



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

Evaluación del efecto antiespasmódico de dos metabolitos secundarios aislados de *Agastache mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A :

Pinzón Ramírez Moisés

D I R E C T O R A :

Dra. Rosa Ventura Martínez



MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: MTRO. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

VOCAL: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

SECRETARIO: M. EN F. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

SUPLENTE: DRA. BEATRIZ ESPINOZA FRANCO

SUPLENTE: MTRA. MA. DEL ROSARIO BENITEZ VELAZQUEZ

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

**INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA 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**

Directora de tesis: Dra. Rosa Ventura Martínez

Asesor interno: M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez

Sustentante: Moisés Pinzón Ramírez

DEDICATORIA

A mis padres, porque ustedes siempre han sido mi ejemplo a seguir, porque con su sacrificio a través de todos estos años me han brindados los elementos necesarios para lograr cada una de las metas sin importan el tamaño de los obstáculos. Siempre han creído en mí a pesar de las situaciones que hemos sufrido juntos.

A ti mama gracias, por ser la persona que me ha acompañado en esas noches de desvelo para motivarme a terminar los pendientes escolares e incluso en la comprensión de esta nueva etapa de mi vida.

Existe miles de palabras para decirles lo mucho que les agradezco su apoyo, pero lo saben bien a veces no soy tan expresivo como quisiera que fuera.

Gracias papas.

Moisés

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis Dr. Rosa Ventura por apoyarme desde que inicie el Servicio Social y hasta la culminación de este documento, por entenderme y por apoyarme como una amiga, siempre alentándome para nunca quedarme atrás.

Al personal del laboratorio de Desarrollo de medicamentos, Dr. Jacinto Santiago, Dr. Claudia Gómez y Dr. Rodolfo Rodríguez que a pesar de su seriedad en cada reunión siempre comentaba una anécdota divertida.

El mundo es de los valientes y atrevidos por que todo es posible siempre y cuando se tenga la decisión de continuar.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 PLANTAS MEDICINALES	11
2.2 <i>Agastache mexicana</i>	12
2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS	13
2.4 FLAVONOIDES	14
2.5 ESPASMOS INTESTINALES	16
2.6 MEDICAMENTOS ANTIESPASMÓDICOS	16
2.7 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE INTESTINO DELGADO	18
2.8 SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO (SNE)	18
2.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA CON PREPARACIONES DE ÍLEON AISLADO DE COBAYO	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 GENERAL	26
5.2 PARTICULARES	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 TIPO DE ESTUDIO	27
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	27
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.	27
6.4 VARIABLES	28
6.5 MATERIAL	28

6.5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	28
6.5.2 MATERIAL DE LABORATORIO	28
6.5.3 SOFTWARE	29
6.5.4 EQUIPO	29
6.5.5 REACTIVOS	29
6.6 MÉTODOS	30
6.6.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN	30
6.6.2 PREPARACIÓN DEL TEJIDO	31
6.6.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE EL TEJIDO PRE-CONTRAÍDO CON KCl.	32
6.6.4 DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN	32
6.7 ANÁLISIS DE DATOS.	33
7. RESULTADOS	35
7.1 DETERMINACIÓN DEL EFECTO RELAJANTE DE LA ACACETINA Y EL ÁCIDO URSÓLICO, METABOLITOS DEL <i>A. mexicana</i>, EN TEJIDO PRECONTRAÍDO CON KCl	35
7.2 DETERMINACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DEL EFECTO RELAJANTE PRODUCIDO POR LA ACACETINA.	37
8. DISCUSIÓN	41
8.1 EFECTO RELAJANTE DE LA ACACETINA Y EL ÁCIDO URSÓLICO	41
8.2 ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL EFECTO RELAJANTE INDUCIDO POR LA ACACETINA.	43
9. CONCLUSIONES	47
10. PERSPECTIVAS	48
11. REFERENCIAS	49

ABREVIATURAS

<i>A. mexicana</i>	<i>Agastache mexicana</i>
ACh	Acetilcolina
AM	Azul de Metileno
ATP	Adenosin trifosfato
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CE ₅₀	Concentración Efectiva 50
CO ₂	Bióxido de Carbono
IPANs	Neuronas intrínsecas aferentes primarias
KCl	Cloruro de Potasio
L-NAME	(N (G)-nitro-L-arginina metilester)
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
O ₂	Oxígeno
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Agastache mexicana</i> (HBK.)	13
Figura 2.	Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Agastache mexicana</i> (HBK.) (a) Acacetina (b) Ácido ursólico.	14
Figura 3.	Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.	15
Figura 4.	Anatomía del intestino delgado.	18
Figura 5.	Corte transversal del intestino delgado.	20
Figura 6.	Representación esquemática entre el SNE y el SNC.	21
Figura 7.	Curva concentración respuesta del efecto relajante de acacetina en el íleon de cobayo pre-contráido con KCl.	35
Figura 8.	Curva concentración respuesta del efecto relajante inducido por ácido ursólico en íleon de cobayo pre-contráido con KCl.	36
Figura 9.	Efecto relajante de la acacetina en ausencia y presencia de Hexametonio, un bloqueador ganglionar, sobre íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl.	38
Figura 10.	Efecto relajante de la acacetina en ausencia y presencia de indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, sobre íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl	38
Figura 11.	Efecto relajante de la acacetina en ausencia y presencia de L-NAME, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, sobre íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl.	39
Figura 12.	Efecto relajante de la acacetina en ausencia y presencia de azul de metileno, un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl.	40

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales juegan un papel clave en el tratamiento de diversas enfermedades que padece la población de la mayor parte del mundo. Se estima que se utilizan cerca de unas 10,000 especies vegetales con este propósito.

La *Agastache mexicana* es una planta medicinal muy popular en México que es utilizada en la medicina tradicional para el alivio de los espasmos producidos por algunas de las enfermedades gastrointestinales, cardiovasculares y nerviosas. Se conocen dos subespecies de la *A. mexicana*, la ssp. *mexicana*; y la ssp. *xolocotziana*, conocidas en la medicina tradicional como “toronjil morado” y “toronjil blanco”, respectivamente, por el color de sus flores.

Algunos extractos del *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* ya han sido estudiados en un modelo experimental de dolor (modelo de contracción abdominal en ratones) que simula los cólicos intestinales. Los resultados de este trabajo muestran que esta especie sí tiene efecto analgésico en esas condiciones experimentales. También, en un trabajo previo de nuestro laboratorio, se demostró que los extractos del *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* producen un efecto espasmolítico en el modelo de íleon de cobayo; sin embargo, no se conoce a los metabolitos responsables de este efecto.

Para esto se diseñó este trabajo experimental, en el cual se estudia el efecto espasmolítico inducido por dos de los principales metabolitos secundarios aislados de la planta (acacetina y ácido ursólico) para saber cuál de éstos es el responsable del efecto inducido por el extracto. Además, en este trabajo se realiza un primer acercamiento que nos permite dilucidar el mecanismo de acción por el cual el o los metabolitos de la planta pueden estar produciendo su efecto espasmolítico.

Esto se realizó utilizando un modelo *in vitro* con el íleon aislado de cobayo pre contraído con cloruro de potasio, ya que este modelo es muy utilizado en la evaluación de diversos efectos farmacológicos. Este fue descrito inicialmente en 1904 por Magnus, y es una de las pruebas *in vitro* más utilizada en la actualidad para la evaluación de diversos efectos farmacológicos de diversos extractos de plantas y fármacos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas medicinales

La medicina alternativa abarca diferentes prácticas médicas, que varían entre países o regiones; entre ellas destaca la fitoterapia¹; que es la ciencia y el arte del uso de los productos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico². Las plantas medicinales juegan un papel clave en el mantenimiento de la salud de la población de la mayor parte del mundo. Se estima que se utilizan unas 10,000 especies vegetales con este propósito, particularmente en la medicina tradicional³.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 80% de la población mundial usa preparaciones botánicas como medicamentos. Las estadísticas demuestran que en los países en desarrollo se necesitan tratamientos baratos y eficaces para curar enfermedades transmisibles, ya que es donde más de un tercio de la población carece de los medicamentos esenciales. La administración de productos herbolarios y las fitomedicinas seguras y eficaces podrían mejorar de forma importante el acceso a la atención de la salud, integrando a la medicina tradicional en el sistema de salud oficial con las nuevas reformas regulatorias⁴. El uso de medicinas derivadas de plantas es muy diverso e incluye, por ejemplo, compuestos puros, infusiones de plantas medicinales, decocciones, tinturas, partes de las plantas cortadas o pulverizadas y extractos no estandarizados. En la mayoría de los casos, no se cuenta con suficiente información acerca de su eficacia clínica, efectos farmacológicos demostrados científicamente y, mucho menos, posibles interacciones farmacológicas con otros medicamentos.

2.2 *Agastache mexicana*

Entre las numerosas especies que son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para la prevención y tratamiento de diversos padecimientos esta la *A. mexicana* (Fig. 1).

El género *Agastache*, pertenece a la familia Lamiaceae, y está conformado por cerca de 22 especies, entre las cuales se encuentra la *Agastache mexicana*. De ésta, se han identificado dos subespecies: *A. mexicana ssp. mexicana*; y *ssp. xolocotziana*, también conocidas por el color de sus flores como “toronjil morado” y “ toronjil blanco”, respectivamente⁵.

A. mexicana [sinonimia: *Cedronella mexicana* (Kunth) Benth.], conocida popularmente en México con los nombres de toronjil, olotillo, abejera, cidronela y melisa, es una hierba perenne de 40 a 50 cm, muy aromática al estrujarse, presenta hojas delgadas, flores y tallos de color morado y tiene un aroma dulce. Esta especie se encuentra distribuida en los estados de Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco y Michoacán⁶.

A. mexicana es una planta de gran demanda que ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar la ansiedad, el insomnio, trastornos cardiovasculares, reumatismo, dolor de estomago y afecciones gastrointestinales^{7,8}. También se utiliza en enfermedades culturales conocidas como “empacho”, “susto” y “mal de ojo”⁸. Estudios recientes han demostrado que extractos polares, medianamente polares y no polares de *A. mexicana* producen una actividad antinociceptiva y antiinflamatoria en un modelo de dolor visceral en ratones⁹ (modelo de Writhing). Estos estudios sustentan en parte su uso en la medicina tradicional para el alivio del dolor visceral. Además, en un trabajo previo de nuestro laboratorio, también se demostró un efecto antiespasmódico del mismo extracto del *Agastache*; sin embargo, no se ha determinado cuál es el metabolito secundario responsable del efecto antiespasmódico y/o su posible mecanismo de acción.



Figura 1. *Agastache mexicana* (HBK.)

2.3 Metabolitos secundarios

Los estudios químicos que se han realizado sobre la *A. mexicana* han conducido al aislamiento de diversos metabolitos secundarios, del grupo de los alcanos (nonano); monoterpenos (camfeno- β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, furfural, citronelal, mentona); terpenos (pulegona), y flavonoides (crisina, apigenina, luteolina, diosmetina, acacetina y ácido ursólico), los cuales se encuentran en diferentes concentraciones. El análisis químico de esta especie ha mostrado que los compuestos identificados como más abundantes del extracto metanólico son acacetina (Fig. 2a) y (2-acetil)-7-O-glucosil-acacetina; mientras que, del extracto de acetato de etilo, el más abundante es el ácido ursólico (Fig. 2b). Además, un análisis por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas mostraron que la pullegona, limoneno, mentona e isopulegona son los principales componentes del aceite esencial. Diversos estudios han mostrado que varios de estos productos poseen diferentes actividades biológicas, confiriéndole la actividad biológica a las especies que los contienen¹⁰.

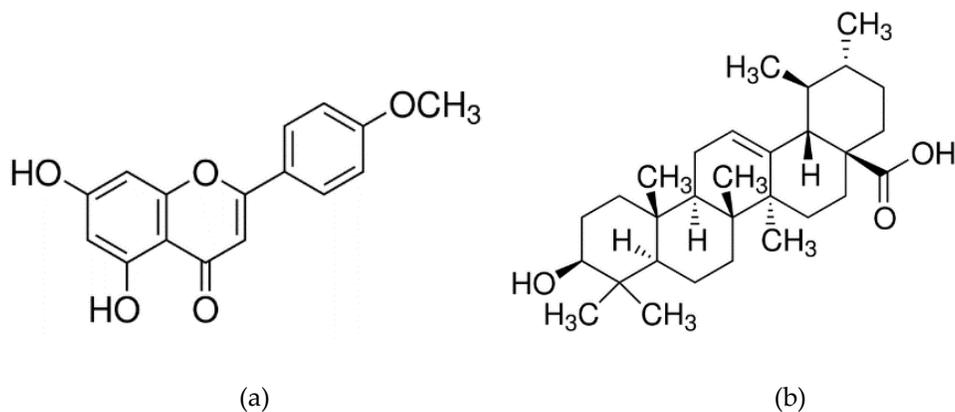


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Agastache mexicana* (HBK.) (a) Acacetina (b) Acido ursólico.

2.4 Flavonoides

La acetina pertenece al grupo de los flavonoides, los cuales constituyen una parte integral de la dieta humana, ya que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales. Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos, que se dividen de acuerdo a sus constituyentes en: flavonoles, flavonas, flavononas, flavanoles (catequinas), antocianidinas y las isoflavonas. La estructura fundamental de los flavonoides está formado por dos anillos de benceno (A y B) unidos por 3 átomos de carbono que por lo general forman un anillo heterociclo oxigenado (o el anillo C).

Los flavonoides se diferencian entre sí por el número y distribución de los grupos hidroxilo, así como en la presencia (o ausencia) de un doble enlace entre el carbono de los átomos 2 y 3 del anillo¹¹ C (Fig. 3).

Se sabe que los flavonoides presentan diferentes efectos biológicos como la inhibición de la agregación plaquetaria, actividad antioxidante, prevención de la proliferación de células y, en los últimos años, se ha propuesto que pueden ejercer efectos benéficos en diferentes patologías, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos¹².

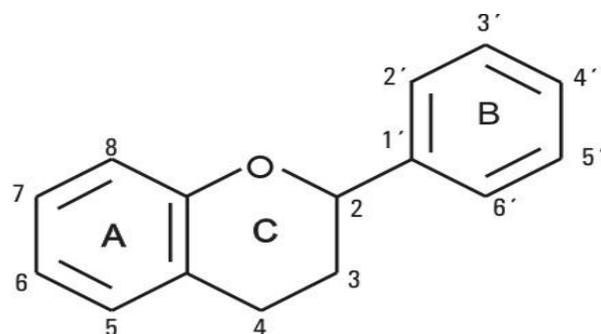


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

Se ha descrito que los flavonoides producen efectos relajantes sobre la contractilidad del músculo liso, tales como el músculo liso vascular¹³, vejiga¹⁴, los conductos deferentes¹⁵, y el útero. En particular, en el tracto gastrointestinal reducen la contracción de células musculares lisas provocada por varios espasmógenos¹⁶, con un mecanismo probablemente debido a una interferencia con los movimientos de calcio a través de las membranas celulares¹⁷.

La evidencia sugiere que los efectos celulares de los flavonoides pueden ser independientes de su capacidad antioxidante, y que pueden estar mediados por la interacción con proteínas específicas que desencadenan las cascadas de señalización intracelular¹⁸. Sin embargo, debido a diferencias en la solubilidad en los lípidos y la presencia de diferentes sustituciones en los átomos de carbono de la estructura básica de los flavonoides, pueden tener una actividad diferente y potencial. La relación estructura-actividad se ha propuesto para la actividad vaso relajante¹⁹ que conlleva a un efecto antiespasmódico en el intestino. Los efectos antiespasmódicos se han estudiado en el modelo del íleon de rata²⁰.

2.5 Espasmos intestinales

Los espasmos se definen como la contracción involuntaria y persistente de un músculo o grupo muscular. Los espasmos en el músculo liso intestinal se pueden originar a nivel del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), a partir del cual, el músculo liso puede recibir una cantidad elevada de impulsos provocando contracciones exageradas, también a nivel del Sistema Nervioso Entérico (SNE) son provocados por diversos cambios químicos y físicos en los alrededores del tejido²¹.

Muchas afecciones diferentes pueden causar espasmos intestinales acompañado de dolor abdominal. Las causas más comunes que dan origen a un espasmo intestinal son: diarrea y/o estreñimiento, síndrome del intestino irritable, alergias o intolerancia a medicamentos (como la intolerancia a la lactosa), intoxicación alimentaria y gastroenteritis vírica epidémica.

2.6 Medicamentos antiespasmódicos

Los fármacos antiespasmódicos, también conocidos como espasmolíticos, son un grupo de sustancias que previenen o interrumpen los espasmos del músculo liso intestinal. En México son los agentes más utilizados de manera inicial para tratar el dolor o el malestar abdominal ocasionado por los espasmos. Los fármacos con efecto antiespasmódico se clasifican en:

- a) Agentes relajantes directos del músculo liso. Estos fármacos actúan sobre receptores musculotropicos del músculo liso del aparato digestivo, reducen el tono y el peristaltismo y alivian los espasmos intestinales sin afectar de forma sustancial la motilidad gastrointestinal. A este grupo pertenecen la mebeverina, la trimebutina y los agentes derivados de la papaverina²².

-
- b) Antiespasmódicos anticolinérgicos. Este subgrupo de antiespasmódicos atenúa los espasmos o contracciones en el intestino y por lo tanto tiene el potencial de reducir el dolor abdominal. En este grupo se incluyen la butilioscina, hioscina, hiosciamina, levsina, dicicloverina, butilescopolamina y bromuro de cimetropio²². Tienen afinidad por los receptores muscarínicos, pero sin actividad intrínseca, se unen al receptor colinérgico e impiden la acción de la acetilcolina.
- c) Agentes bloqueadores de los canales del calcio. Los antagonistas del calcio relajan el intestino al prevenir la entrada de calcio en las células del músculo liso intestinal. Dado que el calcio desencadena la cascada de sucesos que activa la contracción muscular, la inhibición del calcio en las células causa relajación intestinal. Este grupo de medicamentos, al reducir el índice de motilidad, puede disminuir el reflejo gastrocólico y modificar el tiempo de tránsito colónico. A este grupo pertenecen el bromuro de pinaverio, bromuro de otilonio, alverina, fenoverina, rociverina y pirenzepina²².
- d) Antiespasmódicos en combinación. En fecha reciente se han utilizado en México combinaciones de agentes relajantes directos de músculo liso y antagonistas del calcio con dimeticona o simeticona, sustancias tensoactivas que disminuyen la formación de gas en el tracto gastrointestinal mediante una acción directa sobre la tensión superficial de las burbujas de gas, tras desintegrar dichas burbujas y evitar su formación, por lo que se han usado de modo adicional para mejorar la distensión abdominal relacionada y reducir la expulsión de flatos²².

Dado que el principal sitio de acción de los antiespasmódicos involucra al tracto gastrointestinal, y en su mayoría al intestino delgado, es necesario explicar un poco sobre su anatomía y su fisiología.

2.7 Anatomía y fisiología de intestino delgado

El intestino delgado es un órgano tubular enrollado que se extiende desde el píloro a la válvula íleo-cecal y que ocupa la parte central e inferior de la cavidad abdominal. Este limitado por el intestino grueso y se divide en tres segmentos: duodeno, yeyuno e íleon²³ (Fig. 4).

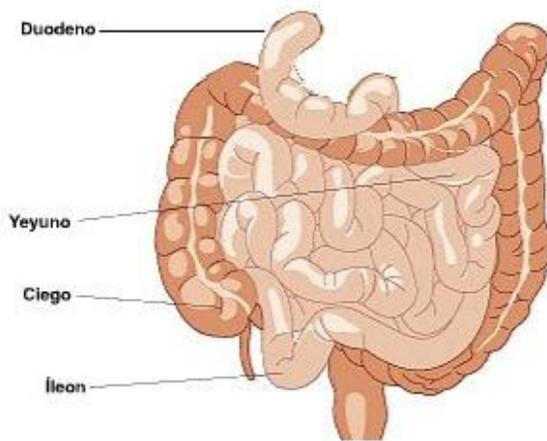


Figura 4. Anatomía del intestino delgado.

El yeyuno-íleon es la porción móvil del intestino delgado que continúa al duodeno y termina a nivel de la válvula ileocecal, desembocando en el intestino grueso. Se divide anatómica y funcionalmente en 2 porciones sucesivas: el yeyuno (del latín jejuno = ayuno) y el íleon (del griego eilein= enrollado). Cumple con funciones de secreción, absorción y motilidad, completando el procesado de los nutrientes. Es un órgano intraperitoneal dado que está íntegramente cubierto por peritoneo visceral. Se extiende desde el ángulo de Treitz hasta la válvula ileocecal²⁴.

2.8 Sistema Nervioso Entérico (SNE)

La motilidad gastrointestinal es la propiedad de las paredes intestinales para contraerse y relajarse a fin de que el contenido del intestino vaya de un lugar a otro, favoreciendo la absorción adecuada de nutrientes. Las estructuras involucradas para realizar esta función son: el SNE (organizado en dos plexos nerviosos), las capas musculares (circular y longitudinal); y, las células intersticiales de Cajal.

El sistema nervioso entérico (SNE) es la parte más compleja del sistema nervioso periférico. Está constituido por una gran cantidad de células gliales y neuronas: 80 a 100 millones de neuronas, que son una milésima parte de las que existen en el encéfalo, pero mayor cantidad que las que hay en la médula espinal. El SNE proviene de las células de la cresta neural y dan origen a dos plexos nerviosos: submucoso o de Meissner; y mientérico o de Auerbach.

La mayor parte de las neuronas involucradas en las funciones motoras del intestino se encuentran localizadas en el plexo mientérico con algunas neuronas aferentes primarias localizadas en el plexo de la submucosa²⁵ (Fig. 5).

El SNE, como ya se ha mencionado, está compuesto por un gran número de neuronas entéricas las cuales pueden ser identificadas por su localización, morfología y función. Gracias a los estudios realizados en el intestino delgado de cobayo, en las últimas dos décadas, se ha logrado hacer una descripción completa de los diferentes tipos de neuronas entéricas²⁴.

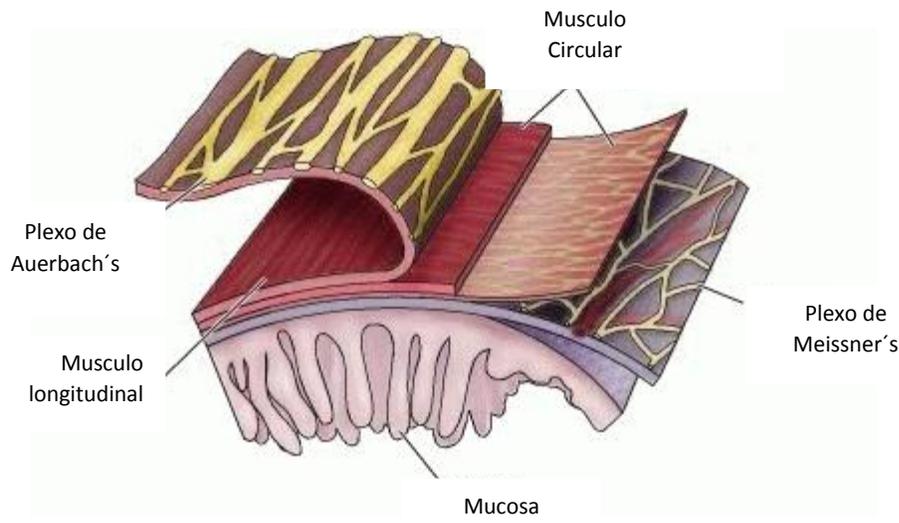


Figura 5. Corte transversal del intestino delgado.

El SNE es un complejo sistema de neuronas y células de sostén capaces de generar información, integrarla y producir una respuesta. Sin embargo, tiene conexiones con el sistema nervioso central (SNC), lo cual crea respuestas de tipo aferente y eferente e intercambia información entre ambos sistemas. Las neuronas aferentes envían información de tres tipos al SNC: el contenido químico intraluminal, el estado mecánico de la pared intestinal (tensión o relajación) y la condición en la que se hallan los tejidos (inflamación, pH, frío, calor). Las neuronas eferentes transmiten información del SNC al SNE. Tanto las vías aferentes como las eferentes siguen dos vías principales: espinal y vagal (Fig 6).

El SNE está constituido por neuronas intrínsecas aferentes primarias, también conocidas por sus siglas en inglés, "IPANs", las cuales se encuentran en el plexo mientérico y el plexo de la submucosa. Estas neuronas responden a estímulos químicos y físicos como la deformación de la mucosa y la tensión del músculo. Al ocurrir esto, las

IPANs se encargan de enviar las señales necesarias al resto del sistema nervioso entérico²³.

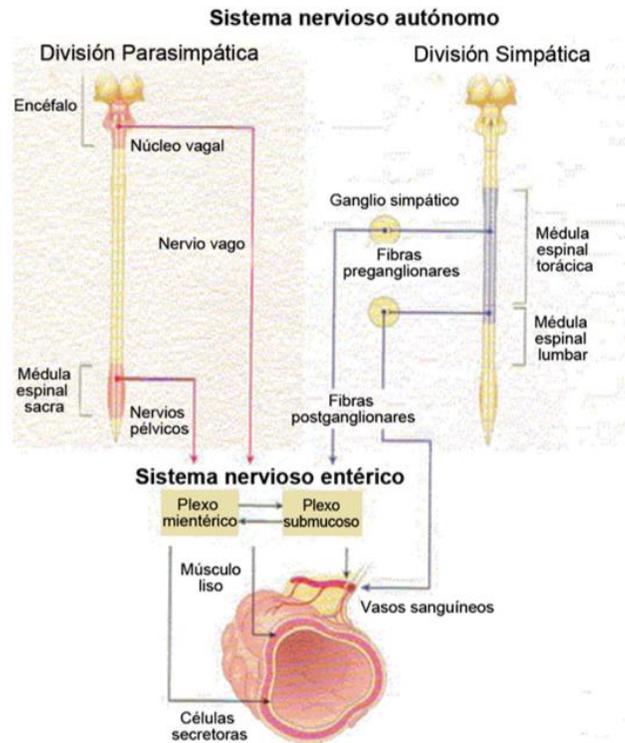


Figura 6. Representación esquemática entre el SNE y el SNC.

Un segundo grupo de neuronas presentes en el intestino delgado son las neuronas motoras. Estas neuronas se encargan de dar el estímulo final al músculo circular para que de esta manera el intestino delgado realice los movimientos peristálticos. Estas neuronas reciben estímulos de las neuronas intrínsecas aferentes primarias y de las interneuronas descendientes y ascendentes. Las neuronas motoras se proyectan en el músculo circular donde forman una red densa de nervios.

Las neuronas motoras se pueden dividir en dos grupos, las neuronas excitatorias e inhibitorias. Los principales neurotransmisores de las neuronas motoras excitatorias son la acetilcolina y las taquicininas, los cuales actúan directamente sobre las células efectoras del músculo liso, células secretoras y células endócrinas

gastrointestinales. Estas últimas secretan hormonas que también se encargan de la motilidad del intestino delgado como lo son: la colecistocinina, secretina y bombesina. Por otro lado los principales neurotransmisores de las neuronas motoras inhibitorias son la noradrenalina, el óxido nítrico (NO), el adenosin trifosfato (ATP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), los cuales actúan directamente sobre el músculo liso.^{24, 25}

2.9 Evaluación de la actividad antiespasmódica con preparaciones de íleon aislado de Cobayo

Se dispone de diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* para evaluar la actividad biológica de extractos vegetales²⁶. El modelo de íleon aislado de cobayo, es una prueba farmacológica *in vitro* que fue descrita inicialmente en 1904 por Magnus²⁷, y es utilizada, entre otras cosas, para evaluar la actividad antiespasmódica de diversos extractos de plantas y fármacos.

Este ensayo se fundamenta en que las porciones superior e inferior del intestino delgado son susceptibles a las acciones de las terminales nerviosas por diversas sustancias y en consecuencia, es posible valorar la actividad biológica de compuestos naturales o sintéticos. Los segmentos aislados de intestino de cualquier especie animal menor, mantienen su funcionalidad de contracción y relajación durante horas, siempre y cuando se mantengan las condiciones fisiológicas con una solución que permita realizar las funciones biológicas del tejido aislado²⁷.

Para evaluar la actividad antiespasmódica, el íleon aislado de cobayo es adecuado, debido a que la actividad espontánea de contracción y relajación es relativamente lenta si se compara con el íleon de conejo, y sus movimientos pendulares son regulares. En un baño de órganos en solución fisiológica y condiciones adecuadas de pH, temperatura y oxigenación, al poner en contacto el tejido suspendido con los

metabolitos activos, se produce contracción o relajación, dependiendo de la naturaleza química. El segmento de intestino al contraerse y relajarse modifica la tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión. La señal eléctrica puede ser amplificada y registrada para cuantificar los cambios en la tensión²⁸.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La herbolaria es una de las alternativas utilizadas entre la población mundial para el tratamiento de diversas enfermedades y/o síntomas, incluyendo el dolor. En este caso, existen diversas especies propias de nuestro país que han sido utilizadas en la medicina tradicional para su alivio; sin embargo, muchas de ellas se utilizan solo a través del conocimiento empírico.

Una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el alivio de los espasmos producidos por algunas de las enfermedades gastrointestinales es la *A. mexicana*. Algunos extractos de esta especie ya fueron probados en diversos modelos experimentales de dolor, entre ellos, un modelo que simula los cólicos intestinales utilizando el modelo de contracción abdominal en ratones. También, en el laboratorio, ya se comprobó el efecto espasmolítico de los extractos de la planta completa. Con estos resultados se ha dado sustento científico al uso tradicional de esta planta; sin embargo, no se ha determinado al metabolito secundario de la planta responsable de este efecto. Para esto se diseñó este trabajo, en el cual se utiliza un modelo *in vitro* del íleon aislado de cobayo precontraído y se determinó el efecto de dos metabolitos de la planta sobre la actividad contráctil del tejido con el propósito de determinar cuál es el responsable del efecto espasmolítico. Además, en este trabajo se pretende determinar el mecanismo de acción por el cual el o los metabolitos de la planta pudieran estar produciendo su efecto espasmolítico.

4. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional los extractos de *A. mexicana* producen un efecto antiespasmódico, entonces la acetina y/o el ácido ursólico, que son metabolitos secundarios aislados de los extractos orgánicos del *Agastache mexicana*, producirán un efecto espasmolítico en el modelo de íleon de cobayo pre-contraído con KCl.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto antiespasmódico de la acetina y el ácido ursólico, metabolitos secundarios aislados de los extractos orgánicos del *Agastache mexicana* en el íleon aislado de cobayo y su posible mecanismo de acción.

5.2 Particulares

- 5.2.1. Evaluar el efecto espasmolítico de la acetina aislada del extracto metanólico de *A. mexicana* en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32 mM].
- 5.2.2. Evaluar el efecto espasmolítico del ácido ursólico aislado del extracto de acetato de etilo de *A. mexicana* en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32 mM].
- 5.2.3. Realizar un estudio que permita inferir el mecanismo de acción involucrado en los efectos espasmolíticos que presentan el o los metabolitos de *A. mexicana*, con el uso de diferentes bloqueadores y antagonistas.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio Experimental

El estudio *in vitro* permite evaluar la actividad biológica de extractos vegetales. El modelo de íleon aislado de cobayo, es una prueba farmacológica *in vitro* utilizada, entre otras cosas, para evaluar la actividad antiespasmódica de diversos compuestos.

6.2 Población de estudio

Anillos de 2 cm de íleon obtenidos de cobayos macho de cepa Hartley, de 400 a 600 gramos adquiridos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.3 Criterios de inclusión y exclusión.

a. Criterios de inclusión:

- Tejido con una contracción en presencia de Acetilcolina (ACh $1 \times 10^{-5} \text{M}$) igual o mayor a 4 gramos.
- Tejido con una contracción sostenida (5 min) en presencia de cloruro de potasio (KCl 32 mM) igual o mayor a 1.5 gramos.

b. Criterios de exclusión:

- Tejido con una contracción en presencia de Acetilcolina (ACh $1 \times 10^{-5} \text{M}$) menor a 4 gramos.
- Tejido con una contracción en presencia de cloruro de potasio (KCl 32 mM) menor a 1.5 gramos.

6.4 Variables

a. Externas

- Temperatura
- Humedad

b. Internas

- Viabilidad del tejido
- Concentración de los metabolitos secundarios
- Respuesta del tejido antes y después de la administración de los metabolitos activos

6.5 Material

6.5.1 Material biológico

- Cobayos macho de cepa Hartley, de 400 a 600 gramos adquiridos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.5.2 Material de laboratorio

- Vaso de precipitado de 500ml
- Pipeta graduada de 1, 2, 5, 10ml
- Frascos de vidrio de 30ml
- Frasco ámbar de vidrio de 20ml
- Frasco ámbar de vidrio de 5ml
- Jeringas de vidrio de 20ml
- Jeringas de vidrio de 1ml
- Material de disección para microcirugía
- Caja de Petri con baño maría
- Aguja curva

6.5.3 Software

- Poliview versión 2.5 para Windows.
- GraphPad InStat versión 3.0 para Windows.

6.5.4 Equipo

- Polígrafo Grass Modelo RPS7C8B
- Recirculador con control de temperatura HAAKE E2
- Balanza analítica
- Cronómetro
- Tanque de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂)

6.5.5 Reactivos

- Acetina
- Papaverina
- Ácido ursólico
- NaOH (Hidróxido de Sodio)
- Agua salina
- NaCl (Cloruro de Sodio)
- NaHCO₃ (Bicarbonato de Sodio)
- KCl (Cloruro de Potasio)
- MgCl₂ (Cloruro de Magnesio)
- NaH₂PO₄ (Fosfato de Sodio)
- Dextrosa
- CaCl₂ (Cloruro de Calcio)
- Colina

-
- Indometacina
 - Hexametonio
 - L-NAME (N (G)-nitro-L-arginina metilester)
 - Azul de metileno (AM)

6.6 Métodos

6.6.1 Método de Extracción

Los metabolitos secundarios utilizados para este estudio fueron proporcionados por la Dra. María Eva González Trujano del laboratorio de Microdiálisis del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Para la preparación del extracto se siguió el siguiente procedimiento: *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* fue colectada en Ozumba, Estado de México en agosto de 2008. La planta fue identificada previamente por los botánicos R. Bye y E. Linares y depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología UNAM N^o 1121.

Las flores fueron desecadas y pulverizadas tomando un peso de 222 g las cuales se maceraron con diferentes disolventes, el primer disolvente utilizado fue con hexano a temperatura ambiente (22 ° C) durante 48 h el cual se repitió 3 veces, seguido por un segundo disolvente, utilizando acetato de etilo el cual se repitió por 3 veces, y se utilizó un tercer disolvente, metanol (3 veces). Se filtraron cada una de las maceraciones y se concentró a vacío para obtener un extracto crudo de hexano de color verde (3 g), el crudo de acetato de etilo de color pardo (6.3 g), y un extracto crudo de metanol de color marrón (25.8 g). Se realizó el análisis cromatográfico por HPLC de los extractos de acetato de etilo y metanol. Las longitudes de onda utilizadas para la detección del ácido ursólico y acacetina fueron a 210 nm y 254 nm, respectivamente. Se determinó que el

porcentaje de la acetina presente en la muestra es de 0.71% (1.57g) y de Ácido ursólico 0.33% (0.73 g)

6.6.2 Preparación del tejido

Se utilizaron cobayo macho de cepa Hartley, de 400 a 600 gramos con 24 h de ayuno, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvo un segmento de 15 cm aproximadamente de íleon y se sometió a una limpieza que consiste en la eliminación del tejido conectivo y del bolo alimenticio que se encuentra en el interior del intestino. Se cortaron anillos de 2 cm y se colocaron en una cámara de órgano aislado con solución Krebs (NaCl [118.0 mM], NaHCO₃ [25 mM], KCl [4.7 mM], MgCl₂ [1.2 mM], NaH₂PO₄ [1.2 mM], dextrosa [11.0 mM], CaCl₂ [2.5 mM] y colina [0.3 mM]) a 37°C y con burbujeo de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para mantener las condiciones fisiológicas.

Los segmentos se colocaron en cámaras de órgano aislado de 20 ml, las cuales se encontraban conectadas a un transductor de presión que a su vez se encuentra conectado a un polígrafo y a una computadora con el programa Polyview para permitir el registro de la actividad del tejido. Las preparaciones se dejaron estabilizar durante 60 minutos en solución Krebs a 37°C, con burbujeo de carbógeno y con una tensión de 1 gramo. Una vez transcurrido el tiempo de estabilización del tejido, se administró a cada segmento 0.2 mL de una solución de acetilcolina (ACh) la cual permitirá tener dentro de la cámara una concentración de [1x10⁻⁵ M], de esta manera se determinara la viabilidad del tejido para las pruebas siguientes. La respuesta ante este estímulo no fue mayor a 4 gramos de tensión, por lo que no se descartó ningún tejido. Al terminar esta prueba se realizó el lavado del tejido, el cual consiste en el cambio de solución Krebs para asegurar la ausencia de ACh en la cámara.

Para cada compuesto utilizado en este proyecto, se siguieron los pasos anteriores para la preparación del tejido y la determinación de la viabilidad de este.

6.6.3 Efecto de los compuestos sobre el tejido pre-contraído con KCl.

Tras la preparación del tejido, descrita anteriormente cada segmento de tejido fue pre-contraído con una solución de KCl [32mM]. Se esperó el tiempo necesario hasta que el tejido alcanzo una meseta máxima estable que duro como mínimo 5 min. Una vez alcanzados los 5 minutos con una meseta estable, los diferentes metabolitos secundarios fueron administrados a diferentes concentraciones con una n=6 (una concentración a la vez). Las concentraciones que se utilizaran para cada uno de ellos fueron las siguientes:

- a. Acetina [0.3, 1, 3, 10 µg/mL]
- b. Ácido ursólico [50, 100, 200, 400 µg/mL]

Después de la administración del compuesto se determinó su efecto sobre el tejido pre-contraído hasta que la tensión del tejido fue estable, es decir, que la tensión no cambio (aproximadamente 5 min). Al cumplir con esto, se procedió a realizar el lavado de cada tejido, el cual consiste en el cambio de la solución Krebs que se encuentra en la cámara por nueva solución. Fue necesario realizar este procedimiento 2 veces para asegurar la eliminación total de compuestos de la cámara. Después de lavar el tejido, se dejó reposar entre 15 y 20 minutos, con reperfusión de solución Krebs, hasta que el tejido recupero su actividad basal. Con esto se dio paso nuevamente a pre-contrair el tejido para después administrar la siguiente concentración del compuesto y repetir el procedimiento antes descrito para cada concentración.^{29, 30}

6.6.4 Determinación del mecanismo de acción

Siguiendo la misma metodología para evaluar el efecto relajante en tejido precontraído con KCl, se determinó el efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de las principales vías encargadas de la contracción y relajación del músculo liso, frente al efecto de los metabolitos secundarios que produzcan efecto antiespasmódico. Para esto,

en un grupo de tejidos intactos estos se contraen con KCl [32mM]. Una vez pasados 5 min, con una meseta máxima estable, se administró el bloqueador o antagonista a evaluar (un fármaco a la vez).

Se incubó el tejido con:

- a. Hexametonio [0.5 mM] por 10 min.
- b. Indometacina [1 μ M] por 15 min.
- c. L-NAME [100 μ M] por 20 min.
- d. Azul de metileno [1 μ M] por 10 min.

Tras haber incubado el tejido el tiempo y con las concentraciones especificadas para cada fármaco, se administró a cada cámara 0.2 ml de la CE_{50} , del o los metabolitos secundario que presente efecto antiespasmódico, se utilizaron diferentes grupos de tejidos para cada tratamiento.

De esta manera se registró la presencia o ausencia de un efecto relajante por parte del compuesto. Al término de la evaluación, se realizó el lavado de cada cámara y se dejó en reposo por 20 min con reperfusión de solución Krebs para que los segmentos recuperen su actividad basal. Pasados los 20 min se repitió el mismo procedimiento para cada uno de los fármacos restantes.

6.7 Análisis de datos.

En todos los casos los datos se expresaron como la media \pm error estándar (EE) de una $n=6$ a 8 anillos. Para el análisis de los promedios correspondientes a los diferentes tratamientos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para determinar la diferencia entre los tratamientos y comparar el efecto de las

concentraciones del extracto con respecto al control. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como una diferencia significativa.

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

7 RESULTADOS

7.1 Determinación del efecto relajante de la acetina y el ácido ursólico, metabolitos del *A. mexicana*, en tejido pre-contraído con KCl

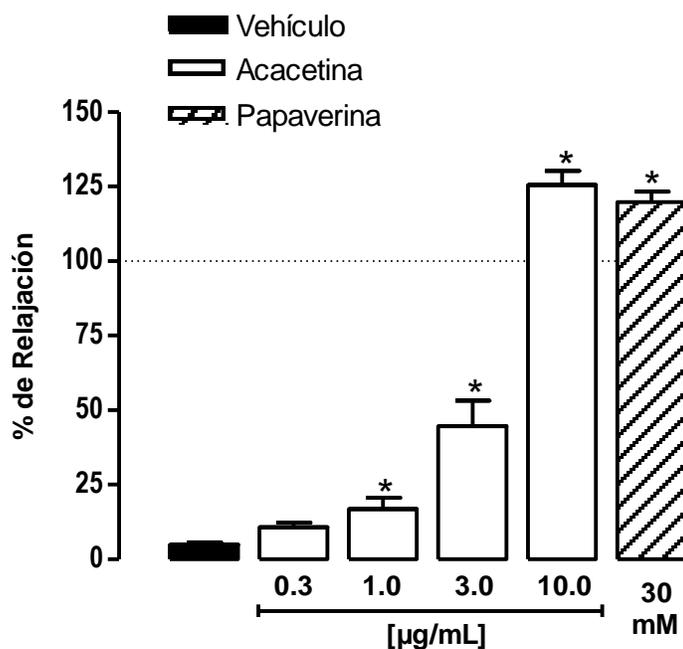


Figura 7. Curva concentración respuesta del efecto relajante de acetina en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32mM]. Se utilizó como control positivo la papaverina (30 mM). Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6) de cada tratamiento. * $p < 0.05$, (ANOVA de una vía seguido por una prueba de Dunnett).

En la Figura 7 se muestra el efecto relajante de la acetina en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl (32 mM). Este efecto fue concentración dependiente, alcanzando un efecto máximo de 125.61 ± 11.67 % a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. El efecto de la acetina mostró diferencia estadística con relación al vehículo en las concentraciones de 1, 3 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (16.83 ± 9.17 , 44.59 ± 19.35 y 125.61 ± 11.67 vs 4.85 ± 1.98 %, $p < 0.05$, ANOVA seguida de una prueba de Dunnett). De esta manera, los resultados muestran que la concentración más alta de acetina (10 $\mu\text{g/mL}$) mostró una efectividad similar a la de la papaverina (125.62 ± 4.77 vs 119.8 ± 8.70 %, ns), el control positivo utilizado en

este modelo experimental. La papaverina es un relajante muscular bien caracterizado y muestra la máxima capacidad de respuesta que tiene el tejido en las condiciones experimentales utilizadas. También, con la curva concentración respuesta de la acacetina, se determinó su CE_{50} , que fue de $2.39 \mu\text{g/mL}$.

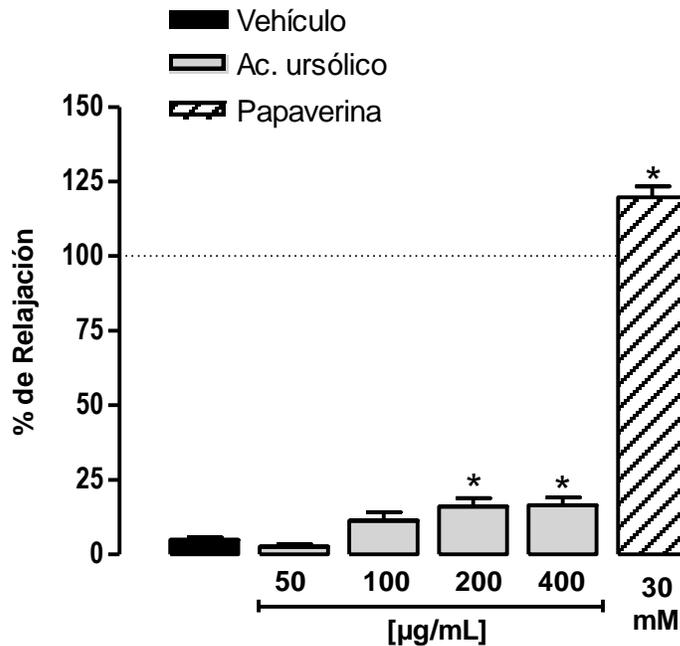


Figura 8. Curva concentración respuesta del efecto relajante inducido por ácido ursólico en íleon de cobayo pre-contraído con KCl [32mM]. Se utilizó como control positivo la papaverina (30 mM). Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6) de cada tratamiento. * $p < 0.05$, (ANOVA de una vía seguido por una prueba de Dunnett).

En la figura 8 se muestra el efecto relajante del ácido ursólico en el tejido precontraído con KCl (32 mM). En este caso, también el ácido ursólico produjo un efecto concentración dependiente, en donde el efecto máximo alcanzado fue de $16.57 \pm 6.33 \%$ a la concentración de $400 \mu\text{g/mL}$. Como se puede observar en la figura, sólo las concentraciones de 200 y $400 \mu\text{g/mL}$ de ácido ursólico mostraron diferencia significativa con el grupo del vehículo (16.04 ± 6.84 y 16.57 ± 6.33 vs $4.85 \pm 1.98\%$, $p < 0.05$, ANOVA seguida de una prueba de Dunnett). A diferencia del máximo efecto producido por la

acacetina, el ácido ursólico no alcanzó el efecto producido por la papaverina, el control positivo en este modelo experimental (16.57 ± 6.33 vs 119.8 ± 8.70 %, $p < 0.05$, Prueba de Student).

Como se muestra en las curvas concentración respuesta de la acacetina y el ácido ursólico, el metabolito que mostró un efecto relajante con relevancia clínica es la acacetina. Por esta razón, solo consideró determinar el posible mecanismo de acción involucrado en el efecto relajante de la acacetina y no del ácido ursólico.

7.2 Determinación del posible mecanismo de acción del efecto relajante producido por la acacetina.

Para tratar de determinar el posible mecanismo de acción involucrado en el efecto relajante de la acacetina, se evaluó éste en presencia de varios compuestos que interfieren en alguno de los mecanismos involucrados con la contracción del músculo liso intestinal.

Para esto, se incubó el tejido con diversos compuestos y después se le adicionó la concentración de $3 \mu\text{g/ml}$ de acacetina, y se comparó el efecto de la acacetina en presencia y en ausencia del tratamiento correspondiente. Se eligió utilizar la respuesta producida por la concentración de acacetina de $3 \mu\text{g/mL}$ para la determinación del posible mecanismo de acción porque es la concentración cercana a la CE_{50} de la acacetina ($2.39 \mu\text{g/mL}$).

Como se muestra en la figura 11, el hexametonio [0.5 mM], un bloqueador ganglionar, incrementó significativamente la respuesta relajante inducida por la acacetina ($3 \mu\text{g/mL}$) (83.92 ± 1.90 vs 65.88 ± 6.0 %, $p < 0.05$, t de student); aunque, se

administrado de manera independiente, no alteró el efecto contráctil del KCl ($0.66 \pm 0.44\%$).

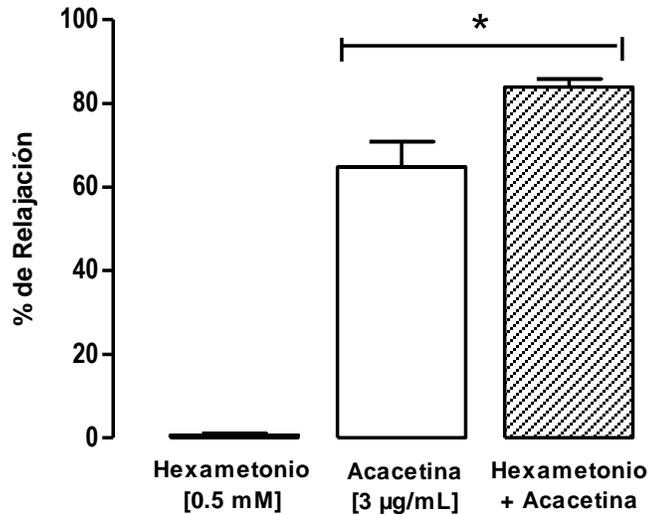


Figura 9. Efecto relajante de la acacetina, metabolito del *A. mexicana* [$3.0 \mu\text{g/mL}$] en ausencia y presencia de Hexametonio [0.5 mM], un bloqueador ganglionar, sobre íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl [32 mM]. Cada barra representa la media \pm E.E. ($n=6$) de cada tratamiento.

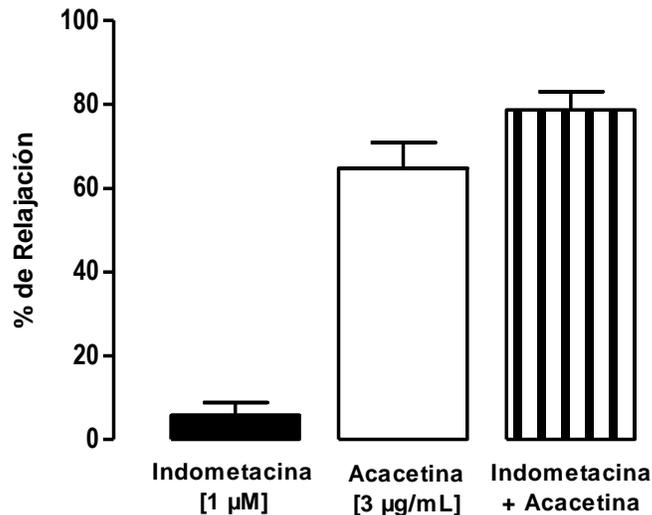


Figura 10. Efecto relajante de la acacetina, metabolito del *A. mexicana* [$3.0 \mu\text{g/mL}$] en ausencia y presencia de indometacina [$1 \mu\text{M}$], un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, sobre íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl [32 M]. Cada barra representa la media \pm E.E. ($n=6$) de cada tratamiento.

Por otro lado, ni la indometacina [1 μ M], un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa; ni el L-NAME [100 μ M], un inhibidor no selectivo de la sintasa de óxido nítrico, modificaron significativamente la respuesta relajante inducida por 3 μ g/mL de acacetina (78.71 ± 4.33 y $79.13 \pm 5.28\%$ vs $65.88 \pm 6.0\%$, respectivamente; $p > 0.05$, t de student) en el íleon de cobayo precontraído. Tampoco alteraron la respuesta contráctil inducido por el KCl, bajo las condiciones experimentales analizadas (5.78 ± 3.05 y 1.22 ± 1.9 , respectivamente) (Figs. 10 y 11).

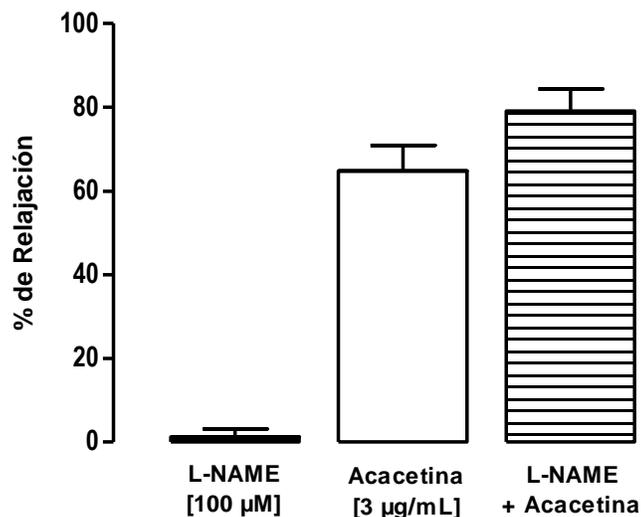


Figura 11. Efecto relajante de la acacetina, metabolito del *A. mexicana* [3.0 μ g/mL] en ausencia y presencia de L-NAME [100 μ M], un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, sobre íleon aislado de cobayo precontraído con KCl [32mM]. Cada barra representa la media \pm E.E. (n=6) de cada tratamiento.

Finalmente, el azul de metileno [1 μ M], un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, disminuyó en casi un 90% el efecto relajante de la acacetina; pero no alteró el efecto contráctil del KCl. El efecto relajante de la acacetina en ausencia y en presencia del azul de metileno mostró una diferencia significativa (65.88 ± 0.50 vs $7.76 \pm 1.53\%$, $p < 0.05$, t de student) (Fig. 12).

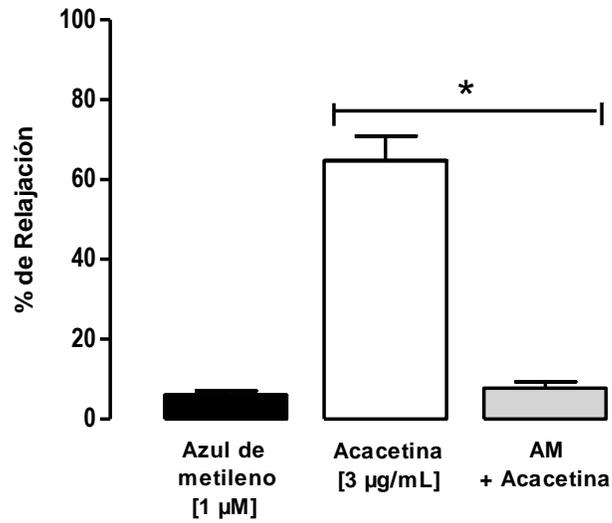


Figura 12. Efecto relajante de la acetina, metabolito del *A. mexicana* [3.0 µg/mL] en ausencia y presencia de azul de metileno [1 µM], un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble íleon aislado de cobayo pre-contráido con KCl [32mM]. Cada barra representa la media ± E.E. (n=6) de cada tratamiento.

8 DISCUSIÓN

8.1 Efecto relajante de la acetina y el Ácido ursólico

La *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*, como ya se había mencionado anteriormente, es una planta muy popular en México que ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos gastrointestinales, cardiovasculares y nerviosos^{31,32}. En un estudio previo³³ se determinó que el extracto metanólico de esta planta produce un efecto espasmolítico, sustentando así su uso tradicional en padecimientos gastrointestinales. El objetivo de este estudio fue determinar cuál de los metabolitos de la planta es el responsable de su efecto espasmolítico, por lo que se decidió estudiar a dos de ellos.

La acetina y el ácido ursólico son los metabolitos más abundantes de los extractos metanólico y de acetato de etilo, respectivamente, del *A. mexicana* ssp *xolocotziana* ³⁴. En un estudio de HPLC se determinó que se encuentran 14.9 mg de acetina y 130.7 µg de ácido ursólico por cada gramo del extracto correspondiente de la planta. Además, se determinó que estos metabolitos son los responsables del efecto antinociceptivo inducido por sus respectivos extractos en un modelo de estiramiento abdominal³⁴.

Los resultados del presente estudio muestran que tanto la acetina como el ácido ursólico producen un efecto espasmolítico en el íleon de cobayo precontraído con KCl, pero el efecto espasmolítico de la acetina fue mucho más pronunciado, por lo que podemos sugerir que éste es el metabolito responsable del efecto espasmolítico inducido por la *A. mexicana* ssp *xolocotziana*. Además, el efecto espasmolítico inducido por la acetina en este estudio (125.62 ± 4.77 %), fue casi 50 % mayor que el inducido por el extracto metanólico de la planta (83.55 ± 6.38 %, determinado previamente³³; sugiriendo

que en el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp *xolocotziana*, además de la acetina, contiene compuestos que contrarrestan el efecto espasmolítico inducido por la acetina.

El modelo utilizado en este estudio para determinar el efecto espasmolítico de los metabolitos de la planta estudiada fue el del íleon de cobayo precontraído con KCl, en el cual, el efecto relajante se interpreta como efecto espasmolítico. Este protocolo ha sido utilizado en diversos estudios para evaluar el efecto relajante o espasmolítico de diversos compuestos y/o extractos naturales^{35, 30}. Éste se basa en la despolarización de las fibras musculares que produce el incremento de potasio y lleva a la apertura de canales de Ca²⁺ tipo L voltaje dependientes. Por este mecanismo se induce un incremento de la concentración intracelular de calcio, que activa a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina causando, finalmente, una contracción sostenida. En el caso del íleon aislado de cobayo, la máxima contracción se alcanza en aproximadamente 2 min y se mantiene por más de 30 min. La papaverina es el control positivo utilizado típicamente en este tipo de estudios por ser un agente espasmolítico bien caracterizado. Su efecto se atribuye a su capacidad de inhibir a la fosfodiesterasa de AMPc y al bloqueo que ejerce sobre los canales de calcio, disminuyendo así, el calcio intracelular y consecuentemente la contracción muscular³⁶. La respuesta del tejido a la papaverina nos permite evaluar la relajación máxima que puede producirse en el tejido en nuestras condiciones experimentales, además de comparar su efecto con el producido por los compuestos estudiados. De acuerdo a los resultados obtenidos, la acetina produce el efecto máximo posible en este modelo experimental, ya que el porcentaje de relajación que produce es similar al de la papaverina, el control positivo.

8.2 Análisis del mecanismo de acción del efecto relajante inducido por la acetina.

Una vez determinado que el efecto espasmolítico de la acetina fue de mayor intensidad que el del ácido ursólico se realizó un estudio para tratar de elucidar su posible mecanismo de acción. Para esto se utilizaron bloqueadores e inhibidores de algunas de las principales vías involucradas en la relajación del músculo liso sobre el efecto espasmolítico inducido por 3 µg/mL de acetina. Esta concentración de acetina se seleccionó por ser cercana a la CE_{50} determinada previamente.

Primero se incubó el tejido con hexametonio, un bloqueador neuromuscular, para determinar si el efecto relajante de la acetina involucraba la inhibición de la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas del sistema entérico. Los resultados indican que el efecto relajante de la acetina parece ser independiente de este mecanismo ya que el hexametonio incrementó su efecto relajante en lugar de disminuirlo.

Esto se debe a que la acetina induce la relajación del tejido precontraído con KCl y se sabe que el potasio induce contracción por mecanismos independientes de las terminales nerviosas, es decir, por activación de canales de calcio voltaje dependientes y el consecuente incremento intracelular de calcio. Por otro lado, se sabe que el hexametonio disminuye la contracción muscular por ser un bloqueador neuromuscular e impedir la liberación de acetilcolina desde las terminales nerviosas; ya que la acetilcolina activa a los receptores muscarínicos (M_3) del músculo liso produciendo contracción muscular. La activación de los receptores M_3 activan a una proteína Gq que produce la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato por la fosfolipasa C, y genera el segundo mensajero trifosfato de inositol (IP_3). El IP_3 actúa en sus receptores del retículo sarcoplásmico produciendo un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} debido a su salida del retículo sarcoplásmico. El Ca^{2+} se une a la calmodulina y se fosforila a la

miosina de cadena corta (MLCK) generando que esta se desplace entre los filamentos de actina, produciendo, finalmente, la contracción de las fibras musculares del músculo liso²⁷. Por lo tanto, si la respuesta relajante producida por la acacetina en este estudio involucrara la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas del sistema entérico, el pretratamiento con el hexametonio hubiera mostrado una disminución en su efecto, y no un incremento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio del mecanismo de acción del extracto metanólico de la *A. mexicana* ssp *xolocoxian*³³ en donde el hexametonio también incrementó el efecto relajante del extracto.

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGI₂, estimulan las terminales colinérgicas de las neuronas del sistema entérico generando la liberación de acetilcolina y produciendo un aumento en la tonicidad del íleon de cobayo³⁶. Por lo que, como parte de este estudio, se analizó la posible participación de las prostaglandinas sobre el efecto relajante producido por la acacetina. Para esto se utilizó la indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa que bloquea la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Si el efecto relajante de la acacetina se debiera a una disminución en la síntesis de prostaglandinas, su efecto se vería alterado por la administración previa de indometacina a una concentración de 1 µM, concentración suficiente para bloquear la síntesis de prostaglandinas en el sistema utilizado^{29, 35}. Los resultados de este estudio mostraron que la indometacina no modificó el efecto del extracto, sugiriendo que el efecto antiespasmódico no se debe a la inhibición de la producción de prostaglandinas.

Finalmente, uno de los neurotransmisores importantes en el sistema gastrointestinal que induce relajación de la musculatura lisa es el óxido nítrico (NO), por lo que decidimos averiguar si el efecto relajante de la acacetina se debe a la liberación de NO. El NO es un importante mensajero intra e inter celular que se encuentra en todo el

organismo y se sintetiza a partir de L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Furfin y cols, 1993). El NO activa a la guanilato ciclasa, la enzima encargada de la síntesis del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), induciendo un aumento en la concentración intracelular de GMPc. Este segundo mensajero, actúa a través de diversas proteínas reduciendo la concentración de calcio intracelular, disminuyendo así, la contracción muscular y favoreciendo la relajación.^{27, 37} Entre las herramientas farmacológicas más utilizadas para demostrar la participación de la vía del NO-GMPc en cualquier sistema se encuentra el metil ester L-nitro arginina (L-NAME), un inhibidor no selectivo de la NOS que actúa como sustrato competitivo de la L-arginina. De esta manera, si el efecto relajante de la acetina se debiera a que estimulara la vía del NO-GMP, el pretratamiento de los tejidos con L-NAME, mostraría una disminución en su efecto relajante. Los resultados de este estudio muestran que el pretratamiento del tejido con L-NAME no alteró el efecto espasmolítico de la acetina, sugiriendo que su efecto relajante no se debe a la activación de la vía del NO-GMPc. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio previo con el extracto metanólico de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en donde el L-NAME tampoco alteró el efecto espasmolítico del extracto³³.

Sin embargo, a pesar de que aparentemente la vía del NO-GMPc no participa en el efecto de la acetina, el pretratamiento del tejido con azul de metileno, un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble³⁸, disminuyó el efecto relajante inducido por la acetina en nuestras condiciones experimentales. Es importante mencionar que el azul de metileno no impide la síntesis de NO, pero sí la del GMPc, el segundo mensajero final responsable del efecto relajante.

Estos resultados sugieren que quizá el NO produzca un efecto relajante por un mecanismo independiente de la síntesis de GMPc, aunque sería necesario realizar más experimentos para determinar si esto es posible. Las evidencias indican que existen dos

grandes vías de acción del óxido nítrico; una de ellas implica la unión a la enzima guanilato ciclasa soluble^{39, 40} (GCs); y la otra, implica la acción directa del óxido nítrico sobre proteínas, nitrosilándolas.

9 CONCLUSIONES

En resumen, de los dos metabolitos secundarios de la *A. mexicana* estudiados en este trabajo, solo uno de ellos, la acacetina, mostró un efecto espasmolítico (antiespasmódico) importante; incluso, con la acacetina se alcanza una eficacia superior que con el extracto metanólico de la planta completa. Esto sugiere que la planta puede contener algunos compuestos que inhiben parte de su efecto espasmolítico, aunque de manera parcial.

Además, parece que la acacetina induce su efecto espasmolítico activando a la vía del óxido nítrico a través de un mecanismo independiente de la síntesis de GMPc, aunque sería necesario realizar más experimentos para determinar si esto es posible.

10 PERSPECTIVAS

Dado que la actividad antiespasmódica de la acetina, metabolito secundario de la *A. mexicana*, es mayor a la del extracto metanólico de la planta, consideramos necesario realizar estudios de efectos adversos y toxicidad del metabolito aislado, con el propósito de considerar su síntesis o aislamiento y así obtener un medicamento fitoterapéutico contra los espasmos intestinales y poder ofrecer una alternativa terapéutica en la práctica clínica.

Además de los estudios propuestos, es necesario comparar su efecto con los fármacos existentes para valorar el costo-beneficio de su producción y utilización en el ámbito clínico.

11 REFERENCIAS

1. Ernest E. Prevalence of use of complementary alternative medicine: A systematic review. Bull WHO 2000;78:252.
2. Salazar-Aranda Ricardo, C de la Torre-Rodríguez Yael, Alanís-Garza Blanca Alicia, Pérez-López Luis Alejandro, Waksman-de-Torres Noemí. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. Departamento de Química Analítica Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Agosto, 2009.
3. Dellacassa E. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Chile 2005: 44
4. Organización Mundial de la Salud. Pregunta al experto. ¿Es segura la medicina tradicional? 2005.
5. Bye R, Linares E., Ramamoorthy TR, Garcia E, Collera O, Palomino G, Corona V. Agastache mexicana ssp. xolocotziana (Lamiaceae) new taxon from Mexican medicinal plants. Phytologia 1987; 62: 156-163.
6. Santiago R, Rojas I, Arvizu G, Muñoz D, Pérez D, Sucilla M. Caracterización del potencial fitotóxico de Agastache mexicana (kunth). Universidad Simón Bolívar. Investigación Universitaria Multidisciplinaria - Año 4, N°4, Diciembre 2005
7. Linares E, Flores B, Bye R. Selection of Medicinal Plants of Mexico. Limusa, México, 1988, 1-125.
8. Argueta VA, Cano L, Rodarte M. Atlas of Plants from Mexican Traditional Medicine, III. Indigenous National Institute, México, 1994; 1355-1356.
9. González-Trujano ME, González-Ramírez A, Pellicer F, López-Muñoz FJ. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the Agastache mexicana extracts by using several experimental models in rodents. J Ethnopharmacol 2012; 142: 700-705.
10. Trease G, Evans W. Farmacognosia. México. 1991. Interamericana McGraw-Hill.

-
11. Middleton Jr. E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52, 673-751.
 12. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 2005; 81, 313S-316S
 13. Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003; 74, 603-612
 14. Dambros M, van Deuketom M, de Jongh R, van Koeveringe GA, De Mey JG, van Kerrebroeck P The inhibitory effect of the flavonoid galangin on urinary bladder smooth muscle contractility is mediated in part by modulation of Ca²⁺ release from intracellular stores. *Planta Med* 2005; 71, 962-964.
 15. Capasso R, Mascolo N. Inhibitory effect of the plant flavonoid galangin on rat vas deferens in vitro. *Life Sci.* 2003; 72, 2993-3001.
 16. Ghayur MN, Khan H, Gilani AH. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Arch Pharm Res* 2007; 30, 970-975.
 17. Capasso R, Fiorino F, Ascione V, Frecentese F, Borrelli F. Inhibition of rat vas deferens contraction by flavonoids in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58, 381-384.
 18. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004; 36, 838-849.
 19. Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi MC, Martinotti E. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 370, 290-298.
 20. Hammad HM, Abdalla SS. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 1997; 28, 767-771.
 21. Galambos A. Spasm in the small intestines. *Am J Dig Dis* 1954; 21: 97-99

-
22. Lembo T, Rink R. Current pharmacologic treatments of irritable bowel syndrome. *Participate* 2002;11:21-4.
 23. Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous System. *Gut* 2000; 47: iv15-iv19.
 24. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987.
 25. Goyal R, Hirano I. The Enteric Nervous System. *The New England J Med*, 1996; 334: 1106 -1115
 26. Rahman AM, Choudhary. Bioassay techniques for drug development San Diego, USA, 2001. Harwood Academic.
 27. Rang HP, Dale M. Pharmacology. Churchill Livingstone Elsevier, 6th edition, Edinburgo, 2008.
 28. Thomas E, Bertrand. Genesis and role od coordinated firing in afeedforward network, a model study of the enteric neivous system. *Neuroscience* 1999; 93(4) 1525-1537.
 29. Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 321 - 324.
 30. Moazedi AA, Mirzaie DN, Seyyednejad SM, Zadkarami MR, Amirzargar A. Spasmolytic Effect of *Petroselinumcrispum* (Parsley) on Rat's Ileum at Different Calcium Chloride Concentrations. *Pakistan J Biol Sci* 2007; 10: 4036 - 4042
 31. Santillán-Ramírez MA, López-Villafranco E, Aguilar-Rodríguez S, Aguilar-Contreras. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 2008; 79: 513- 524.
 32. Molina-Hernández M, Tellez-Alcantara P, Martínez E. *Agastache mexicana* may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine* 2000; 7(3): 199-203
 33. Ramírez-Ramírez AL. Evaluación de la actividad antiespasmódica y antidiarréica del extracto metanólico de *Agastache mexicana* ssp *xolocotziana* en modelos experimentales. Tesis de licenciatura, UNAM, 2014.

-
34. González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. Spasmolytic and Antinociceptive Activities of Ursolic Acid and Acacetin Identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med* 2012; 78: 793-796
 35. Caldas-Magalhaes PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso HJ. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fund Clin Pharmacol* 2004; 18: 539-546.
 36. Nakahata N, Ono T, Nakanishiet H. Possible involvement of a product of the 5-Lipoxygenase pathway in mediation of indomethacin induced inhibition of cholinergic transmission in guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol* 1984; 104: 133-138.
 37. Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006; 9:355-419
 38. Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Fukuto JM, Ignarro LJ. NG-hydroxy-Larginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Physiol* 1998; 275, R1256-1264.
 39. Katzung BG *Farmacología básica y clínica. Manual moderno*, 2005; 9: 187-216.
 40. Nakane M. Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(7):865-70