).

2.3.2. Motilidad intestinal

La motilidad intestinal, también conocida como peristalsis, se produce por la contracción y relajación de las paredes intestinales con el propósito de desplazar el bolo alimenticio a lo largo del intestino delgado para que se lleve a cabo la digestión y la absorción de diversas sustancias (Guyton, 2011).

El intestino delgado forma parte del sistema digestivo y se encuentra en el área denominada mesogastrio. Su principal función es la absorción de nutrientes y el desplazamiento de los alimentos ya digeridos hacia el colon para su posterior excreción. La pared del intestino delgado está compuesta por diferentes capas que le proporcionan su funcionalidad característica para que se lleve a cabo la motilidad intestinal. Las capas de las que se compone son: la serosa, la capa muscular longitudinal, la capa muscular circular, la submucosa y la mucosa (Costa y cols., 2000).

Al igual que todo el sistema digestivo, el intestino delgado se encuentra controlado por el sistema nervioso entérico (SNE), el cual funciona de manera independiente al SNC. Aunque la motilidad intestinal también se encuentra regulada por el SNC a través de las vías simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo (Epstein y cols., 1996); denominada vía extrínseca; la mayor parte de su innervación la recibe a través del SNE, conocido como la vía intrínseca.

2.3.3. Espasmos intestinales

El espasmo es el producto de un movimiento involuntario del músculo liso intestinal; el cual, se presenta como resultado de la irritación directa o estimulación mecánica, química y térmica; además de estar presentes en diversas patologías (Epstein y cols., 1996). Los espasmos pueden causar dolor en el tracto gastrointestinal (TGI), y se denominan comúnmente cólicos (Guyton, 2011).

En patologías que cursan con diarrea o en el síndrome del intestino irritable existe la presencia de espasmos tipo cólico (Remes-Troche y cols., 2010). En este tipo de patologías se ven afectados los movimientos normales del intestino delgado, los movimientos normales se pueden clasificar en dos tipos; en contracciones de mezcla y contracciones de propulsión. En cuanto a los movimientos de mezcla estos dependerán de las ondas eléctricas lentas, en condiciones normales para el humano el ritmo eléctrico básico para el duodeno y el yeyuno no superan un ritmo de 12 por minuto mientras que para el íleon la frecuencia máxima es de 8 a 9 contracciones por minuto. El otro tipo de movimiento el de propulsión que dependerá de las ondas peristálticas mueven el quimo en dirección anal a un ritmo de 0.5 a 2 cm/s, en condiciones normales (Guyton, 2011).

Los agentes espasmolíticos son considerados útiles para el tratamiento del dolor ocasionado por los espasmos del intestino y la irritación producida en la diarrea debido a la hipermotilidad del tracto gastrointestinal, mientras que los agentes espasmogénicos son usados para el tratamiento de la constipación (Cimanga y cols., 2010).

2.4. Fármacos con actividad espasmolítica

Los fármacos utilizados para tratar los espasmos reciben el nombre de espasmolíticos o antiespasmódicos, los cuales producen, como efecto general, una reducción del tono del músculo liso intestinal que induce a las contracciones sostenidas (Rang y Dale, 2008), previniendo o interrumpiendo así los espasmos.

Los espasmolíticos se clasifican en los siguientes grupos dependiendo de su mecanismo de acción, en:

a) Fármacos de acción directa sobre el músculo liso intestinal. Son fármacos que tienen acción musculotrópica e inducen su acción directa sobre las miofibrillas del músculo liso del intestino, con lo cual se reduce el tono intestinal y

alivian los espasmos. Dentro de este grupo se encuentra la trimebutina, la mebevarina y la papaverina (Remes-Troche y cols., 2010).

b) Anticolinérgicos. Son fármacos cuyo mecanismo de acción es antagonizar a los receptores muscarínicos de las vías colinérgicas en SNE y reducir las contracciones inducidas por la ACh en el intestino para impedir que se produzca dolor abdominal. En este grupo se incluyen fármacos como la butilhioscina, este es el más utilizado en México sólo o en combinación con algunos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (Remes-Troche y cols., 2010). Otro fármaco bien conocido del mismo tipo es la atropina, pero es un fármaco bastante controlado que podría afectar otros órganos y sistemas por lo que se usa solo a nivel experimental. También se encuentran los compuestos de amonio cuaternario como el bromuro de clidinio (Pasricha, 2006).

c) Bloqueadores de canales de calcio. Como su nombre lo indica, estos fármacos bloquean los canales de calcio voltaje-dependientes y evitan la entrada de calcio a las células impidiendo la contracción muscular. En este grupo se encuentra el bromuro de pinaverio y bromuro de otilonio (Remes-Troche y cols., 2010).

2.5. Modelo “*in vitro*” para evaluar efecto espasmolítico

Anatómicamente, el intestino delgado se encuentra dividido en tres porciones: el duodeno, el yeyuno y el íleon (Shiner, 1995). Varios estudios han demostrado que el íleon, es la sección del intestino delgado más vascularizada y que se encuentra innervada por el mayor número de neuronas entéricas (Navarro, 2002). Además, a diferencia del intestino de ciertas especies (como rata y ratón), el íleon de cobayo muestra actividad espontánea constante y su viabilidad se extiende por más de 12 horas (Aguilar-Mariscal y cols., 2009)

Existe evidencia que indica que en el intestino delgado de cobayo, una unidad contráctil de 10 mm contiene aproximadamente 6 500 neuronas intrínsecas aferentes primarias en el plexo mientérico, 1 200 interneuronas ascendentes y 3 000 descendentes; además, contiene 4 000 neuronas motoras inhibitoras y

3 000 excitadoras que inervan al músculo circular (Kunze y Furness, 1999). Por consiguiente, el íleon de cobayo representa el segmento del intestino delgado más apropiado para el estudio de los cambios inducidos por los fármacos en la tensión muscular, ya que el efecto de cualquier sustancia que actúe a nivel intestinal, será más evidente y fácil de analizar. Por esta razón, para esta investigación, el íleon aislado de cobayo ha sido empleado para determinar y caracterizar el efecto antiespasmódico de diversos compuestos. Además, es un modelo *in vitro* que permite determinar el efecto de los fármacos sobre la motilidad intestinal midiendo la respuesta de los movimientos longitudinales del intestino a través de un transductor (Harrison y cols., 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de las plantas medicinales a lo largo del tiempo está basado principalmente en un conocimiento etnomédico. Muchas de estas se emplean para tratar distintos padecimientos pero sin tener evidencia científica de sus efectos sobre la salud. No contar con estudios científicos de una especie vegetal, induce un riesgo, ya que puede tener reacciones adversas, llegando a provocar intoxicación y la muerte por el mal uso.

En el caso de México, muchas de las plantas medicinales se utilizan de manera empírica sin tener la evidencia científica que sustente su utilidad en la medicina tradicional. Estos estudios son necesarios para poder regular y controlar el uso correcto de las plantas medicinales. Consideramos que es tan importante tener la evidencia científica de las plantas medicinales que sustente tanto sus efectos farmacológicos, como sus efectos tóxicos, para proveer a la población información apropiada sobre el uso de las plantas medicinales, tal y como lo indica la OMS, para tener alternativas terapéuticas en la atención primaria.

La fisiopatología de diversas enfermedades del TGI involucra alteraciones en la motilidad intestinal, que causan molestias que a veces requieren de tratamiento al mismo tiempo que la patología que está generando estas molestias. En el tratamiento de los cólicos intestinales es común el empleo de las plantas medicinales, ya sea por su fácil acceso o por el conocimiento etnomédico.

Específicamente, en el caso de la *Annona diversifolia*, existen en la medicina tradicional preparaciones para tratar los cólicos; sin embargo, no hay evidencia científica de su efecto espasmolítico. Por lo tanto, el presente trabajo busca, a través de un modelo “*in vitro*” de íleon de cobayo y siguiendo una serie de protocolos ya validados, determinar si existe dicho efecto farmacológico en esta especie vegetal en particular.

4. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional mexicana, la especie vegetal *Annona diversifolia* Saff. es utilizada para tratar dolores y espasmos intestinales; entonces esta especie producirá efecto espasmolítico en el íleon aislado de cobayo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar el efecto espasmolítico del extracto etanólico de *Annona diversifolia* Saff. en el modelo *in vitro* de íleon de cobayo.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto espasmolítico del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en el íleon aislado de cobayo precontraído con KCl.
- Determinar el efecto espasmolítico del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en el íleon aislado de cobayo precontraído con estimulación eléctrica.
- Determinar el efecto espasmolítico del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en el íleon aislado de cobayo sobre la contracción inducida con ACh.

6. METODOLOGÍA

Los procedimientos fueron aprobados por las comisiones de investigación y ética de la Facultad de Medicina.

6.1. Material vegetal

Las hojas de *A. diversifolia* Saff. se colectaron en Tejupilco, Guerrero en septiembre de 2005. La autenticidad de la planta se certificó por la Dra. Ernestina Cedillo-Portugal de la Universidad Autónoma de Chapingo (AUCH) y una muestra se depositó en el “Herbario de Plantas Útiles Efraín Hernández X” de la misma Universidad con el número de espécimen AN9702.

6.2. Extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff.

El extracto fue proporcionado por la Dra. Eva González Trujano del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, el cual se preparó siguiendo el siguiente procedimiento:

Las hojas de *A. diversifolia* se secaron y se pulverizaron (1.5 kg). Con este material se realizó una extracción exhaustiva con etanol a través de un proceso de maceración (3 x 28 L), a una temperatura ambiente de 22 °C y la subsecuente evaporación del disolvente a vacío, para obtener 89 g del extracto que representa un rendimiento de 5.9 %.

Para la determinación del efecto biológico, el extracto etanólico se disolvió con NaOH 0.05 N, el cual se consideró como vehículo (VEH). Las soluciones de las diferentes concentraciones del extracto se prepararon el día del experimento.

6.3. Animales

En este estudio se utilizaron cobayos macho de 400 a 600 g de peso corporal, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina UNAM. Los animales se colocaron en cajas de acrílico a una temperatura controlada de 22 ± 2 °C, con ciclo automático de luz oscuridad de 12 horas (8:00 – 20:00 h), con alimento y agua *ad libitum* (NOM-062-ZOO-1999) el alimento se les retiró y se mantuvieron con libre acceso al agua 24 horas antes del experimento.

6.4. Modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo

6.4.1. Preparación de los tejidos

El cobayo se sacrificó mediante dislocación cervical (NOM-062-ZOO-1999) enseguida se realizó una incisión en el abdomen y se localizó la porción del íleon a través de la identificación de la unión ileocecal. Se descartaron los últimos 10 cm del íleon y se extrajeron 15 cm. Esta porción del íleon se colocó en una caja Petri, en un baño con solución Krebs-bicarbonato (La solución Krebs contiene [mM]: NaCl, 118; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.2; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; glucosa 11; cloruro de colina 0.3 a un pH 7) (Rodriguez y cols., 2006), a una temperatura de 37 °C y con el continuo burbujeo de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). Se le retiró el mesenterio y se le hizo pasar solución Krebs desde la parte proximal a la distal para limpiarlo y verificar que no se haya provocado una fisura al momento de retirar el mesenterio. Posteriormente se cortaron seis anillos de 1.5 a 2.0 cm de largo. Cada anillo se colocó en una cámara de órgano aislado, con solución Krebs-bicarbonato a 37 °C con constante burbujeo de carbógeno utilizando un OxiStreamer modelo SL2CO (95 % O₂ y 5 % CO₂). Cada tejido se fijó a un transductor de fuerza Grass FT-03C el cual se encuentra conectado al polígrafo Grass 7D y al software polyview (los cuales previamente se calibraron). Una vez colocados los tejidos se ajustó la tensión a 1 g, la cual se reajustó 15 min después.

Se dejó estabilizar a los tejidos durante 30 minutos. Se verificó la viabilidad del tejido agregando ACh [1×10^{-5} M] (Ventura-Martínez y cols., 2011; González-Trujano y cols., 2012) y se consideró que el tejido estaba viable si su respuesta contráctil era de 3 a 5 g. Los tejidos que no mostraron esta respuesta fueron descartados del estudio.

6.4.2. Evaluación de la relajación del extracto en tejido precontraído con Cloruro de potasio (KCl)

Una vez que las preparaciones se pusieron en la cámara de órgano aislado y se verificó la viabilidad del tejido; a cada uno se le agregó 0.2 mL de cloruro de potasio [32 mM] para obtener una contracción sostenida. Se consideró que el tejido alcanzó una contracción sostenida cuando ésta se mantuvo por al menos 2 minutos (Ventura-Martínez y cols., 2011; González-Trujano y cols., 2012). Posteriormente se adicionó el vehículo, las concentraciones del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. [3.16, 10, 31.6 y 56.2 μ g/mL] y la papaverina 30 μ M como control positivo; a diferentes grupos de tejidos. Después de la adición de cada tratamiento, la respuesta del tejido se dejó estabilizar por 20 min, al término se realizaron tres lavados dejando 20 min de reposo con perfusión constante después de cada prueba. Cada uno de los tratamientos se colocó en 6 anillos de manera independiente.

El cálculo para obtener el porcentaje de relajación en este protocolo se obtuvo considerando la diferencia entre los gramos de la meseta con KCl [32 mM] (g meseta inicial) y la meseta después de los 20 min de la adición del tratamiento a probar (g meseta final). Esta diferencia se divide entre los gramos de la meseta con KCl (g meseta inicial) y se multiplican por cien. Lo anterior se indica a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de relajación} = \frac{(g \text{ meseta inicial}) - (g \text{ meseta final})}{(g \text{ meseta inicial})} \times 100$$

6.4.3. Evaluación de la relajación del extracto en el tejido precontraído con estimulación eléctrica (E.E.)

Las preparaciones fueron estimuladas eléctricamente a través de dos electrodos que se encuentran de forma paralela y están conectados al estimulador Grass S88. El ánodo se colocó en la parte intraluminal del intestino. Los parámetros que se utilizaron durante la estimulación eléctrica de cada preparación fueron 0.3 Hz de frecuencia, 3.0 ms de duración del impulso eléctrico y una estimulación acumulativa de 0.5 – 14 V con duración de 1 min entre cada una de ellas (Ventura-Martínez y cols., 2011). En el voltaje de 14 V se estabilizó el tejido durante 10 min, considerando una respuesta de 2 g de fuerza como parámetro de viabilidad del tejido. A estos tejidos se les adicionó el vehículo, seguido de una curva acumulativa del extracto [1, 3.16, 10, 31.6 µg/mL] que fue adicionado cada 5 min. Por separado se probó la concentración de 56.2 µg/mL del extracto al igual que papaverina 30 µM, como control positivo.

El cálculo para determinar el porcentaje del efecto relajante en el tejido precontraído con estimulación eléctrica se realizó tomando la diferencia entre la respuesta en gramos inicial (g iniciales) con los 14 V y la respuesta en gramos finales (g finales) una vez que se adicionó la concentración del extracto a evaluar. El producto de la diferencia dividido entre los gramos iniciales a 14 V (g iniciales) y todo multiplicado por cien, proporciona el porcentaje de relajación. Lo anterior se indica a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de relajación} = \frac{(g \text{ iniciales}) - (g \text{ finales})}{(g \text{ iniciales})} \times 100$$

6.4.4. Evaluación del efecto relajante del extracto en la contracción inducida con Acetilcolina (ACh)

Con los tejidos viables se realizó primero una curva acumulativa control de ACh [1×10^{-9} a 1×10^{-5} M]. Posteriormente el tejido se lavó tres veces y se dejó reposar durante 20 min con perfusión constante. Una vez que se realizó la curva control, los tejidos se preincubaron durante 5 min con el vehículo, el extracto etanólico [1, 3.16, 10, 31.6 y 56.2 $\mu\text{g/mL}$] ó la papaverina 30 μM . En cada caso se realizó otra curva acumulativa de ACh en presencia de cada uno de estos tratamientos por separado. Entre cada curva de ACh, el tejido se lavó tres veces y se dejó reposar durante 20 min antes del siguiente tratamiento (Ventura-Martínez y cols., 2011).

Para calcular el efecto de los tratamientos sobre la contracción inducida por ACh, la respuesta máxima obtenida en la curva control con ACh [1×10^{-5} M] 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 de las diferentes concentraciones del extracto [1, 3.16, 10, 31.6 y 56.2 $\mu\text{g/mL}$] ó la papaverina [30 μM].

6.4.5. Evaluación del daño al músculo liso a través de la respuesta con Cloruro de Bario (BaCl_2)

Una vez que se realizó el estudio de la respuesta relajante del extracto en cada una de los protocolos mencionados, se procedió a lavar y dejar reposar el tejido durante 20 min para después adicionar (BaCl_2) [10 mM] y registrar la respuesta contráctil. La respuesta contráctil de cada tejido se comparó con la respuesta control de ACh 1×10^{-5} M la cual determina la viabilidad del tejido de manera individual y se consideró como el 100% de la respuesta del mismo,

la respuesta en gramos fuerza del BaCl₂ 10 mM se expresó en porcentaje de la respuesta contráctil con respecto a la contracción obtenida con ACh.

6.5. Análisis estadístico.

En el caso de los tejidos precontractados con KCl y E.E., los resultados se manejaron como el % de relajación del tejido inducido por el efecto del extracto etanólico de *A. diversifolia*; mientras que, los datos obtenidos en las curvas concentración respuesta con la ACh, los datos se manejaron como el % de la respuesta contráctil de la ACh en presencia del extracto. También, se calculó el área bajo la curva (ABC) de las curvas acumulativas concentración respuesta de ACh. En todos los casos, los datos se presentan como la media ± error estándar de la media (E.E.M) con una n de 5 a 6 tejidos por tratamiento.

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos, se utilizó un análisis de varianza (ANADEVA) seguido por una prueba de Dunnett para comparar las concentraciones del extracto con respecto al control. Además de esta prueba, se realizó una prueba post hoc de Tukey para la comparación entre el efecto inducido por las diferentes concentraciones. La comparación entre pares de medias se llevo a cabo mediante una prueba t de Student no pareada. El criterio para considerar diferencia estadística fue una $P < 0.05$.

El manejo de datos y aplicación de las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Graph Pad Prism 4.00.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto relajante producido por el extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en íleon de cobayo precontraído con KCl

El protocolo del tejido precontraído con KCl [32 mM] consiste en someter al íleon aislado de cobayo a una concentración alta de potasio para provocar una contracción fásica seguida de una contracción sostenida. Cuando se alcanzó una meseta de la contracción sostenida durante 5 min se adicionó la sustancia a evaluar (Figura 6). La contracción sostenida en el tejido control alcanzó una fuerza de 2.2 ± 0.14 g y esta no fue alterada con la adición del vehículo [NaOH 0.05 N] (2.1 ± 0.07 g, N. S. t de Student).

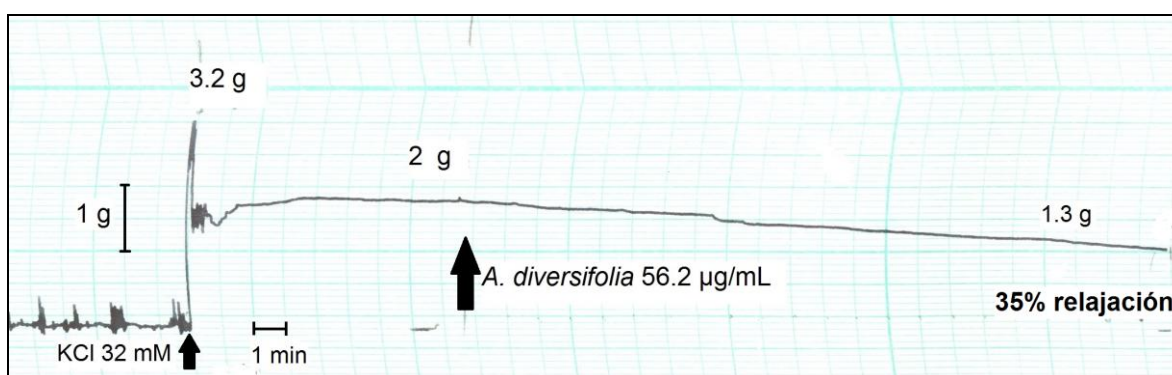


Figura 6. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por el KCl [32 mM] en el íleon aislado de cobayo y el efecto del extracto evaluado sobre el tejido precontraído, (1 cm es igual a 1 g fuerza).

El extracto etanólico de *A. diversifolia* induce una respuesta relajante del tejido precontraído con KCl [32 mM], que tarda en estabilizarse cerca de 20 min, el cual se consideró como el tiempo de corte del efecto del extracto sobre los tejidos en este protocolo experimental. Como se puede observar en la figura 6, el registro típico del efecto del extracto evaluado sobre el tejido precontraído con KCl,

muestra como la contracción del tejido va disminuyendo conforme el extracto se mantiene más tiempo en contacto con el tejido.

Por otro lado, la papaverina [30 μM], utilizada como control positivo en este modelo experimental, induce una relajación que inicia de manera casi inmediata sobre el tejido precontraído con KCl [32 mM] y se estabiliza aproximadamente en 6 min, como se muestra en la figura 7. La papaverina induce un 100 % de relajación en este protocolo experimental.

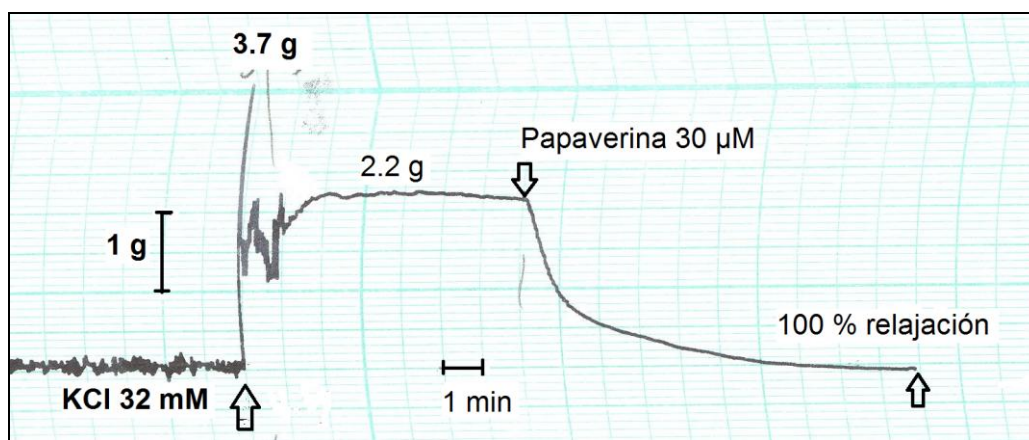


Figura 7. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por el KCl [32 mM] en el íleon aislado de cobayo y el efecto relajante de la papaverina, un control positivo en este modelo, (1 cm es igual a 1 g fuerza).

En este protocolo experimental, el extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. produjo un efecto relajante sobre el tejido precontraído con KCl de manera concentración dependiente (Figura 8), que muestra una diferencia significativa con el vehículo desde la concentración más pequeña [3.16 $\mu\text{g/mL}$] ($P < 0.05$, ANADEVIA, seguido de Dunnett). La máxima respuesta relajante inducida por el extracto se obtuvo con la concentración de 56.2 $\mu\text{g/mL}$ ($37.3 \pm 3.1 \%$). Con la papaverina, utilizada como control positivo, se obtuvo un $94 \pm 2.3 \%$ de relajación (Figura 8).

La relajación obtenida con las concentraciones de 10 y 31.6 $\mu\text{g/mL}$ (31.2 ± 2.78 y $35.5 \pm 3.5 \%$, respectivamente) del extracto no muestran diferencia significativa entre ellas; mientras que, la concentración máxima utilizada

(56.2 $\mu\text{g/mL}$), no permitió que el tejido mostrara una recuperación total; por lo que a concentraciones superiores del extracto de 56.2 $\mu\text{g/mL}$, el tejido pierde sus funciones contráctiles normales. La respuesta relajante del tejido a esta concentración no muestra diferencia estadística con la relajación producida por la concentración de 31.6 $\mu\text{g/mL}$ (37.3 ± 3.1 vs 35.5 ± 3.5 %, N.S. t de Student). Otros puntos que se indican en la gráfica son el efecto del vehículo (NaOH) [0.05 N] y el de la papaverina 30 μM utilizada como control positivo.

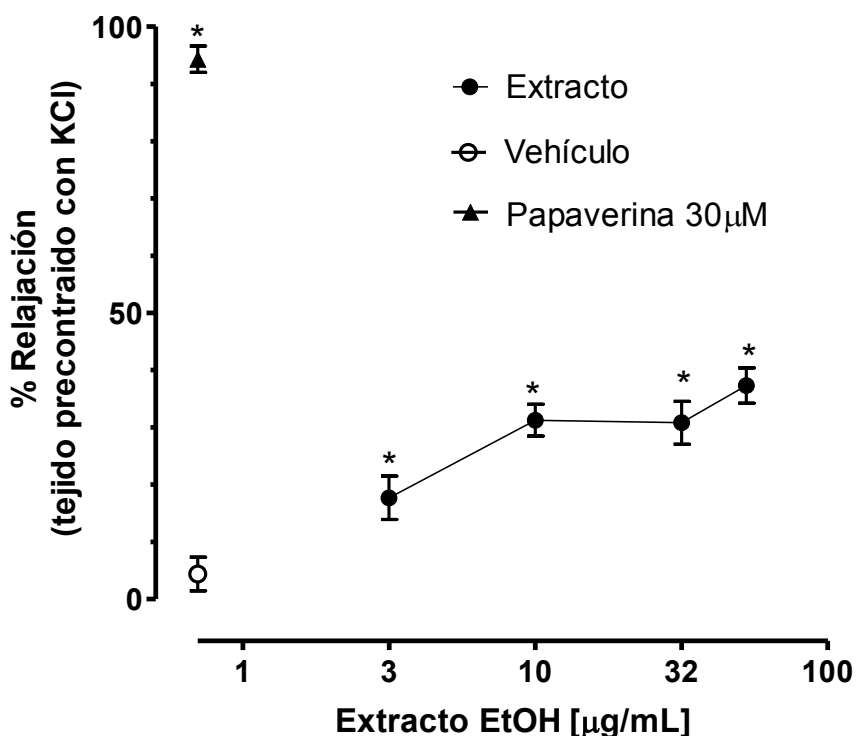


Figura 8. Curva concentración respuesta (CCR) del efecto relajante del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en el íleon de cobayo precontraído con KCl [32 mM]. Cada punto representa media \pm E.E.M. con $n = 6$ (* $P < 0.05$, ANADEV, seguida de una prueba Dunnett).

Al finalizar las evaluaciones del extracto con los tejidos precontraídos con KCl [32 mM] se obtuvo la respuesta contráctil del tejido con BaCl_2 en los tejidos previamente expuestos a diferentes concentraciones del extracto. Para determinar el porcentaje de contracción de cada tejido al BaCl_2 se utilizó la respuesta inicial de ACh [1×10^{-5} M], realizada para determinar la susceptibilidad del tejido antes de

cualquier estímulo, y se consideró como el 100% de la respuesta. La figura 9 muestra la respuesta contráctil del íleon aislado de cobayo con BaCl_2 [10 mM]. La primer barra indica la respuesta contráctil de los tejidos control sin exposición previa al extracto (111.4 ± 11.77 %); las siguientes barras indican cómo se afecta la contracción normal del tejido después de ser expuestos a distintas concentraciones del extracto de *A. diversifolia* Saff. Las barras dos y tres representan a los grupos experimentales que se expusieron dos veces a diferentes concentraciones del extracto, uno a 3.16 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; y otro a 3.16 y 31.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las respuestas contráctiles a BaCl_2 fueron de 77.1 ± 10.66 y 63.3 ± 16.15 %, respectivamente. La última barra representa la respuesta contráctil al BaCl_2 del tejido expuesto a una sola concentración del extracto (56.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la cual fue de 91.9 ± 5.07 %. La respuesta contráctil del tejido a BaCl_2 disminuyó significativamente en los tejidos expuestos más de una vez al extracto de *A. diversifolia* Saff. en comparación con la respuesta de los tejidos control (* $P < 0.05$, ANADEVVA, seguida de Dunnett).

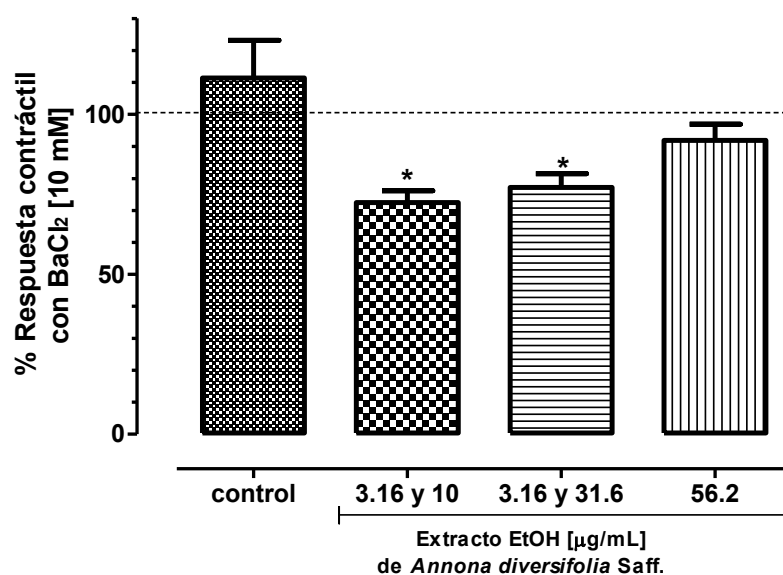


Figura 9. Respuesta contráctil a BaCl_2 en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de *A. diversifolia* Saff. sobre el íleon aislado de cobayo precontraído con KCl [32 mM]. Cada barra representa la media del porcentaje de contracción \pm E.E.M. con una $n = 6$. * $P < 0.05$ análisis de varianza (ANADEVVA), seguida de una prueba Dunnett.

7.2. Efecto relajante producido por el extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en íleon de cobayo precontraído con (E.E.)

Una respuesta supramáxima del tejido se obtuvo con la estimulación eléctrica (E.E.) transmural del íleon de cobayo a 14 V, 0.3 Hz de frecuencia y 3.0 ms de duración. La respuesta contráctil de los tejidos control fue de 2.5 ± 0.16 g de tensión y no fue alterada con la adición del vehículo (NaOH) [0.05N] (2.3 ± 0.15 , N.S., t de Student).

En la figura 10 se muestra el registro en el polígrafo de la respuesta contráctil inducida con E.E. y la respuesta del tejido a concentraciones acumulativas del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff.

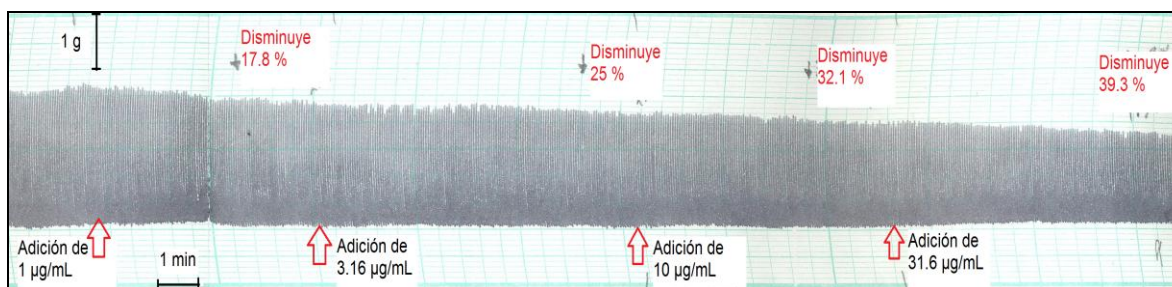


Figura 10. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la contracción inducida por E.E. (14 V, 0.3 Hz, 3 ms) en el íleon aislado de cobayo y el efecto de diferentes concentraciones del extracto EtOH de *A. diversifolia*. (1 cm es igual a 1 g fuerza).

En este protocolo experimental, el extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. produjo un efecto relajante concentración dependiente sobre el tejido precontraído con E.E. (Figura 11) que mostró significancia estadística desde la concentración de 3.16 µg/mL en comparación con el vehículo (ANADEVA, seguido de Dunnett) y con un efecto máximo de 40.1 ± 4.3 % a la concentración de 31.6 µg/mL. El efecto relajante de la concentración del extracto evaluado se determinó 20 min después de la exposición del tejido a cada concentración.

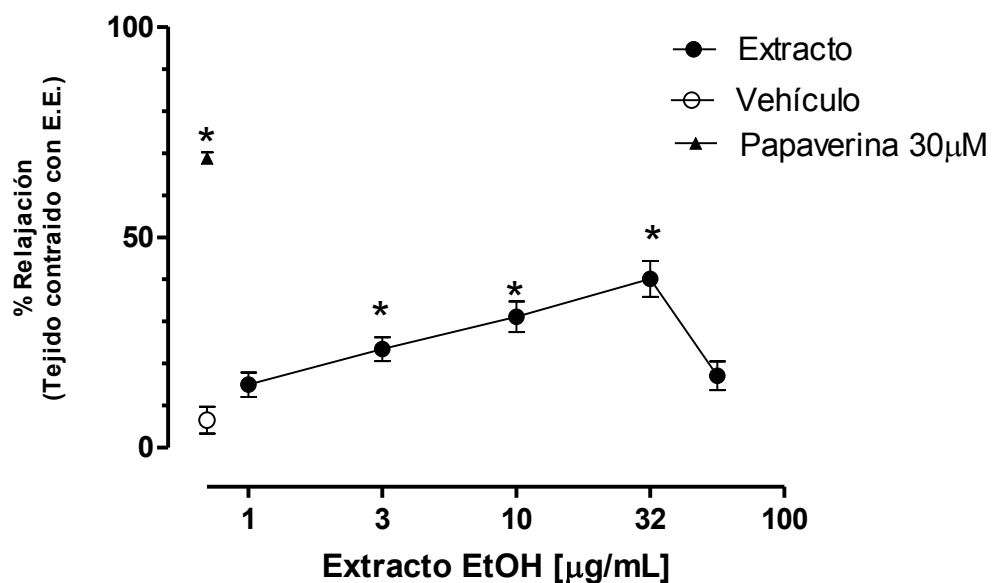


Figura 11. CCR del efecto relajante del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff en ileon de cobayo precontraído con E.E. (14 V, 0.3 Hz, 3 ms). Cada punto de la gráfica representa la media \pm E.E.M. con una $n = 6$. * $P < 0.05$ análisis de varianza (ANAEVA), seguida de una prueba Dunnett.

Con la concentración de 56.2 $\mu\text{g/mL}$ del extracto no se obtuvo un efecto relajante en el tejido ya que no muestra diferencia estadística con el vehículo (ANAEVA, seguido de Dunnett). En estas condiciones experimentales, la papaverina (30 μM) produjo una relajación del $68.8 \pm 1.4 \%$.

Para determinar si las exposiciones repetidas del tejido al extracto alteraban la integridad del músculo liso se determinó la respuesta contráctil de los tejidos a BaCl_2 al finalizar el protocolo con el tejido precontraído con estimulación eléctrica. Como se muestra en la figura 12, ni la exposición del tejido a la concentración más alta del extracto (56.2 $\mu\text{g/mL}$, segunda barra), ni la exposición del tejido a concentraciones repetidas del extracto (de 1 a 31.6 $\mu\text{g/mL}$, tercera barra) alteraron significativamente la respuesta de los tejidos con respecto al control de BaCl_2 [10 mM] (primera barra) (82.6 ± 8.47 y 110.1 ± 8.29 vs 111.4 ± 11.77 , N.S., ANAEVA).

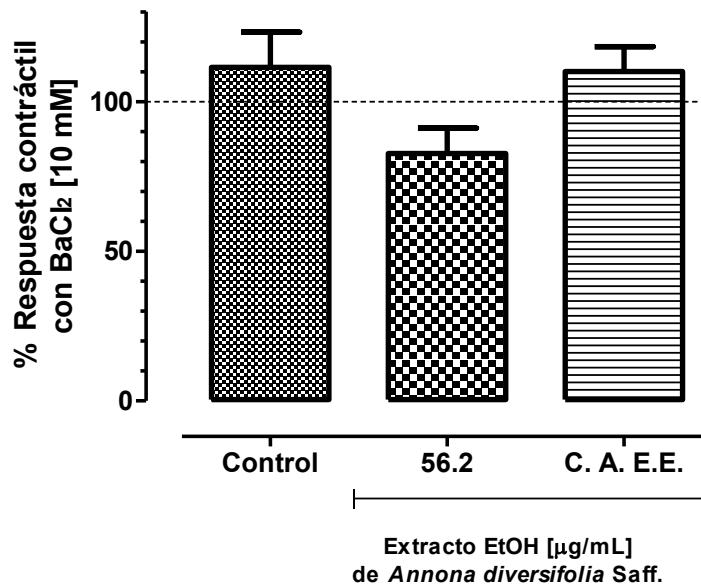


Figura 12. Respuesta contráctil a BaCl₂ en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de *A. diversifolia* Saff. sobre el íleon aislado de cobayo precontraído con E.E. Cada barra representa la media del porcentaje de contracción ± E.E.M. con una n = 6.

7.3. Alteración del efecto contráctil inducido por ACh del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. en íleon de cobayo

El efecto del extracto etanólico de *A. diversifolia* sobre la respuesta contráctil del tejido a la ACh se evaluó realizando una curva acumulativa de ACh [1×10^{-9} a 1×10^{-5} M] en ausencia y en presencia del extracto. La figura 13 muestra un registro representativo de una curva contracción respuesta acumulativa de ACh sola y, la figura 14, muestra la curva de ACh en tejidos preincubados con una concentración del extracto.

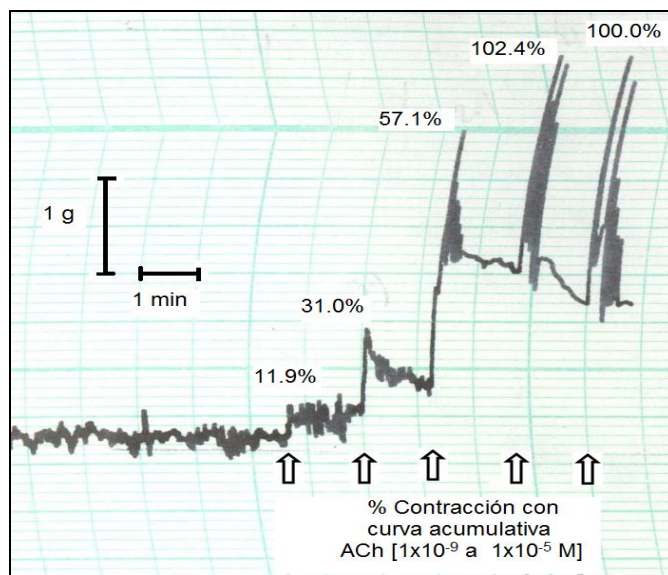


Figura 13. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la CCR acumulativa de ACh en el íleon aislado de cobayo. (1 cm es igual a 1 g fuerza).

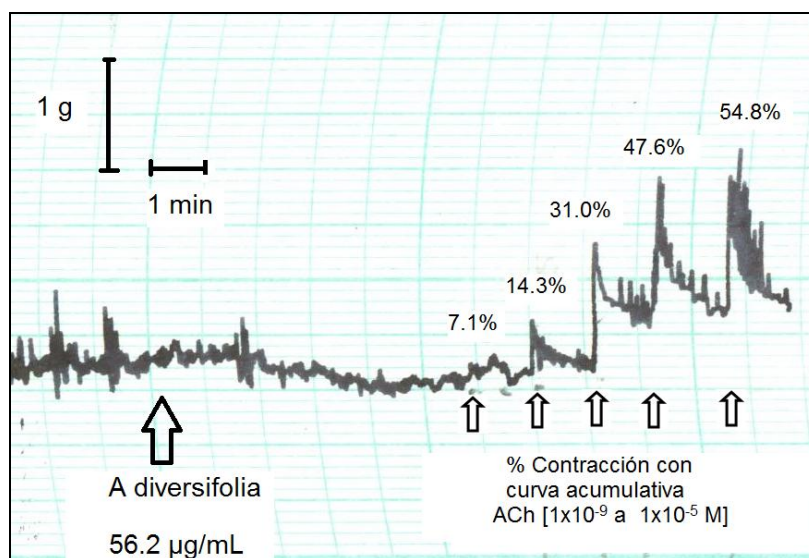


Figura 14. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la CCR acumulativa de ACh en presencia del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff en el íleon aislado de cobayo. (1 cm es igual a 1 g fuerza).

Las concentraciones bajas del extracto (1, 3.16 y 10 µg/mL) no alteraron la curva concentración respuesta (CCR) a ACh en el íleon de cobayo; mientras que, las concentraciones de 31.6 y 56.2 µg/mL redujeron la CCR a la ACh e indujeron

su desplazamiento a la derecha en comparación con la CCR control. La papaverina [30 μ M] bloqueo casi completamente la respuesta contráctil inducida por ACh (Figura 15).

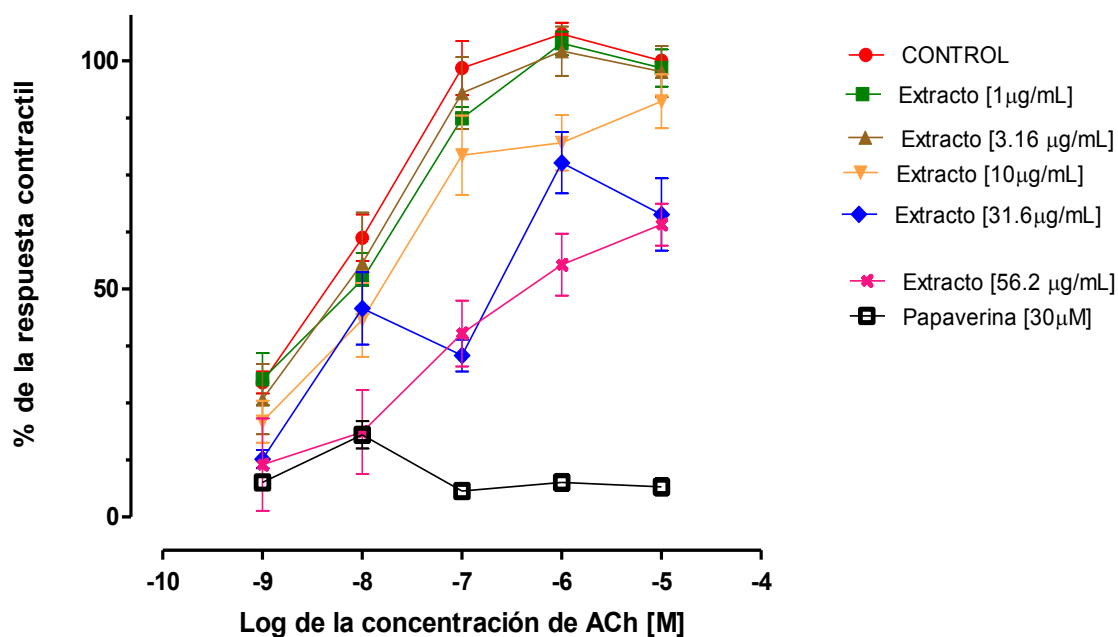


Figura 15. CCR de ACh en ausencia y en presencia del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. y papaverina, como control positivo, en el íleon de cobayo. Cada punto representan la media del porcentaje de la respuesta contráctil con su \pm E.E.M. (n = 6).

Con relación al efecto máximo a la ACh, sólo las concentraciones altas del extracto disminuyeron significativamente el Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) con relación al control (Figura 16) (66.3 ± 7.8 y 64.1 ± 4.6 vs $94.4 \pm 4\%$, respectivamente, $P < 0.05$, ANADEVIA, seguido de Dunnett).

El análisis del área bajo la curva (ABC) de las CCR a ACh calculadas para cada tratamiento y la concentración efectiva cincuenta (CE_{50}) de ACh se muestran en el cuadro 1. A medida que la concentración del extracto aumenta el ABC de la ACh disminuye, solo las concentraciones del extracto de 31.6 y 56.2 μ g/mL mostraron diferencia significativa con respecto al control (ANADEVIA de una vía seguida de una prueba Dunnett). Por el contrario, a medida que la concentración

del extracto aumenta, también, aumenta la CE_{50} de la ACh, alcanzando una significancia estadística con las concentraciones más altas del extracto (31.6 y 56.2 $\mu\text{g/mL}$).

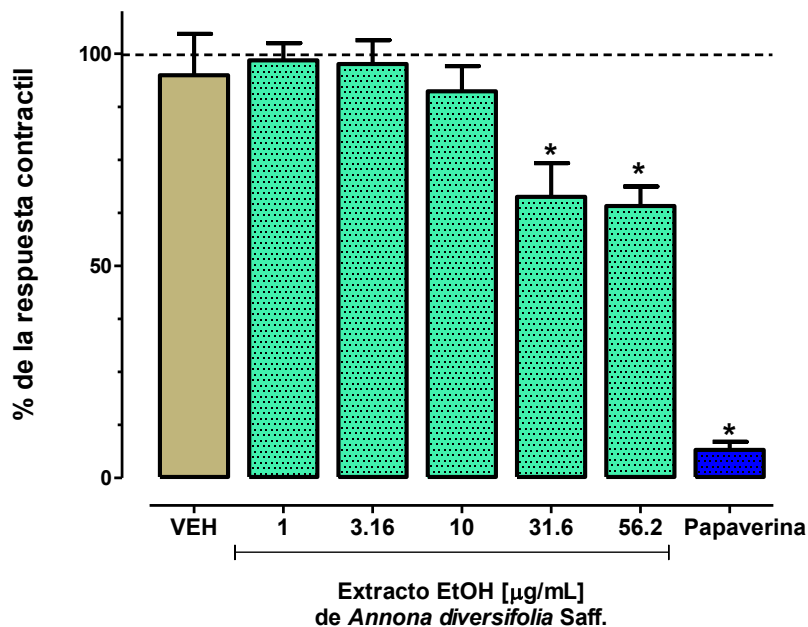


Figura 16. Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) de ACh [$1 \times 10^{-5} \text{M}$] en ausencia y en presencia del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. y papaverina, como control positivo, en el íleon de cobayo. Cada barra representan la media de la respuesta contráctil con su \pm E.E.M. de una $n = 6$. * $P < 0.05$ análisis de varianza (ANADEVA), seguida de una prueba Dunnett.

Cuadro 1 Área Bajo la Curva (ABC) y CE_{50} de ACh obtenidas de las CCR de ACh en íleon de cobayo en presencia del extracto EtOH de *A. diversifolia* Saff.

Tratamiento	ABC	CE_{50} ACh
Vehículo	275.9 ± 6.46	$3.45 \pm 0.28 \times 10^{-9} \text{M}$
Extracto 1 $\mu\text{g/mL}$	266.4 ± 5.52	$5.9 \pm 0.36 \times 10^{-9} \text{M}$
Extracto 3.16 $\mu\text{g/mL}$	271.4 ± 17.67	$6.24 \pm 0.55 \times 10^{-9} \text{M}$
Extracto 10 $\mu\text{g/mL}$	228.5 ± 19.08	$17.4 \pm 0.58 \times 10^{-9} \text{M}$
Extracto 31.6 $\mu\text{g/mL}$	$169.0 \pm 13.83^*$	$101.6 \pm 0.72 \times 10^{-9} \text{M}^*$
Extracto 56.2 $\mu\text{g/mL}$	$136.9 \pm 16.04^*$	$664 \pm 0.74 \times 10^{-9} \text{M}^*$
Papaverina 30 μM	$35.7 \pm 9.35^*$	

Se muestra media \pm E.E.M de una $n = 6$.

* Tratamiento vs vehículo. $P < 0.05$, ANADEVA, seguida de una prueba Dunnett.

Finalmente, para determinar si las exposiciones repetidas del tejido al extracto alteran la respuesta del tejido al BaCl₂ en estas condiciones experimentales, se evaluó la respuesta contráctil del tejido al BaCl₂ al finalizar cada experimento. Como se muestra en la figura 17, sólo la exposición del tejido a la concentración más alta del extracto (56.2 µg/mL, última barra) alteró significativamente la respuesta de los tejidos a BaCl₂ [10 mM] en comparación con la respuesta control (primera barra) (69.9 ± 6.97 vs 111.4 ± 11.77 %, *P<0.05, ANADEVVA, seguido de Dunnett).

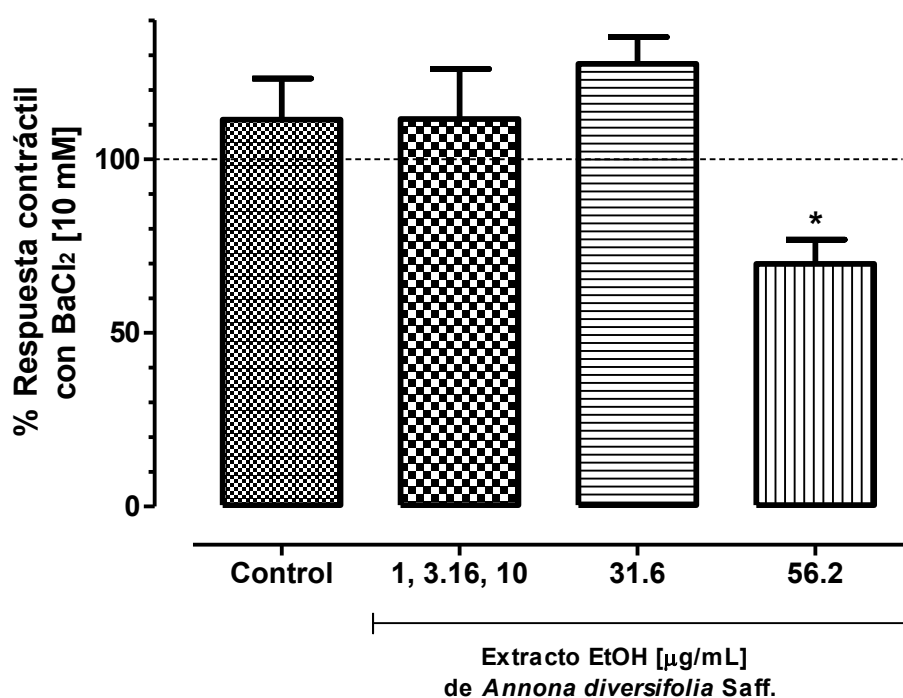


Figura 17. Respuesta contráctil a BaCl₂ en tejido expuestos a diferentes concentraciones del extracto EtOH de *A. diversifolia* Saff. sobre el íleon aislado de cobayo contraído con ACh. Cada barra representa la media del porcentaje de contracción ± E.E.M. con una n = 6. *P <0.05 análisis de varianza (ANADEVVA), seguida de una prueba Dunnett.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La *A. diversifolia* es un árbol frutal comúnmente conocido como “ilama” que pertenece a la familia de las Annonaceae. En general, las hojas y frutos de varias especies de esta familia son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea, catarro, tos, algunas parasitosis y para el alivio de cólicos intestinales. Con relación a la *A. diversifolia*, existen diversos estudios científicos en animales de experimentación que han demostrado sus efectos anticonvulsivos (González-Trujano y cols., 2006b) y antinociceptivos (en modelo de estiramiento abdominal) (Carballo y cols., 2010); sin embargo, hasta el momento no existen reportes científicos que sustenten su utilidad como espasmolítico, para el tratamiento de cólicos intestinales.

En el presente estudio se realizó un bioensayo que muestra la actividad espasmolítica del extracto etanólico de las partes aéreas de *A. diversifolia*. Esta actividad se determinó bajo tres protocolos experimentales y su efecto se comparó con el producido por papaverina, un antiespasmódico musculotrópico bien caracterizado.

En cada protocolo experimental, se inducen contracciones de la musculatura lisa del íleon de cobayo y de esta forma se simula una serie de espasmos exacerbados sobre el tejido. La inducción de la contracción en la musculatura lisa del íleon de cobayo se produce por un aumento del Ca^{2+} intracelular, el Ca^{2+} se une a la calmodulina, una enzima específica, activando a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Esta cinasa fosforila a la cadena ligera de miosina, la cual se une a la actina promoviendo la contracción de las fibras musculares (Webb, 2003). En condiciones fisiológicas, existen concentraciones de Ca^{2+} en el citosol más bajas que en el exterior de la célula (Godfraind y cols., 1986; García y cols., 2005), por lo que es importante reconocer que hay distintas vías por las cuales se puede producir un incremento intracelular de Ca^{2+} .

En el primer protocolo utilizado en este estudio, se produce una contracción sostenida del íleon aislado de cobayo al exponerlo a una concentración elevada de potasio (KCl, 32 mM). Para entender por qué ocurre la contracción en estas condiciones, hay que tener en cuenta que durante el potencial de reposo las células tienen una carga interna negativa (Rang y Dale, 2008) con una concentración de K^+ en el interior de las células de 150 mM; mientras que en el exterior, su concentración es de 2.4 mM; esto genera un potencial de equilibrio en el interior de las células del tejido de -89 mV (Bywater y cols., 1981). Cuando se expone al tejido a una concentración elevada de KCl se induce una despolarización de las fibras musculares, provocando la apertura de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (Figura 18) (Karaki y cols., 1997). Esto provoca un flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula y se induce una contracción rápida y sostenida (Chaudhary y cols., 2012). Bajo este protocolo experimental, la adición del extracto etanólico de *A. diversifolia* produjo un efecto relajante parcial (cerca del 37%) concentración dependiente.

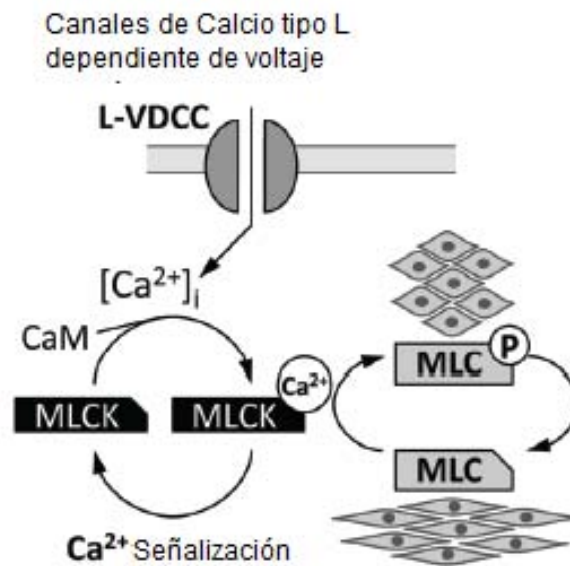


Figura 18. Canales de Calcio tipo L dependientes de voltaje y su efecto sobre la respuesta contráctil. Imagen modificada de Zicha y cols., 2014.

El segundo protocolo experimental consiste en inducir contracciones del íleon de cobayo a través de la estimulación eléctrica (E.E.). Se sabe que estímulos eléctricos de corta duración, como los utilizados en este trabajo, solo permiten activar a casi todas las neuronas entéricas, como las aferentes intrínsecas primarias, las excitadoras, las inhibitoras y las motoras, pero no se estimulan las células del músculo liso (Donnerer y cols., 2014). Por lo tanto, el estímulo eléctrico produce la apertura de canales de Ca^{2+} en la neurona presináptica (Naidoo y cols., 2010) induciendo la liberación de distintos neurotransmisores mediante exocitosis. El principal neurotransmisor excitador que es liberado a través de este mecanismo es la ACh (Nezami y Srinivasan, 2010). En la figura 19 se muestra la síntesis, liberación y degradación de la ACh. Una vez liberado, este neurotransmisor activa receptores presentes en la superficie de las células del músculo liso intestinal, principalmente el M_3 (Ehlert y cols., 1997). Los receptores M_3 están acoplados a una proteína G_q (Sawyer y Ehlert, 1998) y al ser activados se produce la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) 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, y produce una contracción (Figura 20). Además de la ACh, el estímulo eléctrico induce la liberación de sustancias o neurotransmisores inhibitorios, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el óxido nítrico (NO) (Pastel y cols., 2010), que inducen una respuesta de relajación. Por esta razón, la respuesta contráctil máxima inducida por el estímulo eléctrico (2 a 2.5 g) es menor que la respuesta máxima inducida por el potasio (3 a 4 g) o la ACh (4 a 5 g) administradas exógenamente. Además, la contracción inducida por el estímulo eléctrico tiene dos componentes, primero una contracción fásica de duración de pocos segundos, seguida de una respuesta tónica donde disminuye lentamente la respuesta contráctil (Santiago-Mejía y cols., 2007). Bajo este protocolo experimental, la adición del extracto etanólico de *A. diversifolia* produjo un efecto relajante concentración dependiente con una respuesta máxima

de casi el 40 % que se pierde con la concentración más alta del extracto (56.2 mg/ml); mientras que la papaverina induce una relajación de cerca del 70 %.

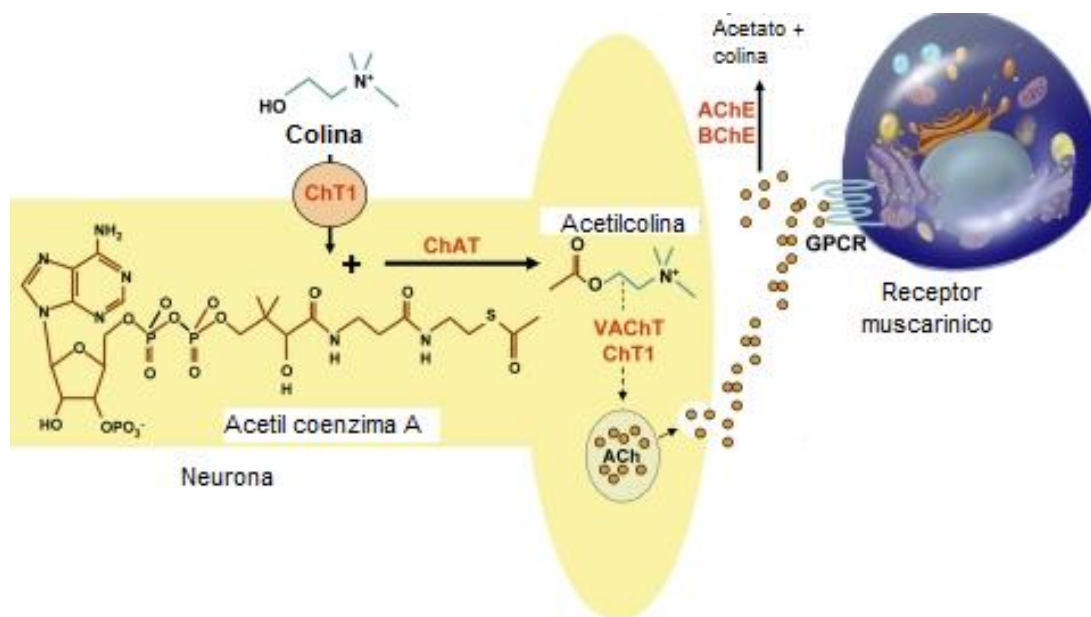


Figura 19. Síntesis y liberación de ACh en las neuronas entéricas. ChAT (colina acetiltransferasa, cataliza la síntesis de ACh a partir de colina y acetil coenzima A); ChT1 (transportador de colina); VACHT (transportador vesicular de ACh). AChE (Actilcolinesterasa), BChE (Butirilcolinesteras), GPCR (receptor unido a proteína G). Imagen modificada de Shah y cols., 2009.

Por último, en el protocolo de estimulación química con ACh se obtuvo una inhibición de la contracción total inducida con ACh de casi el 50 % con la concentración más alta del extracto etanólico de *A. diversifolia*. La ACh induce contracción en el íleon de cobayo por la activación que produce en los receptores muscarínicos M₂ y M₃ (Zhang y Buxton, 1991). La respuesta contráctil de la ACh a través de la activación de los receptores M₃, como ya se explicó anteriormente, son los principales responsables de la respuesta contráctil en el TGI a través del incremento de [Ca²⁺] intracelular (Yang y cols., 2011). Con relación a los receptores M₂, éstos están acoplados a una proteína G_i (Suguro y cols., 2009) e inducen una inhibición de la adenilato ciclasa y una disminución de AMPc, coadyuvando a la contracción del músculo liso de manera indirecta. En estas

condiciones experimentales, la papaverina inhibió prácticamente de manera total la respuesta contráctil inducida por la ACh.

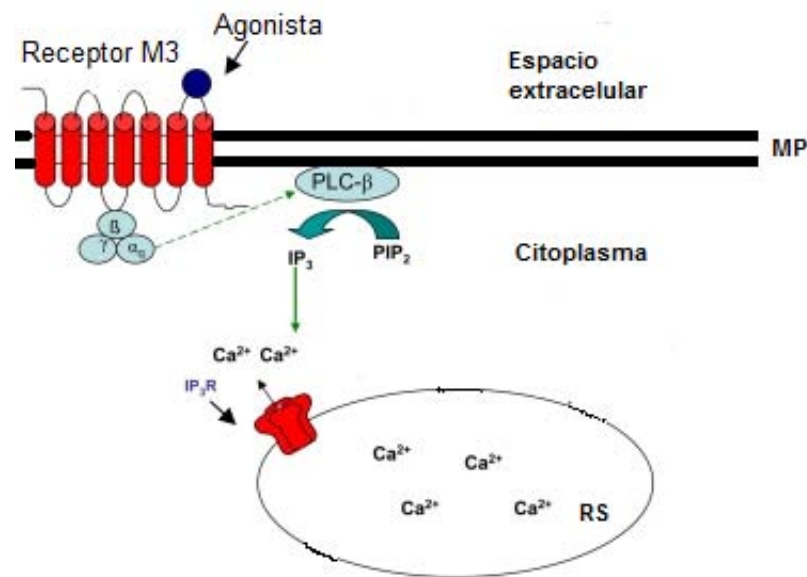


Figura 20. Contracción inducida por ACh producida por la activación de los receptores M₃ en el íleon de cobayo. Imagen modificada de Jude y cols., 2008. PIP₂ (Fosfatidilinositol bifosfato), IP₃ (inositol trifosfato), IP₃R (Receptor de inositol trifosfato), MP (Membrana Plasmática), RS (Retículo sarcoplásmico).

Como ya se mencionó, en cada uno de los protocolos experimentales se utilizó la papaverina como control positivo ya que es un agente musculotrópico que produce relajación del músculo liso por la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) de Adenosin monofostato cíclico (AMPc) produciendo un aumento intracelular de AMPc. Esto provoca la activación de la proteína cinasa A (PKA) y la inactivación de la cinasa (MLCK) impidiendo la contracción muscular (Shimizu y cols., 2000).

La papaverina produce una rápida y reversible relajación del músculo que nos permite verificar que la maquinaria contráctil del tejido se encuentra funcionando adecuadamente y nos permite demostrar que el efecto relajante del extracto se debe a que alcanzamos su efecto máximo y no algún tipo de daño en la musculatura del tejido.

Es importante mencionar que en este estudio la *A. diversifolia* indujo una respuesta relajante atípica, ya que se produce paulatinamente, llegando a una respuesta máxima en aproximadamente 20 min, sobre todo en el protocolo del tejido precontraído con KCl. En cambio, la respuesta típica de relajación en estas condiciones experimentales se puede observar con la papaverina o con otros extractos estudiados en este protocolo experimental, como el *Rosmarinus officinalis* (Ventura-Martínez y cols., 2011) y la *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (Ramírez, 2014), que producen una respuesta relajante máxima de 2 a 5 min después de su adición.

Al finalizar cada experimento, los tejidos son contraídos con BaCl_2 [10 mM], con el propósito de determinar si la musculatura del íleon de cobayo mostraba algún deterioro por la exposición a los diferentes tratamientos. En estas pruebas observamos que cuando el tejido era expuesto a varias concentraciones del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff., como en el protocolo de tejido precontraído con KCl (Figura 9); o bien, a una concentración alta del extracto; como en el protocolo de contracción con E.E. (Figura 12) o con ACh (Figura 19), la respuesta al BaCl_2 disminuye significativamente, esto lo interpretamos como daño a la musculatura lisa del tejido; aunque este daño parece ser leve e irreversible. El mecanismo del BaCl_2 para inducir contracción en el íleon de cobayo involucra principalmente la musculatura del tejido y no al sistema nervioso entérico ya que el bario, al ser un ión bivalente, actúa como si fuera Ca^{2+} afectando el potencial normal de la célula, provocando la apertura de los canales de Ca^{2+} . A través de este mecanismo el bario ingresa a la célula y generara la contracción del músculo liso al actuar directamente sobre las proteínas que forman la maquinaria contráctil (Hasen y cols., 1984; Karaki y cols., 1986).

Respecto a esto, en 2010 Carballo y cols., reportan que el extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia* tiene una dosis letal (DL_{50}) de 707 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.) y por vía oral la DL_{50} es mayor a 5000 mg/Kg, por lo que creemos que algún componente tóxico del extracto se está metabolizando en los animales de experimentación y no se puedan apreciar los efectos tóxicos en un

modelo agudo de dosis letal en animales íntegros; por el contrario, en el modelo empleado en este estudio no hay metabolismo de los componentes químicos de la planta por tratarse de un modelo de órgano aislado.

Dentro de este mismo estudio, Carballo y cols. (2010) reportan la presencia de flavonoides, triterpenos y alcaloides como componentes activos del extracto a través de cromatografía de capa fina. Alguno de estos componentes químicos de la planta podrían explicar el efecto espasmolítico observado en este trabajo. Por ejemplo, flavonoides como la quercetina inhiben las contracciones en íleon de rata por inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) (Hammad y Abdalla, 1997), las variaciones químicas estructurales de los flavonoides les proporcionan distinta afinidad sobre las isoenzimas de la PDE, al inhibir estas enzimas los flavonoides impiden la degradación del AMP_C lo cual permite la relajación de la musculatura lisa (Wun-Chang y cols., 2004). La quercitrina es un flavonoide presente en el extracto acuoso de *A. diversifolia* Saff. (Brindis y cols., 2013), con respecto a éste Galvez y cols. (1993) demostraron su efecto antidiarréico al interferir en la modulación de síntesis de ácido araquidónico en el intestino.

El daño inducido al tejido en este trabajo se le podría atribuir a las acetogeninas presentes en la planta, las cuales se consideran agentes citotóxicos y causantes de neurotoxicidad (Ven y cols., 2014). Si bien, en la *A. diversifolia* Saff. sólo se han encontrado estos compuestos en las semillas, en otras especies de este género, como la *A. muricata*, también se han encontrado en las hojas (Champy y cols., 2004; García, 2009b). El mecanismo citotóxico de las acetogeninas radica en afectar la cadena respiratoria a nivel mitocondrial. Liaw y cols. (2011) sugieren que el efecto citotóxico se debe a la acción quelante que tienen las acetogeninas, debido a que pueden formar complejos químicos con iones divalentes como el calcio, formando complejos que son hidrófobos y pueden atravesar membranas citoplasmáticas con facilidad generando un desbalance en las concentraciones de Ca²⁺ y con ello afectar a la célula a distintos niveles, debido a que el Ca²⁺ participa en distintas funciones enzimáticas.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la *A. diversifolia* induce un efecto relajante del intestino delgado del cobayo de casi el 40% en todos los protocolos con los diferentes espasmógenos utilizados. Este efecto es interpretado como un efecto espasmolítico.

En conclusión, los resultados constituyen una aportación científica al conocimiento etnomédico de la *A. diversifolia* Saff.; dando así sustento a su uso en la medicina tradicional para el alivio de los cólicos por su efecto antiespasmódico.

Finalmente, a pesar de que en la medicina tradicional se utiliza esta especie vegetal para tratar los cólicos, el modelo *in vitro* empleado en este trabajo sugiere que la seguridad del extracto podría no ser adecuada, ya que, el efecto antiespasmódico del extracto muestra una respuesta atípica, que se estabiliza a tiempos muy prolongados (casi 20 min), en comparación con otros extractos estudiados (4 min). Además, los resultados sugieren que la exposición del tejido a varias concentraciones del extracto podrían dañarlo disminuyendo su posibilidad de recuperación. Aunque en los estudios donde determinaron la dosis letal de este extracto administrado por vía oral, se determinó que es un extracto “seguro” para su administración sistémica.

10. PERSPECTIVAS

1. Es necesaria la identificación y cuantificación de los compuesto bioactivos responsables del efecto espasmolítico del extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia* por medio de un estudio biodirigido.
2. Es necesario hacer estudios de toxicidad crónica para determinar su seguridad en diferentes órganos y sistemas.
3. Por último, consideramos que se deben hacer estudios de farmacocinética para determinar si alguno de los componentes “tóxicos” (como las acetogeninas) de la planta se inactivan por la biotransformación en los animales íntegros y esto proporcione un amplio margen de seguridad en el uso sistémico de los extractos de esta especie vegetal.

11. REFERENCIAS

- Aguilar-Mariscal H., Luján-Estrada M., Rodríguez Carranza R. 2009. Curva dosis respuesta gradual. En Farmacología. Programa académico y manual de prácticas de laboratorio. pp 75-77. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.
- Andrés-Agustín J., 2011. Diversidad de géneros y especies de Annonaceae en México. En González-Esquinca R. Luna-Cazáres L., Gutiérrez- Jiménez J., Shile-Guzmán M., Vidal-López D., Anonáceas. Plantas antiguas, estudios recientes pp. 79–89. México: Colección Jaguar UNICACH.
- Angeles-López G., González-Trujano E., Déciga-Campos M., Ventura-Martínez R. 2013. Neuroprotective evaluation of *Tilia americana* and *Annona diversifolia* in the neuronal damage induced by intestinal ischemia. Neurochem Res. 38: 1632–1640.
- Argueta A., Mata S., Zolla C. 2009. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 01 de diciembre de 2014 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
- Ballesteros P.G., Rodríguez P.L., Reynoso J., Zavala H.F., Martínez S.J., Flores L.L. y cols. 2006. Diversidad en las ilamas (*Annona diversifolia* Saff.) de la tierra caliente del balsas, pp 55 México. Guerrero México: SAGARPA.
- Brindis F., González-Trujano M., González-Andrade M., Aguirre-Hernández E., Villalobos-Molina R. 2013. Aqueous extract of *Annona macrophyllata* a potential α -glucosidase Inhibitor. Biomed Res. Int. Article ID 591313, 6 pages. doi:10.1155/2013/591313.
- Brookes S. 2001. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. Anat. Rec. 262, 58–70.
- Bywater R., Holman M., Taylor G. 1981. Atropine-resistant depolarization in the guinea-pig small intestine. J Physiol. 316: 369 – 378.
- Carballo M., Cortada C., Gadano A., 2005. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Theoria. 14: 95 – 108.
- Carballo A., Martínez A., González-Trujano M. Pellicer F., Ventura-Martínez R., Díaz-Reval I. y cols. 2010. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitona as a bioactive compound. Pharmacol Biochem Behav. 95: 6–12.
- Cimanga R.K., Mukenyi P.N.K., Kambu O.K., Tona G.L., Apers S. Totté J. y cols. 2010. The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda moridoides* (Baker) Milene-Redh (Rubiaceae). J Ethnopharmacol. 127: 215–220.
- Chacón I., González-Esquinca A. 2012. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. Nat Prod Res. 26: 42–49.

- Champy P., Hölinger G., Féger J., Gleye C., Hocquemiller R., Laurens A. y cols. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and strial neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadalupe. *J Neurochem.* 88: 63–69.
- Chaudhary M., Bashir I., Mehmood M., Rehman N., Gilani A. 2012. Evaluation of gut modulatory and bronchodilator activities of *Amaranthus spinosus* Linn. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/166>.
- Costa M., Brooks J.H., Henning G.W. 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut.* 47: iv15–iv19.
- Donnerer J., Liebmann I., Holzer-Petsche U. 2014. Hexamethonium-induced augmentation of the electrical twitch response in the guinea-pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus strip. *Neurosci Lett.* 577: 34–37.
- Epstein F.H., Goyal R.K., Hirano I. 1996. Mechanisms of disease. *New Engl J Med.* 334: 1106–1115.
- Ehlert F., Ostrom R., Sawyer G. 1997. Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sci.* 61: 1729–740.
- Estrada-Reyes R., Parra-Delgado H., Martínez-Vázquez M. 2011. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Annona* como fuente de potenciales fármacos. En González-Esquínca R. Luna-Cazáres L., Gutiérrez-Jiménez J., Shile-Guzmán M., Vidal-López D., Anonáceas Plantas antiguas, estudios recientes pp. 62–73. México: Colección Jaguar UNICACH.
- Furness J.B., Costa M. 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience.* 5: 1 – 20.
- Galvez J., Zarzuelo A., Crespo ME., Lorente MD., Ocete MA., Jiménez J. 1993. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* 59: 333 – 336.
- García A., Michelena P., Gandía L. 2005 Fármacos antagonistas del calcio. En Flórez J. *Farmacología Humana.* 5 a. edición. Elsevier
- García L.C., Pérez Hernández B., Martínez R.A., Castro B.F. 2009a. Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. *RCHSZA* 8: 229–239.
- García Aguirre K.K. 2009b Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación gentóxica y potencial quimioterapéutico. Tesis (Doctorado en ciencias Quimicobiológicas) México, IPN Escuela nacional de ciencias biológicas. p 104.
- Godfraind T., Miller R., Wibo M. 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev.* 38: 321–414.

- González-Esquinca A.R., De-La-Cruz-Chacón I., Castro-Moreno M., Orozco-Castillo J.A., Riley-Saldaña C. 2014. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Rev. Bras. Frutic.* 36: 1 – 16.
- González-Trujano M. E., Navarrete A., Reyes B. Cedillo-Portugal E., Hong E. 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Med.* 67, 131–141.
- González-Trujano M.E., Martínez A., Reyes-Ramírez A., Reyes-Trejo B., Navarrete A. 2006a. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Med.* 72, 703–707.
- González-Trujano M.E., Tapia E., López-Meraz L., Navarrete A., Reyes-Ramírez A., Martínez A. 2006b. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia.* 47: 1810–1817.
- González-Trujano M.E., Ventura-Martínez R., Chávez M. Díaz-Reval I., Pellicer F. 2012. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identification in *Agastache mexicana*. *Planta Med.* 78: 793–796.
- Guyton A.C. 2011. Capítulo 63 Propulsión y mezcla de los alimentos en el tubo digestivo. En *Tratado de fisiología médica*. pp 763 – 772. 12ª ed. España. Elsevier.
- Hasen T., Dineen D., Petrak R. 1984. Mechanism of action of barium ion on rat aortic smooth muscle. *Am J Physiol.* C235–C241.
- Hammad H., Abdalla S. 1997. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmac.* 28: 767–771.
- Harrison A.P., Erlwanger K.H., Elbrend V.S., Anderesen N.K., Unmack M.A. 2004. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. *J Pharmacol Toxicol.* 49: 187–199.
- Heinrich M., Haller B., Leonti M. 2014. A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: The eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *J Nat Prod.* 77: 678–689.
- Jude J., Wylam M., Walseth T., Kannan M. 2008. Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc.* 5: 15–22.
- Julián-Loeza A., Santos-Sánchez F., Valadez-Blanco R., Sánchez-Guzmán B., Salas-Coronado R. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Ind Crop Prod.* 34: 1262–1268.
- Karaki H., Satake N., Shibata S. 1986. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Br J Pharmac.* 88: 821–826.
- Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K. y cols. 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 49: 157–230.

- Kasilo O., Nikiema J. 2014. Novel plant bioresources: Applications in food, medicine and cosmetics. 1ª edición. Ameenah Gurib-Fakim.
- Kunze W.A.A., Furness J.B. 1999. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 61: 117–42.
- Liaw C.C., Liao W.Y., Chen C.S., Jao S.C., Wu Y.C., Shen C.N. Wu S.H. 2011. The calcium-chelating capability of tetrahydrofuranic moieties modulates the cytotoxicity of annonaceous acetogenins. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50: 7891–7891.
- Lin C., Yang C., Ko Y., Wu Y., Teng C. 1994. Antimuscarinic action of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, in canine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 113: 1464–1470.
- López-Rubalcava C., Piña-Medina B., Reyes-Estrada R., Heinze G., Martínez-Vázquez M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona Cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci.* 78: 730–737.
- Luna-Cazás L., González-Esquinca R. 2008. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé Ex Dunal. *Polibotanica.* 25: 121–125.
- Naidoo V., Dai X., Galligan J. 2010. R-Type Ca²⁺ channels contribute to fast synaptic excitation and action potentials in subsets of myenteric neurons in the guinea pig intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 22: e353–e363.
- Navarro A. 2002. Anatomía quirúrgica del yeyuno/íleon. Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), II-240.
- Nezami B., Srinivasan S. 2010. Enteric nervous system in the small intestine: Pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep.* 12: 358–365.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- Okoye T., Akah P., Ezike A., Okoye M., Onyeto C., Ndukwu F., Ohaegbulam E., Ikele L. 2012. Evaluation of the acute toxicity of *Annona senegalensis* root bark extracts. *Asian Pac J Trop Med.* 277–282.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra (OMS). 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005.
- Pasricha P. 2006. Tratamiento de trastornos de la motilidad intestinal y del flujo de agua; antieméticos; fármacos utilizados en enfermedades biliares y pancreáticas. En Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. pp 983–1009. México, 11ª edición. McGraw Hill.
- Pastel B.A. Dai X., Burda J.E., Zhao H., Swain G., Galligan J. y cols. 2010. Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. *Neurogastro Motil.* 22: 909–e237.

- Ramírez A. 2014. Evaluación de la actividad antiespasmódica y antidiarreica del extracto metanólico de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* en modelos experimentales. Tesis (Licenciatura QFB.) México, UNAM Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Pp 51.
- Rang y Dale. 2008. Capitulo 4 Mecanismos celulares: excitación, contracción y secreción Capitulo 25 Aparato Digestivo. En Farmacología 6ª ed. pp 54 - 71 y 385 – 396. España. Elsevier.
- Remes-Troche J.M., Gómez-Escudero O., Nogueira-de Rojas J.R. y cols. 2010. Tratamiento farmacológico del síndrome de intestino irritable: revisión técnica. Rev Gastroenterol Mex. 75: 42–66.
- Rodriguez R., Ventura-Martinez R., Santiago-Mejia J., Avila-Costa M., Fortoul T. 2006. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after *in situ* ischemia. Brit J Pharmacol. 147: 371–378.
- Rokaya M., Uprety Y., Poudel R., Timsina B., Münzbeğová Z., Asselin H. y cols. 2014. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. J Ethnopharmacol. 158: 221–229.
- Sánchez A., Fonseca G., Capiro N., Fernández D. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Rev Cubana Farm. 34: 34–43.
- Santiago-Mejia J., Ventura-Martinez R., Gomez C., Parra-Gamez L., Gonzales-Rios J., Rodriguez R. 2007. Polyviewed expression of the altered contractility of the ginea-pig ileum after ischemia *in situ* and superfusión *in vitro*. J Physiol Pharmacol. 58: 275–285.
- Santos-Sánchez N., Julián-Loeza A., Valadez-Blanco R., Guzmán-Sánchez B., Salas-Coronado R. 2011. Composición química y actividad antirradical de tres variedades del frutos de *Annona diversifolia* Safford. En González-Esquinca R. Luna-Cazáres L., Gutiérrez- Jiménez J., Shile-Guzmán M., Vidal-López D., Anonáceas Plantas antiguas, estudios recientes. pp. 201–229. México: Colección Jaguar UNICACH.
- Sawyer G., Ehlert F. 1998. Contractile roles of the M2 and M3 muscarinic receptors in the guinea pig colon. Pharmacol Exp Ther. 284: 269–277.
- Schlie-Guzman M., García-Carranca A., González-Esquinca A. 2009. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. Phtother Res. 23: 1128–113.
- Shah N., Khurana S., Cheng K., Raufman J.P. 2009. Muscarinic receptors and ligands in cancer. Am J Physiol Cell Physiol. 296: C221–C232.
- Shimizu K., Ichikawa T., Urakawa N., Nakajyo S. 2000. Inhibitory mechanism of papaverine on the smooth muscle of guinea pig urinary bladder. J Pharmacol. 83: 143–149.
- Shiner M. 1995. Anatomy of the small intestine. In Gastroenterology vol. 5 Haubnch W.S. eds. Philadelphia: WB Saunders company.

- Sookvanichsilp N., Gritsanapan W., Somanabandhu A., Lekcharoen K., Tiankrop P. 2006. Toxicity testing of organic solvent extracts from *Annona squamosa*: effects on rabbit eyes and ear skin. *Phytother Res.* 8: 365–368.
- Suguro M., Matsuyama H., Tanahashi Y., Unno T., Kitazawa T., Yamada M. y cols. 2009. Muscarinic receptor subtypes mediating Ca²⁺ sensitization of intestinal smooth muscle contractions: studies with receptor knockout mice. *Pharmacology.* 72: 443–451.
- Suleiman M., Dzenda T., Sani C. 2007. Antidiarrhoeal activity of the metanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* Pers (Annonaceae). *J Ethnopharmacol.* 116: 125–130.
- Tiangda CH., Gritsanapan W., Sookvanichsilp N., Limchalearn A. 2000. Anti-headline activity of a preparation of *Annona squamosa* seed extract. *Southeaste Asian J Trop Med Public Health.* 31: 174–177.
- Ven J., Shmitz-Afonso I., Lewin G., Brunelle A., Touboul., Champy P. 2014. Identification of the enviornmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. Alcoholic beverage using HPLC-ESI-LTC. *J Agric Food Chem.* 62: 8696–8704.
- Ventura-Martínez R., Rivero-Osorio O., Gómez C., González-Trujano M.E. 2011. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol.* 137:1528–1532.
- Webb C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* 27: 201–206.
- Wirasathien L., Boonarkart C., Pengsuparp T., Suttisri R. 2006. Biological activities of alkaloids from *Pseuduvaria setosa*. *Pharmaceutical Biology.* 44: 274–278.
- Wun-Chang K., Chwen-Mising S., Ya-Hsin L., Jun-Hao C., Hui-Lin H. 2004. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 68: 2087–2094.
- Yang J.M., Siu P., Che C.T., Yeung J. 2011. Relaxant effects of *Schisandra chinensis* and its major lignans on agonists-induced contraction in guinea pig ileum. *Phytomedicine.* 18: 1153–1160.
- Zhang L., Buxton I. 1991. Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle II. Signal transduction pathways. *Mol Pharmacol.* 40: 952–959.
- Zicha J., Behuliak M., Pintérová M., Bencze M., Kunes J. 2014. The interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res.* 63: S19–S27.