



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO  
ANTIESPASMÓDICO DEL EXTRACTO DE  
*ROSMARINUS OFFICINALIS L.*”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**OSCAR GUILLERMO RIVERO OSORNO**



MÉXICO, D.F. 2010



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:        Profesor: MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS**

**VOCAL:                Profesor: ANA MARIA VAZQUEZ ALVAREZ**

**SECRETARIO:        Profesor: ROSA VENTURA MARTINEZ**

**1er. SUPLENTE:     Profesor: JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ**

**2° SUPLENTE:        Profesor: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DEL  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA. UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: ROSA VENTURA MARTINEZ .**  
**(NOMBRE Y FIRMA)**

**SUSTENTANTE : OSCAR GUILLERMO RIVERO OSORNO .**  
**(NOMBRE Y FIRMA)**

## **DEDICATORIAS**

Porque si la ciencia fuera una planta, tú serías parte del tallo, el soporte de tantas investigaciones con éxito o con fallo, sin saberlo tú brindas la vida por una noble causa, gracias por todo amigo cobayo. El Oscar.

Dedicado a todos aquellos seres que brindan su vida para que la ciencia avance.

Dedicado a mis papas (Luis y Luz María alias “Miss Marilú”), que siempre estuvieron “molestándome” y apoyándome para superarme y llegar hasta este punto. Gracias por todo, nunca me ha faltado nada y gracias por su cariño incondicional. Los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todos mis amigos que han aportado el clásico granito de arena para que yo pudiera llegar hasta aquí.

A mis amigos del MAS que desde el kínder, la primaria, el básquet, secundaria, prepa y hasta el momento de hoy, han compartido conmigo aprendizaje, alegrías, momentos difíciles, goles y diversión.

A mis amigos de la facultad, los que conocí en aquel “cereal” grupo (Moni, Nata, Marisol, Yuridio, Fab, Laura, Jacobo, Allan, Jose Luis, Lalo y el Gordo), los que fui conociendo a lo largo de la carrera (Pau, Ara, Mara, Anlly, Paulette, Paola, Adry, Piby, Ale, Ivan, Marco Greñas, Marco A. y Angel) y con los que compartí buenos momentos en las clases, horas libres y que me hubiera gustado compartir mas (Maci, Karina, Diana, las Viris, Areli, Narda, Susana, Suhjey, Adriana, Mariana, Gaby, Alicia, los multi-O y Servando) gracias por hacer de esta carrera que requiere de mucho trabajo y esfuerzo, un viaje ligero y ameno.

Gracias a ti chaparra que me has acompañado todos estos años aprendiendo nuevas cosas y superando retos. Gracias por todo el cariño que me has dado y si, eres el amor de mi vida. Te amo Judy.

Gracias a la doctora Rosa por haberme aceptado y haberme brindado su tiempo. Gracias por la dedicación y los recursos que ha puesto en los proyectos que he realizado en el laboratorio. El tiempo que he pasado aquí ha sido muy enriquecedor.

Gracias a los chavos del lab (Martha, Moni, Misa, Chucho, Janeth, Moy, Perla y Luz) por ayudarme con los experimentos y por hacer del lab un lugar divertido. Todos ustedes..... ¡bien! Si, si, gua gua gua!

Gracias a la doctora Claudia por contagiar con su alegría a todo el laboratorio y por ser tan generosa con todos nosotros.

Gracias al doctor Jacinto por compartir su sabiduría quirúrgica y farmacológica con todos nosotros. Siempre está ahí cuando se le necesita.

Gracias al señor Constantino por enseñarnos esos pequeños detalles que mejoran nuestra forma de trabajar y por regañarnos por no cumplirlos.

Gracias a la doctora Eva por prestarme su extracto. Sin su ayuda esta tesis no existiría.

Gracias al doctor Rodríguez por la paciencia que ha tenido y por apoyar el crecimiento de estudiantes de varias facultades.

Por último y no por eso menos importante, gracias a la UNAM y a la Facultad de Química. Ha sido un honor y un privilegio haber estudiado en esta institución que le brindan al estudiante de forma gratuita, todo lo que necesita para tener una buena preparación.

## ÍNDICE

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ABREVIATURAS.....                                                                                                         | i   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                                                   | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                                                                    | iv  |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                      | 1   |
| 1.1 Justificación .....                                                                                                   | 3   |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 2. ANTECEDENTES.....                                                                                                      | 5   |
| 2.1 Anatomía y fisiología del intestino delgado.....                                                                      | 5   |
| 2.2 Mecanismo de acción de la acetilcolina en el músculo liso. ....                                                       | 9   |
| 2.3 Efecto de altas concentraciones de K <sup>+</sup> extracelular.....                                                   | 12  |
| 2.4 Estimulación eléctrica del intestino delgado .....                                                                    | 13  |
| 2.5 Espasmos intestinales .....                                                                                           | 14  |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 3. HIPÓTESIS.....                                                                                                         | 16  |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 4. OBJETIVOS.....                                                                                                         | 17  |
| 4.1 Objetivo General.....                                                                                                 | 17  |
| 4.2 Objetivos particulares .....                                                                                          | 17  |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 5. MÉTODO .....                                                                                                           | 18  |
| 5.1 Obtención del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....                                             | 18  |
| 5.2 Preparación del tejido .....                                                                                          | 19  |
| 5.3 Efecto de relajación en tejido pre-contraido con KCl. ....                                                            | 19  |
| 5.4 Efecto de relajación en tejido estimulado químicamente con acetilcolina....                                           | 20  |
| 5.5 Efecto de relajación en tejido con estimulación eléctrica.....                                                        | 21  |
| 5.6 Determinación del mecanismo de acción .....                                                                           | 21  |
| 5.7 Prueba sobre el efecto del extracto etanólico de <i>R. officinalis</i> L. en presencia de nifedipina. ....            | 22  |
| 5.8 Análisis de datos.....                                                                                                | 23  |
| <br>                                                                                                                      |     |
| 6. RESULTADOS .....                                                                                                       | 25  |
| 6.1 Efecto relajante producido por el extracto etanólico de <i>R. officinalis</i> L. en tejido pre-contraido con KCl..... | 25  |

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.2 Efecto relajante inducido por el extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en tejido estimulado químicamente con acetilcolina ..... | 27 |
| 6.3 Efecto relajante inducido por el extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en tejido contraído con estimulación eléctrica .....     | 30 |
| 6.4 Evaluación del mecanismo de acción del efecto relajante del extracto .....                                                               | 31 |
| 6.4.1 Efecto del extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en presencia de hexametonio. ....                                            | 31 |
| 6.4.2 Prueba sobre el efecto relajante del extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en presencia de indometacina. ....                 | 32 |
| 6.4.3 Efecto del extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en presencia de ..... L-NAME. ....                                           | 33 |
| 6.4.4 Efecto relajante del extracto etanólico de <i>R. officinalis L.</i> en presencia de nifedipina. ....                                   | 34 |
| 7. DISCUSIÓN .....                                                                                                                           | 36 |
| 7.1 Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> en tres protocolos experimentales. ....                      | 36 |
| 7.2 Estudio del mecanismo de acción responsable del efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> .....        | 39 |
| 8. CONCLUSIONES .....                                                                                                                        | 44 |
| 9. REFERENCIAS .....                                                                                                                         | 45 |
| ANEXO I (Preparación de soluciones) .....                                                                                                    | 52 |
| ANEXO II (Resumen del método) .....                                                                                                          | 53 |



## ABREVIATURAS

|                  |                                          |
|------------------|------------------------------------------|
| ABC              | Área Bajo la Curva                       |
| AC               | Adenilato Ciclasa                        |
| ACh              | Acetilcolina                             |
| AMPc             | Adenosin Monofosfato Cíclico             |
| ANOVA            | Análisis de Varianza                     |
| ATP              | Adenosin Trifosfato                      |
| Ca <sup>2+</sup> | Ion Calcio                               |
| CCR              | Curva Concentración Respuesta            |
| cm               | Centímetros                              |
| 5HT              | 5- hidroxitriptamina (Serotonina)        |
| EEM              | Error Estándar de la Media               |
| GMPc             | Guanosin Monofosfato Cíclico             |
| Hz               | Hertz                                    |
| h                | Horas                                    |
| IP <sub>3</sub>  | Trifosfato de Inositol                   |
| IPANs            | Neuronas Intrínsecas Aferentes Primarias |
| K <sup>+</sup>   | Ion Potasio                              |
| KCl              | Cloruro de Potasio                       |
| L-NAME           | Metil Ester L-Nitro Arginina             |
| µg               | Microgramos                              |
| µM               | Micromolar                               |
| mM               | Milimolar                                |
| M                | Molar                                    |
| min              | Minutos                                  |
| mL               | Mililitros                               |
| MLCK             | Cinasa de Miosina de Cadena Corta        |
| ms               | Milisegundos                             |
| NaCl             | Cloruro de Sodio                         |
| NO               | Óxido Nítrico                            |

|                  |                                           |
|------------------|-------------------------------------------|
| NOS              | Óxido Nítrico Sintasa                     |
| PEPR             | Potencial Exitatorio Postsináptico Rápido |
| PEPL             | Potencial Exitatorio Postsináptico Lento  |
| PGD <sub>2</sub> | Prostaglandinas D <sub>2</sub>            |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandinas E <sub>2</sub>            |
| PGI <sub>2</sub> | Prostaglandinas I <sub>2</sub>            |
| SNA              | Sistema Nervioso Autónomo                 |
| SNE              | Sistema Nervioso Entérico                 |
| VIP              | Péptido Intestinal Vasoactivo             |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....                                                                                                                                             | 1  |
| <b>Figura 2.</b> Músculos y plexos entéricos.....                                                                                                                                                 | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Neuronas del sistema nervioso entérico.....                                                                                                                                      | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Anatomía del intestino delgado .....                                                                                                                                             | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de ACh en receptores M <sub>3</sub> .....                                                                                                                    | 11 |
| <b>Figura 6.</b> Entrada de calcio extracelular .....                                                                                                                                             | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sobre tejido pre-contraido con KCl .....                           | 25 |
| <b>Figura 8.</b> Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sobre tejido pre-contraido con KCl .....                                                             | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Efecto contráctil inducido por ACh en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en íleon aislado de cobayo. ....        | 27 |
| <b>Figura 10.</b> Efecto contráctil máximo de ACh en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en íleon aislado de cobayo.....           | 29 |
| <b>Figura 11.</b> Efecto máximo inducido por estimulación eléctrico en ausencia y presencia del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. . ....                                     | 30 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en presencia y ausencia de hexametonio , sobre íleon aislado de cobayo, pre-contraido con KCl. .... | 31 |
| <b>Figura 13.</b> Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en presencia y ausencia de indometacina, sobre íleon aislado de cobayo, pre-contraido con KCl ..... | 32 |
| <b>Figura 14.</b> Efecto relajante del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en presencia y ausencia de L-NAME .....                                                             | 33 |
| <b>Figura 15.</b> Prueba con nifedipina .....                                                                                                                                                     | 34 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Usos medicinales del romero .....                                                                                                                                | 3  |
| <b>Tabla 2.</b> Neurotransmisores encontrados en el sistema nervioso entérico. ....                                                                                              | 7  |
| <b>Tabla 3.</b> Áreas bajo la curva de ACh en ausencia y presencia de papaverina y del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. a diferentes concentraciones. .... | 28 |
| <b>Tabla 4.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. y de papaverina en el íleon de cobayo pre-contraído con estimulación eléctrica. ....           | 31 |

### 1. INTRODUCCIÓN

*Rosmarinus officinalis* L.(Linn) mejor conocido como romero, es una planta perteneciente a la familia de las labiadas. Es originaria del mediterráneo pero ha sido muy utilizada en México y otros países del continente americano debido a su introducción por los españoles en la época de la conquista (Heinrich y cols, 2006). El nombre en latín del romero proviene de las palabras *ros* “rocio” y *marinus* “que pertenece al mar”, a pesar de que este arbusto crece lejos de éste (Heinrich y cols, 2006).

En cuanto a su morfología, el romero es un arbusto de hojas perennes que mide de 0.8 a 2 metros de alto. Las hojas son pequeñas, muy abundantes y se presentan en forma linear. Son de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vello (Gonzalez – Trujano y cols, 2007). Las flores son de unos 5 mm de largo de color azul violeta. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza y presenta dos estambres encorvados soldados a ésta. Son flores muy aromáticas y melíferas (que contienen miel) que se localizan en la cima de las ramas (figura 1).



**Figura 1.** *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”

En relación a su fitoquímica, diversos análisis sobre el extracto acuoso del romero han mostrado e identificado diferentes principios activos presentes en las partes aéreas de la planta. Entre estas sustancias se han identificado ácidos fenólicos con propiedades antioxidantes como el ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido clorogénico; y diferentes diterpenos como el ácido carnosólico, carnosol y rosmanol (Al-Sereitia y cols, 1999; Hoefler y cols, 1987). También se han logrado identificar dentro de los extractos acuoso y etanólico la presencia de flavonoides, taninos y saponinas (Hosseinzadeh y Nourbakhsh, 2003).

Con respecto a sus usos, esta planta es comúnmente cultivada por su aceite aromático y es considerada útil para el control de la erosión del suelo. Para propósitos culinarios, las hojas frescas o desecadas, se emplean para sazonar pescado carne y sopas (Gonzalez – Trujano y cols, 2007).

El romero es bien conocido como una especia la cual es utilizada alrededor del mundo con propósitos medicinales. En investigaciones previas se han demostrado varios efectos benéficos del romero debido a sus amplias propiedades. Entre las actividades y efectos estudiados se han demostrado sus propiedades hepatoprotectoras, antioxidantes (Hoefler y cols, 1987), diuréticas (Haloui y cols, 2000), antipiréticas (Martínez y cols, 2004), antibacteriales, antimicóticas (Panizzi y cols, 1993) y antitumorales (Fahim y cols, 1999). Todas las actividades anteriores se han estudiado debido a evidencia reportada de la medicina tradicional de diferentes lugares.

Otros usos del romero que se han encontrado dentro de los “remedios caseros”, son la aplicación tópica de las hojas maceradas en etanol. También, por vía oral, las partes aéreas de la planta son utilizadas como té. Este tipo de preparaciones se utilizan principalmente para el alivio de diversos padecimientos como se describen en la tabla 1 (Aguilar y cols, 1994 ; Argueta y cols, 1994.)

Tabla 1. Usos medicinales del romero

| <b>Tipo de desórdenes</b>     | <b>Usos del romero</b>                                                                                                     |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Esquelético musculares</b> | Alivia dolores reumáticos, artríticos, traumáticos musculares, de articulaciones y de huesos.                              |
| <b>De la piel</b>             | Tiene usos contra infecciones de la piel, cura heridas y tiene propiedades que actúan en contra de la pérdida del cabello. |
| <b>Gastrointestinales</b>     | Se utiliza en contra de cólicos, parásitos intestinales y hemorroides.                                                     |
| <b>Respiratorios</b>          | Actúa contra catarro, tos y resfriados.                                                                                    |
| <b>Circulatorios</b>          | Se utiliza para el dolor de corazón y venas varicosas.                                                                     |
| <b>Sistema nervioso</b>       | En contra de epilepsia y dolores de cabeza.                                                                                |
| <b>Ginecológicos</b>          | Tratamiento para post-parto, actúa en contra de infecciones vaginales y dismenorrea                                        |

### 1.1 Justificación

Desde tiempos antiguos, la civilización ha hecho uso de productos naturales con propiedades terapéuticas. Esta actividad ha contribuido de manera importante al desarrollo de fármacos utilizados actualmente en la medicina moderna debido a la obtención de principios bioactivos a partir de plantas, animales y minerales (Ghisalberti, 1993; Hamburger y Hosttetman, 1991). Gracias a esto se han desarrollado prácticas como la herbolaria y la etnofarmacología, las cuales pueden ser englobadas dentro de la farmacognosia.

La farmacognosia es una ciencia multidisciplinaria cuyo objetivo fundamental es el estudio de los productos naturales con propiedades medicinales (Mata, 2009). Según lo establecido por Kuklinski en el 2000, la farmacognosia tiene varios objetivos.

- Determinar el origen sistemático, la especie de la que procede la droga.
- Establecer las características morfoanatómicas (macroscópicas y microscópicas) que permitan la caracterización de la droga.
- Establecer la composición química de la droga, tanto cualitativa como cuantitativamente.
- Obtener extractos de la droga que contengan los principios activos.
- Controlar la calidad de las drogas.
- Establecer las propiedades farmacológicas de las drogas
- Investigar nuevos principios activos que puedan constituir un punto de partida para el diseño de nuevos fármacos.

En este contexto, se ha demostrado que la especie *Rosmarinus officinalis L.* presenta múltiples propiedades benéficas para el tratamiento de diversos malestares y desórdenes que afectan al hombre. Evidencia presentada por la medicina tradicional, muestra un claro efecto relajante de diversas preparaciones del romero sobre diferentes órganos con musculo liso. Además, en estudios previos se ha demostrado un claro efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* en ratones sometidos a modelos de dolor visceral (modelo de Writhing y el modelo de distensión colon-rectal) los cuales provocan la distensión sostenida de órganos huecos como el intestino y el estiramiento abdominal de los ratones (Peña, 2005; Gonzalez – Trujano y cols, 2007).

Estos antecedentes sugieren la posible acción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* para el alivio de espasmos intestinales y relajación del músculo liso intestinal. Con esta investigación se pretende demostrar el efecto antiespasmódico del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* en el modelo de íleon de cobayo, además de realizar un estudio para caracterizar el mecanismo de acción que produce tal efecto.

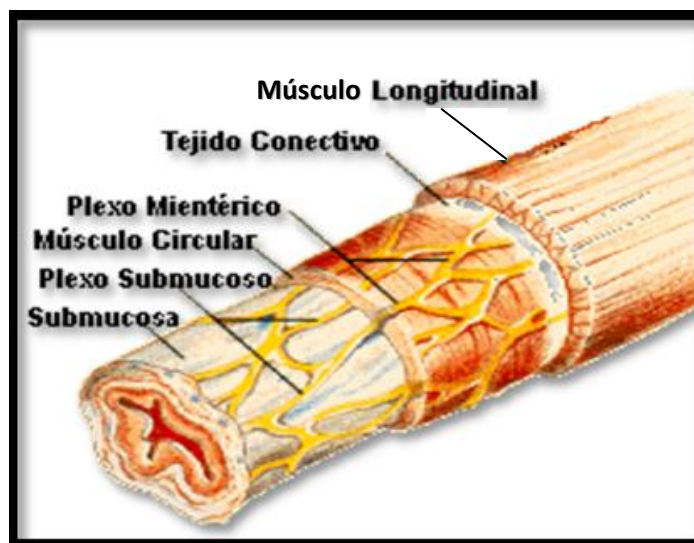


---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Anatomía y fisiología del intestino delgado

El intestino delgado es 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. Las capas de las que se compone son: la serosa, una capa muscular longitudinal, capa muscular circular, la submucosa y la mucosa (figura 2) (Costa y cols, 2000)



**Figura 2.** Músculos y plexos entéricos.

Al igual que todo el sistema digestivo, el intestino delgado se encuentra controlado por el sistema nervioso entérico (SNE). Este se encuentra constituido por diferentes tipos de neuronas las cuales forman redes que están encargadas de la motilidad del intestino delgado. El SNE se encuentra constituido por dos plexos nerviosos, el plexo mientérico que se encuentra entre las capas del músculo longitudinal y el circular, y el plexo de Meissner que se encuentra en la submucosa (figura 2). 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 submucosa (Costa y cols, 2000).

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 entéricas (Kunze y Furness, 1999).

En primer lugar se encuentran las 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 entérico (Costa y cols, 2000).

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 descendentes 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 (ACh) y las taquicininas, que actúan directamente sobre células efectoras como el músculo liso, células secretoras y células endócrinas gastrointestinales. Estas últimas secretan hormonas que también se encargan de la motilidad del intestino delgado como 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 (tabla 2) (Goyal y Hirano, 1996; Kunze y Furness, 1999).

Tabla 2. Neurotransmisores encontrados en el sistema nervioso entérico.

| <b>Tipo de neurotransmisor</b> | <b>Neurotransmisores</b>                                    |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Excitatorios                   | <b>Acetilcolina</b> , Sustancia P, serotonina, y bombesina. |
| Inhibitorios                   | <b>Norepinefrina</b> , NO, ATP, VIP Y secretina.            |

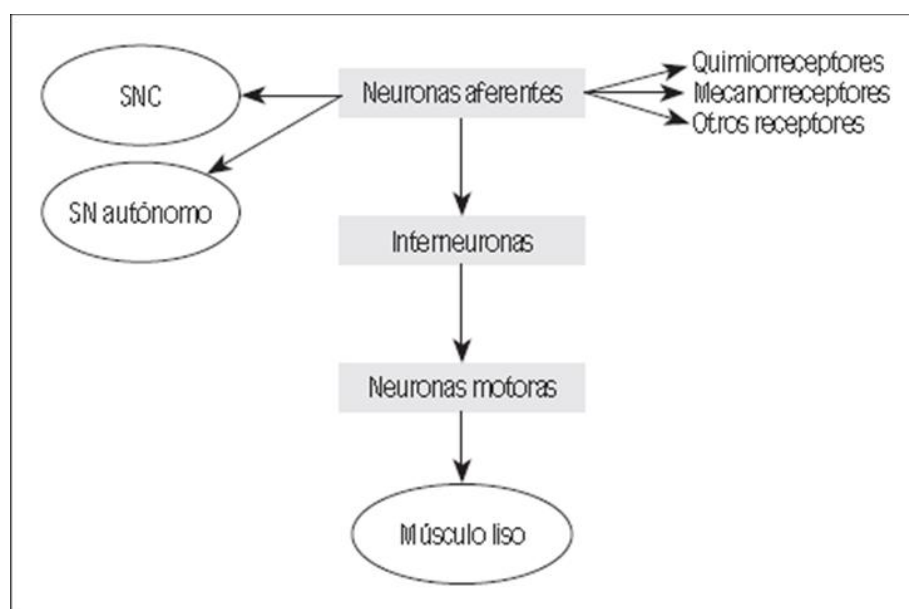
Por último, se encuentra el grupo de las interneuronas, las cuales están clasificadas como ascendentes y descendentes. Estas tienen la función de integrar las señales recibidas por las neuronas intrínsecas aferentes primarias para después transmitir las directamente a las neuronas motoras y de esta manera regular la motilidad y función del intestino delgado (Kunze y Furness, 1999).

Existen evidencias que indican 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 inhibitorias y 3,000 excitatorias que inervan al músculo circular (Kunze y Furness, 1999).

Es importante mencionar que en el intestino delgado existe, además de la innervación intrínseca, una innervación extrínseca que es modulada por el sistema nervioso autónomo (SNA). A nivel parasimpático, la innervación hacia el intestino puede clasificarse en craneal y sacra. La innervación craneal es transportada a través de los nervios vagos. Estas fibras proporcionan una innervación menor en el intestino a comparación del resto del sistema gastrointestinal. La innervación sacra es transportada por los nervios pelvianos, llegando a la mitad distal del intestino

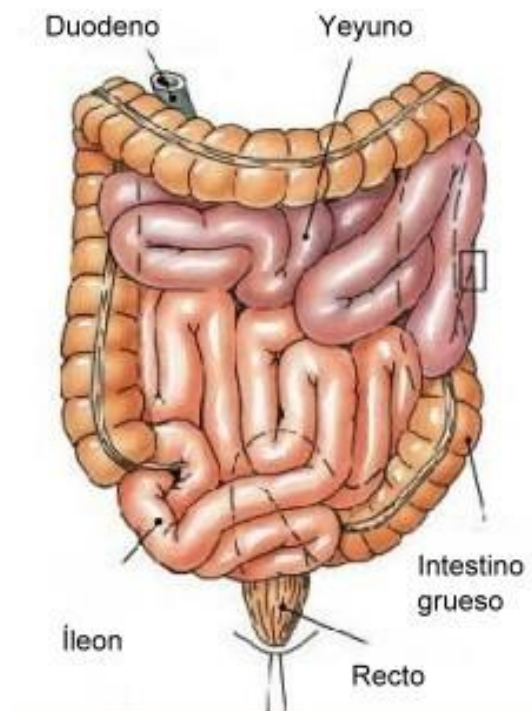
grueso. Las neuronas postganglionares del sistema parasimpático inervan al plexo mientérico y submucoso, su estimulación da lugar a un aumento generalizado del SNE por la acción de acetilcolina (Guyton y Hall, 2001; Venegas, 2007).

A nivel simpático, la innervación llega prácticamente a todas las regiones del aparato gastrointestinal sin mostrar alguna preferencia. Las fibras postganglionares llegan a terminaciones del SNE o directamente a las fibras musculares. La innervación simpática en el intestino delgado es inhibitoria y su principal neurotransmisor es la norepinefrina (Guyton y Hall, 2001).



**Figura 3.** Neuronas del sistema nervioso entérico

Con relación a su anatomía, el intestino delgado se encuentra dividido en tres porciones: el duodeno, el yeyuno y el íleon (figura 4) (Shiner, 1995). Varios estudios han demostrado que el íleon, es la sección del intestino delgado más vascularizada y se encuentra inervada por el mayor número de neuronas entéricas (Navarro, 2002). Además, a diferencia del intestino de ciertas especies, el íleon de cobayo muestra poca actividad espontánea y su viabilidad se extiende por más de 12 horas (Aguilar – Mariscal y cols, 2009).



**Figura 4.** Anatomía del intestino delgado

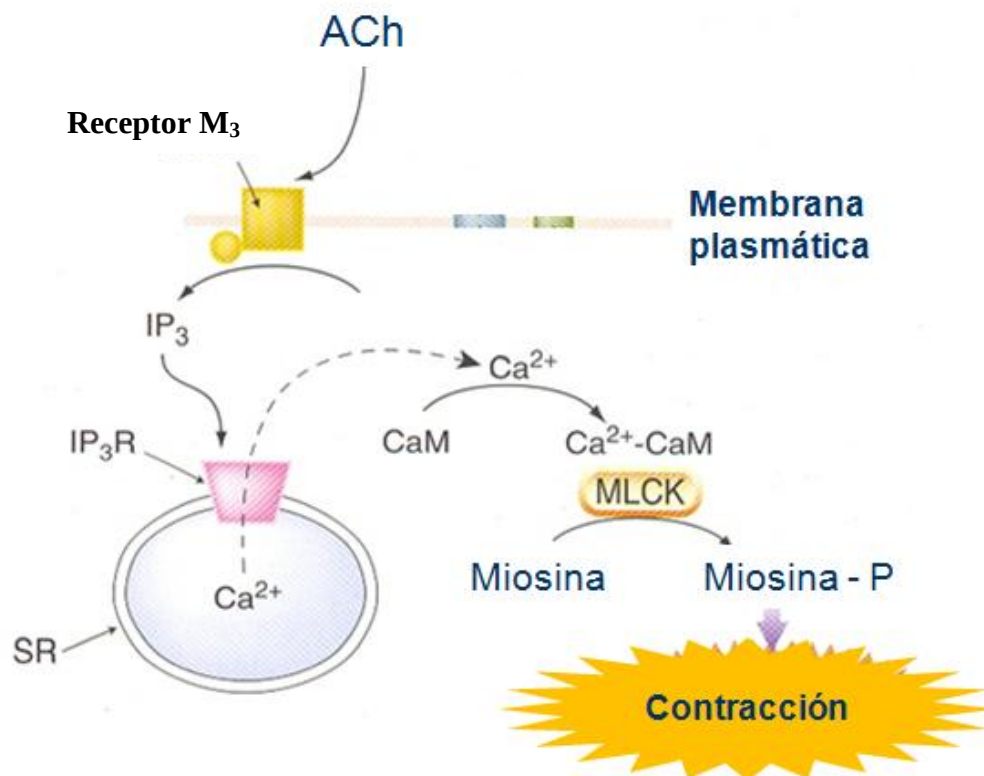
Por consiguiente, el íleon representa el segmento del intestino delgado más apropiado para el estudio de los cambios inducidos por los fármacos en la tensión muscular, ya que el efecto de cualquier sustancia que actúe a nivel intestinal, será más evidente y fácil de analizar. Por esta razón, a lo largo de los años, el íleon aislado de cobayo ha sido empleado para determinar y caracterizar el efecto antiespasmódico de diversos compuestos así, como para realizar estudios farmacológicos de diversa índole.

## **2.2 Mecanismo de acción de la acetilcolina en el músculo liso.**

Como ya se revisó anteriormente, la ACh es el principal neurotransmisor excitatorio encargado del aumento de la tonicidad del intestino delgado. Este neurotransmisor actúa sobre los receptores muscarínicos en las células del músculo liso. A lo largo de todo el organismo existen varios subtipos de receptores muscarínicos ( $M_1 - M_5$ ). En el caso del músculo liso, en su mayoría, los receptores presentes son los subtipos  $M_2$  y  $M_3$ . Al igual que en otros tejidos con músculo liso,

en el intestino delgado se presenta una combinación del 20% de receptores  $M_3$  y 80 % de  $M_2$  (Ehlert y cols, 1997). Estos receptores están acoplados a una proteína  $G_0$  y están asociados directamente a la respuesta contráctil del músculo liso, mientras que los receptores  $M_2$  están asociados a la inhibición de la adenilato ciclasa y a la disminución de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Sawyer y Ehlert, 1998).

A grandes rasgos, el mecanismo de acción de la acetilcolina a través de los receptores  $M_3$ , se lleva a cabo de la siguiente manera: la acetilcolina, al activar el receptor  $M_3$ , la proteína  $G_0$  acoplada a este receptor es activada produciendo la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato por la fosfolipasa C. Como producto de esta hidrólisis, se genera el segundo mensajero trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), el cual actúa sobre el receptor de trifosfato de inositol ( $IP_3R$ ) 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 (Rang y Dale, 2007). Tras la salida del  $Ca^{2+}$ , este se une a la calmodulina, una proteína con 4 sitios de unión a  $Ca^{2+}$ , la cual sirve como intermediario para la activación de la cinasa de miosina de cadena corta (MLCK, por sus siglas en inglés). La MLCK lleva a cabo la fosforilación de miosina de cadena corta generando que esta se desplace entre los filamentos de actina, generando la contracción de las fibras musculares del músculo liso (figura 7) (Rang y Dale, 2007).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de ACh en receptores M<sub>3</sub>

Por otro lado, diversas investigaciones demuestran que los receptores M<sub>2</sub> se encuentran relacionados a la respuesta contráctil del músculo liso de manera indirecta. Los receptores M<sub>2</sub> inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (AC) en el intestino delgado. De esta manera se evita el efecto relajante ocasionado por el incremento de AMPc (Sawyer y Ehlert, 1998). Sin embargo, estudios realizados a nivel de íleon de cobayo, han sugerido que el efecto de los receptores M<sub>2</sub> se debe a la disminución del AMPc inducido por agonistas adrenérgicos y otros compuestos que actúan aumentando la actividad de la AC. No obstante, los receptores M<sub>2</sub> no tienen ningún efecto sobre los niveles basales de AMPc (Thomas y cols, 1993).

En conclusión, la acetilcolina y los agonistas muscarínicos presentan un efecto doble sobre la contracción del intestino delgado; ya que mientras que la activación de los receptores M<sub>3</sub> producen una contracción directa del tejido, los receptores M<sub>2</sub> inhiben la relajación del tejido por una disminución de AMPc.

### 2.3 Efecto de altas concentraciones de $K^+$ extracelular

La contracción del músculo liso está directamente relacionada con la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$ . A su vez, las contracciones y la elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular, se encuentran reguladas por mecanismos farmacológicos y por mecanismos electromecánicos. Estos últimos involucran la despolarización de la membrana, en donde no es necesaria la presencia de receptores específicos como en los mecanismos farmacológicos. En el caso de la administración de altas concentraciones de cloruro de potasio (KCl) sobre el músculo liso, se produce un mecanismo electromecánico donde la elevada concentración de  $K^+$  extracelular induce la despolarización de la membrana, lo cual abre los canales dependientes de voltaje de  $Ca^{2+}$  tipo L, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula, y por consiguiente, la contracción de las fibras musculares (figura 6) (Mita y cols, 2002).

#### Canales de $Ca^{2+}$ dependientes de ligando

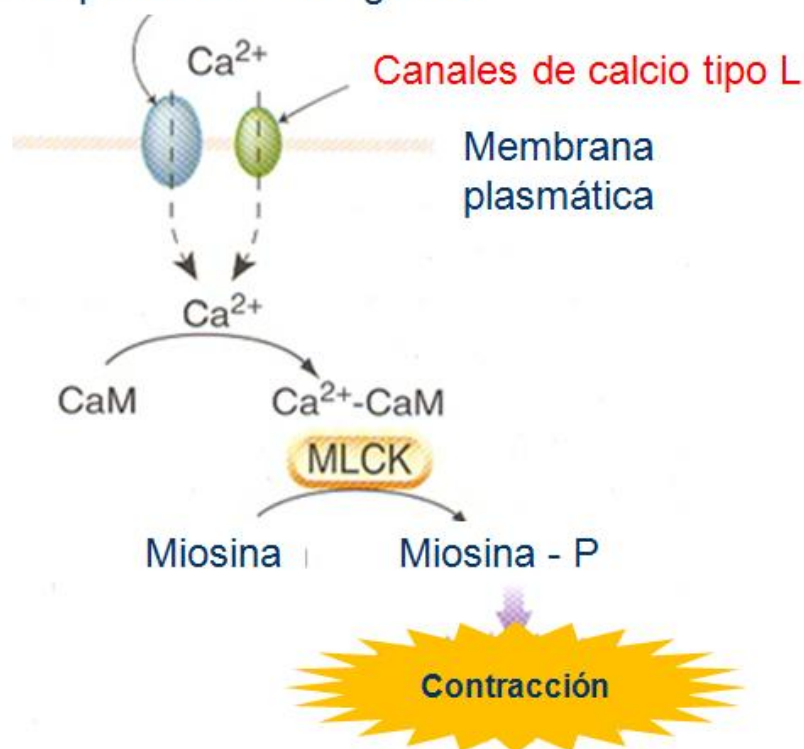


Figura 6. Entrada de calcio extracelular



## **2.4 Estimulación eléctrica del intestino delgado**

Además de la clasificación que ya se había revisado sobre las neuronas presentes en el SNE, existe otra clasificación desde un punto de vista electrofisiológico donde las neuronas son designadas como “S” y “AH”. Las neuronas de tipo S, al ser estimuladas eléctricamente, presentan un potencial excitatorio postsináptico rápido (PEPR); mientras que las neuronas tipo AH, presentan un potencial excitatorio postsináptico lento (PEPL). Se ha demostrado, mediante estudios funcionales y neuroanatómicos, que las neuronas de tipo S representan a las interneuronas y a las neuronas motoras; mientras que las neuronas AH representan a las neuronas intrínsecas aferentes primarias. (Galligan y cols, 2000).

El mecanismo excitatorio predominante en el SNE se encuentra mediado por ACh quien a su vez, es responsable del PEPR de las neuronas S. Varios estudios han mostrado que al igual que las neuronas AH, las neuronas tipo S presentan un PEPL. Sin embargo, éste no se encuentra principalmente mediado por ACh. En el caso del PEPL, la influencia de otros neurotransmisores como las taquicinas, serotonina (5HT), prostaglandinas, somostatina y glutamato (exógeno) son de gran importancia (Abalo y cols, 2000).

Al estimular eléctricamente el intestino delgado se produce la contracción del músculo liso debido a la secreción de varios neurotransmisores, principalmente ACh.

Además de liberarse estos transmisores excitatorios, también se produce la estimulación de neuronas inhibitorias produciendo de esta manera la secreción de norepinefrina y ATP, dando como resultado una disminución en la contracción del músculo liso (Maske y cols, 1980).

## **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 SNA, a partir del cual, el músculo liso puede recibir una cantidad elevada de impulsos provocando contracciones exageradas. También a nivel del SNE, los espasmos son provocados por diversos cambios químicos y físicos en los alrededores del tejido (Galambos, 1954).

Además de originarse a estos dos niveles, los espasmos son provocados por dos mecanismos. El principal mecanismo consiste en el desequilibrio del sistema parasimpático y de las terminaciones colinérgicas en el intestino, lo cual provoca la secreción elevada de acetilcolina. Algunas causas que producen esto son la irritación del tracto intestinal, secreción elevada de hormonas, presencia de alguna enfermedad, agentes patógenos o toxinas, por obstrucción del tracto y, en varias ocasiones, por la predisposición de las personas a sufrir estrés nervioso (Davis, 1988).

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

Para el tratamiento de los espasmos, existe un grupo de medicamentos llamados antiespasmódicos o espasmolíticos. Ante un espasmo, estos medicamentos producen la relajación del músculo liso de la pared de las vísceras huecas, como el intestino, la vesícula biliar, uretra y el útero. Existen dos clasificaciones para los antiespasmódicos: 1) Anticolinérgicos o neurotrópicos que actúan antagonizando los receptores muscarínicos; y 2) los musculotrópicos, que actúan directamente sobre músculo liso cuyo mecanismo de acción puede variar (Davis, 1988).

Otras opciones terapéuticas para el tratamiento de los espasmos intestinales es el uso de extractos de plantas. Basados en su empleo en la medicina popular, existen estudios científicos de plantas que desenlazan en el descubrimiento de principios activos para la producción de nuevos fármacos. Este es el caso de *Rosmarinus officinalis* L., que dentro de la medicina tradicional, el uso de diferentes preparaciones como tés y maceraciones, a partir de las partes aéreas de la planta, son administradas vía oral para el tratamiento de espasmos de musculo liso en órganos como el intestino, útero y tracto renal. (González-Trujano y cols, 2007).

A falta de evidencia científica que sustenta el uso de *Rosmarinus officinalis* L. como antiespasmódico en la medicina tradicional, se realizó esta investigación la cual pretende avalar el uso popular del romero para el tratamiento de espasmos intestinales y dar pie al futuro aislamiento de uno o varios principios activos.

### 3. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional, diferentes preparaciones de *Rosmarinus officinalis* L. producen un efecto antiespasmódico, entonces su extracto etanólico producirá un efecto relajante sobre el músculo liso del íleon aislado de cobayo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Determinar y evaluar el efecto antiespasmódico del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. utilizando del modelo de íleon aislado de cobayo.

### 4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto antiespasmódico del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. utilizando el íleon de cobayo pre-contraido con KCl”.
- Evaluar el efecto antiespasmódico del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. utilizando el íleon de cobayo en la contracción inducida con ACh.
- Evaluar el efecto antiespasmódico del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. utilizando el íleon de cobayo en la contracción inducida con estimulación eléctrica.
- Investigar el posible mecanismo de acción del efecto antiespasmódico producido por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en el íleon de cobayo utilizando diversos bloqueadores y antagonistas específicos.

## 5. MÉTODO

### 5.1 Obtención del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.

Para la obtención del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L., se pesan 330 g de las partes aéreas secas de la planta. Estas se introducen a un matraz de 2 L y se adiciona 1,200 mL de hexano, de manera que se cubra totalmente el material vegetal. Las hojas se maceran sucesivamente con el mismo volumen de hexano a temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) por 72 horas (el procedimiento se realiza por triplicado). Esta primera extracción tiene como objetivo la eliminación de grasas presentes en la muestra. Posteriormente, el residuo de las hojas se macera con 1.2 L de etanol de manera que cubra el material vegetal. Se deja macerar sucesivamente la muestra en etanol a temperatura ambiente por 72 h (el procedimiento se realiza por triplicado). Una vez transcurrido el tiempo de maceración con etanol, el extracto obtenido se filtra por gravedad para después concentrarse por destilación a presión reducida en un rota-evaporador hasta la total eliminación del disolvente. Como producto final se obtienen 111 g de un sólido verde con un rendimiento del 33.60%. Las partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L. fueron recolectadas en el estado de Morelos en junio del 2005 (Gonzalez – Trujano y cols, 2007). Una muestra del espécimen se depositó en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social en donde fue identificado por M. en C. Abigail Aguilar (IMSSM-15005)

El extracto utilizado para esta investigación, fue proporcionado por la Dra. María Eva González Trujano del laboratorio de Microdiálisis del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, siguiendo la metodología antes descrita.

## 5.2 Preparación del tejido

Se utilizaron cobayos macho de la cepa Hartley de entre 400 y 600 gramos de peso corporal con 24 h de ayuno; los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvo una porción de 10 cm de íleon el cual se limpio de tejido conectivo y bolo alimenticio que se encuentra en el interior del intestino. Se cortaron 6 segmentos de 1.2 cm aproximadamente y se depositaron en una cámara con solución Krebs (NaCl [118.0 mM], NaHCO<sub>3</sub> [25 mM], KCl [4.7 mM], MgCl<sub>2</sub> [1.2 mM], NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [1.2 mM], dextrosa [11.0 mM], CaCl<sub>2</sub> [2.5 mM] y colina [0.3 mM]) a 37°C y con burbujeo de carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) para mantener las condiciones fisiológicas. (Las soluciones utilizadas en este trabajo se encuentran reportados en el anexo I, pág. 54).

Cada uno de los segmentos fue montado en una cámara de órgano aislado de 20 mL y se conectó a un transductor de presión, el cual transmite la señal a un polígrafo. Las preparaciones se dejaron estabilizar durante 30 minutos en solución Krebs a 37°C, con burbujeo de carbógeno bajo una tensión de 1 gramo. Una vez transcurrido el tiempo de estabilización del tejido, se administró a cada segmento 0.2mL de una solución de acetilcolina (ACh) [1x10<sup>-5</sup> M] para asegurar la viabilidad del tejido. Al terminar esta prueba se realizó el lavado del tejido el cual consiste en el cambio total de solución Krebs, para asegurar la eliminación total de la ACh de la cámara.

## 5.3 Efecto de relajación en tejido pre-contraido con KCl.

Tras la preparación del tejido, descrita anteriormente, la solución Krebs de las cámaras se sustituyó por una solución Krebs con una concentración de NaCl de [58mM], y enseguida se adicionó una solución de KCl [60 mM] para precontraer al tejido. La disminución en la concentración de NaCl se realizó con una relación equimolar con respecto a la concentración de KCl para evitar un desequilibrio en la presión osmótica del tejido.

---

---

Una vez adicionado el KCl [60 mM], se esperó el tiempo necesario para que el tejido alcanzara una meseta máxima estable y que esta perdurara como mínimo 5 min. Si el tejido no cumplía con este requisito, era descartado. Una vez alcanzada la meseta, el extracto se administró a diferentes concentraciones 150, 300, 600 y 1200 µg/mL (una concentración a la vez).

En cada administración del extracto, se evaluó el efecto relajante, y se procedió a realizar el lavado de cada tejido, el cual consiste en el cambio completo de la solución Krebs que se encuentra en la cámara por nueva solución con concentración normal de NaCl. Fue necesario realizar este procedimiento 2 veces para asegurar la eliminación total de la concentración del extracto administrado. Entre cada administración de las concentraciones del extracto, se dejó reposar al tejido entre 30 y 45 minutos, con reperfusión de solución Krebs, hasta que el tejido recuperó su actividad basal (Fatehi y cols, 2004; Moazedi y cols, 2007).

#### **5.4 Efecto de relajación en tejido estimulado químicamente con acetilcolina**

En un segundo grupo de experimentos, se realizó una curva acumulativa de acetilcolina [ $1 \times 10^{-10}$  –  $1 \times 10^{-5}$ M] en ausencia del extracto (Control). Al terminar la curva se realizó un lavado y se dejó un periodo de reperfusión de 20 minutos para que el tejido recuperara su actividad basal. Posteriormente, se administró en las cámaras una concentración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [150, 300 y 600 µg/mL] y se dejó incubar el tejido en presencia del extracto por 10 minutos. Después, se corrieron curvas acumulativas de las diferentes concentraciones de ACh para cada concentración del extracto. Se realizó un lavado, además de dejar un periodo de reperfusión de 20 minutos entre cada curva. Como control positivo se corrió una curva acumulativa de ACh en presencia de papaverina [30 µM] (Sánchez-Mendoza, 2007; Fatehi y cols, 2004; Cechinel-Filho y cols, 2007).



---

La respuesta máxima obtenida con la concentración de ACh de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  en la curva control, se consideró como el 100% del efecto contráctil y en base a este valor, se obtuvieron los porcentajes del efecto contráctil producido en las curvas en presencia del extracto [150, 300 y 600  $\mu\text{g/mL}$ ] y papaverina [30  $\mu\text{M}$ ].

### 5.5 Efecto de relajación en tejido con estimulación eléctrica

En un tercer grupo de experimentos, los segmentos fueron estimulados eléctricamente (con una corriente de 14 volts con una frecuencia de 0.3 Hz y pulsaciones de 3 ms de duración) utilizando un estimulador y un splitter (S88 stimulator de GRASS y Med-Lab Stimu- Splitter II) hasta obtener la respuesta máxima (se mantuvo la perfusión de solución Krebs durante la estimulación). Una vez alcanzada la respuesta máxima, se detuvo la perfusión y se administró el extracto [150, 300 y 600  $\mu\text{g/mL}$ ]. El tejido se dejó incubar con el extracto por 10 minutos. Posteriormente se procedió a detener la estimulación eléctrica y se lavó el tejido, dejándolo reposar por 10 minutos para que recuperara su actividad basal. Nuevamente se estimuló eléctricamente el tejido con las condiciones antes mencionadas, para obtener la respuesta máxima y poder administrar la siguiente concentración de extracto a evaluar (Abalo y cols, 2000).

Para este procedimiento se consideró a la respuesta máxima del tejido estimulado eléctricamente en ausencia del extracto como el 100% del efecto contráctil. A partir de este dato, se obtuvieron los valores de la máxima contracción en presencia del extracto a diferentes concentraciones y de la papaverina.

### 5.6 Determinación del mecanismo de acción

Utilizando la metodología del tejido pre-contraído con KCl, se evaluó el efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de las principales vías encargadas de la contracción y relajación del músculo liso, frente al efecto del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.. Para esto, al finalizar la preparación del tejido, se prosiguió a pre-contrair los segmentos con KCl [60mM]. 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:

- Hexametonio con una concentración final de 0.5 mM por 10 min.
- Indometacina con una concentración final de 1  $\mu$ M por 30 min.
- L-NAME con una concentración final de 100  $\mu$ M por 30 min.

Tras haber incubado el tejido el tiempo y con las concentraciones especificadas para cada fármaco, se administró a cada cámara 0.4ml de una solución de extracto para obtener una concentración final de 600  $\mu$ g/ml. De esta manera se registró la presencia o ausencia de un efecto relajante por parte del extracto. Al término de la evaluación, se realizó el lavado de cada cámara y se dejó 45 min de reposo al tejido con reperusión de solución Krebs para que los segmentos recobraran su actividad basal. Posteriormente se repitió el mismo procedimiento para cada uno de los fármacos restantes (Caldas Magalhaes y cols, 2004).

### **5.7 Prueba sobre el efecto del extracto etanólico de *R. officinalis* L. en presencia de nifedipina.**

Para la determinación de la participación del calcio intra y extracelular en el efecto relajante del extracto, se siguió el siguiente procedimiento. El tejido se precontrae con ACh 100  $\mu$ M hasta obtener una meseta máxima la cual sirvió como control. Tras haber obtenido una meseta estable, el tejido se lavó y se dejó un periodo de reposo de 30 min con goteo de solución Krebs para recuperar la actividad basal del tejido.

Al término de este periodo, el tejido fue nuevamente pre-contraido con ACh [100  $\mu$ M] y se administró el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [600

µg/mL]. De esta manera, se evaluó el efecto presentado por el extracto en el íleon aislado de cobayo. Posteriormente se lavó el tejido y se dejó estabilizar por 30 min. Después de este tiempo, a cada cámara se le administró 0.2 ml de una solución de nifedipina que permitió alcanzar una concentración final de 1 µM en la cámara. El tejido se incubó con nifedipina por 5 min para después pre-contrarlo con ACh [100 µM] y adicionar el extracto a una concentración de 600 µg/mL.

Por último, después del lavado y reposo del tejido, se realizó una nueva pre-contracción con ACh en presencia de nifedipina para determinar el efecto de esta sobre la contracción inducida por ACh (Caldas Magalhaes y cols, 2004).

### 5.8 Análisis de datos.

En el caso de los tejidos pre-contraidos con KCl, se calculó el % de relajación producido por cada concentración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en el tejido. En los protocolos donde se precontrae el tejido con estimulación eléctrica y ACh se calculó como el % de la respuesta contráctil en presencia del extracto. Además, se calculó el área bajo la curva (ABC) de las curvas acumulativas concentración respuesta de ACh en ausencia y presencia de las diferentes concentraciones del extracto. En todos los casos, los datos se presentan como la media ± error estándar (E.E.).

Para calcular el efecto relajante en el tejido pre-contraido con KCl, se consideró la disminución del efecto contráctil inducido por KCl [60mM] después de que el extracto fue administrado. El porcentaje de relajación se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{gramos de tensión tras la administración del extracto} \times 100}{\text{gramos de tensión del tejido pre - contraído con KCl [60 mM]}} = \% \text{ de relajación}$$

---

Para calcular la disminución de la contracción inducida con ACh en presencia del extracto, se tomaron en cuenta los gramos de tensión obtenidos por la administración de ACh  $1 \times 10^{-5}$  M en la curva control, como el 100% del efecto contráctil. El porcentaje de contracción se calculó de la siguiente manera:

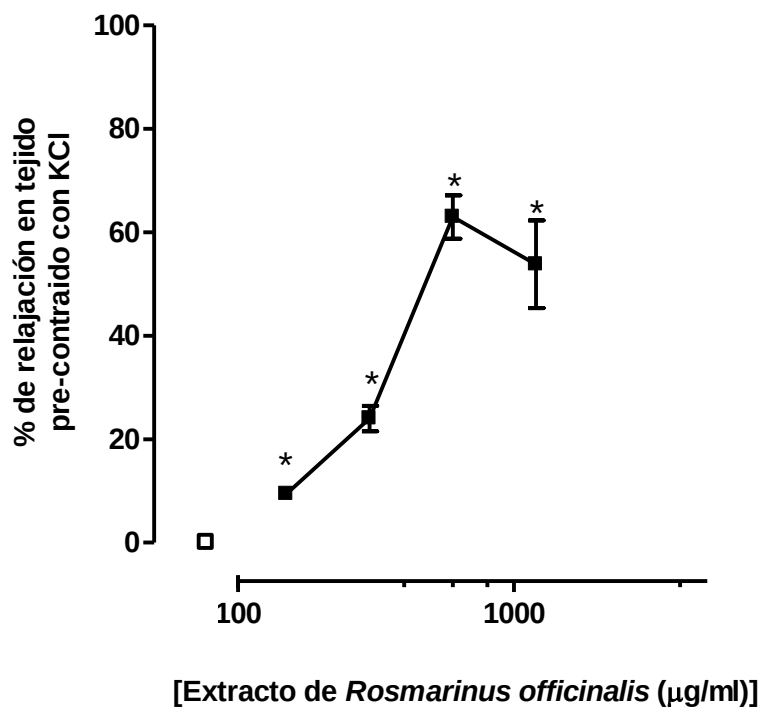
$$\frac{\text{gramos de tensión por [X] concentración del extracto} \times 100}{\text{gramos de tensión obtenidos por ACh } 1 \times 10^{-5} \text{ M en la curva control}} = \% \text{ de contracción}$$

Para calcular la disminución de la contracción inducida con estimulación eléctrica (EE) en presencia del extracto, se tomaron en cuenta los gramos de tensión obtenidos por la respuesta máxima del tejido a la estimulación eléctrica con 14 v, 0.3Hz y 3ms, como el 100% del efecto contráctil. El porcentaje de contracción se calculó de la siguiente manera:

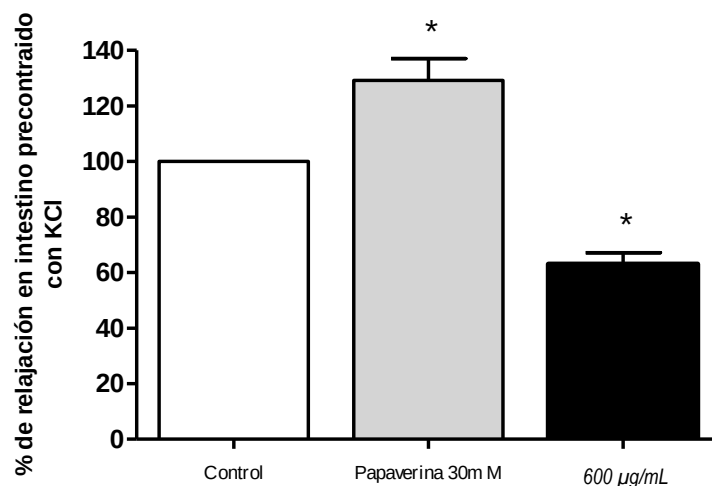
$$\frac{\text{gramos de tensión obtenidos en presencia del extracto} \times 100}{\text{gramos de tensión del efecto máximo inducido por EE}} = \% \text{ de contracción}$$

Para determinar la diferencia entre los tratamientos (3 o más) se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para comparar el efecto de las concentraciones del extracto con respecto al control. Además de esta prueba, se realizó una prueba de Tukey para la comparación entre el efecto de las diferentes concentraciones. La comparación entre dos tratamientos se llevó a cabo mediante una prueba t de Student pareada. El criterio de aceptación 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.

## 6. RESULTADOS

6.1 Efecto relajante producido por el extracto etanólico de *R. officinalis* L. en tejido pre-contraído con KCl.

**Figura 7.** Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [150, 300, 600, 1200 µg/ml] sobre tejido pre-contraído con KCl [60 mM]. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E. (n=6). \*p<0.05, ANOVA, Dunnett.



**Figura 8.** Efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [600 µg/ml] sobre tejido pre-contraído con KCl [60 mM]. Como control positivo se utilizó papaverina 30 µM. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. (n=6). \*p<0.05, ANOVA, Dunnett.

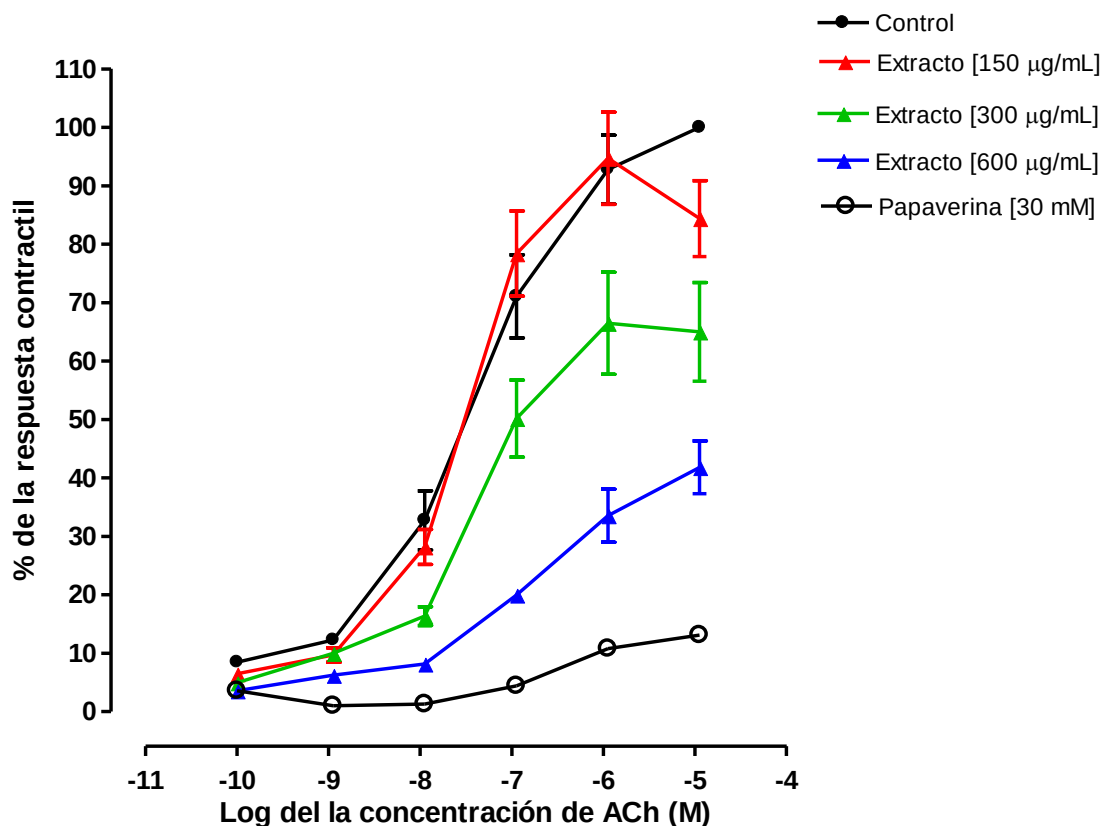
---

En la figura 7 se muestra una curva concentración respuesta, en donde, el eje de las X representa la concentración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L* en escala logarítmica; mientras que el eje de las Y representa el porcentaje de relajación producido por las diferentes concentraciones del extracto en los segmentos de íleon aislado de cobayo previamente contraídos con KCl [60 mM].

Como se muestra en la figura 7, la relajación inducida por diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L*. en el íleon de cobayo pre-contraído con KCl fue dosis dependiente. Las concentraciones utilizadas del extracto [150, 300, 600 y 1200 µg/ml] muestran una diferencia significativa en el efecto relajante en comparación del vehículo ( $9.43 \pm 0.77$ ,  $24.02 \pm 2.45$ ,  $62.97 \pm 4.18$ ,  $53.82 \pm 8.50\%$  vs 0.0%, respectivamente,  $p < 0.05$ ; ANOVA, Dunnett). Sin embargo, no existe una diferencia significativa entre las concentraciones más altas del extracto de *Rosmarinus officinalis L*. en este modelo (600 y 1200 µg/ml, t de student). Por lo tanto, se considera que el efecto máximo del extracto se obtuvo con la dosis de 600 µg/ml. Debido a esto, ésta es la concentración del extracto que se utiliza en estudios posteriores

En la figura 8, se muestra la máxima relajación producida con el extracto (600 µg/ml) y con la papaverina [30 µM]. La papaverina fue utilizada como control positivo para comprobar que el tejido tenga la capacidad de revertir completamente el efecto contráctil inducido con el KCl [60mM]. Como se puede observar en esta figura a pesar de que el efecto de la papaverina es significativamente mayor en comparación con el efecto máximo del extracto ( $129.2 \pm 7.89$  vs  $62.97 \pm 4.18$ , t de student,  $p < 0.05$ ), el efecto relajante del extracto es muy importante.

## 6.2 Efecto relajante inducido por el extracto etanólico de *R. officinalis* L. en tejido estimulado químicamente con acetilcolina



**Figura 9.** Efecto contráctil inducido por ACh [ $1 \times 10^{-10}$  –  $1 \times 10^{-5}$  M] en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en íleon aislado de cobayo. Se utilizó como control positivo a la papaverina 30 µM. Los resultados se expresan en % de la respuesta contráctil. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E. (n=6).

En la figura 9 se muestran las curvas concentración respuesta acumulativas de la ACh [ $1 \times 10^{-10}$  –  $1 \times 10^{-5}$  M] en ausencia y presencia de diversas concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. En esta figura, el eje de las X representa la concentración de la ACh en escala logarítmica; mientras que el eje de las Y representa el porcentaje de contracción inducido por ACh.

Como se puede observar, el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. inhibió, de manera concentración-dependiente, la respuesta contráctil inducida por

ACh en el íleon de cobayo. En la misma figura se puede observar que la papaverina (utilizada como control positivo) inhibió casi por completo la contracción inducida por la ACh, lo que comprueba la capacidad que tiene el tejido de inhibición de la contracción en este protocolo experimental.

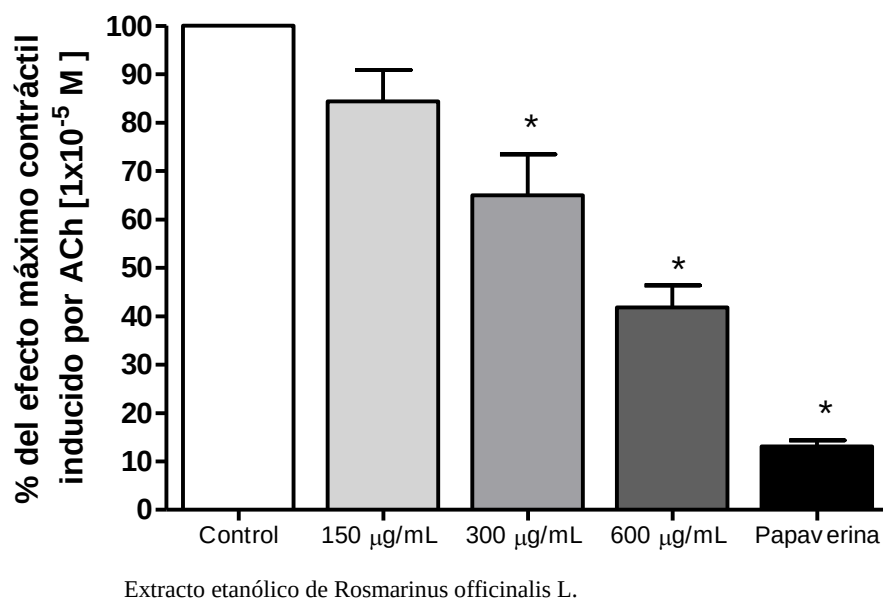
Al realizar el análisis de las áreas bajo la curva de las CCR de acetilcolina (Tabla 3) se muestra que aunque la dosis más pequeña utilizada del extracto [150 µg/ml] no mostró una diferencia significativa con el control, si se muestra una tendencia a inhibir la contracción inducida por la ACh en el íleon de cobayo. Esta tendencia del extracto a disminuir el efecto contráctil de la ACh alcanzó significancia estadística con las dos concentraciones más altas (300 y 600 µg/ml). En comparación con el control, evidentemente, la respuesta de los segmentos pretratados con la papaverina muestra una inhibición significativa, lo que confirma la respuesta máxima de inhibición del efecto contráctil inducido por un relajante muscular que es comúnmente empleado como control positivo.

**Tabla 3.** Área bajo la curva del efecto contráctil de la ACh en ausencia y presencia de papaverina y del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. a diferentes concentraciones.

| Concentración      | Efecto contráctil (ua) |
|--------------------|------------------------|
| Control            | 263.7 ± 8.95           |
| Extracto 150 µg/mL | 256.8 ± 17.72          |
| Extracto 300 µg/mL | 178.4 ± 19.72 *        |
| Extracto 600 µg/mL | 90.91 ± 7.35 *         |
| Papaverina 30 µM   | 25.99 ± 2.24 *         |

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



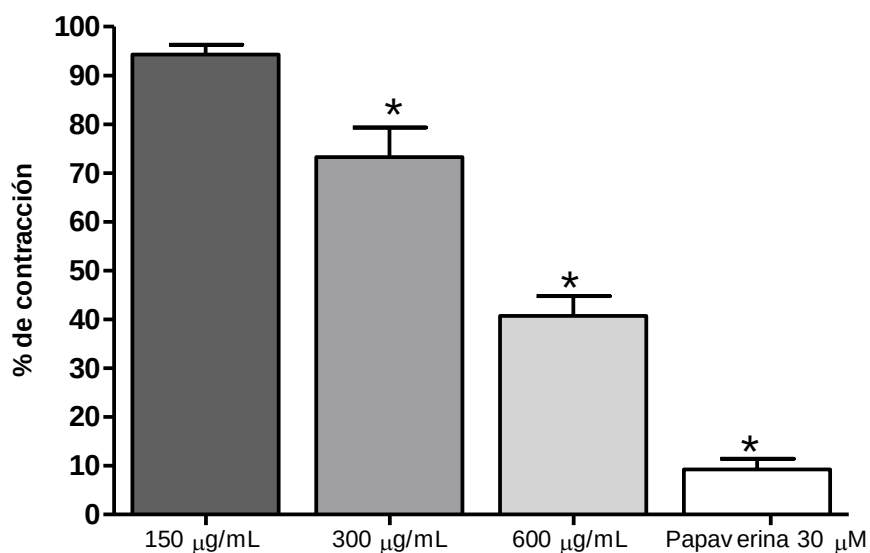


**Figura 10.** Efecto contráctil máximo de ACh [ $1 \times 10^{-5}$  M] en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. y papaverina 30  $\mu$ M, en íleon aislado de cobayo. Control = ACh [ $1 \times 10^{-5}$  M]. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. (n=6).  $p < 0.05$ , ANOVA, Dunnett.

En la figura 10 se muestra en el eje de las x el tratamiento evaluado y en el eje de las y el máximo efecto contráctil de la concentración de ACh  $1 \times 10^{-5}$  M. Como se puede observaren esta figura el efecto del extracto sobre la inhibición de la contracción inducida por ACh  $1 \times 10^{-5}$  M es concentración dependiente.

En la figura 10 se muestra el efecto máximo presentado por ACh a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto y papaverina 30  $\mu$ M. Al realizar un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ), se determinó que el efecto de la ACh en presencia de las concentraciones de 150, 300 y 600  $\mu$ g/mL presentan una diferencia significativa con respecto al lo obtenido por el control ( $84.38 \pm 6.49$  %,  $65.00 \pm 8.45$ %,  $41.81 \pm 4.52$  % vs 100% respectivamente, ANOVA, Dunnett  $p < 0.05$ ).

### 6.3 Efecto relajante inducido por el extracto etanólico de *R. officinalis* L. en tejido contraído con estimulación eléctrica



**Figura 11.** Efecto máximo inducido por estimulación eléctrica (EE) (14 volts con una frecuencia de 0.3 Hz y pulsaciones de 3 ms) en ausencia y presencia del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.. También se muestra el efecto de la papaverina 30 µM, el cual se utilizó como control positivo, sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico. Cada barra representa la media ± E.E. (n=6). \*p<0.05, ANOVA, Dunnett.

En la figura 11 se muestra en el eje de las X el tratamiento evaluado y en el eje de las Y el porcentaje de contracción inducido por estimulación eléctrica (14 volts, 0.3 Hz, y 3 ms de duración). El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. disminuye de manera dosis dependiente la máxima contracción inducida por el estímulo eléctrico, alcanzando significancia estadística con las dosis de 300 y 600 µg/ml ( $73.28 \pm 6.06$  y  $40.68 \pm 4.11$  % vs 100%, respectivamente, ANOVA, Dunnett, p<0.05). Como en los protocolos anteriores, también se determinó el efecto de la papaverina [30 µM] como control positivo sobre la contracción inducida por estimulación eléctrica, mostrando una disminución de cerca del 90%.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos sobre la contracción de los tejidos estimulados eléctricamente en ausencia y en presencia de diversas

concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. y de papaverina.

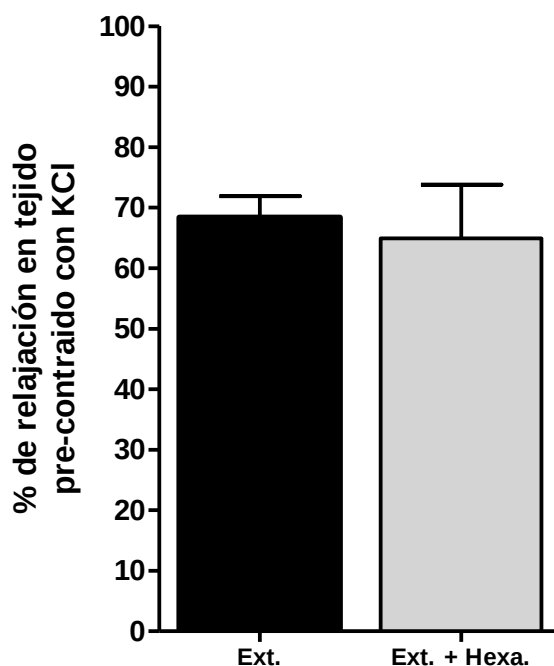
**Tabla 4.** Efecto del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. y de papaverina en el íleon de cobayo pre-contraído con estimulación eléctrica.

| Tratamiento      | Efecto del extracto (% de contracción) |
|------------------|----------------------------------------|
| Control          | 100 %                                  |
| 150 µg/mL        | 94.32 ± 1.94 %                         |
| 300 µg/mL        | 73.28 ± 6.06 % *                       |
| 600 µg/mL        | 40.68 ± 4.11 % *                       |
| Papaverina 30 µM | 9.265 ± 2.19 % *                       |

- ANOVA, Dunnett,  $p < 0.05$ .

#### 6.4 Evaluación del mecanismo de acción del efecto relajante del extracto

##### 6.4.1 Efecto del extracto etanólico de *R. officinalis* L. en presencia de hexametonio.

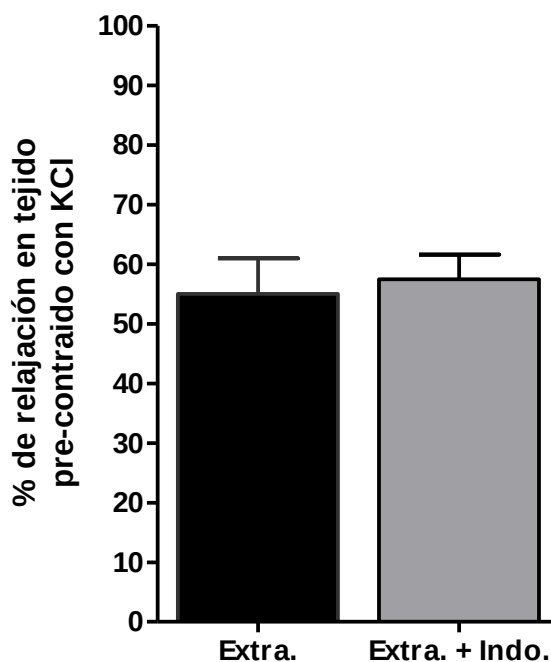


**Figura 12.** Efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [600 µg/mL] (**Ext**) en presencia y ausencia de hexametonio [0.5 mM] (**Hexa.**), sobre íleon aislado de cobayo, pre-contraído con KCl [60mM]. Cada barra representa la media ± E.E. (n=6).

Las figuras 12, 13 y 14 muestran en el eje de las Y el efecto relajante sobre segmentos de íleon de cobayo pre-contráidos con KCl [60mM] y en el eje de las X el tratamiento evaluado.

Como muestra la figura 13, un bloqueador ganglionar como el hexametonio [0.5mM], no modificó la respuesta relajante inducida por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (600 µg/mL) ( $64.94 \pm 8.85$  vs  $68.38 \pm 3.53\%$ , t de student) en el tejido pre-contraido con KCl.

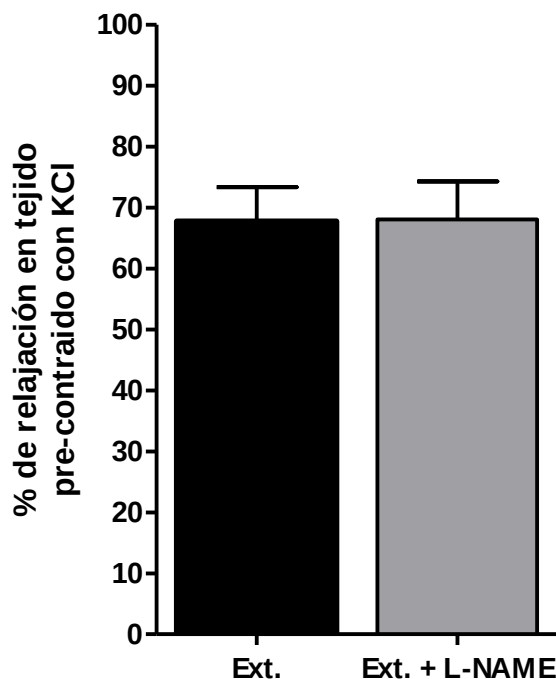
#### 6.4.2 Prueba sobre el efecto relajante del extracto etanólico de *R. officinalis* L. en presencia de indometacina.



**Figura 13.** Efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [600 µg/mL] (**Ext.**) en presencia y ausencia de indometacina [1 µM] (**Indo.**), sobre íleon aislado de cobayo pre-contraido con KCl [60mM]. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. (n=6).

La figura 13 muestra que la indometacina (1 µM), un inhibidor no selectivo de la ciclo-oxigenasa, no modificó la respuesta relajante inducida por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (600 µg/mL) ( $55.03 \pm 5.97$  vs  $57.48 \pm 4.14\%$ , t de student) en el tejido pre-contraido con KCl.

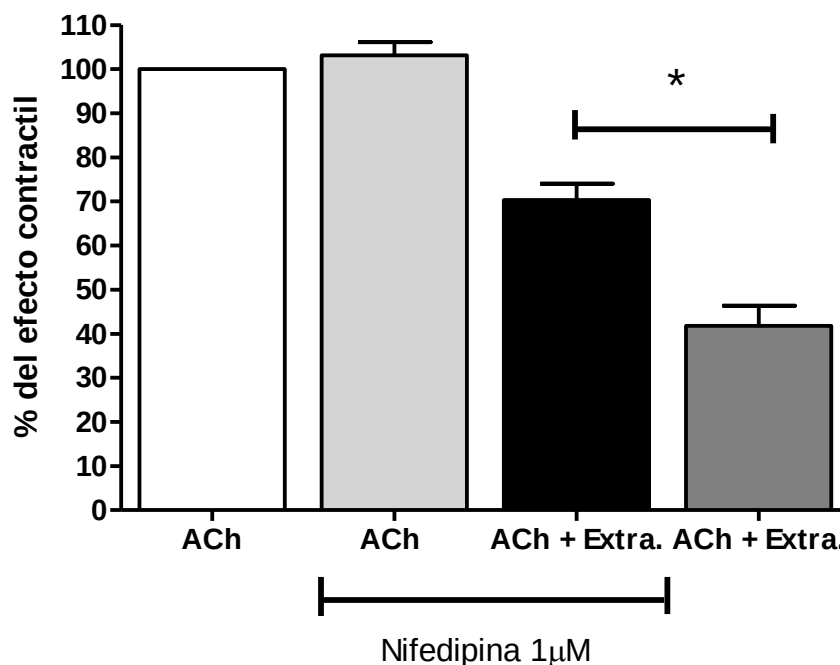
#### 6.4.3 Efecto del extracto etanólico de *R. officinalis* L. en presencia de L-NAME.



**Figura 14.** Efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [600 µg/mL] (**Ext.**) en presencia y ausencia de L-NAME [100 µM]. Cada barra representa la media ± E.E. (n=6).

La figura 14 muestra que el L-NAME [100 µM], un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, no modificó la respuesta relajante inducida por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (600 µg/mL) ( $67.76 \pm 5.61$  vs  $68.08 \pm 6.25\%$ , t de student) en el tejido pre-contraido con KCl.

#### 6.4.4 Efecto relajante del extracto etanólico de *R. officinalis* L. en presencia de nifedipina.



**Figura 15.** Contracción inducida por ACh sola y en presencia de 1µM de nifedipina; 1 µM de nifedipina y 600 µg/mL del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.; y 600 µg/ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. de 6 tejidos. El asterisco señala diferencia significativa ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ )

En la figura 15 se muestra en el eje de las X el tratamiento evaluado y en el eje de las Y el efecto contráctil de ACh [100µM]. Como se puede observar, la nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, no alteró la contracción inducida por ACh, pero sí disminuyó significativamente la inhibición de la contracción inducida por ACh en los tejidos pretratados con el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.).

En este procedimiento se evaluó la disminución del efecto contráctil inducido por ACh [100µM]. Se comparó el efecto del extracto en presencia y ausencia de nifedipina mediante la aplicación de una prueba t de student ( $p < 0.05$ ). Como resultado, se obtuvo una diferencia significativa entre las medias del efecto contráctil. En ausencia de nifedipina se obtuvo un efecto contráctil del  $41.82 \pm$

4.52% (n=6), mientras que en presencia de nifedipina se obtuvo el  $70.29 \pm 3.76\%$  (n=6).

De la misma forma, se analizó la capacidad del tejido para recuperarse después de haber sido sometido a una pre-contracción con ACh [100 $\mu$ M] además de haber administrado el extracto en presencia de nifedipina. Como resultado del análisis, no se presentó diferencia significativa entre el efecto presentado por la primera administración de ACh [100 $\mu$ M] y el efecto presentado por la última administración de ACh [100 $\mu$ M] (100 % vs  $103.20 \pm 2.92\%$   $p > 0.05$ , t de student).

---

---

## 7. DISCUSIÓN

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

### 7.1 Efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en tres protocolos experimentales.

En el primer protocolo se utilizó el modelo de íleon de cobayo pre-contraido con KCl [60mM]. Este protocolo ha sido comúnmente utilizado en diversos estudios en donde se evalúa el efecto relajante o antiespasmódico de diversos compuestos y/o extractos naturales (Madeira y cols, 2002; Caldas-Magalhaes y cols, 2004; Moazedi y cols, 2007). Éste se basa en la despolarización de las fibras musculares que producen el incremento de  $K^+$  y lleva a la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L voltaje dependientes e incremento de la concentración intracelular del mismo. El efecto final se observa como una contracción sostenida, que en el caso del íleon de cobayo, se alcanza en aproximadamente en 2 min y se mantiene por más de 30 min. Bajo este protocolo experimental, la administración del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. produjo un efecto relajante concentración dependiente y reversible (figura 7).

En relación al segundo y tercer protocolos empleados en este estudio, se utilizaron como herramientas farmacológicas la respuesta contráctil producida por la estimulación química con ACh, y la producida por la estimulación eléctrica del íleon aislado de cobayo. En ambos protocolos se observó una inhibición de la contracción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. concentración dependiente, lo cual interpretamos como efecto antiespasmódico (Figuras 9 y 10).



En el protocolo de estimulación química del tejido con ACh, el cual es uno de los mecanismos responsables de los espasmos intestinales más estudiados, se sabe que ésta causa despolarización y contracciones tónicas del músculo liso intestinal a través de la activación de los receptores muscarínicos M<sub>3</sub> presentes en el músculo liso del íleon de cobayo. Esta activación produce un incremento en la frecuencia de descarga del potencial de acción y despolarización de las células del músculo liso, lo cual resulta en un incremento intracelular del calcio, que activa a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina causando, finalmente, la contracción muscular (Rang y Dale, 2007).

Con relación a la contracción inducida por la estimulación eléctrica, se sabe que ésta libera varios neurotransmisores, principalmente ACh (Bornstein y cols, 2004) desde la sinapsis funcionales. Éste neurotransmisor activa subsecuentemente receptores presentes en la superficie de las células del músculo liso. La estimulación de los receptores muscarínicos produce contracción vía activación de proteína G que están acopladas a diversas vías de señalización y proteínas efectoras. Estos eventos, como ya se expuso anteriormente, incrementan el calcio intracelular y producen contracción muscular (Gerthoffer, 2005).

Estos resultados concuerdan con los efectos relajantes producidos por el aceite volátil de la misma planta (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre el músculo liso de la tráquea de conejo y cobayo sobre las contracciones inducidas por ACh y KCl (Aqel, 1991).

Por otro lado, nuestros resultados y los resultados de los estudios que muestran la eficacia del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. sobre la disminución de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético en un modelo de nocicepción en ratón (González-Trujano y cols., 2007; Hosseinzadeh y Nourbakhsh, 2003), el cual ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de moléculas útiles para el alivio del dolor visceral (Cervero y Laird, 1999); respaldan

---

la práctica en la medicina tradicional del uso de la decocción de *Rosmarinus officinalis* L. como agente antiespasmódico.

La papaverina, un agente antiespasmódico bien caracterizado (Matin y cols, 1993; Paula y cols, 2003), se utilizó como control positivo en este estudio, ya que nos permitió evaluar la relajación máxima que puede producirse en el tejido en nuestras condiciones experimentales, además de comparar su efecto con el presentado por el extracto. De esta manera, se determinó que la papaverina produce cerca del 100% de relajación ó, inhibición de la respuesta contráctil ante la estimulación química o eléctrica, dependiendo del protocolo empleado; mientras que, el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. produjo un efecto máximo de alrededor del 60%, independientemente del protocolo empleado (figuras 7, 9 y 11). Esto sugiere que el efecto relajante del extracto estudiado se debe a que llegamos al efecto máximo del extracto y no depende de la capacidad de relajación del tejido.

Con relación al mecanismo propuesto del efecto relajante inducido por la papaverina, se sugiere que éste es mediado, al menos en parte, por la acumulación intracelular de AMPc. Sin embargo, estudios realizados con el músculo liso del intestino delgado de cobayo, han demostrado que el mecanismo de acción presentado por la papaverina en este tejido, es mediante la inhibición de la respiración mitocondrial (Kaneda y cols, 1998).

Es importante mencionar que el máximo efecto relajante producido por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. se obtiene con la concentración de 600 µg/ml, y no con la de 1,200 µg/ml. Incluso, como se observa en la Figura 7, parece que la dosis de 1200 µg/ml produce resultados más dispersos y, aunque no muestra diferencia significativa con el efecto producido con la dosis de 600 µg/ml, ésta presenta una tendencia a disminuir el efecto relajante del extracto. Esto puede ser por el hecho de que a concentraciones muy altas, el extracto ya

produce efectos inespecíficos sobre el tejido utilizado; o bien, el efecto final de la dosis más

alta se debe a la suma del efecto relajante de probables sustancias contenidas en el extracto junto con el efecto contráctil de otras sustancias presentes en el mismo extracto; aunque esto no se ha demostrado.

### **7.2 Estudio del mecanismo de acción responsable del efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.**

Una vez determinado el efecto relajante del extracto de *Rosmarinus Officinalis* L. sobre el íleon aislado de cobayo se realizó un estudio para elucidar su posible mecanismo de acción. Para este ensayo se utilizaron bloqueadores e inhibidores de algunas de las principales vías involucradas en la relajación del músculo liso.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* parece ser independiente de la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas del sistema entérico, ya que el hexametonio, un bloqueador ganglionar, no alteró su efecto relajante (figura 12). El hexametonio ha sido frecuentemente utilizado para inhibir la liberación de neurotransmisores de las neuronas entéricas, entre ellos la ACh, de las terminales colinérgicas, inhibiendo así el efecto contráctil producido por la acción de este neurotransmisor sobre los receptores  $M_3$  del músculo liso (Barlow y cols, 1972; Eglen y cols, 1989). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio del mecanismo de acción del efecto relajante inducido por el metileugenol en preparaciones de íleon de cobayo. El metileugenol es un análogo del eugenol, un importante constituyente químico de los aceites esenciales de muchas plantas aromáticas (Lima y cols, 2000). En ese estudio, la administración del hexametonio no alteró el efecto relajante del metileugenol sugiriendo un efecto directo de éste sobre el músculo liso del íleon de cobayo.

Para evaluar el efecto del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en presencia de hexametonio, se utilizó una concentración de hexametonio [0.5 mM], similar a la utilizada por Schaumann en 1955, para inhibir los movimientos peristálticos de íleon de cobayo y utilizada en el procedimiento descrito por Caldas-Magalhaes en 2004 para evaluar el efecto antiespasmódico del aceite esencial de *Croton nepetaefolius*.

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que las prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, 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 cobayo (Bennett y cols, 1975; Nakahata y cols, 1984). Por lo que, como parte de este estudio, se analizó la posible participación de las prostaglandinas sobre el efecto relajante producido por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en el tejido pre-contraido con KCl. Para esto se utilizó la indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclo-oxigenasa que bloquea la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico.

Por lo tanto, en caso de que el efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. se debiera a un mecanismo de acción relacionado con la disminución de la síntesis prostaglandinas, su efecto se vería disminuido por la administración previa de indometacina. Esto debido a que se administró una concentración de indometacina [1 µM] la cual asegura la disminución de la síntesis prostaglandinas (Fatehi y cols, 2004; Caldas-Magalhaes y cols, 2004) y por consiguiente, se asegura que la pre-contracción inducida con KCl [60mM] no tiene ninguna relación con la estimulación de terminales colinérgicas por presencia de prostaglandinas. Esto significa, que al inhibir previamente a la ciclo-oxigenasa, la sustancia activa del extracto pierde su posible punto de acción y se esperaría que su efecto relajante se viera disminuido o nulificado. Sin embargo, en este estudio, la administración de indometacina no modificó el efecto del extracto, sugiriendo que el efecto antiespasmódico no se debe a la inhibición de la

---

---

producción de prostaglandinas. En contraste con los resultados obtenidos en un estudio en donde se demostró que la indometacina inhibe significativamente el efecto relajante de un extracto de *Ferula asafoetida* (Estiercol del Diablo), sugiriendo, en este caso, que la inhibición de la producción de prostaglandinas participa en la relajación producida por este extracto (Fatehi y cols, 2004).

Otro posible mecanismo que puede estar involucrado en el efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. es la inducción de la síntesis de óxido nítrico. El óxido nítrico (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 sintasa (NOS). Esta enzima presenta 3 isoformas que regulan diferentes funciones fisiológicas. La NOS que se encuentra principalmente en músculo liso, macrófagos e hígado es una isoenzima inducible (Furfin y cols, 1993). Uno de los efectos del NO es la activación de la guanilato ciclasa, enzima encargada de la síntesis del segundo mensajero guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El aumento de GMPc afecta la actividad de diversas fosfodiesterasas, canales iónicos y posiblemente otras proteínas. Como resultado de esto, se inhiben las contracciones inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular del músculo liso (Rang y Dale, 2007). La metil ester L- nitro arginina (L-NAME) es un antagonista que compete estereoselectivamente con el sustrato L-arginina, provocando de esta manera la inhibición de la NOS, y en consecuencia, la inhibición de la síntesis de NO (Das y cols, 1999).

De esta manera, si la inducción de la síntesis de óxido nítrico estuviera involucrada con el efecto relajante del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. se esperaría que el pretratamiento del tejido con L-NAME disminuya el efecto relajante del extracto; sin embargo, los resultados de este estudio (figura 14) muestran que el pretratamiento del íleon con L-NAME [100  $\mu\text{M}$ ] (concentración utilizada en íleon de rata por Gharib-Naseri y cols, 2007 y en el procedimiento descrito por Caldas-Magalhaes para inhibir la NOS en íleon de cobayo), no alteran

el efecto relajante del extracto sugiriendo que el efecto antiespasmódico no se debe a la inhibición de la producción de óxido nítrico.

Por último, se sabe que el incremento intracelular del  $\text{Ca}^{+2}$ , que es responsable de la contracción del músculo liso, puede ser mediado por la apertura de canales de calcio tipo L voltaje-dependientes. De esta manera, la nifedipina, un bloqueador de canales de calcio, es capaz de inhibir el efecto contráctil inducido por altas concentraciones de KCl, pero no es capaz de inhibir el efecto contráctil inducido por ACh. Esto se debe a que el incremento intracelular de calcio inducido por la ACh se produce por la liberación del calcio desde almacenes intracelulares y no por la activación de canales de calcio voltaje dependientes.

Con estos antecedentes y utilizando el protocolo de la contracción inducida por la ACh sobre el íleon de cobayo se analizó la posibilidad de que el efecto antiespasmódico del extracto se debiera al bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes ó a la inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde almacenes intracelulares.

Los resultados muestran que el pretratamiento con nifedipina fue capaz de bloquear parcialmente la disminución del efecto contráctil inducida por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en el tejido pre-contraído con ACh. Tomando en cuenta estos resultados y manejándolos en términos de relajación, el efecto máximo de relajación producido por el extracto es de cerca del 60%, y éste es disminuido por la nifedipina en un 30%. Estos resultados sugieren que parte del efecto sobre la inhibición de la contracción del músculo liso inducida por el extracto, se debe a la inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde almacenes intracelulares.

Entre las posibilidades para explicar el otro 50 % del efecto relajante se encuentra el bloqueo de canales de calcio extra celular. Al tomar en cuenta los

resultados obtenidos en el protocolo de evaluación del efecto relajante del extracto sobre tejido pre-contraido con KCl (Fig. 7), se obtuvo un efecto relajante del 62.97% mientras que en tejido pre-contraido con ACh se obtuvo el 58.18%. Estos no presentan una diferencia significativa, por lo tanto el efecto del extracto es constante tanto en tejido pre-contraido con KCl como tejido pre-contraido con ACh. Al demostrarse la mitad del efecto relajante en presencia de nifedipina y mostrar un efecto completo en una pre-contracción inducida por KCl, podría sugerirse que el efecto del extracto etanólico de *R. officinalis* L. se debe a un efecto compuesto a nivel intracelular, inhibiendo el proceso de contracción relacionado con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y mediante el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esto mismo lleva a suponer la posible existencia de dos o más principios activos dentro de la composición del extracto.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la capacidad del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. para relajar el músculo liso del intestino delgado aislado de cobayo. El extracto fue capaz de relajar en aproximadamente un 60% el tejido sometido a tres tipos de pre-contracción las cuales simulan un espasmo muscular (KCl [60mM], ACh [ $1 \times 10^{-10}$  –  $1 \times 10^{-5}$  M] y estimulación eléctrica). De este hecho, se le atribuye al extracto la propiedad antiespasmódica o espasmolítica.

Además de la demostración de un efecto relajante por parte del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. sobre el intestino delgado, uno de los objetivos de esta investigación es realizar un primer acercamiento al posible mecanismo de acción que sigue el extracto. Todo esto con el fin de aportar más y nueva evidencia que facilite el futuro aislamiento de la o las sustancias activas presentes en el extracto. El extracto no presentó actividad alguna a nivel de la disminución de niveles de prostaglandinas, producción de NO ni sobre la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas del sistema entérico. Sin embargo, los resultados sugieren una actividad importante del extracto sobre canales de calcio extracelular y liberación de calcio intracelular.

Dentro de la clasificación de antiespasmódicos, el extracto, según los resultados presentados, muestra posibles efectos anticolinérgicos y musculotrópicos. Para la definición apropiada será necesario realizar un estudio más completo para determinar el posible mecanismo de acción del efecto producido por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.

Como perspectivas, este estudio propone fundamentar el uso popular del romero para tratar cólicos y espasmos intestinales. También propone a la planta de *Rosmarinus officinalis* L. como posible fuente de principios activos para el diseño de nuevos fármacos antiespasmódicos, con lo cual, deja como meta, el futuro aislamiento y análisis de uno o varios principios activos.



---

**9. REFERENCIAS**

1. Abalo R, Pascual D, Goicoechea C, Martín MI. Blockade by pertussis toxin of the opioid effect on guinea pig ileum. Contractility and electrophysiological neuronal recording. *Neurosci Lett* 2000; 291: 131-134.
2. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jáquez P, Lopez ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, DF. 1994.
3. Aguilar-Mariscal H, Luján – Estrada M, Rodriguez Carranza R. Curva dosis respuesta gradual. En: Farmacología. Programa académico y manual de prácticas de laboratorio. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, 2009: 75 -77.
4. Al-Sereitia MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 1999; 37: 124-131.
5. Aqel MB. Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 1991; 33: 57- 62.
6. Argueta, VA, Cano-Asseleih LM, Rodarte ME. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, vol. 3. Instituto Nacional Indigenista, México, DF. 1994.
7. Barlow RB, Franks M, Pearson, JDM. A comparison of the affinities of antagonists for acetylcholine receptors in the ileum, bronchial muscle and iris of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1972; 46: 300- 308.

8. Bennett A, Kenneth G, Stockely E, Stockely HL. Modulation by prostaglandins of contractions in guinea pig ileum. *Prostaglandins* 1975; 9: 377 - 384.
9. Bornstein JC, Costa M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogas Mot* 2004; 16: 34 -38
10. Caldas-Magalhaes PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso HJ. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fund Clin Pharmacol* 2004; 18: 539-546.
11. Cechinel-Filho V, Zampirolo JA, Stulzer HK, Schlemper V. Antispasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. *Fitoterapia* 2007; 78: 125-128.
12. Cervero F, Laird JMA. Visceral pain. *The Lancet* 1999; 353: 2145 - 2148
13. Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous System. *Gut* 2000;47: iv15–iv19.
14. Das R, Kravtsov GM, Ballard H J, Kwanet C. L-NAME inhibits Mg<sup>2+</sup>-induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium. *Brit J Pharmacol* 1999; 128: 493 – 499
15. Davis WM. Method of treating smooth muscle spasm. 1988. <http://www.freepatentsonline.com/4725593.html>
16. Diccionario Terminológico de ciencias médicas. 12 edición Salvat, 1990 Barcelona.

- 
- 
17. Eglen RM, Michel AD, Cornett CM, Kunysz EA, Whiting RL. The interaction of hexamethonium with muscarinic receptor subtypes in vitro Brit J Pharmacol 1989; 98: 499-506.
  18. Ehlert FJ, Ostrom SR, Sawyer GW. Subtypes of the Muscarinic Receptor in Smooth muscle. Life Sci 1997; 61:1729 – 1740.
  19. Fahim FA, Esmat AY, Fadel HM, Hassan KF. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. Int Food Sci Nutr 50 1999, 413-427.
  20. Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. J Ethnopharmacol 2004; 91: 321 – 324.
  21. Furfine E, Harmon MF, Paith JE, Garvey EP. Selective Inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase by L-p-Nitroarginine. Biochem 1993; 32:8512-8517.
  22. Galambos A. Spasm in the small intestines. Am J Dig Dis 1954; 21: 97-99.
  23. Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. J Auto Nerv Sys 2000; 81: 97-103.
  24. Gerthoffer WT. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscle. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 288: G849 – G853

- 
- 
25. Gharib-Naseri MK, Asadi-Moghaddam M, Bahadoram S. Antispasmodic effect of *Tecoma stans* (L.) Juss leaf extract on rat ileum. DARU 2007; 15: 123.
26. Ghisalberti, E. Bioactive natural products, Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. CRC Press 1993:1.
27. González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Deciga-Campos M, López-Muñoz FJ. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol 2007; 111: 476-482.
28. Goyal R, Hirano I. The Enteric Nervous System. The New England J Med 1996; 334: 1106 -1115.
29. Guyton A C, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. Mc Graw-Hill 10ª edición, España, 2001.
30. Haloui M, Loudec L, Michel JB, Lyoussi B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. J Ethnopharmacol 2000; 71: 465 – 472.
31. Hamburguer M, Hostetman K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 1991; 30: 3864-3874.
32. Heinrich M, Kufer J, Leonti M, Pardo de Santayana M. Ethnobotany and ethnopharmacology. Interdisciplinary links with the historical sciences. J Ethnopharmacol 2006; 107: 157–160.
33. Hoefler C, Fleurentin J, Mortier F, Pelt JM, Guillemain J. Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant

- extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. J Ethnopharmacol 1987; 19: 133-143.
34. Hosseinzadeh H, Nourbakhsh M. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. Phytotherapy Research 2003;17: 938-941.
35. Kaneda T, Shimizu K, Nakajyo S, Urakawa N. The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. Eur J Pharmacol 1998; 355: 149–157
36. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega, Barcelona, 2000.
37. Kunze WAA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal Motility. Ann Rev Physiol 1999; 61: 117-140.
38. Lima CD, Criddle DN, Coelho-de-Souza AN, Monte FJ, Jaffar M, Leal-Cardoso JH. Relaxant and antispasmodic Actions of Methyleugenol on Guinea Pig isolated ileum. Planta Med 2000; 66: 408 – 411.
39. Madeira SVF, Matos FJA, Leal-Cardoso JH, Criddle DN. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. J Ethnopharmacol 2002; 81: 1-4.
40. Martin ML, Diaz MT, Montero MJ, Prieto P, Roman LS. Antispasmodic activity of benzyloquinoline alkaloids analogous to papaverine. Planta Med 1993; 59: 63-67.
41. Martínez SMM, De la Paz JS, Corral AS, Martínez CR. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en Ratas. Rev Cub Plant Med 2004; 9:1-7

- 
- 
42. Maske R, Orlandi B, Dowdle EB. Contractile Responses of Guinea-Pig ileum to high frequency electrical field stimulation. Eur J Pharmacol 1980; 67: 47-52.
43. Mata, R. Curso de Farmacognosia. Facultad de Química, UNAM, 2009.
44. Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. Biochem J 2002; 364: 431-440.
45. Moazedi A A, Mirzaie DN, Seyyednejad SM, Zadkarami MR, Amirzargar A. Spasmolytic Effect of *Petroselinum crispum* (Parsley) on Rat's Ileum at Different Calcium Chloride Concentrations. Pakistan J Biol Sci 2007; 10: 4036 – 4042
46. 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.
47. Navarro A. Anatomía quirúrgica del yeyuno/íleon. Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), 2002, II-240
48. Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of our *Mediterranean lamiaceae*. J Ethnopharmacol 1993; 39: 167-170.
49. Paula AC, Hayashi LS, Freitas JC. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Yahl) Griseb (Convolvulaceae). Braz J Med Biol Res 2003; 36: 105- 112.

- 
- 
50. Peña E, Estudio del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en roedores. Tesis para obtener el título de Q.F.B.. Facultad de Química, México, D.F., 2005
51. Rang, H P, Dale, M. Pharmacology. Churchill Livingstone Elsevier, 6<sup>th</sup> edition, Edinburgo, 2007
52. Sánchez-Mendoza ME, Torres G, Arrieta J, Aguliar A, Castillo–Henkel C, Navarrete A. Mechanism of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. J Ethnopharmacol 2007; 111:142 -147.
53. Sawyer G W, Ehlert FJ. Contractile Roles of the M2 and M3 Muscarinic Receptors in the Guinea Pig Colon. Pharmacol Exp Ther 1998; 284:269–277
54. Schaumann W. The paralyzing action of morphine on the guinea pig ileum. Brit J Pharmacol 1955; 10: 456-461.
55. Shiner M. Anatomy of the Small Intestine. En: Haubrich WS, Schaffner F, Berk EJ. Gastroenterology Bockus. 5<sup>a</sup> edición, vol2. Company. Filadelfia: W.B. Saunders, 1995: 885-898.
56. Thomas AE, Baker SA, Ehlert FJ. Functional Role for the M2 Muscarinic Receptor in Smooth Muscle of Guinea Pig Ileum. Mol Pharmacol 1993; 44: 102-110
57. Venegas VG. Motilidad digestiva: ¿Qué es normal o anormal? Anatomía y fisiología del tubo digestivo. Medwave 2007;7:  
[www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Cursos/gastroynutricioninf07/3/3246](http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Cursos/gastroynutricioninf07/3/3246)

---



---

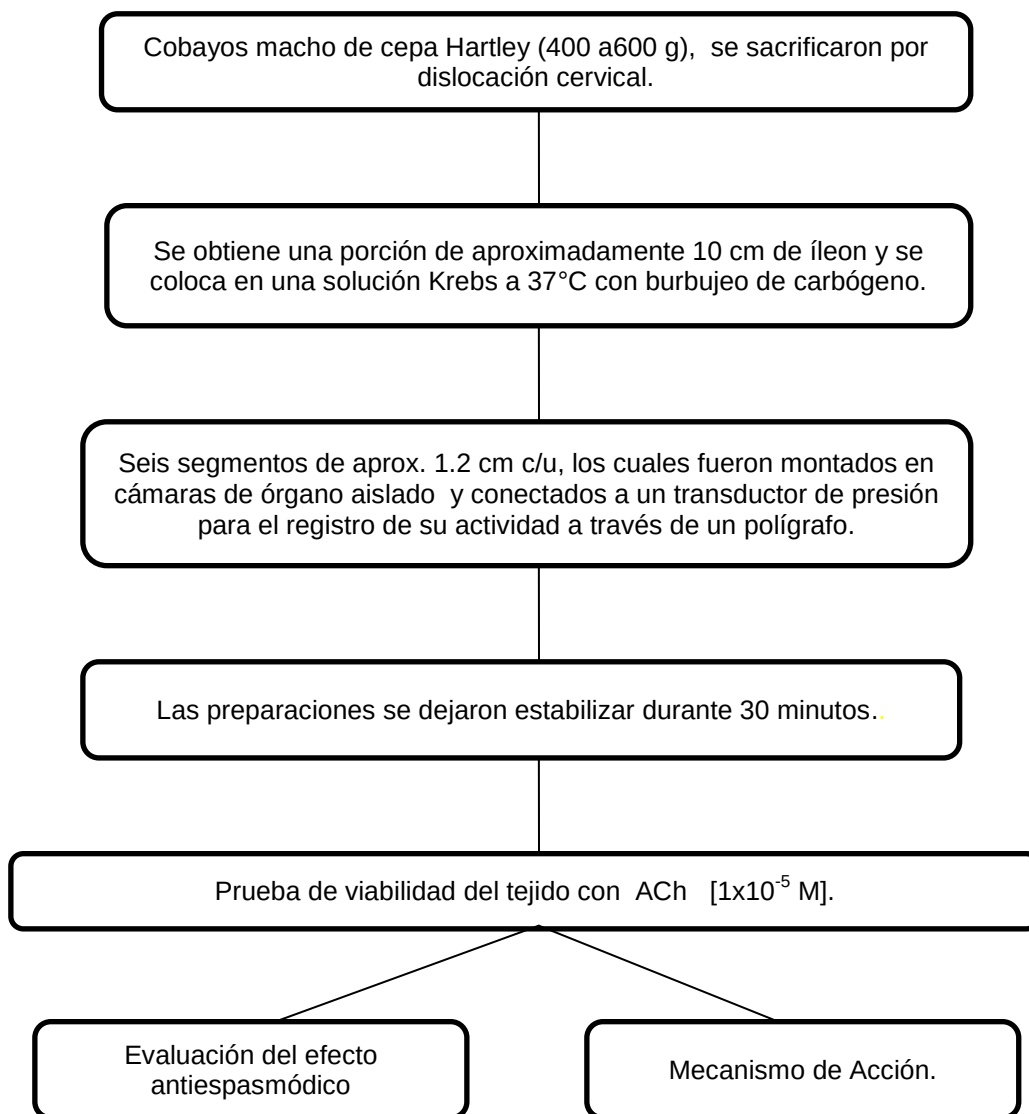
**ANEXO I (Preparación de soluciones)**

| <b>Compuesto o solución</b>                                                                                                                                                                                                | <b>Disolvente</b>                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Solución Krebs</b> (NaCl [118.0 mM], NaHCO <sub>3</sub> [25 mM], KCl [4.7 mM], MgCl <sub>2</sub> [1.2 mM], NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1.2 mM], Dextrosa [11.0 mM], CaCl <sub>2</sub> [2.5 mM] y Colina [0.3 mM]) | Agua destilada                                     |
| <b>Acetilcolina</b>                                                                                                                                                                                                        | Agua destilada                                     |
| <b>KCl</b>                                                                                                                                                                                                                 | Agua destilada                                     |
| <b>Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.</b>                                                                                                                                                              | Solución Krebs                                     |
| <b>Hexametonio</b>                                                                                                                                                                                                         | Agua destilada                                     |
| <b>L-NAME</b>                                                                                                                                                                                                              | Agua destilada                                     |
| <b>Indometacina</b>                                                                                                                                                                                                        | Solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [0.1M] |
| <b>Nifedipina</b>                                                                                                                                                                                                          | DMSO al 2%                                         |



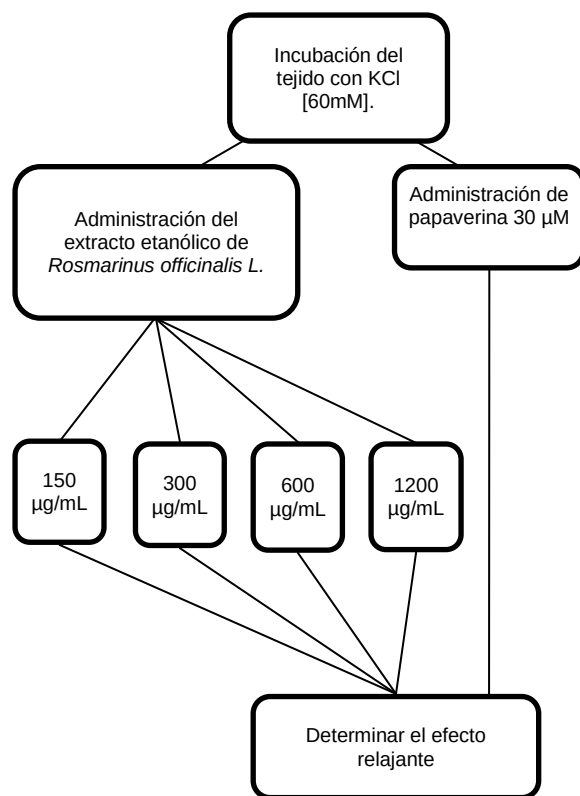
---

---

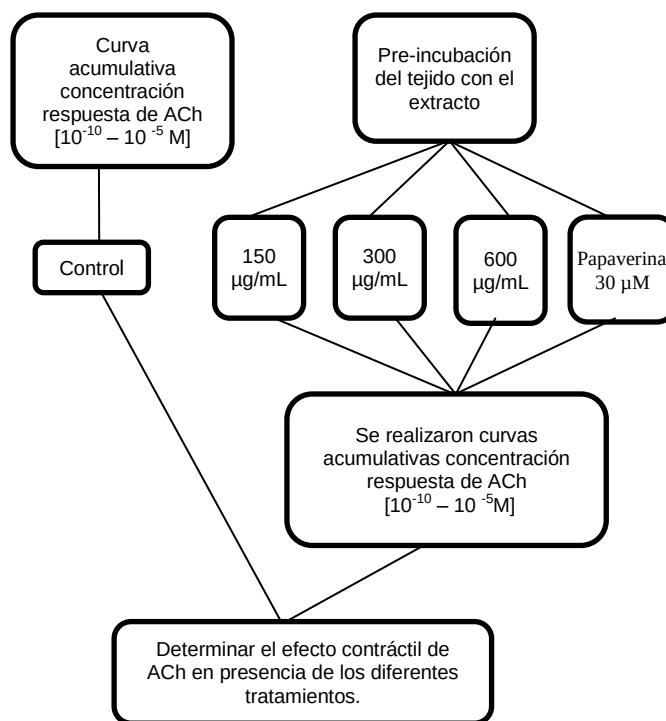
**ANEXO II (Resumen del método)****Preparación del tejido**

## Evaluación del efecto antiespasmódico

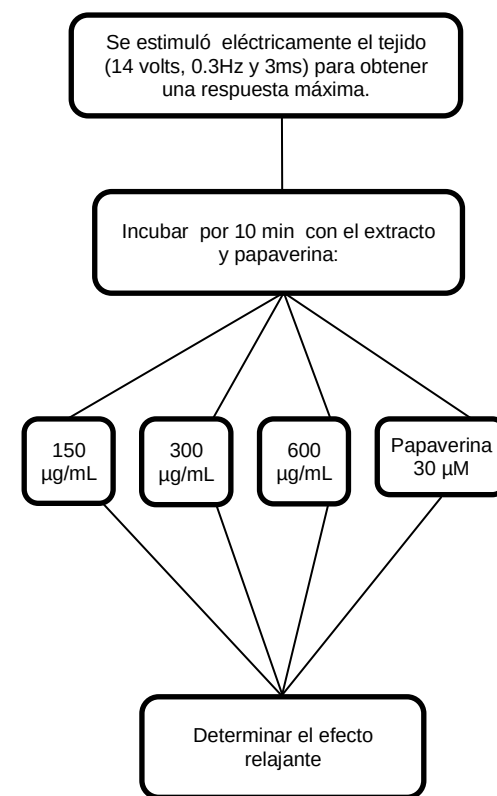
### Efecto de relajación en tejido pre-contraido con KCl



### Efecto de relajación en tejido estimulado químicamente



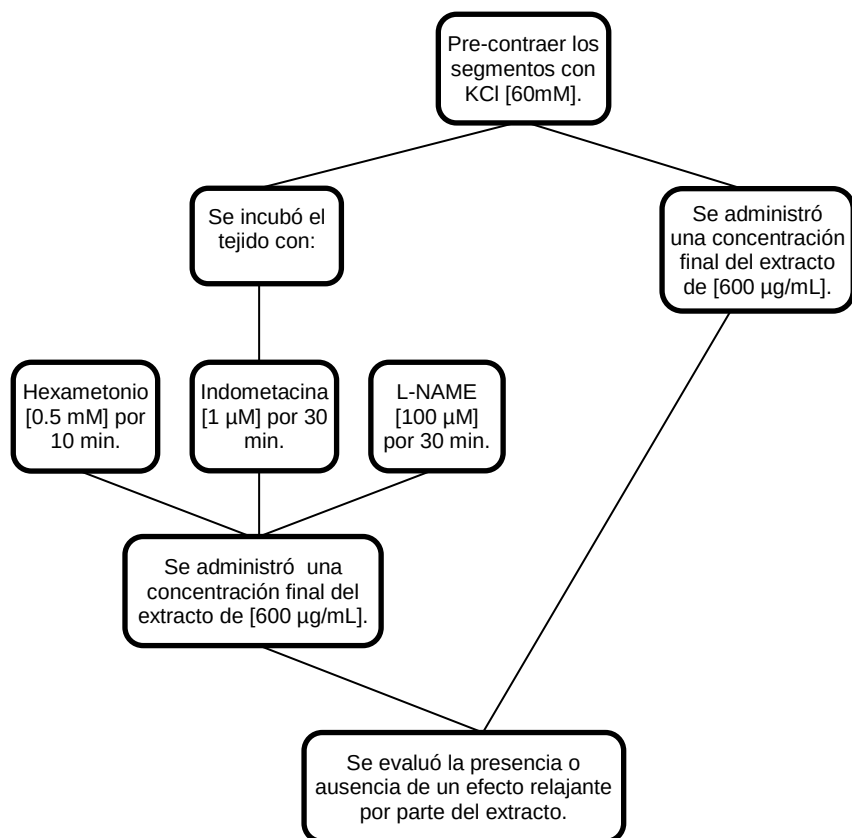
### Efecto de relajación en tejido con estimulación eléctrica



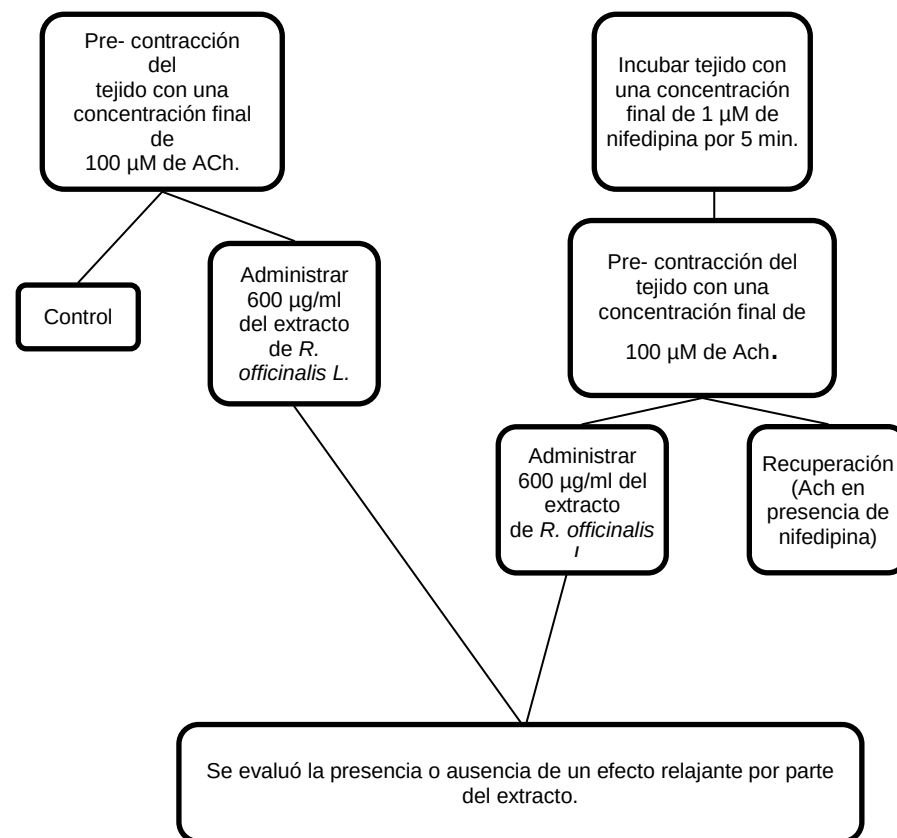
**Notas:** Después de cada tratamiento, el tejido se lava sustituyendo la solución Krebs en la cámara por nueva solución Krebs y dejando 30 min de reposo. Las concentraciones mencionadas en este protocolo se refieren a la concentración final en la cámara.

## Mecanismo de Acción

### Pruebas con hexametonio, indometacina y L-NAME



### Prueba con nifedipina



**Notas:** Después de cada tratamiento, el tejido se lava sustituyendo la solución Krebs en la cámara por nueva solución Krebs y dejando 30 min de reposo. Las concentraciones mencionadas en este protocolo se refieren a la concentración final en la cámara.