



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación del efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes erecta* en el modelo de íleon aislado de cobayo y su posible mecanismo de acción.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

AARÓN CÓRDOVA CARBAJAL



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: M en C. Alejandro Ortiz Osornio

SECRETARIO: Dra. Rosa Ventura Martínez

1er. SUPLENTE: Dra. María Eva González Trujano

2° SUPLENTE: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

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

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

CLAVE DEL PROYECTO: IN201713

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

AGRADEZCO A LA DGAPA-UNAM LA BECA RECIBIDA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. GUADALUPE ESTHER ÁNGELES LÓPEZ

SUSTENTANTE:

AARÓN CÓRDOVA CARBAJAL

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| ABREVIATURAS | vi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 2 |
| 2.1. Medicina Tradicional..... | 2 |
| 2.1.2 Productos Naturales | 3 |
| 2.2 <i>Tagetes erecta</i> Linnaeus. | 4 |
| 2.2.1 Botánica..... | 4 |
| 2.2.2 Distribución | 4 |
| 2.2.3 Usos en la medicina tradicional | 5 |
| 2.2.4. Estudios fitoquímicos | 8 |
| 2.2.5 Efectos farmacológicos de <i>Tagetes erecta</i> | 8 |
| 2.3 Motilidad Intestinal | 10 |
| 2.3.1 Sistema Nervioso Entérico (SNE)..... | 11 |
| 2.3.2. Mecanismo de contracción del Músculo Liso..... | 14 |
| 2.3.3 Espasmos | 14 |
| 2.3.4 Fármacos utilizados para tratar espasmos | 15 |
| 2.4 Modelo <i>in vitro</i> de íleon aislado de cobayo para evaluar el efecto espasmolítico..... | 16 |
| 2.4.1 Contracción Inducida por Cloruro de Potasio | 16 |
| 2.4.2 Contracción por Estímulo Eléctrico..... | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.4.3 Contracción Inducida por Acetilcolina..... | 17 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| 4. HIPÓTESIS | 19 |
| 5. OBJETIVOS | 20 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 21 |
| 6.1 Material vegetal | 21 |
| 6.1.1 Obtención del extracto | 21 |
| 6.2 Animales | 21 |
| 6.3 Modelo <i>in vitro</i> de íleon aislado de cobayo | 22 |
| 6.3.1 Preparación de extracto y soluciones | 22 |
| 6.3.2 Preparación del tejido | 22 |
| 6.3.3 Evaluación del efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el tejido precontraído con KCl..... | 23 |
| 6.3.4 Evaluación del efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el tejido precontraído con estimulación eléctrica (EE) | 24 |
| 6.3.5 Evaluación del efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el tejido estimulado químicamente con ACh | 25 |
| 6.3.6 Determinación del posible mecanismo de acción del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> | 25 |
| 6.4 Determinación de la integridad del músculo liso del íleon de cobayo a través de la contracción producida por cloruro de bario (BaCl ₂)..... | 26 |
| 6.5 Análisis de datos | 26 |
| 7. RESULTADOS..... | 28 |
| 7.1 Efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el tejido precontraído con cloruro de potasio (KCl) | 28 |
| 7.2 Efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el tejido precontraído por estimulación eléctrica (EE)..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 7.3 Efecto del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre la contracción inducida por acetilcolina (ACh)..... | 32 |
| 7.4 Respuesta del tejido con cloruro de bario (BaCl ₂) | 34 |
| 7.5 Determinación del posible mecanismo de acción del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> | 34 |
| 8. DISCUSIÓN | 39 |
| 8.2. Efecto espasmogénico del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre el íleon aislado de cobayo..... | 42 |
| 8.3 Análisis del posible mecanismo de acción del efecto espasmolítico del extracto | 42 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 45 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 46 |
| 11. REFERENCIAS..... | 47 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fotografía de los especímenes de <i>T. erecta</i> recolectados para la elaboración de los extractos. | 5 |
| Figura 2. Planta identificada como <i>Tagetes spp.</i> en el código De la Cruz-Badiano..... | 6 |
| Figura 3. Lámina de la flor de <i>Cempoalsuchitl</i> en el Código Florentino..... | 7 |
| Figura 4. Corte de intestino donde se muestran los plexos, músculo liso circular y longitudinal, la mucosa y la luz. | 12 |
| Figura 5. Esquema de la organización del circuito neuronal en el SNE..... | 13 |
| Figura 6. Diagrama simplificado de la contracción del músculo liso | 15 |
| Figura 7. Mecanismo de acción de la contracción inducida por ACh. | 17 |
| Figura 8. Esquema del tejido colocado en la cámara de órgano aislado. | 23 |
| Figura 9. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la actividad contráctil del íleon aislado de cobayo en presencia de KCl y el efecto del extracto acuoso..... | 29 |
| Figura 10. Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto acuoso en íleon de cobayo precontraído con KCl..... | 29 |
| Figura 11. Registro representativo del efecto contráctil inducido por EE del íleon aislado de cobayo el efecto inducido por la adición del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> | 30 |
| Figura 12. Registro representativo del efecto contráctil inducido por EE del íleon aislado de cobayo el efecto inducido por la adición de papaverina | 31 |
| Figura 13. Curva concentración respuesta del efecto relajante inducido por <i>T. erecta</i> , sobre el tejido precontraído con EE | 31 |
| Figura 14. Registro representativo de la actividad espontánea del tejido y su respuesta a la administración del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> , y la posterior administración de ACh..... | 32 |
| Figura 15. Curva concentración respuesta de la contracción inducida químicamente por ACh en presencia del extracto. También se muestra el efecto de la papaverina..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Contracción inducida por el extracto acuoso de <i>T. erecta</i> sobre la actividad espontánea del tejido. También se muestra el efecto contráctil de la ACh..... | 34 |
| Figura 17. Efecto relajante del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> (562 µg/mL) en íleon de cobayo precontraído con KCl 32 mM en ausencia (control) y en presencia de indometacina, L-NAME y hexametonio | 35 |
| Figura 18. Registro representativo de una curva concentración respuesta acumulativa de Ca ²⁺ en un tejido incubado con el extracto acuoso de <i>T. erecta</i> | 36 |
| Figura 19. Curvas concentración-respuesta de cloruro de calcio en presencia del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> y verapamilo..... | 37 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Metabolitos aislados de <i>T. erecta</i> con sus estructuras y actividades biológicas..... | 9 |
| Tabla 2. Concentración efectiva media (CE ₅₀) de Ca ²⁺ , efecto máximo y área bajo la curva (ABC) obtenidas de las CCR de Ca ²⁺ en íleon de cobayo en presencia del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> | 38 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| μg | Microgramo |
| μM | Micromolar |
| ABC | Área bajo la curva |
| ACh | Acetilcolina |
| AMP | Monofosfato de adenosina |
| AMPc | Monofosfato cíclico de adenosina |
| ANADEVA | Análisis de varianza |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BaCl_2 | Cloruro de bario |
| CaCl_2 | Cloruro de calcio |
| CCR | Curva concentración respuesta |
| CE50 | Concentración efectiva 50 |
| DG | Diacilglicerol |
| DL50 | Dosis letal 50 |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetra acético |
| EE | Estimulación eléctrica |
| EEM | Error estándar medio |
| $E_{\text{máx}}$ | Efecto máximo |
| g | Gramos |
| GMP | Monofosfato de guanosina |
| GMPc | Monofosfato cíclico de guanosina |
| Hz | Hertz |
| IP_3 | Trifosfato de inositol |
| IPAN | Neurona intrínseca primaria aferente |
| KCl | Cloruro de potasio |
| L-NAME | L-N ^G -Nitroarginine methyl ester |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| M | Molar |
| mL | Mililitros |
| MLC | Cadena ligera de miosina |
| MLCK | Cinasa de la cadena ligera de miosina |
| mM | Milimolar |
| N.S. | No significativo |
| NO | Óxido nítrico |
| PGE ₂ | Prostaglandina E2 |
| PIP ₂ | 4,5 difosfato de fosfatidilinositol |
| RS | Retículo sarcoplásmico |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNE | Sistema nervioso entérico |
| SON | Sintasa de óxido nítrico |
| <i>T. erecta</i> | <i>Tagetes erecta</i> |
| TGI | Tracto gastrointestinal |
| V | Volt |
| VIP | Péptido intestinal vasoactivo |

1. INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, la humanidad ha encontrado en los productos naturales el remedio para combatir sus enfermedades y preservar su salud. Históricamente existen varios testimonios, en los cuales se hace referencia al uso de especies vegetales, animales y minerales en diversas civilizaciones. Actualmente, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza con mayor frecuencia las plantas medicinales para el tratamiento de sus padecimientos como medicina tradicional.

México posee una notable riqueza de conocimientos ancestrales en el uso de plantas medicinales. Estas especies vegetales, no solo se han utilizado en las áreas rurales, sino también en las zonas urbanas. Desafortunadamente, muchas de estas plantas mexicanas que se comercializan a lo largo del país, no poseen evidencia científica que demuestre su eficacia y seguridad.

La flor de cempasúchil o flor de muerto (*Tagetes erecta* L.) es una de las especies que tiene antecedentes históricos de uso medicinal desde la época prehispánica. El historiador, Francisco Hernández (1615), describe su uso medicinal para tratar malestares gastrointestinales. Además, en estudios recientes de *Tagetes erecta* se ha encontrado que sus extractos presentan diversas actividades biológicas como antibacterial, nematocida, fungicida, herbicida, insecticida, antimalárico, antioxidante, antimutagénico, antinociceptivo, antiinflamatorio y diurético.

Sin embargo, no existen estudios científicos y controlados para determinar el efecto espasmolítico del extracto acuoso de la flor de cempasúchil para tratar malestares intestinales, por lo que en este trabajo se determinará este efecto en un modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo para dar sustento a su uso en la medicina tradicional; así como su posible mecanismo de acción.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Medicina Tradicional

La medicina tradicional es la suma de los conocimientos, técnicas y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias de las poblaciones nativas de diferentes culturas y son usadas en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de diversas enfermedades. Estas prácticas incluyen el uso de plantas, material herbal o preparaciones herbolarias que pueden contener una o varias especies. En algunas ocasiones estos productos pueden tener ingredientes activos que producen una actividad biológica (WHO, 2013) y es el área de interés de la investigación de los productos naturales.

El uso de las prácticas tradicionales como la herbolaria en la medicina tradicional ha aumentado significativamente en los últimos años, las causas incluyen la baja disponibilidad y alto precio de medicamentos alopáticos en zonas de bajos recursos, que tiene como consecuencia que varias poblaciones utilicen plantas medicinales para el tratamiento primario de sus síntomas (WHO, 2013; Serrano y cols., 2003).

En países desarrollados también ha aumentado su uso, en Europa hay alrededor de 100 millones de usuarios y se estima que son mucho más en el resto de los continentes. En general, estos usuarios utilizan la medicina tradicional con la idea de que por ser un tratamiento de origen *natural* es inocuo, que si bien podría no curarlos, no presentará efectos adversos como los medicamentos alopáticos. Lo anterior no es necesariamente cierto para todas las plantas, y mucho menos cuando se combinan tratamientos herbolarios con alopáticos, ya que la combinación puede presentar efectos adversos que se pueden atribuir a la adulteración del material vegetal, por sustitución de la especie o una parte de la planta por otra. Los efectos adversos se pueden atribuir también a un uso irracional; se pueden recetar o recomendar sin conocer su información en materia seguridad y eficacia. En muchos casos esta información no existe. Por lo anterior, la Organización Mundial de la Salud recomienda usar remedios herbolarios, pero respaldándolos en información confiable, que garantice su seguridad y eficacia (Serrano y cols., 2003).

Los *remedios herbolarios* según la Ley General de Salud de México son “preparados de plantas medicinales, o sus partes individuales o combinadas y sus derivados, presentados en forma farmacéutica, a los cuales se les atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad”. Estos preparados o remedios deben cumplir con ciertos estatutos de higiene y calidad, deben reportar la especie o especies que están comercializando en la forma farmacéutica, así como diversos análisis químicos que permitan identificar su contenido. También están sometidos a estudios de farmacovigilancia; por lo que pueden ser retirados del mercado en caso de que la Secretaría de Salud considere que no son seguros (Ley General de Salud, 2014; NOM-220-SSA1-2012, Reglamento de Insumos para la Salud, 2014).

Por otro lado, los *medicamentos herbolarios*, son “los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional” (Ley General de Salud, 2014). Es importante destacar que no es lo mismo que un remedio herbolario, ya que el remedio no tiene su seguridad y eficacia demostrada.

2.1.2 Productos Naturales

Los productos naturales son compuestos de origen orgánico o inorgánico usados por el ser humano, como las plantas medicinales en la medicina tradicional. La farmacognosia estudia a los productos naturales con propiedades medicinales y gracias a la misma se han descubierto varias moléculas con actividad terapéutica de origen natural. Algunas de estas moléculas llegan a ser medicamentos alopáticos, otras sirven como precursores químicos de fármacos.

Como principal fuente de sustancias activas, la farmacognosia se refiere a las plantas y las selecciona por medio de tres criterios para encontrar las especies con potencial actividad terapéutica. El criterio etnobotánico los clasifica por su uso en medicina tradicional, los otros criterios son el quimiotaxonómico, ecológico y serendipia (Albuquerque y cols., 2006)

2.2 *Tagetes erecta* Linnaeus.

Tagetes erecta (*T. erecta*) es una planta con un importante trasfondo cultural, usada por mayas y mexicas desde tiempos prehispánicos con fines medicinales y rituales con varios nombres, como es *cempoalxochitl*, *cempohualxochitl*, *cempoalsúchil* o *tepczempualxotlil* que significa flor de veinte pétalos en náhuatl (Ortiz de Montellano, 1975) y los maya conocían a esta flor con el nombre de “Ix-ta-púl” (Arvigo y cols., 1993). Actualmente su nombre común es flor de cempasúchil o flor de muertos, y es ampliamente usado en los altares con fines religiosos como ofrenda en las casas de los mexicanos para sus difuntos el Día de Todos los Santos y el Día de Muertos (1 y 2 de Noviembre, respectivamente). El papel de la flor de cempasúchil en esta festividad es puramente religioso, ya que se usa para adornar un camino de pétalos hacia donde está el altar, junto a otras flores adorna los arcos, además de ser parte integral del altar (García, 2006).

2.2.1 Botánica

Tagetes erecta L. es una hierba anual de 60 cm a 1 m de altura, muy aromática al estrujarse, con o sin pelos y ramosa. Sus tallos presentan pequeñas ranuras. Las hojas con hendiduras casi hasta la nervadura central y sus bordes con dientes. Las cabezuelas son muy vistosas debido al color de sus flores amarillo fuerte a anaranjado (Figura 3). Crece en climas cálido, semicálido, seco y templado. Adaptada a distintos hábitats, cultivada en huertos, crece en milpas o zonas urbanas, asociada a distintos tipos de vegetación como bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo y bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino-encino (Argueta y cols., 2009).

2.2.2 Distribución

Se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo alrededor de los trópicos. En México, se encuentra en los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán,

Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998).



Figura 1 Fotografía de los especímenes de *T. erecta* recolectados para la elaboración de los extractos. Cortesía de la Mtra. Gimena Pérez Ortega.

2.2.3 Usos en la medicina tradicional

La cita más antigua de su uso la hacen Martín De la Cruz y Juan Badiano en el Códice De la Cruz-Badiano (Figura 1), el registro herbolario más antiguo de América, publicado en el 1540 (Taylor, 2011). En éste se identificó a la planta *Copaliyac xiuhtontli* como *Tagetes spp*; e indica la preparación de sus hojas, raíz de *tlatlanquaye* y *alectorium*, una piedra formada en el hígado de gallos viejos; molidos y bebidos en el mejor vino para tratar el dolor abdominal.

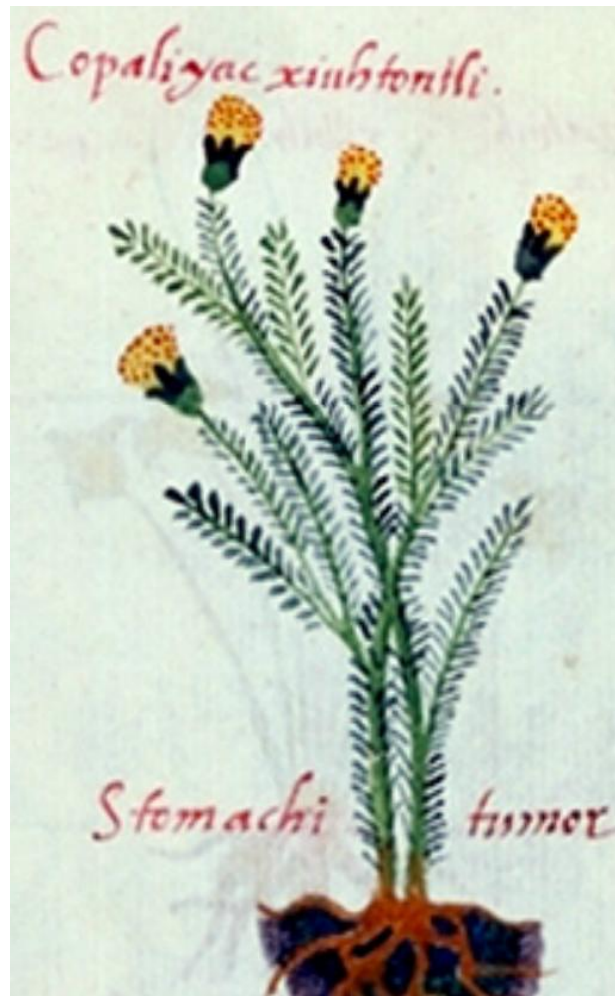


Figura 2 Planta identificada como *Tagetes spp.* en el código De la Cruz-Badiano (<http://www.inah.gob.mx/paseos/biblioteca/>)

Fray Bernardino de Sahagún en el Códice Florentino en el siglo XVII, describe el uso ritual prehispánico del “*cempoalsúchil*” como adorno para las mujeres que representaban a la diosa Vixtociatl, que eran sacrificadas a Tláloc en diversos ritos mexicas (Figura 2). En medicina tradicional se usaba para curar las “punzadas de cabeza”, friéndolas en aceite de almendras y lo aplicaban caliente; para el empacho, lo hervían y tomaban la infusión (<http://www.wdl.org/en/item/10096/view/3/688/>).



Figura 3 Lámina de la flor amarilla de *Cempoalsúchil* en el Códice Florentino. Imagen tomada de la versión digital de World digital Library, volumen 3, lámina 688.

Francisco Hernández de Toledo, en su obra “*Quatro libros de la naturaleza, y virtudes de las plantas, y animales*” hace una descripción detallada del uso medicinal del “Cempoalxóchitl” o clavel de indias con sus siete variedades. Relata que el “zumo” (un tipo de caldo, el equivalente moderno de una infusión) de hojas o las hojas “machacadas” y bebidas con vino, corrigen y tiemplan el estómago; aplicado por fuera “resuelve ventosidades”; tomado tibio provoca vómito. Además, se reporta que tiene propiedades de relajante, diurético, afrodisíaco, alivia la “*cachexia* de origen frío”, vicios o mala disposición del hígado y en general, un admirable remedio para las enfermedades frías o cuando la causa de la enfermedad es por la orina y sudor. La raíz frotada en el vientre quita el dolor de estómago y sirve como diurético. Las flores fritas en aceite y el zumo se usaban como bálsamo para llagas, almorranas y heridas (Ortiz y cols., 2013).

En el Siglo XIX el Doctor José Eleuterio González menciona que su nombre en náhuatl es tepczempualxotlil y su uso en infusión y ungüento es usado como estomáquico, febrífugo y antiespasmódico (Ortiz y cols., 2013).

Sus extractos también son parte de perfumes, suplementos alimenticios y colorantes (Priyanka y cols., 2013).

2.2.4. Estudios fitoquímicos

En un extracto hidroetanólico resuspendido en metanol, y usando el método de Folin-Ciocalteu, se encontró que de los compuestos fenólicos contenidos en *T. erecta*, 97% corresponden a flavonoides y 2% antocianinas. Sus flavonoides incluyen quercetina, quercetagetina, kaempferol, kaempferitrina y sus glucósidos (Navarro-González y cols., 2015). Además posee derivados fenólicos como el ácido siríngico y el ácido gálico, tiofenos, terpenoides, esteroides, carotenoides y un alcaloide, la 6-etoxi-2,4-dimetilquinolina (Dewick, 2002; Xu y cols., 2012) (Tabla 1).

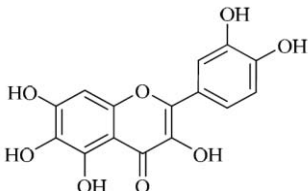
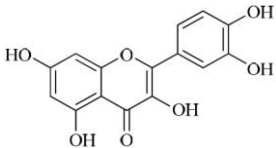
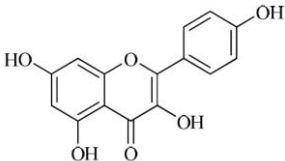
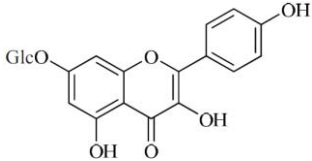
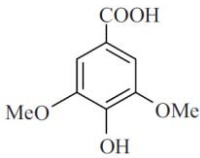
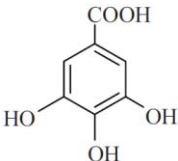
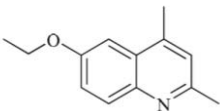
2.2.5 Efectos farmacológicos de *Tagetes erecta*

Se ha demostrado que algunos extractos de varias partes de la planta presentan actividad antibacterial (Gopi y cols., 2012), nematocida (Valencia, 2014), fungicida, herbicida, insecticida, antimalárico, antioxidante, antimutagénico (Li-wei y cols., 2012), antidepresiva (Kulbe y cols., 2013), antiinflamatoria y diurética (Shinde y cols., 2009; Hossain y cols., 2014).

En cuanto a su actividad sobre el tracto gastrointestinal (TGI), en un estudio donde se analizó el efecto espasmolítico de las hojas, tallo, semilla, corteza, flor, fruto y raíz de 141 especies de plantas medicinales de Chiapas; se encontró que 47 especies produjeron una inhibición de la contracción inducida por estimulación eléctrica en el íleon de cobayo. Entre ellas, el extracto metanólico de *T. erecta* (250 µg/mL) produjo una inhibición del 89 %. Sin embargo, en este estudio solo evaluaron el efecto de cada extracto de las plantas en dos

segmentos intestinales (Tortoriello y cols., 1995), ya que su propósito era hacer un cernimiento del efecto espasmolítico de estas plantas.

Tabla 1. Metabolitos aislados de *T. erecta* con sus estructuras y actividades biológicas.

| Compuesto | Estructura | Actividad biológica |
|---|---|--|
| Flavonoides | | |
| Quercetagetina |  | Antibacterial (Baxter y cols., 1998) |
| Quercetina |  | Espasmolítico en íleon aislado de cobayo y bloqueador de canales de calcio (Fanning y cols., 1983) |
| Kaempferol |  | Antioxidante, antiinflamatorio y antibacterial (Baxter y cols., 1998) |
| Kaempferitrina |  | Hipoglucemiante (Cazarolli y cols., 2013) |
| Misceláneos | | |
| Ácido siríngico (derivado fenólico) |  | Antimitógeno, antidiabético (Abaza y cols., 2013) |
| Ácido gálico (derivado fenólico) |  | Anticancerígeno (Khaledi y cols., 2011) |
| 6-ethoxy-2,4-dimethylquinolina (alcaloide) |  | Sin actividad biológica reportada |

En 2014, Victoria Carolina Alonso Valencia en su tesis de licenciatura, demostró la capacidad de una infusión preparada con toda la planta para inhibir la motilidad intestinal en un modelo *in vivo* en ratones CD1, utilizando el modelo de tránsito intestinal con el carbón activado; además, sugiere que la quercetina, pectina o kaempferol pueden ser los responsables de este efecto (Valencia, 2014).

En el modelo de dolor visceral en ratones (writhing) se demostró que los extractos metanólico, clorofórmico y con éter, disminuyeron significativamente las contorsiones inducidas con una administración intraperitoneal de ácido acético, lo cual se interpreta como efecto antinociceptivo (Shinde y cols., 2009; Hossain y cols., 2014).

Los efectos inducidos por la *T. erecta* sobre el TGI podrían deberse a la presencia de quercetina, uno de los metabolitos presentes en la planta, ya que se ha demostrado que ésta produjo un efecto espasmolítico en el íleon de cobayo precontraído con KCl, a través de la inhibición de los canales de calcio voltaje dependientes (Morales y cols., 1994).

Finalmente, se han realizado varios estudios de toxicidad en los que se determinó que la DL50 del extracto de cloroformo fue de 8,964 mg/Kg administrado por vía intraperitoneal en ratas long Evans; y los estudios de toxicidad subaguda muestran que el extracto no produce daños morfológicos en hígado, riñón, corazón y pulmones (Nikkon y cols., 2009). También se determinó que la CL50 es de 316.2 ppm en el modelo de artemia salina (Valencia, 2014).

2.3 Motilidad Intestinal

La motilidad intestinal consiste en la contracción de los músculos circulares y longitudinales del tracto gastrointestinal (TGI), que mezclan y mueven el alimento para digerir y absorber sus nutrientes. Estos movimientos también se conocen como movimientos peristálticos o peristalsis (Kellow, 2012)

El TGI se divide en esófago, estómago, intestino delgado y colon. Está separado por esfínteres y cada parte cumple una función específica, por lo que cada una tiene su patrón de motilidad. Cuando alguno de estos patrones se ve alterado se puede generar un malestar

(Kellow, 2012). A su vez, el intestino delgado se divide en tres segmentos; duodeno, yeyuno e íleon, los tres tienen como función absorber los nutrientes del alimento consumido.

Al igual que todo el sistema digestivo, el intestino delgado se encuentra controlado por el Sistema Nervioso Entérico (SNE), que en algunas ocasiones puede actuar de manera independiente al Sistema Nervioso Central (SNC).

2.3.1 Sistema Nervioso Entérico (SNE)

El SNE es un conjunto de más de 100 millones de neuronas distribuidas en plexos ganglionados entre las capas musculares del TGI (Figura 4). Es el sistema encargado de regular la motilidad, el flujo sanguíneo, las funciones endócrinas, inmunes y secretorias del TGI (Tortora y Derrickson, 2011).

Están reguladas por los plexos más importantes que son el submucoso y el mientérico. El plexo mientérico se encarga principalmente de las funciones motoras y el plexo submucoso regula la secreción y absorción. Ambos involucran la participación de un sistema sensorial, que funciona por medio de mecanorreceptores, quimiorreceptores y osmoreceptores que regulan la contracción muscular (Tortora y Derrickson, 2011).

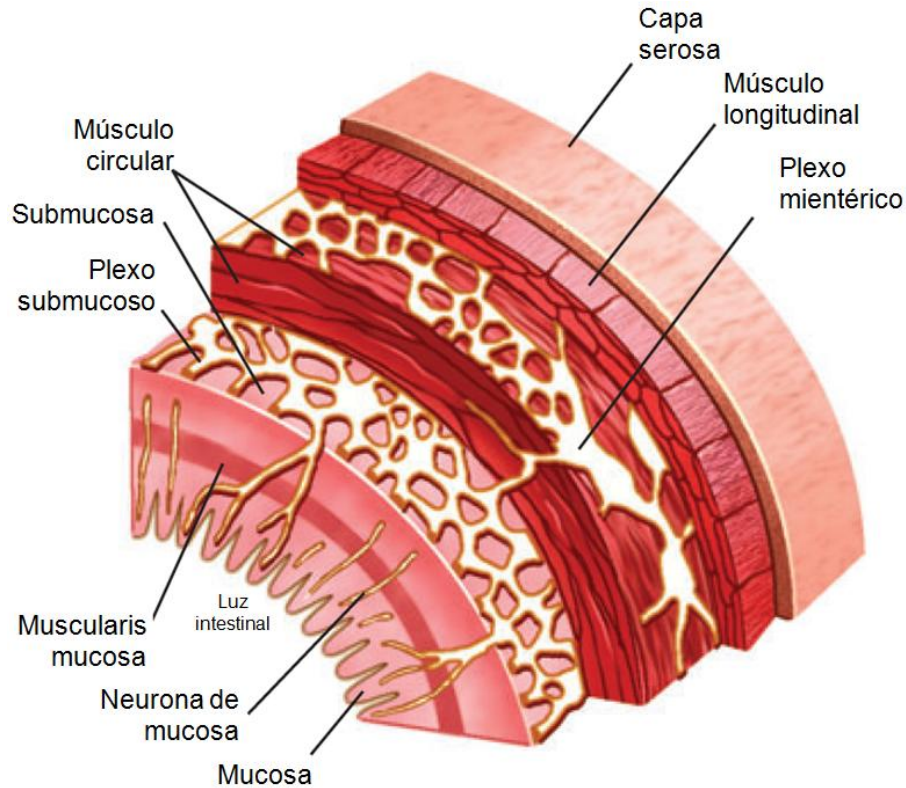


Figura 4. Corte de intestino donde se muestran los plexos nerviosos, músculo liso circular y longitudinal, la mucosa y la luz.

Ambos plexos tienen células de Cajal, que funcionan como marcapasos, conductores de la actividad eléctrica y regulan la neurotransmisión de las neuronas entéricas.

El SNE regula de forma autónoma las funciones descritas; sin embargo, como ya se mencionó, también hay inervación por parte del SNC a través del sistema nervioso simpático y parasimpático por medio de los nervios toracolumbar y vago, respectivamente. El sistema simpático disminuye la motilidad intestinal y aumenta la actividad de los esfínteres mientras que el parasimpático favorece la motilidad intestinal (Dyck, 2001).

Las neuronas del SNE por su funcionalidad se pueden clasificar en motoras, neuronas intrínsecas aferentes primarias (IPAN) e interneuronas. Las IPAN detectan cambios osmóticos, químicos y mecánicos en luz intestinal, además reciben información del sistema nervioso autónomo e inervan a otras neuronas del SNE, también se comunican con el SNC a través del nervio vago, llevan información sensorial como saciedad y dolor (Liddle, 2006). Las terminaciones nerviosas de las IPAN en la mucosa (Figura 5) son particularmente sensibles a

la serotonina, que es liberada en respuesta a un estímulo mecánico y es intermediaria en los reflejos entéricos (Furness, 2006)

Las interneuronas reciben señales de las IPAN y regulan la actividad de las neuronas motoras. Usan acetilcolina (ACh), somatostatina y serotonina como neurotransmisores. La serotonina puede activar motoneuronas excitadoras colinérgicas o relajar activando motoneuronas que contienen óxido nítrico (NO) (Furness, 2006).

Las neuronas motoras excitatorias secretan principalmente ACh junto con otros cotransmisores como prostaglandinas y taquininas, de las cuales el más conocido es la sustancia P. Las inhibitorias usan óxido nítrico, trifosfato de adenosina (ATP), péptido intestinal vasoactivo y péptido pituitario activador de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC).

Por inervación simpática, la noradrenalina es sintetizada y secretada por neuronas posganglionares e inhibe la contracción.

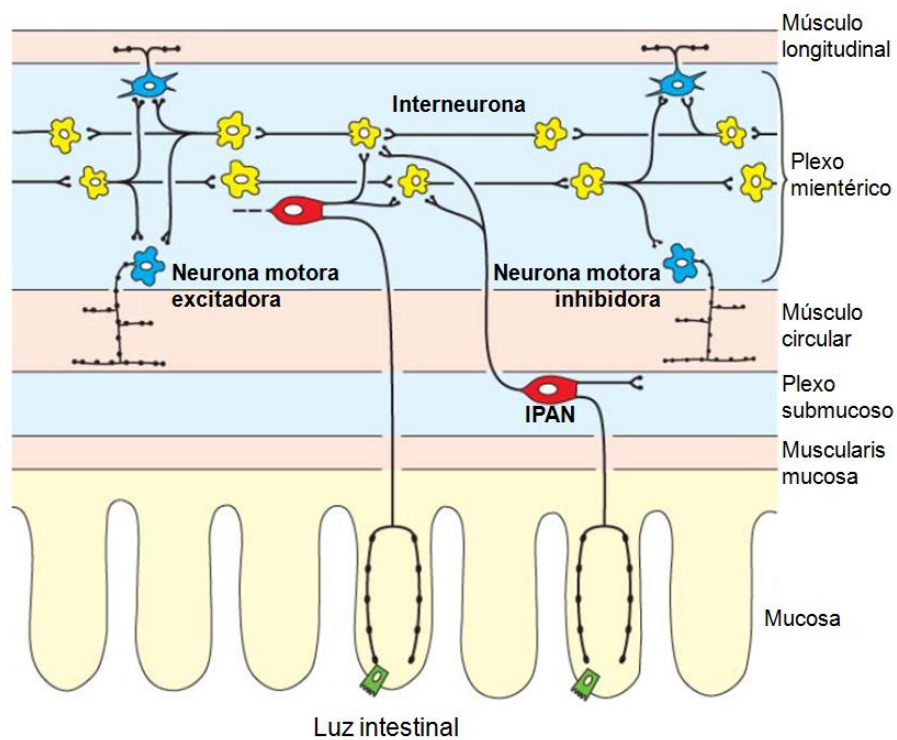


Figura 5. Esquema de la organización del circuito neuronal en el SNE.

2.3.2. Mecanismo de contracción del Músculo Liso

El músculo liso visceral se mueve de forma autónoma debido a la existencia del SNE. Está compuesto por unidades sencillas, donde varias células musculares o miocitos están interconectados por uniones gap que forman una red donde se transmiten y propagan los potenciales de acción de célula a célula; de este modo una neurona inerva directamente a un miocito, aunque los miocitos vecinos también reciben el estímulo (Tortora, 2011).

La contracción depende en gran medida del aumento de Ca^{2+} intracelular, ya sea de origen extracelular que entra por canales; o bien, por su liberación desde el retículo sarcoplásmico (RS), una vesícula en la célula muscular rica en Ca^{2+} . Varios mecanismos que exploraremos más adelante aumentan la concentración del Ca^{2+} , que se une a una proteína llamada calmodulina y forma un complejo que activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), una enzima que cambia la conformación de la cadena ligera de miosina (MLC) por medio de una fosforilación, que permite su unión a ATP y su interacción con actina; todo esto genera una contracción (Webb, 2003).

La MLC es regulada por la fosfatasa de MLC que remueve al fosfato que la mantiene activa. Esta enzima es activada indirectamente en presencia de altas concentraciones de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) y AMPc por diversos mecanismos (Figura 6) (Sanders y cols., 2012).

2.3.3 Espasmos

Cuando el músculo liso se contrae alterando el patrón específico del área afectada producto de una dismotilidad se genera un espasmo. Puede tener su origen en un daño neural de SNE, un daño al músculo liso o como respuesta a un estímulo como crecimiento bacteriano, desequilibrio osmótico, inflamación y absorción deficiente de sales biliares. Además de otros desórdenes del SNC y periférico que causan dismotilidad en el TGI, como el mal de Parkinson, epilepsia autonómica, migraña, tumores en el tallo cerebral y neuropatía diabética entre otros (Dyck, 2001).

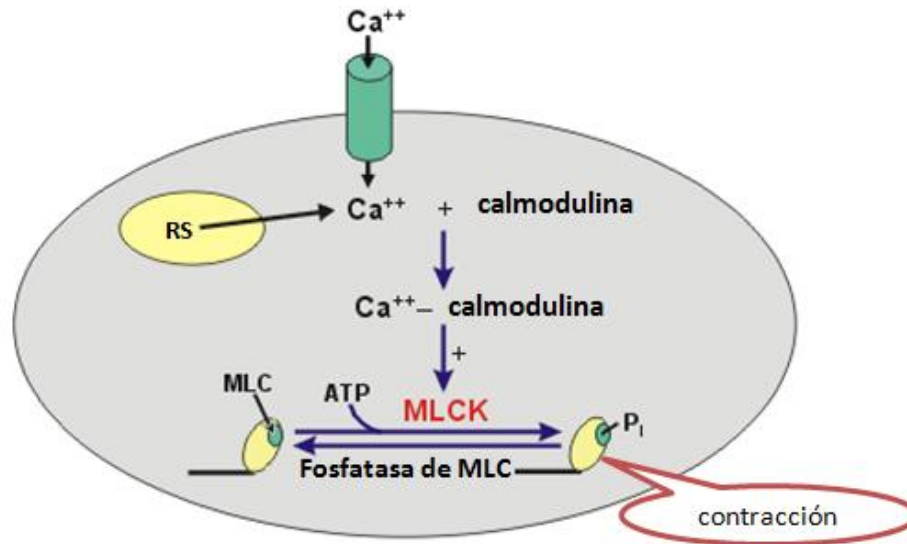


Figura 6. Diagrama simplificado de la contracción del músculo liso

2.3.4 Fármacos utilizados para tratar espasmos

Para el tratamiento farmacológico de los espasmos existen los espasmolíticos o antiespasmódicos, y se clasifican dos grandes grupos por su mecanismo de acción. El primero se denomina neurotrópico, o parasimpaticolítico y son antagonistas de la ACh, los mejores ejemplos son atropina, pirenzepina, dicicloverina y butilioscina, además del bromuro de oxitropio e ipratropio en vías respiratorias.

El segundo grupo son los musculotrópicos y tienen mecanismos de acción diversos, uno de ellos es la papaverina y la moxaverina que actúan inhibiendo a la fosfodiesterasa, que hidroliza al AMPc. Al aumentar la concentración de AMPc se activa la proteína cinasa A, que activa telocinina, incrementando la actividad de la fosfatasa de la MLC, que impide la unión de la MLC a la actina al remover su grupo fosfato (Sanders y cols., 2012; Shimizu y cols., 2000) impidiendo la contracción muscular.

El fármaco antiespasmódico por excelencia utilizado en la clínica es la butilioscina, sola o en combinación con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (IMSS, 2015).

2.4 Modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo para evaluar el efecto espasmolítico

El íleon es la sección más vascularizada e inervada por neuronas del plexo mientérico del intestino delgado (Navarro, 2002). El íleon de cobayo, en 10 mm tiene 6500 IPAN, 4200 interneuronas, 4000 neuronas motoras inhibitorias y 3000 excitadoras haciéndolo particularmente sensible a estímulos; además permanece viable en la cámara de órgano aislado hasta por 12 horas, a diferencia de otras especies (Ventura-Martínez y cols., 2011). Por lo cual, es un tejido ideal para probar y analizar el efecto de potenciales espasmolíticos.

2.4.1 Contracción Inducida por Cloruro de Potasio

Uno de los es estímulos para inducir la contracción en el modelo de íleon de cobayo es la alteración de la concentración electrolítica. Al agregar cloruro de potasio (KCl) 32 mM a la cámara de órgano aislado se logra una solución hiperosmótica rica en K^+ , que provoca el encogimiento osmótico de la célula causando un aumento en la permeabilidad del Ca^{2+} permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular seguido de una despolarización y contracción (Goldenberg y Muerer, 1983). En la curva concentración respuesta de Ca^{2+} en presencia del extracto se trabaja con una solución rica en K^+ , que mantiene una alta permeabilidad a Ca^{2+} .

2.4.2 Contracción por Estímulo Eléctrico

El segundo protocolo para la inducción de la contracción del íleon de cobayo es por la estimulación eléctrica. Se sabe que además de la clasificación funcional, existe una electrofisiológica en el SNE que divide a las neuronas en clase *AH*, neuronas sensoras de despolarización lenta y las de clase *S*, interneuronas y neuronas motoras de rápida despolarización. Estas últimas al recibir el estímulo eléctrico se despolarizan por apertura de canales iónicos (Rattay, 1999) y liberan neurotransmisores sobre la placa muscular, principalmente ACh, pero también purinas, serotonina y péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Galligan y cols., 2000) pero a frecuencias de estimulación menores a 5 Hz se favorece la liberación de ACh (Agoston y cols., 1988).

2.4.3 Contracción Inducida por Acetilcolina

Otro protocolo para la inducción de las contracciones es por estimulación química con ACh. La ACh es el principal neurotransmisor excitatorio en el TGI. Es secretada por neuronas del SNE y actúa uniéndose a receptores muscarínicos M_2 y M_3 localizados en la membrana celular de los miocitos (Florez, 2014).

El receptor M_2 es el más expresado en el íleon de cobayo, está unido a proteína G_i e inhibe la adenilato ciclasa, que sintetiza AMPc. La disminución en la concentración de AMPc inactiva a la fosfatasa de MLC, inhibiendo el mecanismo de relajación y favoreciendo los mecanismos contráctiles del tejido. El efecto de ACh sobre este receptor sólo se puede observar en músculo relajado por altas concentraciones de AMPc intracelular (Ehlert y Thomas, 1995).

Por otro lado el receptor M_3 está unido a proteína G_q , que activa a fosfolipasa $C\beta$ que cataliza la reacción de 4,5 difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) a trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DG), el IP_3 se une a su receptor en retículo sarcoplásmico liberando Ca^{2+} desde almacenes intracelulares, produciendo así una contracción intestinal (Figura 7) (Sanders y cols., 2012).

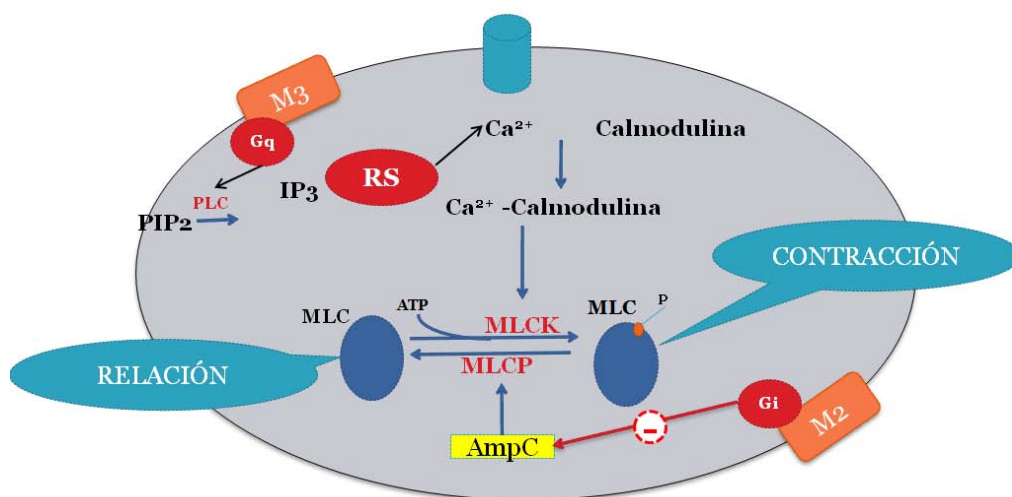


Figura 7. Mecanismo de acción de la contracción inducida por ACh.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tagetes erecta o flor de cempasúchitl es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana desde hace siglos para aliviar malestares gastrointestinales, entre otros usos. Algunos de estos malestares pueden ser causados por espasmos del músculo liso intestinal y los espasmolíticos pueden aliviar el malestar inhibiéndolos.

Tortoriello y cols. en 1995 reportaron que el extracto metanólico de las hojas de la *T. erecta* indujeron un 89% de relajación en el modelo de íleon de cobayo precontraído eléctricamente. Sin embargo, como ya se mencionó en los antecedentes, en este estudio se realizó un cernimiento farmacológico de 141 especies usadas en la medicina tradicional chiapaneca para el alivio de malestares gastrointestinales; por lo que, solo evaluaron este efecto con dos tejidos para cada extracto de cada planta. También, en una tesis de licenciatura realizada en la Facultad de Química de la UNAM, reportaron que la infusión de la planta completa produjo un efecto anti diarreico en el modelo de motilidad intestinal con carbón activado en ratones (Valencia, 2014). Finalmente, se ha demostrado el efecto analgésico de los extractos metanólico, clorofórmico y con éter, en un modelo de dolor visceral en ratones (Shinde y cols., 2009; Hossain y cols., 2014). Sin embargo, en estos estudios no muestran el efecto espasmolítico del extracto acuoso de la flor, que es como se usa en la medicina tradicional para el alivio de los malestares gastrointestinales, así como tampoco estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción responsable de este efecto espasmolítico.

Por otro lado, de acuerdo a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud con relación a que el uso de las plantas medicinales en la medicina tradicional se debe contar con evidencia científica que la respalde; por lo que en este estudio se pretende demostrar el efecto espasmolítico del extracto acuoso de *T. erecta* L. en el íleon de cobayo con varios espasmógenos, además de determinar su posible mecanismo de acción.

4. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional mexicana *Tagetes erecta* es utilizada para aliviar los espasmos intestinales y se ha demostrado el efecto espasmolítico del extracto metanólico de sus hojas; así como su efecto antidiarrérico y analgésico en ratones; entonces el extracto acuoso de las inflorescencias de esta especie producirá un efecto espasmolítico en el íleon aislado de cobayo precontraído con diferentes espasmógenos. Además, por su contenido en quercetina, el mecanismo de acción responsable del efecto espasmolítico de este extracto involucrará una disminución intracelular de calcio por inhibición de canales de calcio voltaje dependientes en el tejido.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el extracto acuoso de las inflorescencias de *Tagetes erecta*, en el modelo de íleon aislado de cobayo, produce un efecto espasmolítico y determinar su posible mecanismo de acción.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes erecta* en el modelo de íleon aislado de cobayo precontraído con cloruro de potasio.
- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes erecta* en el modelo de íleon aislado de cobayo precontraído por estímulo eléctrico.
- Evaluar el efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes erecta* en el modelo de íleon aislado de cobayo en presencia de ACh.
- Analizar el posible mecanismo de acción del efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes erecta* utilizando diversos bloqueadores y antagonistas específicos.

6. METODOLOGÍA

Este estudio forma parte de un proyecto aprobado por las Comisiones de investigación y ética de la Facultad de Medicina de la UNAM con número de proyecto: 022-2012.

6.1 Material vegetal

Las flores silvestres de *Tagetes erecta* fueron recolectadas por la Mtra. Gimena Pérez Ortega en el municipio de Huertas de San Pedro, Morelos con coordenadas 19° 00" N; 99° 15" W. Una muestra del espécimen fue conservado en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social con voucher IMSSM No-15987 donde fue identificada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras.

6.1.1 Obtención del extracto

El extracto fue proporcionado por la Dra. María Eva González Trujano del Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría, donde se obtuvo bajo el siguiente procedimiento:

Se pesaron 39 g de flores (inflorescencias) secas, se agregaron a un litro de agua en ebullición y se retiró de la fuente de calor. Las flores se dejaron 15 minutos en contacto con el agua caliente y el producto se liofilizó en un equipo Labconco. Se obtuvieron 5.61 g totales del extracto acuoso, lo cual proporciona un rendimiento del 14.3%.

El extracto es un polvo seco color café, con un olor dulce muy intenso. Al agregar agua se obtiene un líquido color naranja.

6.2 Animales

Para la evaluación del efecto espasmolítico se utilizaron cobayos macho híbridos de 400 a 600 g de peso corporal obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de una UNAM. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un ciclo de 12 horas de

luz/oscuridad. Veinticuatro horas antes del experimento, se les retiró el alimento permitiéndoles el libre acceso al agua.

6.3 Modelo *in vitro* de íleon aislado de cobayo

6.3.1 Preparación de extracto y soluciones

El extracto acuoso, se disolvió en agua destilada. Las concentraciones utilizadas fueron: (100, 316, 562 o 1000 µg/mL). Como control positivo se utilizó a la papaverina 30 mM y como vehículo agua destilada.

El hexametonio, un bloqueador ganglionar; y el L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester), un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NO) se disolvieron en agua destilada; mientras que la indometacina, un inhibidor de las ciclooxygenasas, en carbonato de calcio (0.1 M).

6.3.2 Preparación del tejido

Se sacrificó al cobayo por dislocación cervical de acuerdo con la normatividad vigente (NOM-062-ZOO-1999). Se localizó la fosa ileocecal, a partir de la cual se descartaron los últimos 10 cm de íleon y se extraen los siguientes 12 cm en dirección proximal, que inmediatamente se depositan en un medio de solución de Krebs-bicarbonato (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM y colina 0.3 mM) a 37°C y burbujeo constante de una mezcla O₂ 95%/CO₂ 5% (Ventura-Martínez y cols., 2011).

Se retiró el tejido mesentérico del segmento intestinal y se lavó con Krebs-bicarbonato para expulsar el bolo alimenticio presente. Se cortaron anillos de aproximadamente 1 a 2 cm, los cuales se suspendieron en una cámara de órgano aislado con medio Krebs-Bicarbonato y se sujetaron a un transductor de presión a través de un hilo de algodón a su extremo proximal; y a la base de la cámara por medio de un hilo de algodón sujeto a su extremo distal (Figura 8A). El transductor de presión se encarga de enviar la respuesta mecánica a un polígrafo GRASS (Figura 8B).

Los anillos se tensaron a 1 g y se estabilizaron durante media hora, después de la cual se verificó la viabilidad del tejido adicionándole ACh 10^{-5} M. Se descartaron los tejidos que presentaron una respuesta menor a 3 g. Los tejidos viables se lavaron con 40 mL de Krebs y permanecieron sin estímulo hasta estabilizar su actividad espontánea.

Por la luz intestinal se hace pasar un electrodo y otro por fuera (figura 8), éstos se usarán más adelante para aplicar el estímulo eléctrico.

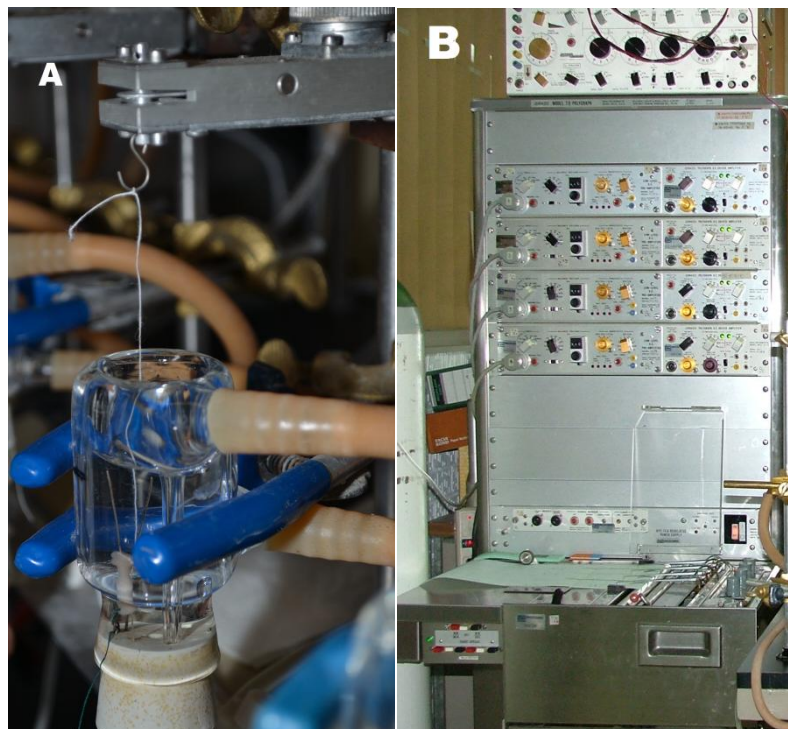


Figura 8 Fotografía del tejido colocado en la cámara de órgano aislado (A) y el sistema de registro (polígrafo) (B).

6.3.3 Evaluación del efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el tejido precontraído con KCl

En un grupo de experimentos y tras la preparación del tejido, descrita anteriormente, cada segmento fue contraído con 0.2 mL de KCl [32 mM]. Se esperó que el tejido alcanzara una meseta máxima estable que perdurara al menos 5 min. Una vez alcanzada la meseta se adicionaron los tratamientos de extracto acuoso de *T. erecta* (100, 316, 562 o 1000 $\mu\text{g/mL}$),

papaverina (30 mM) o agua destilada como vehículo para la determinación de su efecto sobre el tejido precontraído. Cada tratamiento se adicionó por separado y después de cada uno de ellos, se lavó el tejido con de solución Krebs-Bicarbonato y se le permitió reposar al menos 20 minutos, hasta que el tejido recuperó su actividad basal (Fatehi y cols., 2011).

El porcentaje de relajación producido por cada concentración del extracto se calculó con la diferencia de la respuesta del tejido estimulado con KCl 32 mM en presencia del tratamiento (*g final*) a la respuesta en gramos tejido estimulado con KCl 32 mM sin tratamiento (*g inicial*), todo dividido entre la respuesta inicial y multiplicado por 100.

$$\% \text{ de relajación} = \frac{g \text{ inicial} - g \text{ final}}{g \text{ inicial}} * 100\%$$

6.3.4 Evaluación del efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el tejido precontraído con estimulación eléctrica (EE)

En otro grupo de experimentos, a los tejidos se les aplicó un estímulo eléctrico (EE) de 14 V por 3 ms a 0.3 Hz para inducir contracciones rítmicas, y se le permitió al tejido estabilizar su respuesta por al menos durante 5 minutos. Cuando los tejidos alcanzaron contracciones rítmicas y estables, se adicionaron los tratamientos, de extracto acuoso de *T. erecta* (100, 316, 562 o 1000 µg/mL), papaverina (30 mM) o agua destilada como vehículo.

Después de cada tratamiento se detuvo el EE y se lavó el tejido con 60 mL de Krebs-Bicarbonato y se le permitió reposar al menos 20 minutos con reperfusión de la misma solución, hasta que el tejido recuperó su actividad basal (Teague y cols., 2002)

En este caso el porcentaje de relajación se calculó restando la respuesta del tejido estimulado en presencia del tratamiento (*g final*) a la respuesta del tejido estimulado sin tratamiento (*g inicial*) multiplicado por 100.

$$\% \text{ de relajación} = \frac{g \text{ inicial} - g \text{ final}}{g \text{ inicial}} * 100\%$$

6.3.5 Evaluación del efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el tejido estimulado químicamente con ACh

Finalmente, una vez verificada la viabilidad, se adicionaron los tratamientos a evaluar (extracto acuoso 100, 316 y 562 µg/mL o papaverina) e inmediatamente después, la ACh 10^{-5} M. El tejido se lavó después de registrar la respuesta, con 60 mL de Krebs-bicarbonato. Se permitió al tejido descansar al menos 10 minutos antes de adicionar el siguiente tratamiento (Teague y cols., 2002).

Los resultados se expresaron como el porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por ACh 10^{-5} M. Se comparó el efecto de los tejidos incubados con cada tratamiento contra un grupo control.

6.3.6 Determinación del posible mecanismo de acción del extracto acuoso de *T. erecta*

Para tratar de averiguar el mecanismo de acción involucrado en el efecto espasmolítico del extracto se utilizó el tejido precontraído con KCl.

En un grupo de tejidos se incubó con hexametonio (0.5 mM) durante 10 min, un bloqueador ganglionar; indometacina (1 µM) durante 30 minutos, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa; o L-NAME (100µM) durante 30 minutos, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (ON) (Magalhaes y cols., 2004).

Una vez incubado el inhibidor, se adicionó el extracto a 562 µg/mL y se permitió al tejido alcanzar su máximo efecto relajante en aproximadamente 10 minutos, al final se lavó con 60 mL de Krebs-Bicarbonato a 37°C y se le permitió reposar al menos 20 minutos.

Por otro lado, para tratar de determinar si el efecto espasmolítico inducido por el extracto acuoso de *T. erecta* era por una posible interacción con canales de calcio dependientes de voltaje, se realizó el siguiente protocolo en otro grupo de tejidos: se cambió el medio por una solución Krebs-Bicarbonato sin calcio con la siguiente composición: NaCl 78.5 mM, KCl 46.7 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM, colina 0.3 mM y EDTA 0.1 mM; a 37°C y burbujeo constante de una mezcla O₂ 95%/CO₂ 5%.

Se permitió que el tejido se estabilizara en su nuevo medio por 30 minutos y posteriormente se adicionaron los tratamientos; extracto a 316, 562 µg/mL o verapamil 0.1 µM como control positivo y se incubaron por 5 minutos. Después, para construir una curva concentración respuesta (CCR) acumulativa de calcio se utilizaron concentraciones de 0.05 mM a 25 mM de cloruro de calcio (CaCl₂), se lavó el tejido con 60 mL del medio modificado y se le permitió reposar 20 minutos antes de adicionar un nuevo tratamiento (Mehmood y cols., 2010).

El porcentaje de contracción inducido por calcio, se calculó con el cociente de la respuesta en gramos a cada concentración de calcio (*g final*) contra la respuesta máxima (*g max*) de la curva control del tejido correspondiente multiplicado por 100.

$$\% \text{ de contracción} = \frac{g \text{ final}}{g \text{ max}} * 100\%$$

6.4 Determinación de la integridad del músculo liso del íleon de cobayo a través de la contracción producida por cloruro de bario (BaCl₂)

Al finalizar los experimentos, se sometieron los tejidos a una concentración 0.01 M de BaCl₂ para verificar que el tejido haya permanecido viable y que cualquiera de los tratamientos, pero sobre todo el extracto evaluado no haya inducido daño muscular al tejido.

6.5 Análisis de datos

Los resultados de los tejidos estimulados con KCl 32 mM y estímulo eléctrico se presentan como % de relajación, para ACh 10⁻⁵ M se presenta como % de inhibición del efecto por ACh y las curvas concentración-respuesta (CCR) a calcio se presentan como % de contracción. Todos los resultados reportados se presentan como la media (n de 5 a 6) con su respectivo error estándar (EEM).

En los ensayos de tejidos estimulados con KCl 32 mM, estímulo eléctrico y ACh 10⁻⁵ M, se compararon los resultados del extracto acuoso de *T. erecta* contra sus controles mediante

un análisis de varianza (ANADEVA) seguido de una prueba post hoc *Dunnet*, considerando una $*p < 0.05$, para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control.

Para determinar el mecanismo de acción se comparó la respuesta de los tejidos precontraídos con KCl 32 mM y tratados con el extracto acuoso de *T. erecta* 562 µg/mL e incubados con antagonistas contra un control en ausencia de antagonistas, pero tratado con la misma concentración del extracto mediante una ANADEVA seguida de una prueba post hoc *Dunnet*, $*p < 0.05$.

En el caso de las CCR de Ca^{2+} , se calcularon la concentración efectiva (CE_{50}), efecto máximo (E_{max}) y área bajo la curva (ABC) para cada tratamiento. Cada uno de los 3 parámetros obtenidos para cada tratamiento se comparó contra los parámetros obtenidos para el control mediante una ANADEVA seguida de una prueba *Dunnet*. El análisis de datos y su análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el tejido precontraído con cloruro de potasio (KCl)

En el protocolo experimental donde se utilizó al tejido precontraído con KCl (32 mM), el potasio indujo una contracción fásica; que en el registro se observa como una contracción breve e intensa; seguida por una contracción sostenida que se mantuvo durante más de 5 min. El promedio de la fuerza de contracción sostenida de los tejidos fue de $2.3 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ y el vehículo no alteró esta respuesta ($2.3 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$, N.S. t de Student). Los tratamientos a evaluar se administraron cuando se alcanzó esta contracción sostenida (Figura 9) y la respuesta del tratamiento en la disminución producida sobre esta contracción se interpretó como efecto relajante.

De esta manera, como se muestra en la Figura 10, el extracto acuoso de *T. erecta* relajó al tejido precontraído con KCl de manera concentración dependiente. Las concentraciones del extracto que indujeron un efecto relajante significativo con relación al vehículo fueron 316, 562 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (30.0 ± 4.3 , 47.2 ± 9.2 , 62.5 ± 4.9 vs 1.2 ± 0.7 %, respectivamente; ANADEVA, seguida de Dunnett, $p < 0.05$). El máximo efecto relajante se produjo con la concentración de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ de extracto con $62.5 \pm 4.9\%$.

El efecto relajante máximo de cada concentración del extracto se obtuvo alrededor de los 4 minutos después de su adición a la cámara de órgano aislado.

Por otro lado, la papaverina [30 μM], utilizada como control positivo en este modelo experimental, induce una relajación del $122.0 \pm 13.4\%$ (Figura 10) que inicia de manera casi inmediata y se estabiliza aproximadamente en 6 minutos. Este efecto fue significativamente diferente cuando se comparó con el efecto del vehículo ($p < 0.05$, t de Student). La papaverina nos mostró el máximo efecto relajante sobre el tejido bajo estas condiciones experimentales.

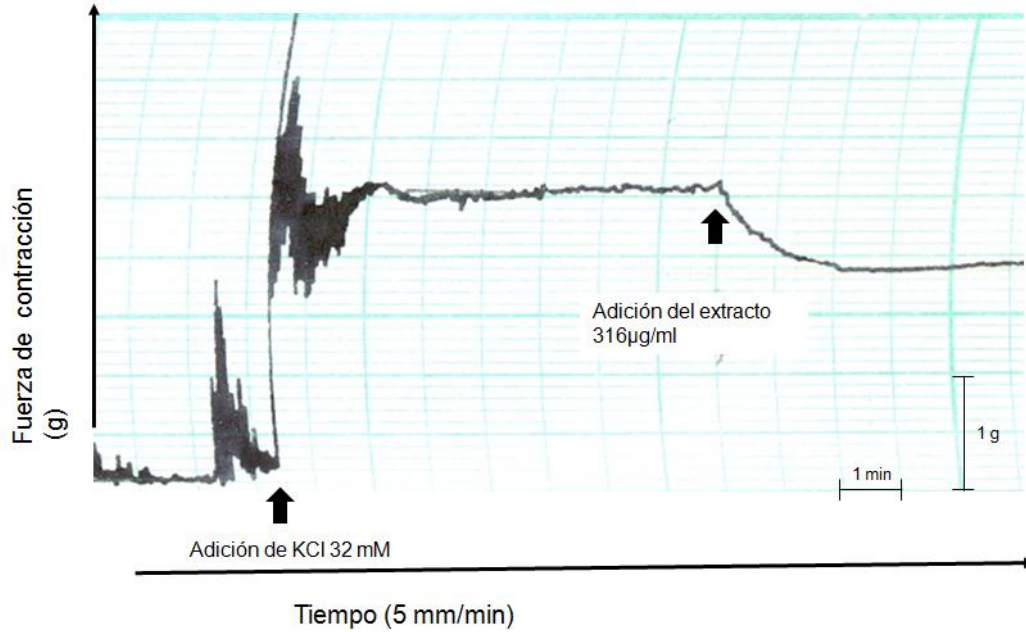


Figura 9. Registro representativo del polígrafo donde se muestra la actividad contráctil del íleon aislado de cobayo en presencia de KCl (32mM) y el efecto del extracto acuoso a 316 µg/mL (1 cm equivale a 1 g de fuerza de contracción).

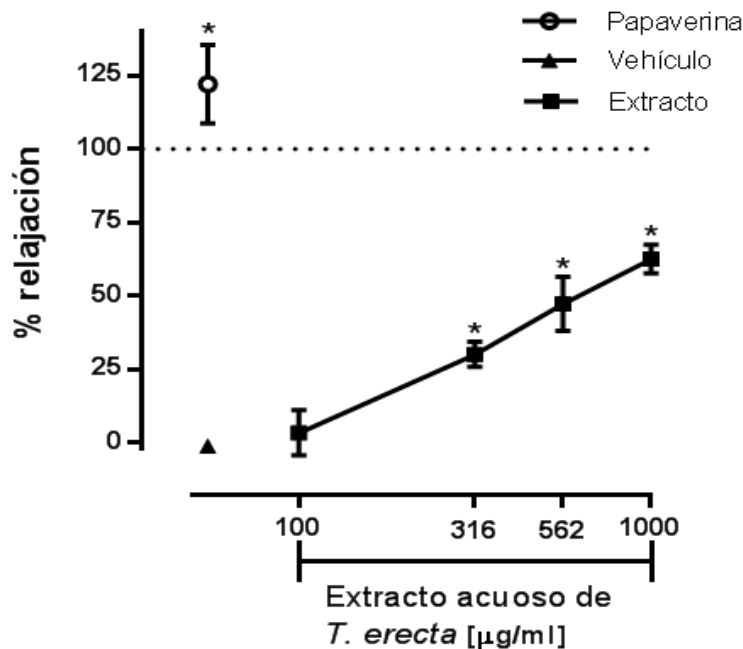


Figura 10. Curva concentración respuesta del efecto relajante del extracto acuoso (100, 316, 562, 1000 µg/mL) en íleon de cobayo precontraído con KCl (32 mM). Cada punto representa la media ± EEM (n de 5 a 6) (*p<0.05, ANADEV, seguida de una prueba Dunnett).

7.2 Efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el tejido precontraído por estimulación eléctrica (EE)

La respuesta supramáxima contráctil del tejido a la EE (14 V, 0.3 Hz y 3 ms de duración), fue de $1.5 \text{ g} \pm 0.20 \text{ g}$ y no se alteró al adicionar el vehículo ($1.5 \text{ g} \pm 0.2 \text{ g}$, N.S. t de Student). La adición del extracto acuoso de *T. erecta* produjo un espasmo inicial en el tejido seguido por una disminución en la fuerza de contracción inducida por la EE (Figura 11); mientras que, la papaverina, el control positivo, relajó al tejido inmediatamente (Figura 12). En las figuras 11 y 12 se señalan los momentos donde se adicionó el tratamiento a evaluar.

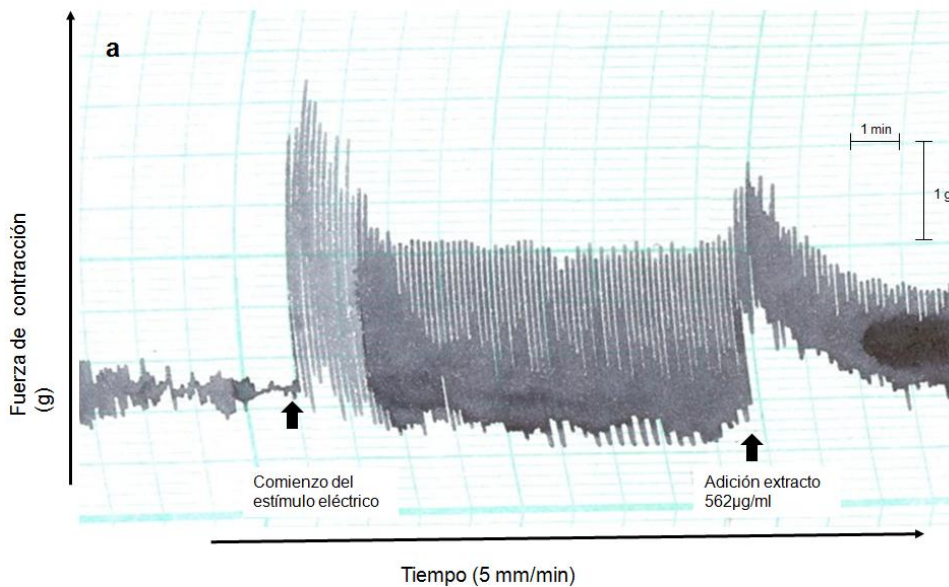


Figura 11 Registro representativo del efecto contráctil inducido por EE (14 V, 0.3 Hz y 3 ms) del íleon aislado de cobayo el efecto inducido por la adición del extracto acuoso de *T. erecta*.

Bajo estas condiciones experimentales, el extracto acuoso de *T. erecta* disminuye de manera concentración-dependiente la máxima contracción inducida por el EE. Este efecto fue considerado como efecto relajante y alcanzó significancia estadística con todas las concentraciones evaluadas (100, 316, 562 y 1,000 µg/mL) con relación al vehículo (35.9 ± 2.5 , 54.1 ± 8.7 , 74.1 ± 8.2 , 73.9 ± 2.7 vs 2.1 ± 1.4 %, respectivamente; ANADEVA, Dunnett, $p < 0.05$) (Figura 13).

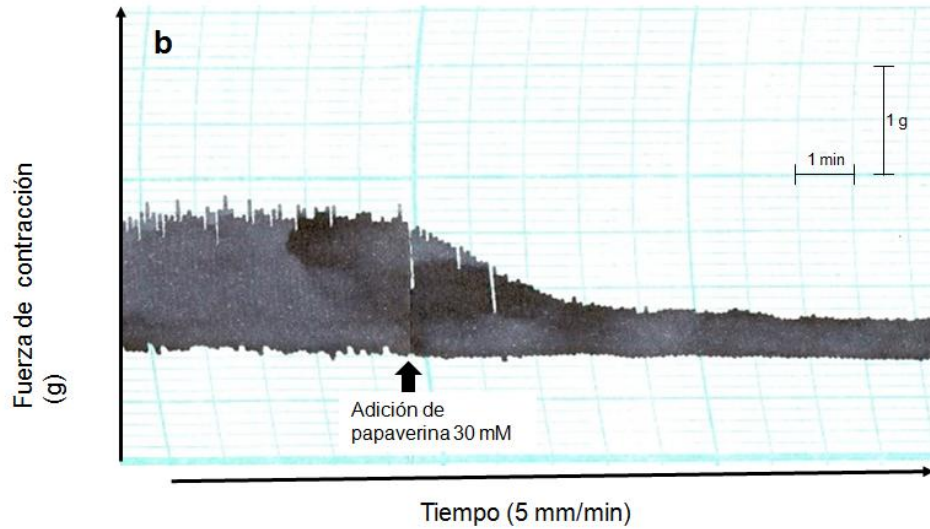


Figura 12 Registro representativo del efecto contráctil inducido por EE (14 V, 0.3 Hz y 3 ms) del íleon aislado de cobayo el efecto inducido por la adición de papaverina (30 mM).

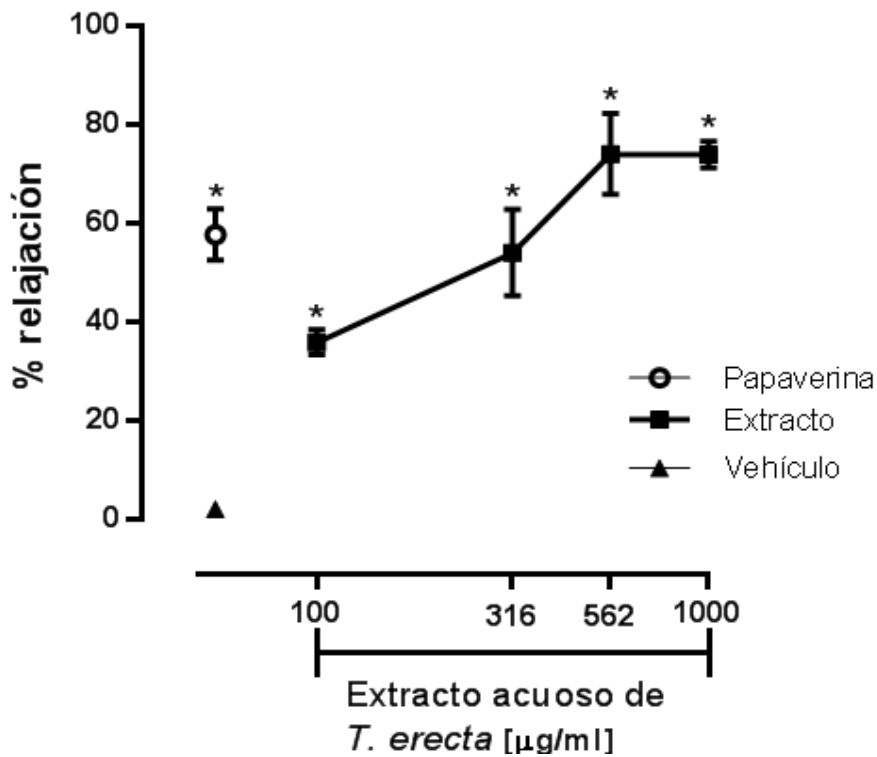


Figura 13 Curva concentración respuesta del efecto relajante inducido por *T. erecta*, sobre el tejido precontraído con EE (14 V, 0.3 Hz y 3 ms). También se muestra el efecto de la papaverina. Los datos se expresan como la media de 5 a 6 anillos \pm EEM. Todos los datos se compararon contra el vehículo (ANADEVA seguida de una prueba Dunnet (* $p < 0.05$)).

En este protocolo experimental, el efecto máximo se alcanzó con la concentración de 562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto; mientras que la papaverina produjo un efecto relajante de $57.7 \pm 5.2 \%$ que fue significativamente diferente al efecto del vehículo ($2.1 \pm 1.4\%$) ($p < 0.05$, t de Student).

7.3 Efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre la contracción inducida por acetilcolina (ACh).

La adición del extracto acuoso de *T. erecta* (562 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre el tejido antes de la estimulación con ACh [10^{-5} M], produjo una respuesta contráctil de casi 3 g de fuerza sobre su actividad espontánea (Figura 14) que no alteró la respuesta contráctil inducida por ACh sola (3.9 ± 2.2 vs 4.0 ± 0.2 g, N.S. t de student).

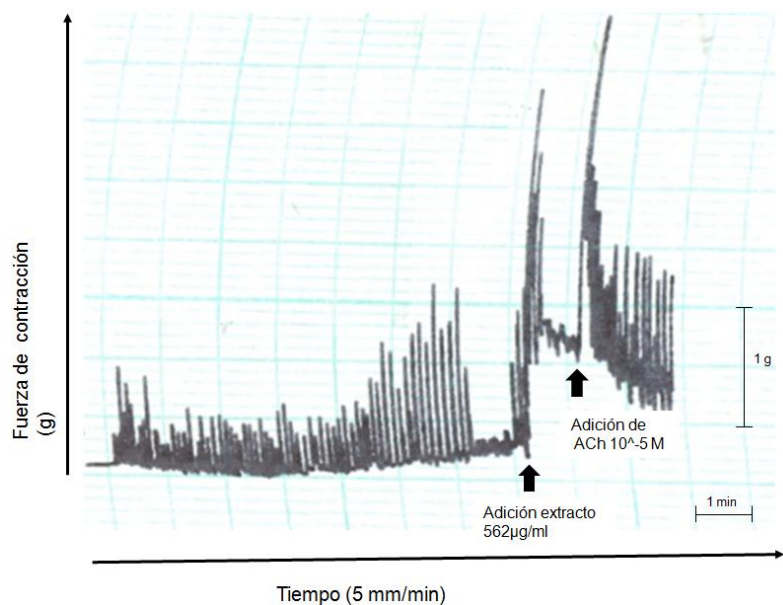


Figura 14 Registro representativo de la actividad espontánea del tejido y su respuesta a la administración del extracto acuoso de *T. erecta*, y la posterior administración de ACh (10^{-5} M).

El extracto acuoso de *T. erecta* no alteró la respuesta contráctil inducida por la ACh (10^{-5} M) en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 15). Por el contrario, la papaverina disminuyó el efecto contráctil hasta en un $40.9 \pm 7.2\%$.

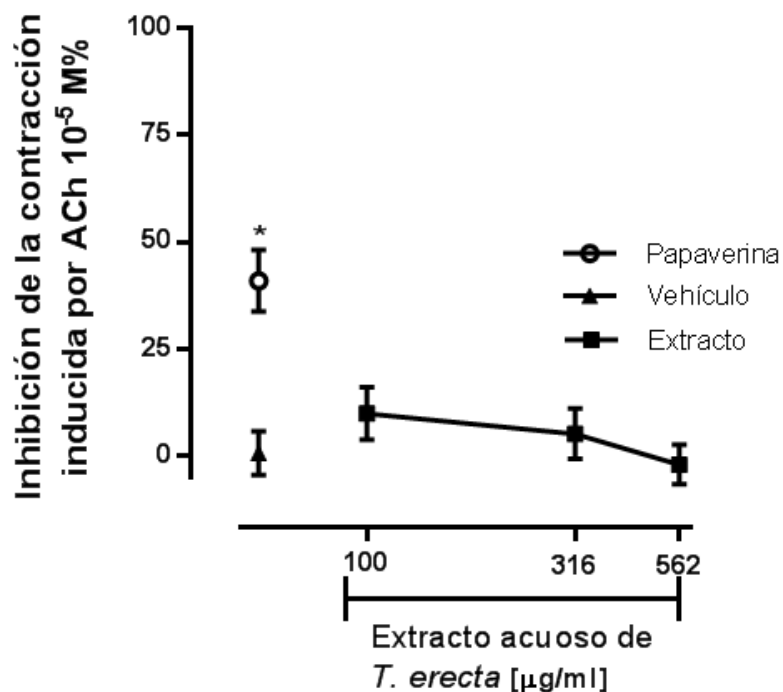


Figura 15 Efecto del extracto acuoso de *T. erecta* sobre la contracción inducida por ACh (1×10^{-5} M). También se muestra el efecto de la papaverina. Los datos se expresan como la media de 5 a 6 anillos \pm EEM. Todos los datos se compararon contra el vehículo (ANADEVA seguida de una prueba Dunnet (* $p < 0.05$)).

Aunque el extracto no alteró la contracción producida por ACh, este protocolo nos permitió observar un efecto espasmogénico sobre la actividad espontánea del tejido. En la figura 16 se muestra que el efecto contráctil inducido por el extracto acuoso de *T. erecta* es concentración dependiente y alcanza una respuesta máxima de $3.1 \text{ g} \pm 0.31 \text{ g}$ con la concentración de 562 µg/mL , que representa cerca de un 90% del efecto contráctil inducido por la ACh (10^{-5}M).

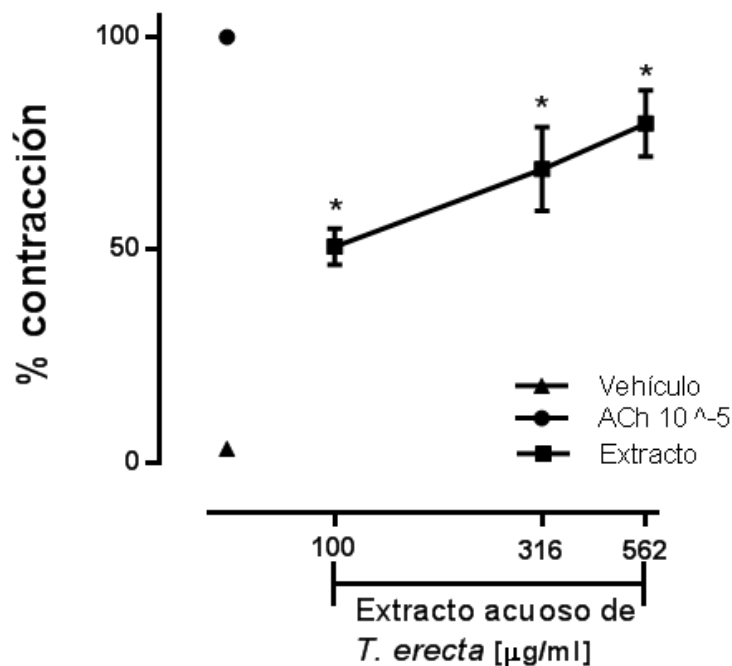


Figura 16. Contracción inducida por el extracto acuoso de *T. erecta* sobre la actividad espontánea del tejido. También se muestra el efecto contráctil de la ACh (10^{-5} M). Los datos se expresan como la media de 5 a 6 anillos \pm EEM del porcentaje de contracción con respecto a ACh (100%). Todos los datos se compararon contra el vehículo (ANADEVA seguida de una prueba Dunnet (* $p < 0.05$)).

7.4 Respuesta del tejido con cloruro de bario (BaCl_2)

Al final de todos los protocolos experimentales, los tejidos fueron estimulados con BaCl_2 (0.01 M) con el propósito de verificar la integridad de las células musculares del tejido después de las estimulaciones a las que fueron sometidos. En todos los casos, los tejidos alcanzaron una contracción por arriba de 4 g con el BaCl_2 .

7.5 Determinación del posible mecanismo de acción del extracto acuoso de *T. erecta*.

Para determinar el posible mecanismo de acción involucrado en el efecto antiespasmódico del extracto acuoso de *T. erecta* se utilizó el protocolo del tejido precontraído con KCl (32 mM) y la concentración del extracto de 562 µg/mL.

Como se puede observar en la figura 17 ni la indometacina (1 μ M), un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa; ni el L-NAME[100 μ M], un inhibidor de la oxido nítrico sintetasa; ni el hexametonio (0.5 mM), un bloqueador ganglionar; alteró la respuesta relajante inducida por el extracto acuoso de *T. erecta* (42.3 ± 6.2 , 42.2 ± 5.0 , 36.8 ± 6.5 vs $47.5\% \pm 6.5\%$ ANADEVA) sobre el tejido precontraído con KCl.

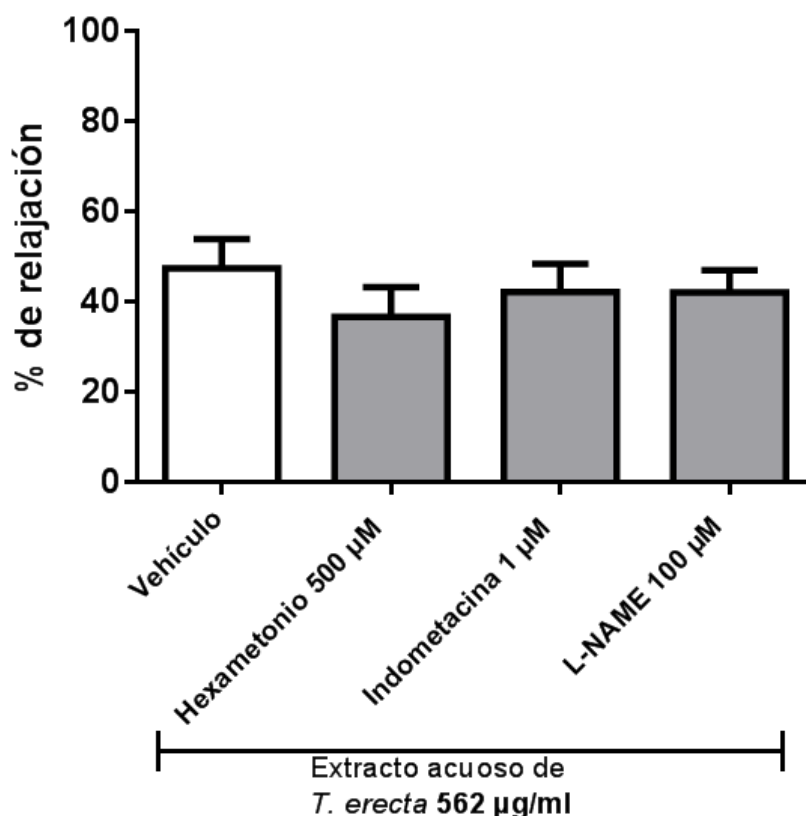


Figura 17 Efecto relajante del extracto acuoso de *T. erecta* (562 μ g/mL) en íleon de cobayo precontraído con KCl 32 mM en ausencia (control) y en presencia de indometacina, L-NAME y hexametonio. Cada barra representa la media de 5 a 6 anillos \pm EEM (ANADEVA).

Con el propósito de determinar si el efecto espasmolítico inducido por el extracto acuoso de *T. erecta* era a través del bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes. Se determinó el efecto contráctil del tejido a concentraciones crecientes de Ca^{2+} en presencia de dos concentraciones del extracto.

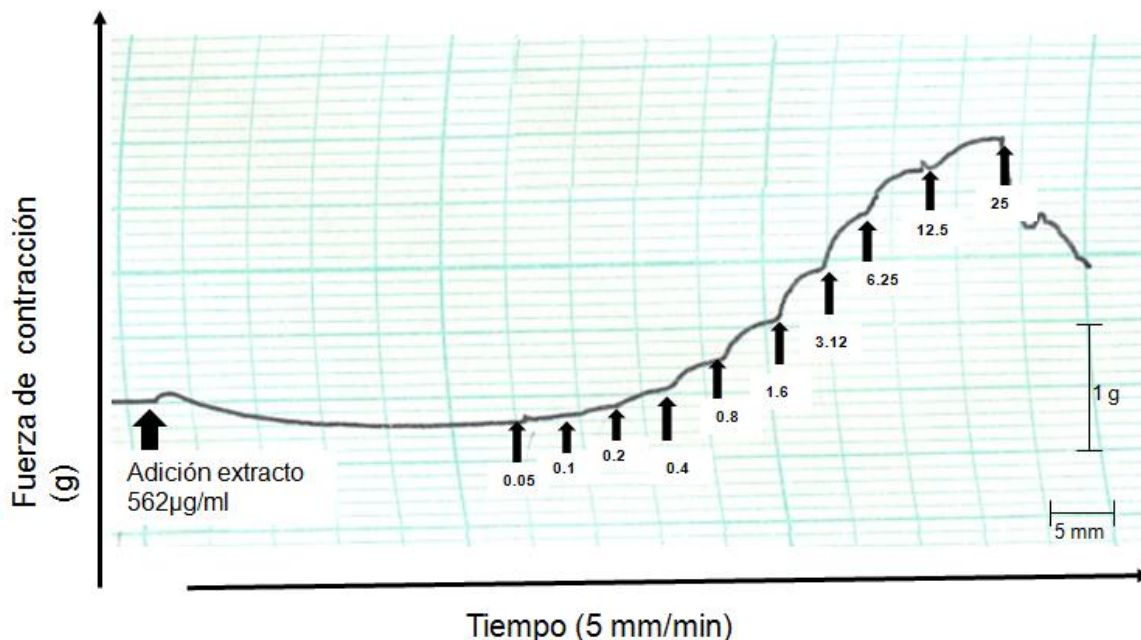


Figura 18. Registro representativo de una curva concentración respuesta acumulativa de Ca^{2+} en un tejido incubado con el extracto acuoso de *T. erecta*.

En la figura 18 se muestra un registro representativo de las contracciones inducidas por concentraciones crecientes de cloruro de calcio y el momento en el que se adiciona el extracto de *T. erecta*. Aquí se muestra que el extracto indujo un ligero efecto relajante en el tejido inmediatamente después de su adición.

El pretratamiento del tejido con el extracto acuoso de *T. erecta* desplazó la CCR de CaCl_2 a la derecha y disminuyó significativamente el efecto máximo contráctil inducido por CaCl_2 de la misma manera que lo hizo el verapamilo, un bloqueador de canales de calcio voltaje dependientes (Figura 19, Tabla 2); por lo que se realizó el análisis de los valores de la concentración Efectiva 50 (CE_{50}) y de las áreas bajo la curva (ABC) de las CCR. Este análisis señala que no existe una diferencia significativa en las CE_{50} del CaCl_2 en presencia de ninguna de las dos concentraciones del extracto acuoso de *T. erecta*; sin embargo, el verapamilo sí incremento significativamente la CE_{50} con relación a la curva control (Tabla 2). Con relación a las ABC, sí hay una disminución significativa de este parámetro de los tratamientos (extracto y verapamil) con relación al control (Tabla 2).

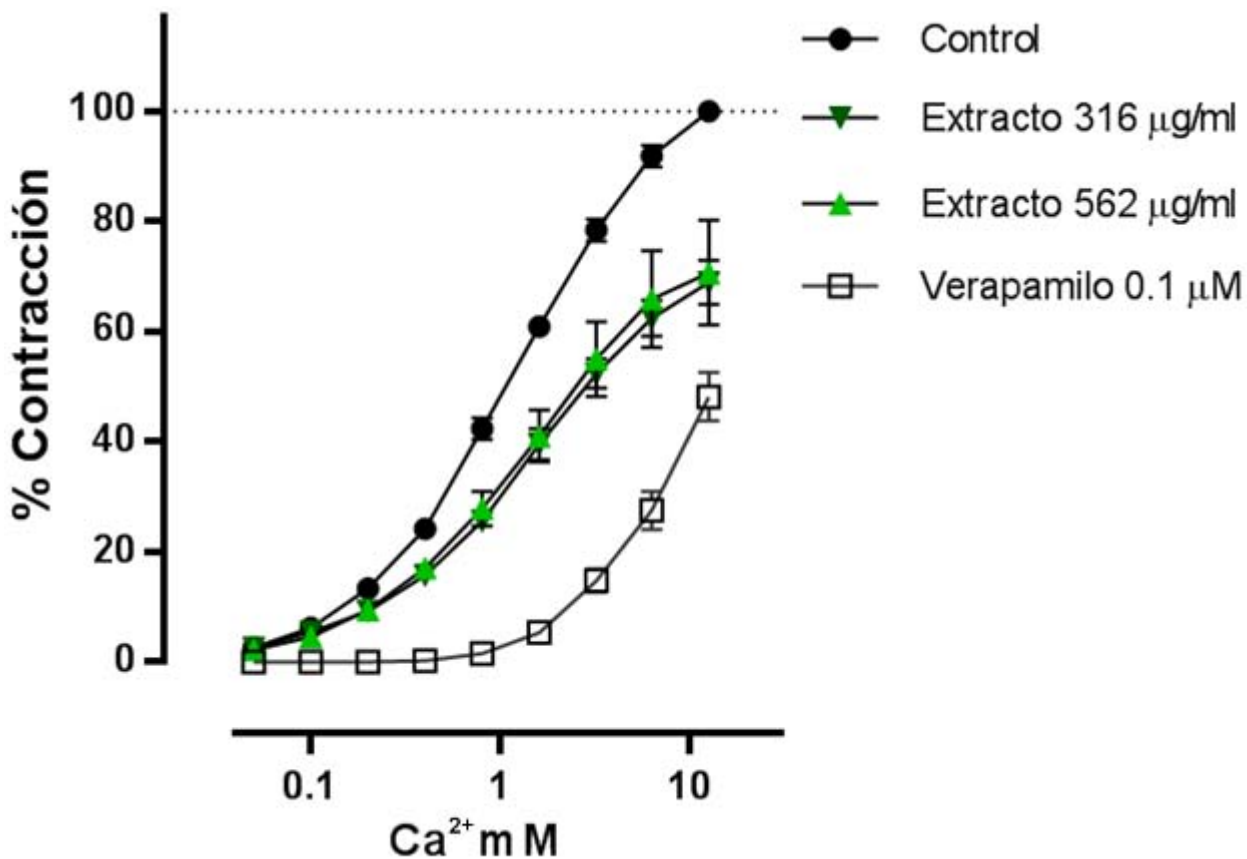


Figura 19 Curvas concentración-respuesta de cloruro de calcio en presencia del extracto acuoso de *T. erecta* y verapamilo (0.1 µM, un bloqueador de canales de calcio voltaje dependientes), utilizado como control positivo. Los datos se expresan como la media de 5 a 6 anillos ± EEM. Todos los datos se compararon contra la curva control.

Tabla 2 Concentración efectiva media (CE_{50}) de Ca^{2+} , efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) y área bajo la curva (ABC) obtenidas de las CCR de Ca^{2+} en íleon de cobayo en presencia del extracto acuoso de *T. erecta*.

| | CE_{50} Ca^{2+} mM | E_{max} (%) | ABC |
|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| Control | 1.3 ± 0.1 | 100 | 1,031 ± 11.9 |
| Extracto 316 µg/mL | 1.9 ± 0.6 | 68.9 ± 4.0* | 697.2 ± 34.6* |
| Extracto 562 µg/mL | 1.4 ± 0.1 | 70.6 ± 9.4* | 728.5 ± 94.1* |
| Verapamilo 0.1 µM | 9.9 ± 1.9* | 48.1 ± 4.4* | 321.3 ± 35.6* |

Se muestra media ± EEM con una n=6. Tratamientos vs control *p<0.05, ANADEVa *pos hoc* Dunnet.

8. DISCUSIÓN

Tagetes erecta L. es una planta comúnmente conocida como flor de cempasúchil o flor de muertos y pertenece a la familia Asteraceae. Es ampliamente utilizada en la cultura mexicana con motivos religiosos, pero también en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las cuales se encuentra el tratamiento de malestares gastrointestinales (Taylor, 2011). Entre los estudios científicos que se han realizado de esta planta se señala su utilidad como antibacterial (Gopi y cols., 2012), nematocida, fungicida, herbicida, insecticida, antimalárico, antioxidante y antimutagénico (Li-wei y cols., 2012). Con relación a su efecto sobre el TGI, hasta donde sabemos solo se ha realizado un estudio exploratorio de su efecto espasmolítico con el extracto metanólico de sus hojas (Tortoriello y cols., 1995) y la determinación del efecto analgésico y antidiarréico en ratones (Shinde y cols., 2009; Valencia, 2014), sin embargo no existe evidencia del efecto espasmolítico del extracto acuoso de la flor, que es la que se usa en la medicina tradicional; así como tampoco del mecanismo de acción responsable de este efecto.

En el presente estudio se realizó un ensayo que muestra la actividad espasmolítica del extracto acuoso de las flores de *T. erecta* sobre la musculatura lisa del TGI. Esta actividad se determinó en un modelo experimental *in vitro* con tres protocolos que involucraban el efecto del extracto sobre el tejido precontraído, los cuales nos ayudaron a sustentar el efecto antiespasmódico que se le ha atribuido a esta planta.

8.1. Efecto espasmolítico del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el íleon aislado de cobayo

En cada protocolo experimental se inducen contracciones de la musculatura lisa del íleon de cobayo y de esta forma se simula una serie de espasmos exacerbados.

En el primer protocolo experimental se utiliza cloruro de potasio para precontraer el tejido. Este protocolo ha sido utilizado en diversos estudios en donde se evalúa el efecto relajante o antiespasmódico de diversos compuestos y/o extractos naturales (Ventura-Martínez y cols,

2011). Éste se basa en la contracción del músculo liso como consecuencia de la despolarización membranal producida por una alta concentración de potasio (K^+). El incremento de K^+ extracelular activa un mecanismo electromecánico que induce la despolarización de la membrana, ocasionando la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula (Karaki y cols., 1984). El Ca^{2+} se une a la calmodulina, una enzima con 4 sitios de unión a Ca^{2+} , la cual actúa como intermediario para la activación de la MLCK. La MLCK fosforila a la MLC generando que esta se desplace entre los filamentos de actina, produciendo, finalmente, la contracción de las fibras musculares del músculo liso (Webb, 2003). Bajo este protocolo, la administración del extracto acuoso de *T. erecta* produjo un efecto relajante concentración dependiente de casi el 65%.

En el segundo protocolo experimental, se le aplicó un estímulo eléctrico de alta intensidad (14 V) al tejido para producir su contracción. Se sabe que la estimulación eléctrica produce la activación de las neuronas del SNE al abrir sus canales de Ca^{2+} e induciendo la liberación de neurotransmisores (Naidoo y cols., 2010). La frecuencia (0.3 Hz) y duración (3 ms) utilizadas durante el experimento, estimula principalmente a las neuronas motoras colinérgicas para liberar ACh. La ACh estimula a los receptores muscarínicos M_2 y M_3 en las células del músculo liso. Los receptores M_3 están acoplados a una proteína Gq que activa a una fosfolipasa C, catalizando la reacción de fosfatidil inositol difosfato (PIP_2) a fosfatidil inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG). El IP_3 se une a su receptor en retículo sarcoplásmico liberando Ca^{2+} desde almacenes intracelulares e incrementando su concentración en el citosol. Este incremento de calcio intracelular provoca la contracción del tejido por el mecanismo anteriormente descrito (Ehlert y cols., 1995; Sanders y cols., 2012). Por otro lado, los receptores M_2 , están acoplados a una proteína Gs, que inhibe a la adenilato cíclica, disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc, condición bajo la cual está activado el mecanismo relajante de la fosfatasa de MLC (Sanders y cols., 2012). Sin embargo, además de la liberación de ACh desde las neuronas mientéricas, también se liberan otros neurotransmisores de tipo inhibitorio como la noradrenalina, el péptido intestinal vasoactivo, sustancia P y óxido nítrico (NO) (Agoston y cols., 1988; Liddle, 2006). Esto explica que en general, en un tejido sano, la contracción inducida por el estímulo eléctrico es menor (cerca de 2 g) a la inducida por la administración exógena de ACh (cerca de 4 g). Los resultados de

este protocolo muestran que, al igual que en el protocolo anterior, la administración del extracto acuoso de *T. erecta* produjo un efecto relajante concentración dependiente de casi el 74% en el tejido estimulado eléctricamente.

Finalmente, en la estimulación química con ACh no se observó un efecto espasmolítico de extracto acuoso de *T. erecta*. La ACh es el principal neurotransmisor excitador en el TGI e induce contracción por su unión a receptores M_2 y M_3 , cuyo mecanismo de acción ya fue descrito en el párrafo anterior, en la membrana de los miocitos.

En los dos protocolos en los que se demostró el efecto espasmolítico del extracto, se utilizó la papaverina como control positivo, un agente antiespasmódico bien caracterizado (Ventura-Martinez y cols, 2011). Esto nos permitió determinar la capacidad máxima de relajación del tejido en nuestras condiciones experimentales, además de comparar su efecto con el producido por el extracto. La papaverina es un alcaloide extraído del opio que induce relajación del músculo liso por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa de los tipos PDE4B, PDE5 y PDE10 (Weber y cols., 2009; Xin y cols., 2003), produciendo un aumento de AMPc que activa a la fosfatasa de MLC, removiendo el grupo fosfato de la MLC e impidiendo su interacción con la actina, lo que finalmente produce relajación (Shimizu y cols., 2000). Además, la elevación intracelular de este segundo mensajero estimula la acumulación de calcio hacia almacenes intracelulares disminuyendo sus concentraciones citosólicas ocasionando la relajación del músculo liso. También altera la respiración mitocondrial de las células por inhibición de la fosforilación oxidativa (Takeharu y cols, 1998). En nuestras condiciones experimentales la papaverina relajó más del 100% el tejido precontraído con KCl, y cerca de un 60% en el tejido precontraído con EE. Esto sugiere que, con las concentraciones utilizadas del extracto, alcanzamos el máximo efecto relajante inducido por el extracto, independientemente de la capacidad de relajación del propio tejido

El extracto de *T. erecta* no induce daño muscular en ninguna de las concentraciones utilizadas ya que todos los tejidos se contrajeron con la misma intensidad con el $BaCl_2$ con o sin tratamiento, sugiriendo que es un extracto “seguro”. El mecanismo del $BaCl_2$ para inducir contracción en el íleon de cobayo involucra principalmente la musculatura del tejido y no al SNE ya que el bario, al ser un ión bivalente, actúa como si fuera Ca^{2+} afectando el potencial normal de la célula, provocando la apertura de los canales de Ca^{2+} . A través de este

mecanismo el bario ingresa a la célula y generara la contracción del músculo liso al actuar directamente sobre las proteínas que forman la maquinaria contráctil (Karaki y cols., 1984).

8.2. Efecto espasmogénico del extracto acuoso de *T. erecta* sobre el íleon aislado de cobayo.

Si bien el extracto acuoso de *T. erecta* no logró relajar al tejido en presencia de ACh, este protocolo permite observar el efecto del extracto sobre la actividad espontánea del tejido. Esto reveló que el extracto produce un efecto espasmógeno, con una fuerza de contracción de cerca del 80 % de la máxima inducida por ACh.

Es importante destacar que el extracto de *T. erecta* solo induce un efecto espasmolítico en presencia de un estímulo espasmogénico, como ocurre en los espasmos intestinales. Además, se ha reportado que produce un efecto analgésico en un modelo de dolor visceral en ratones (modelo de writhing) (Shinde y cols., 2009; Hossain y cols., 2014). Este modelo consiste en la administración intraperitoneal de un agente irritante que induce contracciones abdominales que simulan los espasmos inducidos en situaciones de dolor visceral (Yamasaki y cols, 2000). Este antecedente en conjunto con los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el efecto antinociceptivo en el modelo de dolor visceral del *T. erecta* puede deberse a un efecto inhibitorio sobre los espasmos intestinales, los cuales son ocasionados por una alteración sobre los mecanismos que regulan la motilidad intestinal.

8.3 Análisis del posible mecanismo de acción del efecto espasmolítico del extracto

El mecanismo de acción del efecto espasmolítico de un extracto es sumamente complejo, ya que contiene un gran número de compuestos que pueden ser los responsables de la actividad y además pueden interactuar entre ellos. Para elucidar un probable mecanismo de acción, se realizaron una serie de pruebas con inhibidores que bloquean algunas vías de señalización involucradas en la contracción y relajación del tejido.

El hexametonio, un bloqueador ganglionar, ha sido utilizado para inhibir la liberación de neurotransmisores de las neuronas mientéricas de las terminales colinérgicas, entre ellos la

ACh, inhibiendo así el efecto contráctil producido por la acción de este neurotransmisor sobre los receptores M₃ del musculo liso (Eglen y cols, 1989)

El oxido nítrico (NO) es un neurotransmisor importante en el sistema gastrointestinal que induce relajación de la musculatura lisa. Es un importante mensajero intra e inter celular que se encuentra en todo el organismo y se sintetiza a partir de L-arginina por la acción de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS) (Furfine y cols, 1993). El NO activa a la guanilato ciclasa, la enzima encargada de la síntesis del GMPc, induciendo un aumento en su concentración intracelular. Este segundo mensajero activa a la protein cinasa G, que inhibe la vía de RHo cinasa de sensibilización al calcio y también activa a telocinina, que a su vez aumenta la actividad de la fosfatasa de la MLC e que impide la unión de la MLC a la actina (Sanders y cols., 2012) inhibiendo la contracción (Liddle, 2006). El metil ester L-nitro arginina (L-NAME) es un inhibidor de la NOS que actúa como sustrato competitivo de la L-arginina, el sustrato natural de la NOS. De esta manera, con la administración del L-NAME se inhibe la síntesis de NO (Das y cols, 1999). Con este fármaco exploramos la posible participación del NO sobre el efecto relajante inducido por el extracto.

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGI₂ estimulan las terminales colinérgicas de las neuronas del SNE generando la liberación de acetilcolina y produciendo un aumento en la tonicidad del íleon de cobayo (Grasa y cols., 2006). En este estudio se utilizó un pretratamiento con indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa que bloquea la síntesis del prostaglandinas a partir del acido araquidónico (Florez, 2014).

Los resultados sugieren que en el efecto espasmolítico inducido por el extracto acuoso de *T. erecta* no están involucradas las prostaglandinas o el óxido nítrico, ni se debe a su interacción con la liberación de mediadores de la relajación desde las neuronas mientéricas ya que ni el L-NAME, ni la indometacina, ni el hexametonio alteraron el efecto relajante inducido por el extracto en el tejido precontraído con KCl en este modelo.

Considerando que el mayor efecto espasmolítico del extracto acuoso de *T. erecta* se produjo en el tejido precontraído con KCl se consideró que podía deberse a un bloqueo de canales de calcio. Para comprobar esta hipótesis, se determinó el efecto del extracto sobre la

contracción del tejido inducida por concentraciones crecientes de calcio. Los resultados muestran que el extracto disminuye el efecto contráctil del tejido al calcio de manera similar, aunque no con la misma eficacia, que el verapamil, un conocido bloqueador de canales de calcio voltaje dependientes, sugiriendo que su efecto espasmolítico podría deberse al bloqueo de los canales de calcio voltaje dependientes inducido por alguno de los componentes del extracto. En este sentido, se sugiere que uno de los componentes responsables de este efecto es la quercetina, ya que se sabe que es uno de los flavonoides presentes en la planta (Navarro-González y cols., 2015). Además, existe evidencia que señala que el efecto espasmolítico inducido por quercetina se debe al bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo L de la placa muscular lisa del íleon de cobayo y de la aorta de rata (Fanning y cols., 1983; Roghania y cols., 2006).

Es importante recordar que el extracto acuoso de *T. erecta* relaja incluso en ausencia de Ca^{2+} , lo que sugiere que su efecto espasmolítico involucra otro mecanismo de acción además del bloqueo de canales de calcio. Esto puede ser por la presencia de otros compuestos activos que inducen otros mecanismos como la inhibición de fosfodiesterasas en íleon de rata (Hammad y cols, 1997); ya que al inhibir a estas enzimas se impide la degradación de AMPc, permitiendo la relajación del músculo liso (Wun-Chang y cols., 2004).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el extracto acuoso de las inflorescencias de *T. erecta* induce un efecto antiespasmódico en el íleon aislado de cobayo previamente contraído, es decir, cuando se simulan las condiciones clínicas en presencia de espasmos intestinales. Esto, aunado al efecto analgésico que induce en un modelo de dolor visceral, constituye una aportación científica al conocimiento etnomédico de *T. erecta*, dando así sustento a su uso en la medicina tradicional para el alivio de los cólicos.

Por otro lado, el efecto espasmogénico inducido por el extracto en la actividad espontánea del tejido “normal”, sugiere que, en los pacientes bajo situaciones clínicas que no involucren espasmos intestinales como parte de su sintomatología, el extracto podría producir malestares gastrointestinales como un efecto adverso. Aunque es necesario realizar más estudios en este sentido.

También se determinó que el efecto espasmolítico del extracto se debe en parte al bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes, pero no involucra la producción de prostaglandinas ni de óxido nítrico; así como tampoco a la liberación de neurotransmisores del SNE.

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

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados de este proyecto, se propone continuar con los estudios para aislar los compuestos responsables de la acción espasmolítica y espasmógena del extracto acuoso de *T. erecta*; así como determinar bajo qué mecanismo de acción se produce el efecto espasmogénico del extracto.

También consideramos que es necesario hacer estudios de toxicidad crónica para determinar su seguridad en diferentes órganos y sistemas.

11. REFERENCIAS

Abaza M, Al-Attiyah R, Bhardwaj R, Abbadi G, Koyippally M, Afzal M. Syringic acid from *Tamarix aucheriana* possesses antimutagenic and chemo-sensitizing activities in human colorectal cancer cells. *Pharm Biol* 2013; 51 (9): 1110-1124

Agoston D, Conlon J, Whittaker V. Selective depletion of the acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide of the guinea-pig myenteric plexus by differential mobilization of distinct transmitter pools. *Exp Brain Res* 1988; 72: 535-542

Albuquerque U, Hanazaki N. As pesquisas etnorientadas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Braz J Pharmacogn* 2006; 16,10: 679-689

Argueta A, Cano L, Rodarte M. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana/ Cempasúchil o flor de muerto. 2009

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=cempas%C3%BAchil%20o%20flor%20de%20muerto&id=7343>

Arvigo R, Michael J, Balick J. Rainforest Remedies: One Hundred Healing Herbs of Belize, 2nd ed. Lotus Press, Wisconsin, 1993 p. 143

Baxter, H, Harborne J, Moss P. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants, 2nd ed. CRC Press, 1998 p. 43

Cazarolli L, Pereira D, Kappel V, Folador P, Figueiredo M, Pizzolatti M, Silva F. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 2013; 712(1-3):1-7

Das R, Kravstov G, Ballard H, Kwanet C. L-NAME inhibits Mg²⁺-induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium. *Brit J Pharmacol* 1999; 128: 493-499

Dewick P. Medicinal Natural Products a biosynthetic approach. 2nd ed. John Wiley & sons, 2002

Dyck J, Thomas P. Peripheral Neuropathy. 4th ed. Elsevier Saunders, 2001, p 2683-2706

Eglen R, Michel A, Cornett C, Kunysz E, Whiting R. The interaction of hexamethonium with muscarinic receptor subtypes in vitro. *Brit J Pharmacol* 1989; 98: 499-506

Ehlert F, Thomas E. Functional role of M2 muscarinic receptors in the guinea pig ileum. *Life Sci* 1995; 56: 965-971

Fanning M, Macander P, Drzewiecki G, Middleton. Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea pig ileum smooth muscle. *Eur Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 71(4):371-373.

Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad S. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *J Ethnopharmacol* 2011; 137(3): 1528–1532

Florez J. Farmacología Humana. 6a ed. Elsevier Masson. 2014

Furfin E, Harmon M, Pith J, Garvey E. Selective Inhibition of Constitutive Nitric oxide Synthase by L-p-Nitroarginine. *Biochem* 1993; 32:8512-8517

-
- Furness J. The Enteric Nervous System. Blackwell Publishing. 2006
- Galligan J, LePard K, Schneider D, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81 (3):97-103
- García I. La festividad indígena dedicada a los muertos en México CONACULTA Patrimonio Cultural y Turismo. Cuaderno 16. 2006
- Goldenberg M, Meurer R. The effect of calcium antagonists on contractions of the sensitized and normal guinea pig ileum. *Prostaglandins* 1983; 26: 4-8
- Gopi G, Elumalai A, Jayasri A. A concise review on *Tagetes erecta*. *IJPR* 2012; 3:183-188
- Grasa L, Arruebo M, Plaza M, Murillo M. PGE2 receptors and their intracellular mechanisms in rabbit small intestine. *Prostag Oth Lipid M* 2006; 79 (3-4):206-217
- Hammad H, Abdalla S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 1997; 28 (5):767-771
- Hossain M, Biva I. Antinociceptive and Diuretic Activities of *Tagetes erecta* Linn. *WJPPS* 2014; 2 (1):133-136
- <http://www.inah.gob.mx/paseos/biblioteca/> Cruz M, Badiano J. *Libellus Medicinabilus Indorum Herbis*. 1540
- <http://www.wdl.org/en/item/10096/view/3/688/> Sahagún B. *Historia General de las cosas de la Nueva España, Libro undécimo*
- IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuadro básico de medicamentos. Dirección de Prestaciones Médicas. 2015
- Karaki H, Urakawa N, Kutsy P, Potassium-induced Contraction in Smooth Muscle. *J Smooth Muscle Res* 1984; 20: 427-444
- Kellow J. Gut Motility: In Health and Irritable Bowel Syndrome. International Foundation for Functional Gastrointestinal Disorders, 2012. <http://www.iffgd.org/store/viewproduct/121>
- Khaledi H, Abeer A, Wagee A, Hapipah M, Mahmood A, Pouya H. Antioxidant, Cytotoxic Activities, and Structure–Activity Relationship of Gallic Acid-based Indole Derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2011; 344: 703–709
- Khulbe A, Pandey S, Sah S. Antidepressant-like action of the hydromethanolic flower extract of *Tagetes erecta* L. in mice and its possible mechanism of action. *Indian J Pharmacol*. 2013; 45(4):386-90
- Ley General de Salud, Capítulo IV, Última reforma publicada DOF 04-06-2014. Secretaría de Salud.
- Liddle R. Gastrointestinal Hormones and Neurotransmitters, en Felman M, Friedman L, Brandt L, *Gastrointestinal and Liver Disease*, 8a ed. Elsevier Saunders. 2006. P 3-25
- Li-wei X, Juan C, Huan-yang Q, Yan-ping S. Phytochemicals and their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *CHM* 2012; 4(2):103-117

Magalhaes P, Lahloub S, Leal-Cardosoc J. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18(5):539-546

Mehmood M, Gilani A. Pharmacological Basis for the Medicinal Use of Black Pepper and Piperine in Gastrointestinal Disorders. *J Med Food* 2010; 13(5):1086–1096

Morales MA1, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* 1994;25(1):17-21.

Naidoo V, Dai X, Galligan J. R-Type Ca²⁺ channels contribute to fast synaptic excitation and action potentials in subsets of myenteric neurons in the guinea pig intestine. *Nuerogastroenterol Motil* 2010; 22:353-363

Navarro A. Anatomía quirúrgica del yeyuno/íleon. Universidad de Buenos Aires (UBA). 2002. II-240

Navarro-González I, González-Barrio R, García-Valverde V, Bautista-Ortín A, Jesús M. Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterization of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MS. *Int J Mol Sci* 2015; 16:805-822

Nikkon F, Habib R, Saud Z, 1m. Karim R, Roy A, Zaman S. Toxicological evaluation of chloroform fraction of flower of *Tagetes erecta* L. on rats. *Drug Dev Res* 2009; 1:161-165

NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Secretaría de salud. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio

NOM-220-SSA1-2012. Norma Oficial Mexicana. Instalación y operación de la farmacovigilancia.

Ortiz A, Olvera J, Gallegos N. Sección Farmacia y Botánica tomo II. Publicaciones del Dr. José Eleuterio González en Ciencias Médicas. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey. 2013

Ortiz de Montellano B. Imperial Aztec Medicine. *Science, New Series*. 1975; 118: 215-220

Priyanka D, Shalani T, Navneet V. A Brief Study on Marigold (*Tagetes* species): A review. *IRJP* 2013; 4(1): 43-48

Rattay F. The basic mechanism for the electrical stimulation of the nervous system. *Neuroscience* 1999; 89(2): 335-346

Reglamento general de Salud, Título tercero; 2014

Roghania M, Baluchnejadmojaradb T, Dehkordic F. The Involvement of L-Type Voltage-Operated Calcium Channels in the Vascular Effect of Quercetin in Male Rats. *IJPR* 2006; 3:199-202

Sanders K, Sang Don Koh, Seungil Ro, Ward S. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 633–645

Serrano A, Cabrera L, Saldaña M, Ruiz B, Avendaño C. Riesgos de las plantas medicinales en uso concomitante con medicamentos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 2003; 27(6): 161-167

Shimizu K, Ichikawa T, Urakawa N, Nakajyo S. Inhibitory mechanism of papaverine on the muscle of the guinea pig urinary bladder. *J Pharmacol* 2000; 83:142-149

Shinde N, Kanase N, Shilimkar V, Undale V, Bhosale A. Antinociceptive and Anti-Inflammatory effects of solvent extracts of *Tagetes erectus* Linn (Asteraceae). *Trop J Pharm Res* 2009; 8(4):325-329

Takeharu K, Kazumasa S, Shinjiro N, Norimoto U. The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. *Eur J Pharmacol* 1998; 355(2-3):149-157

Taylor J. The Marigold: History and Horticulture. *Chron Horticult* 2011; 51(1):24-28

Teague B, Asiedu S, Moore P. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro:evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 2002; 137:139-145

Tortora G, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. 13a ed. John Wiley & sons Inc. 2011

Tortoriello J, Meckes-Fischer M, Villarreal M, Berlin B, Berlin E. Spasmolytic Activity of Medicinal Plants Used to Treat Gastrointestinal and Respiratory Diseases in the Highland of Chiapas. *Phytomedicine* 1995; 2(1): 57-66

Valencia V. Determinación del posible efecto antidiarreico y desparasitante del extracto acuoso de *T. erecta* en ratones CD1 (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2014

Ventura-Martínez R, Rivero-Osorno O, Gómes C, González-Trujano M. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol* 2011; 137:1528-1532

Villaseñor R, Espinosa G. Catálogo de malezas de México. Fondo de Cultura Económica, 1998.

Webb R. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 2003; 27: 201–206

Weber M, Breier M, Ko D, Thangaraj N, Marzan D, Swerdlow N. Evaluating the antipsychotic profile of the preferential PDE10A inhibitor, papaverine. *Psychopharmacology* 2009; 203 (4):723-735

WHO World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2014-2023. 2013

Wun-Chang K, Chwen-Ming S, Ya-Hsin L, Jun-Hao C, Hui-Lin H. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:2087–2094

Xin Z, Kim E, Lin C, Liu W, Tian L, Yuan Y, Fu J. Effects of icariin on cGMP-specific PDE5 and cAMP-specific PDE4 activities. *Asian J Androl* 2003; 5:15-18

Xu Li-Wei, Chen Juan, Qi Huan-Yang, Shi Yan-Ping. Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *CHM* 2012; 4(2):103-117

Yamasaki T, Matsushita Y, Kawashima K, Someya M, Nikajima Y, Kurashige T. Evaluation of the pharmacological activity of extracts from *Amomi* semen on the gastrointestinal tracts. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 331-335