



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Potencial antidiarreico *in vitro*, *in vivo* y
antibacteriano de los extractos orgánicos de hoja,
corteza y fruto de *Vitex pyramidata* B.L. Rob.
(Lamiaceae) usada en la medicina tradicional
mexicana.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE EDUARDO RÍOS CARRILLO



**DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO LAGUNA
HERNÁNDEZ**

2011



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Ríos
Carrillo
Jorge Eduardo
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo
303147927

2. Datos del tutor

Dr.
Guillermo
Laguna
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Helia Reyna
Osuna
Fernández

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Sebastián
Poggio
Chilarducci

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Teresa
Núñez
Cardona

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz

7. Datos del trabajo escrito

Potencial antidiarreico *in vitro*, *in vivo* y antibacteriano de los extractos orgánicos de hoja, corteza y fruto de *Vitex pyramidata* B.L. Rob. (Lamiaceae) usada en la medicina tradicional mexicana.

86 p.
2011



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
P r e s e n t e

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Potencial antidiarreico in vitro, in vivo y antibacteriano de los extractos orgánicos de hoja, corteza y fruto de Vitex pyramidata B. L. Rob. (Lamiaceae) usada en la medicina tradicional mexicana

realizado por **Ríos Carrillo Jorge Eduardo** con número de cuenta **3-0314792-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

Propietario Dr. Sebastián Poggio Chilarducci

Propietario Tutor Dr. Guillermo Laguna Hernández

Suplente Dra. María Teresa Núñez Cardona

Suplente M. en C. Enrique Moreno Sáenz

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "
Ciudad Universitaria, D. F., a 29 de junio de 2011
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.
MAG/CZS/cigs

Créditos institucionales y técnicos

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Guillermo Laguna Hernández del Laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas, Edificio A, 3er piso de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Así mismo para la realización de este trabajo se requirió el uso de equipo y materiales químicos y biológicos de otros departamentos e instituciones como: rotavapor del Taller de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM facilitado por la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz. Equipo y materiales del Laboratorio de Animales II de la Facultad de Ciencias de la UNAM proporcionados por C. Pedro García con apoyo del M. en C. Enrique Moreno Sáenz. Ratas Wistar y Long-Evans provenientes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular proporcionadas por el MVZ Héctor Alfonso Malagón Rivero con la autorización de la Dra. Claudia Rivera Cerecedo. Ratones Balb/C procedentes del Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General de México proporcionados por el Dr. Ricardo Vargas Orozco. Ratones para práctica, materiales y espacio del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM proporcionados por el M. en C. Agustín Carmona Castro con la autorización del M.V.Z. Mario Javier Soriano Bautista. Cepas bacterianas del Cepario de Bacterias Entéricas del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM proporcionadas por el Dr. Armando Navarro Ocaña y del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del IMSS, Xochitepec, proporcionadas por la M. en C. María Gabriela Rojas. Equipo y materiales del Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento El Hombre y su Ambiente de la UAM Xochimilco proporcionados por la Dra. María Teresa Núñez Cardona.

Dedicatorias y agradecimientos

A mis padres.

Por ser un gran ejemplo a seguir, por apoyarme en todo lo que he necesitado, por su paciencia, confianza, por nunca dejar de creer en mí, por su amor, por la educación y valores que me han inculcado.

A mis hermanos.

Por todo lo que hemos vivido y seguiremos viviendo.

A mis primos y tíos.

Por su apoyo, confianza y la convivencia que hemos tenido, se los agradezco a todos.

A mis amigos.

Por los momentos compartidos, por su apoyo y confianza, por las vivencias y por la paciencia que me han tenido, especialmente a Edith Vázquez, Juan Carlos Bravo, Zuriel Barreda, a mí musa Itzel Georgina Meneses e ineludiblemente a Ximena Gómez Maqueo por su ayuda en las pruebas microbiológicas.

A mis profesores.

Por sus enseñanzas, por los conocimientos adquiridos, por su ejemplo, paciencia, experiencias, apoyo y por contagiarme la sed de conocimiento, especialmente a Ernesto Velázquez, Rosa María Fonseca, Alejandro Marche, Enrique Moreno, Alfonso José Vilchis, David Benavides, Amaya Luna, Amancio Estrella, Iván Israel Castellanos, Belen Garduño, Zenón Cano y Álvaro Chaos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por ser donde mi gusto y fascinación por el estudio y el conocimiento se reafirmo, y por las grandes oportunidades de conocer y desarrollarme en otras actividades como el Taekwondo, Tiro con arco, Buceo y Montañismo.

A la Facultad de Ciencias.

Donde he pasado gran parte de mi tiempo desde que entre a la carrera, donde he aprendido más que en ningún otra etapa de mi vida y donde conocí a grandes personas.

A todos los que me ayudaron de alguna forma directa o indirectamente para la realización y culminación de este trabajo, especialmente: Dr. Guillermo Laguna, M. en C. Enrique Moreno, Dra. María Teresa Núñez, MVZ Héctor Alfonso Malagón, Dr. Ricardo Vargas, Dr. Armando Navarro, M. en C. Agustín Carmona, Dra. Helia Reyna Osuna, Dr. Sebastián Poggio y C. Pedro García.

Muchas Gracias.

Citas

La más larga caminata comienza con un paso.

Leonardo Da Vinci

Quien hace puede equivocarse, quien no hace nada ya está equivocado

Daniel Kon

Se debe querer algo grande, pero se debe también aspirar a realizarlo. De otro modo, será un querer nulo; los laureles de la simple voluntad son hojas secas que jamás han reverdecido.

Hegel

La vida no se mide por las veces que respiras, sino por los momentos que te dejan sin aliento.

Macarena Cacheiro

El que no se rebela contra la indignidad se revela como indigno.

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

Voltaire

En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación.

Jules de Gaultier

Nada vale la ciencia si no se convierte en conciencia.

Carlo Dossi

La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano.

Marcus Jacobson

Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad.

Karl Popper

La conclusión es que sabemos muy poco y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos. Y más asombroso todavía que un conocimiento tan pequeño pueda dar tanto poder.

Bertrand Russell

El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría.

Isaac Asimov

Todo conocimiento tiene por sí mismo algún valor, no hay nada tan pequeño e insignificante que yo no prefiera conocer a ignorar.

Ben Jonson

Índice

Hoja de datos del jurado.....	I
Votos aprobatorios.....	II
Créditos institucionales y técnicos.....	III
Dedicatorias y agradecimientos.....	IV
Citas.....	VI
Índice.....	VII
Lista de cuadros y figuras.....	X
Resumen.....	1
1. Antecedentes.....	2
1.1 Las plantas y la medicina tradicional en México.....	2
2. Diarrea.....	4
2.1 Generalidades.....	4
2.2 Situación de la diarrea en México.....	5
2.3 Definición y clasificación.....	5
2.4 Etiología de la diarrea.....	6
2.4.1 Diarrea infecciosa.....	7
2.4.2 Diarrea no infecciosa.....	7
2.5 Prevención social.....	8
3. Tratamiento.....	9
3.1 Rehidratación oral e intravenosa.....	9
3.2 Antibióticos.....	9
3.3 Otros fármacos.....	10
4. La búsqueda de nuevos tratamientos.....	11
4.1 Estudio de plantas medicinales	11
4.2 Otras alternativas de tratamiento.....	13
4.2.1 Vacunas.....	13

4.2.2 Fitomedicamentos.....	16
5. Planta medicinal en estudio.....	19
5.1 El género <i>Vitex</i>	19
5.2 <i>Vitex pyramidata</i> Robinson.....	20
5.2.1 Descripción botánica.....	21
5.2.2 Uso medicinal de la planta.....	21
6. Justificación y objetivos.....	23
6.1 Justificación.....	23
6.2 Objetivo General.....	23
6.3 Objetivos particulares.....	23
7. Hipótesis.....	24
8. Trabajo de gabinete y campo.....	25
8.1 Visita a herbarios.....	25
8.2 Sitio de colecta.....	25
8.3 Ejemplares de referencia.....	25
8.4 Preparación de los extractos.....	26
9. Selección de los extractos con mayor actividad antimotílica <i>in vitro</i> en intestino aislado de rata.....	28
9.1 Animales utilizados.....	28
9.2 Obtención de la muestra y montaje de la preparación.....	28
9.3 Evaluación de los extractos de <i>V. pyramidata</i>	30
9.4 Toma de registros.....	30
9.5 Análisis estadístico.....	32
10. Modelo farmacológico <i>in vivo</i> de los extractos seleccionados sobre la motilidad gastrointestinal en ratón.....	34
10.1 Animales utilizados.....	34
10.2 Método.....	34
10.3 Análisis estadístico.....	36
11. Pruebas microbiológicas: método de dilución en agar.....	37

11.1 Microorganismos usados	37
11.2 Método.....	37
12. Resultados.....	40
12.1 Rendimientos.....	40
12.2 Selección preliminar de extractos de hoja, corteza y fruto; modelo farmacológico del efecto antimotílico <i>in vitro</i> en intestino aislado de rata.....	40
12.3 Efecto <i>in vivo</i> de los extractos seleccionados sobre la motilidad gastrointestinal en ratón.....	43
12.4 Pruebas microbiológicas: método de dilución en agar.....	44
13. Discusión.....	47
14. Conclusiones.....	59
15. Literatura citada.....	60
Anexos.....	73
A. Solución fisiológica Krebs.....	73
B. Información de las cepas bacterianas utilizadas.....	74
C. Características generales y epidemiológicas de las especies bacterianas utilizadas.....	76
D. Pruebas estadísticas.....	83

Lista de cuadros y figuras

Cuadros

1. Preparaciones estudiadas como antiespasmódicos y que están indicadas contra la diarrea.....	16
2. Rendimientos de los diferentes extractos orgánicos.....	40
3. Concentración mínima inhibitoria encontrada de las diferentes cepas bacterianas (mg/ml).....	46
D1. ANOVA de la frecuencia por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> , las diferencias significativas están marcadas con color rojo.....	83
D2. Prueba de Tukey (HSD) de la frecuencia por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> : los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p<0.01$) y verde ($p<0.05$).....	83
D3. ANOVA de la tensión por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> , las diferencias significativas están marcadas con color rojo.....	84
D4. Prueba de Tukey (HSD) de la tensión por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> : los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p<0.01$) y verde ($p<0.05$).....	84
D5. ANOVA de la amplitud por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> , las diferencias significativas están marcadas con color rojo.....	85
D6. Prueba de Tukey (HSD) de la amplitud por el tratamiento en el modelo <i>in vitro</i> : los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p<0.01$) y verde ($p<0.05$).....	85
D7. ANOVA del avance del marcador por el tratamiento en el modelo <i>in vivo</i> , las diferencias significativas están marcadas con color rojo.....	86
D8. Prueba de Tukey (HSD) del avance del marcador por el tratamiento en el modelo <i>in vivo</i> : los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p<0.01$) y verde ($p<0.05$).....	86

Figuras

1. Distribucion de <i>V. pyramidata</i> en la República Mexicana.....	20
2. Ejemplar de <i>V. pyramidata</i> del que se obtuvo parte del material vegetal y detalle de sus hojas e infrutescencias.....	21
3. Mapa del estado de Michoacán; con la marca la localidad donde se obtuvo el material vegetal, y detalle del camino entre la poblacion Paso de Núñez y El Carrizal.....	26
4. Diagrama del procedimiento general llevado acabo en el presente estudio.....	27
5. Cámara de órganos aislados con una muestra de intestino conectado al transductor de fuerza.....	29
6. Diagrama del procedimiento para la selección de los extractos con mayor actividad antimotílica <i>in vitro</i> en intestino aislado de rata.....	31
7. Ejemplo de uno de los registros obtenidos mostrando los tres parámetros evaluados en el modelo <i>in vitro</i>	32
8. Diagrama del procedimiento del modelo farmacológico del efecto <i>in vivo</i> de la motilidad gastrointestinal en ratón.....	35
9. Diagrama del procedimiento de las pruebas microbiológicas mediante el método de dilución en agar.....	38
10. Efecto de los extractos orgánicos de <i>V. pyramidata</i> sobre la frecuencia de las contracciones del intestino.....	41
11. Efecto de los extractos orgánicos de <i>V. pyramidata</i> sobre la tensión basal del intestino.....	42
12. Efecto de los extractos orgánicos de <i>V. pyramidata</i> sobre la amplitud de las contracciones del intestino.....	43
13. Efecto de los extractos orgánicos de <i>V. pyramidata</i> en el modelo <i>in vivo</i>	44

Resumen

La diarrea es un trastorno sumamente frecuente en todo el mundo que sigue siendo causa frecuente de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo, en particular en niños. La Organización Mundial de la Salud reporta que es uno de los cinco principales problemas de salud pública y la segunda causa de muerte infantil mundial. En México es la segunda causa de morbilidad y principal causa de consulta externa y hospitalaria en menores de cinco años.

Los estudios etnobotánicos de plantas medicinales, pueden ser fuente de información para encontrar compuestos bioactivos, su uso ha hecho posible el desarrollo de un gran número de medicamentos para uso clínico. Una gran variedad de especies del género *Vitex* se usan como remedios por el pueblo mexicano y ha sido motivo de estudios en diversos países, aún así, solo 28 especies han sido estudiadas.

El presente trabajo representa el primer estudio farmacológico de *Vitex pyramidata* utilizada en la medicina tradicional mexicana. Se evaluó el potencial antidiarreico *in vitro*, *in vivo* y antibacteriano de los extractos orgánicos hexánico, diclorometánico y metanólico de hoja, corteza y fruto.

Se ensayaron los extractos en un modelo *in vitro* con intestino aislado de rata a una concentración de 150 µg/ml. Seis de los nueve extractos disminuyeron significativamente la frecuencia de los movimientos peristálticos. Tres de estos extractos: hexánico de hoja y los metanólicos de hoja y corteza, mostraron mayor actividad.

En el modelo *in vivo* se analizaron estos tres extractos a una concentración de 250 mg/kg, sin embargo no se encontraron diferencias significativas que pudieran considerarse relevantes.

En las pruebas microbiológicas los extractos diclorometánico y metanólico de corteza, y hexánico y metanólico de hoja presentaron actividad. Las trece cepas bacterianas ensayadas fueron sensibles al menos frente a uno de estos extractos a una concentración máxima de 8 mg/ml, considerada como una actividad antibacteriana significativa, y nueve cepas presentaron inhibición a concentraciones menores o iguales a 2 mg/ml en al menos un extracto.

Los resultados obtenidos en este estudio validan el conocimiento y uso medicinal tradicional que se tiene de *V. pyramidata* como antidiarreico.

1. Antecedentes

1.1 Las plantas y la medicina tradicional en México

El uso de las plantas medicinales en el mundo es parte de la cultura y de las tradiciones de los pueblos, además, se trata de un recurso barato y accesible, ya que la mayoría de los remedios vegetales se obtienen a partir de plantas que crecen en cada localidad (Waller, 1993). El uso de la medicina tradicional –en especial las plantas medicinales- está muy extendido en los países en vías de desarrollo, su empleo está arraigado a las circunstancias históricas y creencias, siendo en algunos casos la medicina tradicional, la única fuente accesible de atención médica, especialmente para los pacientes más pobres (OMS, 2002).

En México dicho conocimiento y uso de las propiedades medicinales de las especies vegetales se remonta siglos antes de la conquista, y en la actualidad se siguen empleando (Ruiz, 2007), por lo que constituyen uno de los principales o únicos recursos terapéuticos tanto en el medio rural como suburbano, donde los servicios de atención médica son escasos, acentuándose en las poblaciones más alejadas de las cabeceras municipales y de los centros urbanos, particularmente para los indígenas (Tapia-Conyer, 1994; Osuna *et al.*, 2005), ya sea porque los centros de atención médica se encuentran lejos de la localidad o bien, porque es más costoso el tratamiento con medicina alópata (Frei *et al.*, 1998). Por esta razón en México, los terapeutas tradicionales (especialistas de la medicina tradicional) representan la única alternativa médica para más de 40 millones de mexicanos que no tienen acceso a los diferentes centros de salud. Está documentado que existen en promedio de cuatro a cinco terapeutas tradicionales por cada médico alópata, cifra que corrobora la importancia que tiene actualmente en México la medicina tradicional, con sus recursos humanos, animales, minerales y vegetales (Lozoya *et al.*, 1987; Lozoya, 1990).

Se estima que en nuestro país entre 3000 y 5000 especies vegetales son usadas medicinalmente (Lozoya, 1990; Argueta *et al.*, 1994), y que dada la diversidad vegetal podrían llegar a ser hasta

20 mil (Aguilar y Martínez, 1993; Estrada y Quezada, 1994). Del total de especies medicinales registradas, la mayoría corresponden a remedios utilizados para curar enfermedades gastrointestinales incluida la diarrea (Argueta *et al.*, 1994; Frei *et al.*, 1998; Ankli *et al.*, 1999), lo que constituye un reflejo de la alta incidencia de este tipo de enfermedades en México (Ruiz, 2007). De hecho, históricamente para Fray Bernandino de Sahagún, Martín de la Cruz y Juan Badiano, las enfermedades gastrointestinales eran las más frecuentes entre los nahuas (Flores, 1982).

Los estudios etnobotánicos de plantas medicinales, pueden ser una fuente de información para encontrar los compuestos bioactivos (Verpoorte, 1998). La búsqueda de nuevos agentes farmacológicamente activos obtenidos de fuentes naturales, ha hecho posible el desarrollo de muchos medicamentos para su uso clínico (Shu, 1998), a pesar de esto, de la riqueza y la variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies de las que se poseen estudios fitoquímicos y farmacológicos es muy escaso (Mata, 1993). Los siglos de uso empírico avalan en la mayoría de los casos, los recursos vegetales utilizados como medicinales, sin embargo, es necesario aplicar el método científico de manera interdisciplinaria para el estudio de las plantas que actualmente están siendo utilizadas como medicinales, es decir, que se aborden aspectos etnobotánicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, entre otros (Verpoorte, 1998; Osuna *et al.*, 2005).

2. Diarrea

2.1 Generalidades

La diarrea es un trastorno sumamente frecuente, en todo el mundo hay más de mil millones de individuos que cada año sufren uno o más accesos de diarrea aguda. Las deficiencias en la higiene y el acceso restringido a los servicios asistenciales explican porque la diarrea infecciosa aguda sigue siendo una de las causas más frecuentes de morbilidad en los países en desarrollo, en particular entre los niños (Kasper *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2006). Su incidencia la ubica como una de las principales causas de morbilidad dentro del grupo de las enfermedades infecciosas (Guerra-Godínez *et al.*, 2003). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea es uno de los cinco principales problemas de salud pública mundial (Terrés y Casas, 2002). La OMS calcula que 1,8 millones de personas mueren cada año debido a enfermedades diarreicas -incluido el cólera-, un 90% de esas personas son niños menores de cinco años principalmente de países en desarrollo, en los que representa un 19% de la mortalidad total en la niñez, siendo la diarrea, la segunda causa de muerte infantil en el mundo. En los países del tercer mundo se debe principalmente al agua contaminada y a un saneamiento deficiente (OMS, 2003a; OMS, 2003b; OMS, 2005; OMS, 2008).

Se ha observado que niños que presentan cinco o más episodios de diarrea aguda al año, no solo disminuyen en talla y peso, sino que también disminuyen en su desarrollo cognoscitivo (Nataro y Kaper, 1998), y aunque en un extremo del espectro la diarrea puede constituir simplemente síntomas molestos, en el otro constituye trastornos graves capaces de amenazar la vida (Kasper *et al.*, 2006).

2.2 Situación de la diarrea en México

En México la diarrea es la segunda causa de morbilidad en la población general y la principal causa de demanda de consulta externa y hospitalaria en los niños menores de cinco años (Terrés y Casas, 2002). La incidencia de enfermedades diarreicas de 1993 al 2000 se incrementó en 40.3%; de 5060.7 casos por cien mil habitantes pasó a 7107.2, debido a la disminución del subregistro y a un posible incremento de las diarreas que en promedio sufre la población (Farthing, 2000).

Se calcula que el síndrome diarreico es el responsable de por lo menos 5 mil defunciones anuales en menores de 5 años (Farthing, 2000). Actualmente se calcula que cada niño mexicano padecerá en promedio dos episodios diarreicos anuales, lo cual tiene un alto impacto económico ya que el costo estimado de hospitales asciende a los 670 dólares sumado a la pérdida de alrededor de 32 horas laborales por parte de los padres (Escobar-Picaso *et al.*, 2006). En México el 80% de las diarreas son producidas por Rotavirus, *Escherichia coli* en especial el serotipo enterotoxigénico, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. (Mota, 2002; Terrés y Casas, 2002). Ramiro *et al.* (2002) reportan que el rotavirus es la segunda causa de hospitalización por diarrea en México solo después de *E. coli*.

En México el 81.3% de las diarreas corresponden al tipo agudo, el 9.5% a diarrea con sangre y el 9.2% a diarrea crónica (Romero y Herrera, 2002).

2.3 Definición y clasificación

La diarrea (del griego y el latín: *dia*, a través, y *rheein*, fluir o correr), se define en sentido amplio como la expulsión de heces no formadas o anormalmente líquidas, con una mayor frecuencia de defecación (Griffith *et al.*, 2003; Kasper *et al.*, 2006). Según la Norma Oficial Mexicana para la atención a la salud del niño (NOM-031-SSA2-1999), la diarrea aguda es la evacuación de tres o más veces en 24 horas, por menos de dos semanas. Para un adulto que consume una dieta que priva en el hemisferio norte occidental, evacuaciones superiores a 200 g/día puede considerarse en general como diarrea (Kasper *et al.*, 2006). Las causas de la diarrea

son innumerables, pero todas las alteraciones de la función intestinal son similares. Dado que el peso de las heces está determinado en gran parte por el agua en las mismas, la mayor parte de los casos de diarrea se originan por trastornos del transporte intestinal de agua y electrolitos (Goodman y Gillman, 1991).

Desde una perspectiva mecánica, la diarrea puede originarse por aumento de la carga osmótica dentro del intestino, lo cual origina retención de agua dentro de la luz; secreción excesiva de electrolitos y agua hacia la luz intestinal, exudación de proteínas y líquido desde la mucosa y alteraciones de la motilidad intestinal, lo cual da lugar a un incremento neto del volumen de las heces y el peso de las mismas, acompañado por un cambio del contenido de agua (Griffith *et al.*, 2003). El objetivo del tratamiento de la diarrea es aumentar la absorción intestinal de agua mediante la reducción del contenido de electrolitos lumbinales, por el aumento de la absorción activa de Na^+ o la disminución de la secreción de aniones, o mediante la disminución de la motilidad intestinal, favoreciendo así la absorción (Goodman y Gillman, 1991).

Es importante reconocer que la diarrea casi siempre se autolimita y que la mortalidad por esta enfermedad se relaciona con las complicaciones, el peligro que conlleva es la pérdida de nutrientes corporales y líquidos, siendo la deshidratación la causa de muerte en cerca de 70% de los casos letales (Álvarez-Larrauri, 1998; Silvia, 2000; Terrés y Casas, 2002; Ruiz, 2007).

Uno de los parámetros que pueden ser utilizados para clasificar a la diarrea, es en función de su duración como; *diarrea aguda*: la que dura menos de dos semanas; *diarrea persistente*: si dura de dos a cuatro semanas y *diarrea crónica*: cuando dura más de cuatro semanas (Kasper *et al.*, 2006 y NOM-031-SSA2-1999).

2.4 Etiología de la diarrea

La etiología de las diarreas es variada. Según ésta, la diarrea se divide en infecciosa y no infecciosa (Mota-Hernández, 2006).

2.4.1 Diarrea infecciosa

Corresponde a más del 90% de los casos de diarrea aguda, y dentro de los agentes infecciosos que la producen se incluyen virus, bacterias, parásitos y hongos; estos casos se manifiestan a menudo acompañados por vómito, fiebre y dolores abdominales (Mota-Hernández, 2006; Kasper *et al.*, 2006).

La mayoría de las diarreas infecciosas se transmiten por vía fecal-oral, a través de contactos personales directos, o con mayor frecuencia al ingerir agua o alimentos contaminados con los microorganismos patógenos que están en las heces de humanos o de animales. En las personas inmunocompetentes, la microbiota fecal saprofita, que abarca a más de 500 especies taxonómicas distintas, rara vez produce diarrea y en realidad puede desempeñar un papel protector, impidiendo la proliferación de agentes patógenos ingeridos. La lesión o infección aguda aparece cuando el agente patógeno ingerido supera a las defensas inmunitarias y no inmunitarias: ácido gástrico, enzimas digestivas, secreción de moco, peristaltismo y microbiota saprofita supresora de las mucosas digestivas del hospedero (Kasper *et al.*, 2006). Entre las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, las comúnmente asociadas a este padecimiento son: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei*, *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* (Coria *et al.*, 2001).

2.4.2 Diarrea no infecciosa

Corresponde al 10% del total de las causas, ésta se debe a medicamentos u otros fármacos, ingestión de sustancias tóxicas, isquemia y sobrealimentación, alimentos hiperosmolares, alergias o hipersensibilidad, hormonas, trastornos psiquiátricos y post-quirúrgicos entre muchas otras causas (Kasper *et al.*, 2006; Mota-Hernández, 2006).

2.5 Prevención social

La incidencia de las diarreas puede ser abatida mediante el mejoramiento de las condiciones del medio y la educación e higiene personal. Para un control efectivo se requieren obras de saneamiento básico, suministro de agua potable y el depósito adecuado de los desechos (Álvarez-Larrauri, 1998).

3. Tratamiento

Cuando se identifica alguna causa primaria de diarrea, además de infecciones comunes, la base del tratamiento se orienta a dicha causa. Hay unas cuantas situaciones en que se requieren tratamientos específicos contra el patógeno bacteriano o parasitario. En términos generales, el tratamiento no debe orientarse de modo específico a alterar la frecuencia de defecaciones ni la consistencia de los excrementos. Los productos contra la motilidad (loperamida, difenoxilato y codeína) se deben usar sólo para controlar por lapsos breves, los síntomas en adultos durante periodos de incomodidad social notable, como los viajes (Murtagh, 2007).

3.1 Rehidratación oral e intravenosa

En el tratamiento del paciente con diarrea, la hidratación oral para la reposición de líquidos y electrolitos tiene importancia esencial, siendo aceptada universalmente como uno de los procedimientos más importantes para prevenir o corregir el desequilibrio hidroelectrolítico, disminuir las complicaciones, los costos de atención y abatir la mortalidad por la enfermedad (Larracilla, 2002; Kasper *et al.*, 2006). Si la diarrea es intensa, para evitar la deshidratación habrá que administrar inmediatamente soluciones con azúcar y electrolitos (bebidas deportivas o un preparado similar) por vía oral. En los pacientes con deshidratación intensa, en particular en lactantes y ancianos, se necesita la rehidratación por vía intravenosa (Kasper *et al.*, 2006).

3.2 Antibióticos

Su uso prudente está indicado en casos escogidos como disentería, cólera o inmunocompromiso (Kasper *et al.*, 2006; Mota-Hernández, 2006). Los principales grupos de antibióticos empleados para tratar las infecciones causadas por enterobacterias son: β -lactamas, quinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas y sulfonamidas (Georgopapadakoü, 2002). Algunos de los efectos adversos que causan los antibióticos son: el incremento de la resistencia bacteriana, los

costos elevados del tratamiento, las reacciones alérgicas y sobre todo la destrucción de la microbiota bacteriana normal que favorece la colonización de gérmenes potencialmente patógenos y predispone al huésped a adquirir infecciones sistémicas graves (Gutiérrez-Camacho *et al.*, 1997).

3.3 Otros fármacos

En la diarrea de grado moderado, sin fiebre ni sangre en las heces, la Loperamida, que inhibe la secreción y la motilidad intestinal, puede aliviar los síntomas, no obstante, es mejor no usar este tipo de fármacos en los pacientes con disentería febril, porque puede agravar o prolongar la duración de la diarrea (Kasper *et al.*, 2006). El efecto adverso de mayor frecuencia son los cólicos (Gutstein y Akil, 2003), además pueden presentarse mareos, vértigo, resequedad de la mucosa bucal, erupción en la piel, alteraciones gástricas y fatiga (Ritter *et al.*, 1999; Kalant y Roschlau, 2002). Su uso excesivo, especialmente en niños puede ser fatal (Ritter *et al.*, 1999), pues la dosis excesiva puede conducir a depresión del sistema nervioso central e íleon paralítico (Jafri y Pasricha, 2003).

4. La búsqueda de nuevos tratamientos

4.1 Estudio de plantas medicinales

Además de las terapias medicas modernas, el uso de plantas medicinales en el tratamiento de las diarreas es una práctica frecuente en innumerables países. Dichas especies vegetales son consideradas como fuentes potenciales de compuestos con actividad antiespasmódica y/o moléculas modelo para la síntesis de nuevos fármacos (Astudille-Vázquez *et al.*, 2009). Además, dado al incremento de la resistencia de muchos patógenos comunes a agentes quimioterapéuticos, existe un renovado interés en el descubrimiento de nuevos compuestos que puedan ser usados para combatir las enfermedades infecciosas (Enzo, 2006).

Existen numerosos estudios que han servido para validar el uso tradicional de plantas medicinales para tratar o prevenir la diarrea (Enzo, 2006). La forma de evidenciar el efecto antidiarreico de una especie vegetal incluye modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Astudille-Vázquez *et al.*, 2009).

Muchos extractos de plantas han sido seleccionados por su actividad antimicrobiana, mientras que otros han sido investigados por otras propiedades antidiarreicas. Los extractos pueden exhibir efectos antiespasmódicos, retardo del tránsito intestinal, suprimir la motilidad intestinal, estimular la absorción de agua o reducir la secreción de electrolitos. Estas actividades, junto con la actividad antimicrobiana, pueden ayudar a explicar los beneficios de la utilización de determinadas plantas en el tratamiento de las enfermedades diarreicas (Enzo, 2006), y son la base de la evaluación farmacológica de un potencial agente antidiarreico (Astudille-Vázquez *et al.*, 2009).

Astudille-Vazquez *et al.* (2009) revisaron 242 estudios realizados entre 1972 y 2008 de plantas con actividades antiespasmódicas, gastrointestinales y antidiarreicas provenientes de 101

familias botánicas. Encontraron que el 45.4% de las especies estudiadas se distribuían en sólo 8 familias botánicas, en primer lugar se encuentra la familia Asteraceae (27%) en la que se concentró el mayor número de especies con efectos antiespasmódicos y/o antidiarreicos, le siguieron las Fabaceae (21%) y Lamiaceae (18%). Con frecuencias menores se encontraron a las familias Euphorbiaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Verbenaceae y Apocynaceae.

La detección de la familia Asteraceae coincide con los resultados de Tortoriello *et al.* (1995), sobre plantas medicinales empleadas en padecimientos gastrointestinales y respiratorios en Chiapas (México). Así mismo las plantas más estudiadas fueron *Psidium guajava* (Guayabo), *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), *Ocimum gratissimum* (Orégano cimarrón) y *Acorus calamus* (Cálamo). La experimentación *in vitro* (58%) fue más frecuente con respecto a la *in vivo* (42%). Los tipos de compuestos antiespasmódicos encontrados corresponden a flavonoides (33%), terpenos (25.3%) y alcaloides (22%).

Sobre la distribución geográfica los autores mencionan que en los países asiáticos es donde se han estudiado más las especies vegetales (34% de los estudios), seguido por América, Europa y por ultimo África. Sin embargo, es importante mencionar que al considerar los estudio sobre aceites esenciales, fracciones activas y compuestos puros, son los países europeos en donde se ha trabajado más (17%), seguidos por América (14%) y Asia (12%). También observaron que muchos de los estudios realizados en los países denominados “desarrollados”, se efectuaron con especies vegetales que forman parte de la medicina tradicional de los países llamados “en vías de desarrollo”. Dichos resultados están relacionados indudablemente, con las condiciones socioeconómicas de cada lugar y confirman lo expresado por Soejarto *et al.* (1996) respecto a la existencia de países que son ricos en tecnología y países que son ricos en biodiversidad. En última instancia, la variable económica es determinante en la profundidad del estudio de una planta medicinal (Astudille-Vázquez *et al.*, 2009).

Por otro lado, el tamizaje fitoquímico de los extractos bioactivos de plantas que se utilizan como antidiarreicas en la medicina tradicional, ha revelado la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, terpenos, hidratos de carbono, lactonas, proteínas, aminoácidos, glucósidos y saponinas. De estos, los taninos, fenoles, saponinas, alcaloides y flavonoides se

han relacionado o se ha sugerido que están involucrados en la actividad antibacteriana y antiviral, mientras que los taninos y flavonoides se cree que son responsables de otras actividades con efectos antidiarreicos. Las investigaciones sobre el modo de acción indican que los taninos y flavonoides aumentan el agua del colon y la reabsorción de electrolitos, mientras que otros fitoquímicos actúan por inhibición de la motilidad intestinal (Enzo, 2006).

Ciertamente las pruebas aportadas por los estudios recientes de las terapias basadas en plantas, alienta una mayor investigación en la expectativa de que los tratamientos alternativos para enfermedades diarreicas alcanzará un mayor desarrollo (Enzo, 2006).

4.2 Otras alternativas de tratamiento

4.2.1 Vacunas

Una de las formas con las que se está intentando atacar a los agentes infecciosos, en particular los causantes de enfermedades diarreicas, es por medio de vacunas. De éstas, las vacunas frente a los procesos diarreicos debidos a rotavirus están en una etapa de desarrollo muy avanzada y actualmente son comercializadas, en contraste con lo que ha sucedido con las infecciones gastrointestinales producidas por bacterias, que no disponen hasta el momento, de vacunas más recientes o más eficaces (Ciro, 2004; Sáenz, 2005). Se han realizado múltiples trabajos de investigación con vacunas experimentales contra *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* y diferentes especies del género *Salmonella*, (Sáenz, 2005). Y aunque los diferentes patógenos capaces de producir enfermedades diarreica apenas suponen una docena, la diversidad de cepas y de antígenos son el principal obstáculo para el desarrollo de vacunas eficaces (Álvarez, 2008).

Así, los principales avances logrados en el desarrollo de vacunas frente a algunos patógenos que causan enfermedades diarreicas son los siguientes:

Rotavirus

En 1998, los Estados Unidos de Norteamérica (EU) fue el primer país en autorizar y recomendar la vacunación contra rotavirus para todos los niños como parte de un programa rutinario de inmunización infantil (Ciro, 2004), en este mismo año se aprobó una vacuna viva reasortante tetravalente oral, denominada *Rhesus Rotavirus Vaccine (RRV-TV-Rota Shield)*, sin embargo tiempo después fue retirada del mercado por el riesgo de invaginación intestinal asociada a su administración (Sáenz, 2005). En la actualidad están en proceso de desarrollo al menos siete vacunas en diversas fases de prueba (Ciro, 2004). Un hecho importante es el desarrollo de la vacuna *Rotarix*® de virus atenuados, la vacuna es segura y bien tolerada y fue aprobada por las autoridades sanitarias de México, por lo que el programa de vacunación se inició el 2005, esto constituyó el primer paso para el lanzamiento global de una vacuna contra los rotavirus (Sáenz, 2005).

Campylobacter jejuni

La inmunidad a *C. jejuni* parece ser específica de cepa y los antígenos que confieren inmunidad no son bien conocidos. El Instituto Médico de Investigación de la Armada de EU desarrolló una vacuna candidata que consiste en células enteras inactivadas combinadas con la toxina *TL* de *E. coli* como adyuvante de mucosa (Baqar *et al.*, 1995), en investigaciones con animales se vio que una dosis única tuvo una eficacia del 87% (Álvarez, 2008). Se están desarrollando otras estrategias de vacunación teniendo en cuenta la flagelina de *C. jejuni*, se ha evaluado una vacuna recombinante de la subunidad flagelina en ratones en una sola dosis intranasal con toxina *TL* que confirió protección de más del 80% (Lee *et al.*, 1999).

Vibrio cholerae

La vacuna del cólera se investiga preferentemente con el fin de evitar la diarrea del viajero. El objetivo de la inmunización es proteger directamente a niños y viajeros que se trasladan a zonas endémicas (Sáenz, 2005). Se ha autorizado el uso de dos modernas vacunas orales contra el cólera en numerosos países (Ciro, 2004). Una de las vacunas contiene microorganismos muertos de *V. cholerae* O1 inactivado, se administra junto con la subunidad *B* de la toxina del

cólera (Holmgren *et al.*, 1992). La otra vacuna es una cepa atenuada de *V. cholerae* O, elaborada con técnicas de ingeniería genética, empleada como vacuna oral de microorganismos vivos de una sola dosis (Levine y Kaper, 1995; Sáenz, 2005). La eficacia vacunal obtenida hasta ahora con ambas no ha sido alta, se desconoce su efectividad en áreas endémicas y sólo se recomienda su uso en situaciones catastróficas (Sáenz, 2005). América Latina y Asia han sido sitios de importantes ensayos clínicos y prácticos de estas vacunas (Ciro, 2004).

E. coli enterotoxigénica

Se ha preparado una vacuna segura e inmunógena que contiene cinco cepas inactivadas de *E. coli* enterotoxigénica que en su conjunto expresan las principales variantes de los factores antigénicos de colonización, otras vacunas que se investigan son de liposomas, también se investiga una comestible, en la cual el antígeno *LT* se incluye en la planta (Sáenz, 2005).

Salmonella spp.

Las estrategias seguidas para el desarrollo de estas vacunas han estado dirigidas, casi en su totalidad, a la obtención de preparados inmunizantes contra *S. typhi* para uso humano y al de vacunas con *S. typhimurium* o *S. enteritidis* para uso veterinario, tratando de prevenir la infección en los portadores que funcionan como reservorio (Sáenz, 2005). Los extensos brotes de fiebre tifoidea resistente al cloramfenicol ocurridos en México (1972), Viet Nam (1973) y Perú (1980) estimularon el desarrollo de una nueva generación de vacunas (Ciro, 2004), dicha estrategia se sigue actualmente contra *S. typhi* y consiste en utilizar como inmunógeno el polisacárido *Vi* purificado, o bien, emplear cepas atenuadas por vía oral (Sáenz, 2005). Distintos ensayos con la vacuna *Vi*, cuya inmunogenicidad se potencia conjugando el polisacárido a una proteína portadora, han demostrado que una sola dosis tiene una eficacia del 72 al 80% (Ciro, 2004 y Sáenz, 2005). Existe otro modelo, la vacuna *Ty 21a*, que ha sido extensamente probada en Egipto y Chile, recomendada como vacuna para viajeros internacionales (Ciro, 2004 y Sáenz, 2005). También existen varios candidatos vacunales de cepas de *Salmonella* atenuadas por ingeniería genética y aún en fase muy precoz de investigación (Sáenz, 2005). Se prevé que en los próximos años la vacuna conjugada de

polisacáridos *Vi* y por lo menos una vacuna oral atenuada de microorganismos vivos elaborada con técnicas de ingeniería genética pasarán a formar parte de los productos de venta autorizada (Ciro, 2004).

Shigella spp.

Las observaciones hechas en varios lugares han mostrado que la exposición natural o experimental a los antígenos de *Shigella* provoca inmunidad clínica, que indica la factibilidad de desarrollar una vacuna eficaz. Se ha visto que dicha inmunidad es específica de los serotipos, lo que ha llevado a reconocer que la fracción *O* del lipopolisacárido es un antígeno de importancia crítica para inclusión en una vacuna (Ciro, 2004). Actualmente hay tres enfoques que están en proceso activo para el desarrollo de la vacuna: vacunas parenterales conjugadas de polisacáridos específicos de *O*, vacunas nasales de proteosomas transportadores de lipopolisacáridos de *Shigella* y vacunas de mutantes invasores vivos atenuados de *Shigella* creados por supresión para administración oral (Ciro, 2004 y Sáenz, 2005).

4.2.2 Fitomedicamentos

Son escasos los estudios de medicamentos herbolarios estandarizados, Astudille-Vazquez *et al.* (2009) detectaron solamente 11 preparaciones estudiadas como antiespasmódicos y que están indicados contra la diarrea, en el cuadro 1 se presenta un listado de estos.

Cuadro 1. Preparaciones estudiadas como antiespasmódicos y que están indicadas contra la diarrea (Astudille-Vazquez et al., 2009).

Nombre comercial	Especie vegetal	Parte usada	Referencia/País
Kamillosan®	<i>Matricaria chamomilla</i>	Parte aérea	Achterrath-Tuckermann <i>et al.</i> , 1980. (Alemania).
Pecarin®	<i>Ribes nigrum</i>	Fruto	Kyerematen y Sandberg, 1986. (Suecia).
Suspensión oral	<i>Psidium guajava</i>	Polvo de hoja	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2000. (Cuba).

QG-5®	<i>Psidium guajava</i>	Hoja	Lozoya <i>et al.</i> , 2002. (México).	
Mebarid®	<i>Holarrhena antidysenterica</i>	Corteza	Bafna y Bodhankar, 2003. (India).	
	<i>Berberis aristata</i>	Tallo		
	<i>Aegle marmelos</i>	Fruto y raíz		
	<i>Punica granatum</i>	Cáscara		
	<i>Myristica fragrans</i>	Fruto		
	<i>Salmalia malabarica</i>	Goma-exudado		
	<i>Panchamrut parpati</i>			
Dai-kenchu-to	<i>Panax ginseng</i>	Raíz	Hashimoto <i>et al.</i> , 2003. (Japón).	
ColiMil®	<i>Matricaria recutita</i>		Capasso <i>et al.</i> , 2007. (Italia).	
	<i>Foeniculum vulgare</i>			
	<i>Melissa officinalis</i>			
Iberogast® (STW5)	<i>Liquiritiae radix</i>	Raíz	Ammon <i>et al.</i> , 2006. (Alemania).	
	<i>Angelicae radix</i>			
	<i>Carvi fructus</i>	Fruto		
	<i>Silybi mariani</i>			
	<i>Matricariae flos</i>	Flor		
	<i>Chelidonii herba</i>	Planta		
	<i>Iberus amara</i>			
	<i>Menthae piperitae</i>	Hoja		
	<i>Melissae folium</i>			
Soonkijangquebo™ (SKJQB)	<i>Amomum xanthioides</i>	Semilla	Ryu <i>et al.</i> , 2004. (Korea).	
	<i>Astragalus membranaceus</i>	Raíz		
	<i>Atractylodes coreana</i>			
	<i>Polgonum multiflorum</i>			
	<i>Paeonia japonica</i>			
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>			
	<i>Peuraria thunbergiana</i>			
	<i>Zingiber officinale</i>			
	<i>Citrus unshiu</i>			Fruto
	<i>Zizyphus jujuba,</i>			
	<i>Poria cocos</i>	Tallo		
		<i>Teucrium japonicum</i>		Hoja

En relación con la aceptación y uso de la herbolaria en la práctica médica en México, Taddei-Bringas *et al.* (1999) realizaron un estudio en una unidad urbana de medicina familiar del

Instituto Mexicano del Seguro Social en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Los resultados de la encuesta aplicada a 60 médicos (entre otros participantes), indicaron que 85 % conocían y aceptaban la herbolaria y que 75 % la utilizaban. Posteriormente, en relación al conocimiento sobre fitofármacos, se preguntó a 264 médicos que atendían en primer nivel en el sistema público de salud o en el sector privado del Estado de Morelos, los resultados señalaron que 90.2 % de los participantes quedó incluido en el rubro “conocimiento deficiente” sobre medicamentos herbolarios (Romero *et al.*, 2005). Estos aspectos son de interés porque la comunidad médica es un factor importante en la implementación del uso de fitofármacos (Astudille-Vazquez *et al.*, 2009).

Así pues, ante el panorama socio-económico que se avizora en los países económicamente dependientes como México, la necesidad de contar con fitofármacos perfectamente estandarizados en cuanto a su concentración de compuestos activos, dosis, bioequivalencia, efectos colaterales, evaluaciones sobre su toxicidad, etc. para dar respuesta a los requerimientos de salud de una población en crecimiento, debe ser prioritaria dentro de los programas de salud pública (Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

5. Planta medicinal en estudio

5.1 El género *Vitex*

Vitex es uno de los géneros más numeroso, comprende 250 a 270 especies -o más según el autor- distribuidas en todo el mundo, entre árboles y arbustos que se encuentran en regiones del trópico y sub-trópico (Mejía, 2002; Ganapaty y Vidyadhar, 2005). Recientemente el género *Vitex* se ha clasificado dentro de la familia Lamiaceae -Labiadas- y anteriormente en la familia Verbenaceae (Paton *et al.*, 2000).

Una gran variedad de especies de *Vitex* se usan como remedios por el pueblo mexicano (Mejía, 2002; Meena *et al.*, 2010). Y ha sido motivo de estudios en países como China, India, Alemania y más recientemente en México (Mejía, 2002); sólo 28 especies se han estudiado fitoquímicamente (Ganapaty y Vidyadhar, 2005) y de éstas, 15 han sido ampliamente estudiadas (Padmalatha, 2009), siendo las más estudiadas *V. negundo* y *V. rotundifolia* (Mejía, 2002). Para el caso de *V. pyramidata* la planta en estudio de este trabajo, no existen hasta la fecha estudios fitoquímicos ni farmacológicos de ningún tipo que validen su uso en la medicina tradicional como antidiarreico o para alguno de sus otros usos.

Hay varias especies del género *Vitex* que han sido reportadas en diversos estudios etnobotánicos cuyo principal uso en la medicina tradicional es el antidiarreico y para afecciones gastrointestinales, como *V. pyramidata*, *V. pubescens*, *V. agnus-castus*, *V. doniana*, *V. mollis* y *V. gaumeri* (Argueta *et al.*, 1994; Ahmad y Holdsworth, 1995; Bajpai *et al.*, 1995; Ladeji *et al.*, 2004). De estas *V. gaumeri* y *V. pyramidata* siguen sin estudios, y *V. doniana* es la única en la que se ha evaluado su actividad sobre el músculo uterino y músculo liso intestinal (Agunu *et al.*, 2005; Ladeji *et al.*, 2004).

5.2 *Vitex pyramidata* Robinson Proc. Amer. Acad. 29: 321. 1894.

Esta planta es conocida con el nombre de querenguerénicua en Michoacán; querengue en Guerrero; cuata, cuatu, cuato, *bitsha* y *bitasha* (Cora) en Nayarit; negrito, coyote, ju?? y tescalama en Sinaloa; coyotomate y capulín entre otros nombres (Martínez, 1959; Gispert y Rodríguez, 1998; Ejemplares de herbario). Botánicamente la planta no tiene sinonimias reportadas (Tropicos, 2011).

Su distribución abarca varios países del continente americano como Honduras, Jamaica y México, encontrándose en este último país en los estados de Chihuahua, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco (Ejemplar tipo; Tequila), México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Sonora y Yucatán (Fig. 1), siendo su distribución altitudinal de los 180 a los 1550 m y encontrándose principalmente en vegetación de selva baja (Tropicos, 2011; Ejemplares de herbario).

La floración y fructificación varía dependiendo de la zona geográfica. Los registros que se obtuvieron a partir de ejemplares de herbario indican que la floración inicia desde marzo y se prolonga hasta octubre presentándose la mayoría de los registros en el mes de julio. Así mismo, la fructificación inicia en marzo llegando hasta noviembre, presentándose el máximo de registros en los meses de septiembre y octubre.



Figura 1. Distribución de *V. pyramidata* en la República Mexicana (DLIFE, 2011).

5.2.1 Descripción botánica

Arbusto o algunas veces árbol alto de hasta 15 metros de altura; hojas largas pecioladas, las 5 hojuelas elípticas lanceoladas a oblongas, de 18 cm de largo o menos, redondeada a acuminada en el ápice, obtusa o redondeada en la base, haz glabro, envés densamente tomentoso-grisáceo; flores en cimas paniculadas, las panículas axilares, piramidales, con muchas flores blanco rosadas a moradas, tan largas como las hojas; fruto carnosos cercano a 1 cm de diámetro negro azulado (Fig. 2) (Standley, 1912; Martínez, 1959; Argueta *et al.*, 1994).



Figura 2. Ejemplar de *V. pyramidata* del que se obtuvo parte del material vegetal y detalle de sus hojas e infrutescencias.

5.2.2 Uso medicinal de la planta

Su principal uso es para contrarrestar la diarrea -Estado de México-, y la soltura en Nayarit (Martínez, 1959; Argueta *et al.*, 1994; Gisper y Rodríguez, 1998). Generalmente se usa la hoja en cocimiento, aunque puede emplearse el fruto o toda la planta (Argueta *et al.*, 1994). Para la diarrea se usa el cocimiento de frutos y hojas (Martínez, 1959), también se pueden preparar sus

hojas junto con las de otras plantas como de Kualamo (*Vitex mollis*) y guayaba (*Psidium guajava*) usándose dos hojas de cada planta y cociéndose en un litro de agua, el agua resultante se bebe como agua de uso –esta última preparación también está indicada para la soltura- (Gispert y Rodríguez, 1998). Otra forma de preparación es remojar hasta que el agua adquiera una coloración azul claro (Argueta *et al.*, 1994; Gispert y Rodríguez, 1998).

La planta se utiliza también contra la tos –uso que se le da en la localidad donde se colectó el material vegetal para el presente trabajo de investigación-, como “pectoral”, para regular la menstruación y curar el “mal de orín”, para tratar la mordedura de animales ponzoñosos y contra el “virtilinque pinto blanco” (Vitiligo) (Argueta *et al.*, 1994). Sus usos medicinales siguen vigentes en la actualidad (BDMTM, 2011).

En el siglo XX, Maximino Martínez (Martínez, 1969 (1934)) la reporta como *alexitere* antidiarreico y expectorante; dice que regula la menstruación, como “pectoral” y para tratar el piquete de alacrán (Argueta *et al.*, 1994).

6. Justificación y objetivos

6.1 Justificación

Por la gran importancia que tiene la diarrea en México y en el mundo, los efectos adversos de los fármacos convencionales utilizados para la enfermedad, la resistencia de algunos patógenos, el uso medicinal tradicional que se le da a *Vitex pyramidata* y la falta de estudios de ésta, es importante realizar investigación que busque además de nuevas alternativas para el tratamiento de la diarrea, conocimiento que valide su uso tradicional.

6.2 Objetivo General

Evaluar el potencial antidiarreico *in vitro*, *in vivo* y antibacteriano de los extractos orgánicos de hoja, corteza y fruto de *Vitex pyramidata* usada en la medicina tradicional mexicana.

6.3 Objetivos particulares

- Evaluar el potencial antidiarreico *in vitro* de los extractos orgánicos de hoja, corteza y fruto de *V. pyramidata* por medio de su actividad antimotílica en intestino aislado de rata.
- Evaluar el potencial antidiarreico *in vivo* de los extractos seleccionados de *V. pyramidata* por el modelo farmacológico de motilidad gastrointestinal en ratón.
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos orgánicos de hoja, corteza y fruto de *V. pyramidata* por medio del método de dilución en agar.

7. Hipótesis

Si el uso de *V. pyramidata* reportado en estudios etnobotánicos en cuanto a la utilización de sus hojas, corteza y frutos como antidiarreicos en la medicina tradicional mexicana es correcto, entonces los extractos orgánicos o alguno de ellos, mostrarán actividad antimotílica sobre el intestino y/o antibacterial en los modelos utilizados.

8. Trabajo de gabinete y campo

8.1 Visita a herbarios

Se visitaron tres herbarios; Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología de la UNAM, Herbario Medicinal del IMSS en el Centro Médico Nacional Siglo XXI y el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, para obtener datos sobre la distribución, fenología y ver las características de la planta en estudio para su reconocimiento en campo, revisándose un total de 45 ejemplares.

8.2 Sitio de colecta

Las hojas, corteza y frutos fueron colectados en los meses de octubre y noviembre de tres ejemplares de *V. pyramidata* en el Municipio de Carácuaro Michoacán, entre las poblaciones de Paso de Núñez y El Carrizal ($18^{\circ} 53'12''$ N y $100^{\circ} 55'40''$ O), a una altitud de 846 m, (Fig. 3). Dicho Municipio se localiza al sureste del estado, y limita al norte con Nocupétaro y Madero, al este con Tiquicheo, al sur con Huetamo y al oeste con Turicato y Nocupétaro.

Su relieve lo constituyen las estribaciones meridionales del Sistema Volcánico Transversal, y los cerros de Santa Teresa, San Francisco, Pílon y Zacapungamio. Su clima es tropical con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 749.3 milímetros, con temperaturas que oscilan de 19.7 a 33.4°C . En el Municipio predomina el bosque tropical con parota y tepeguaje (EMDM, 2010), la presencia de los árboles de *V. pyramidata* es escasa en la localidad.

8.3 Ejemplares de referencia

Los ejemplares de referencia fueron depositados en el Herbario Medicinal del IMSS con el No. de registro IMSSM 15723.

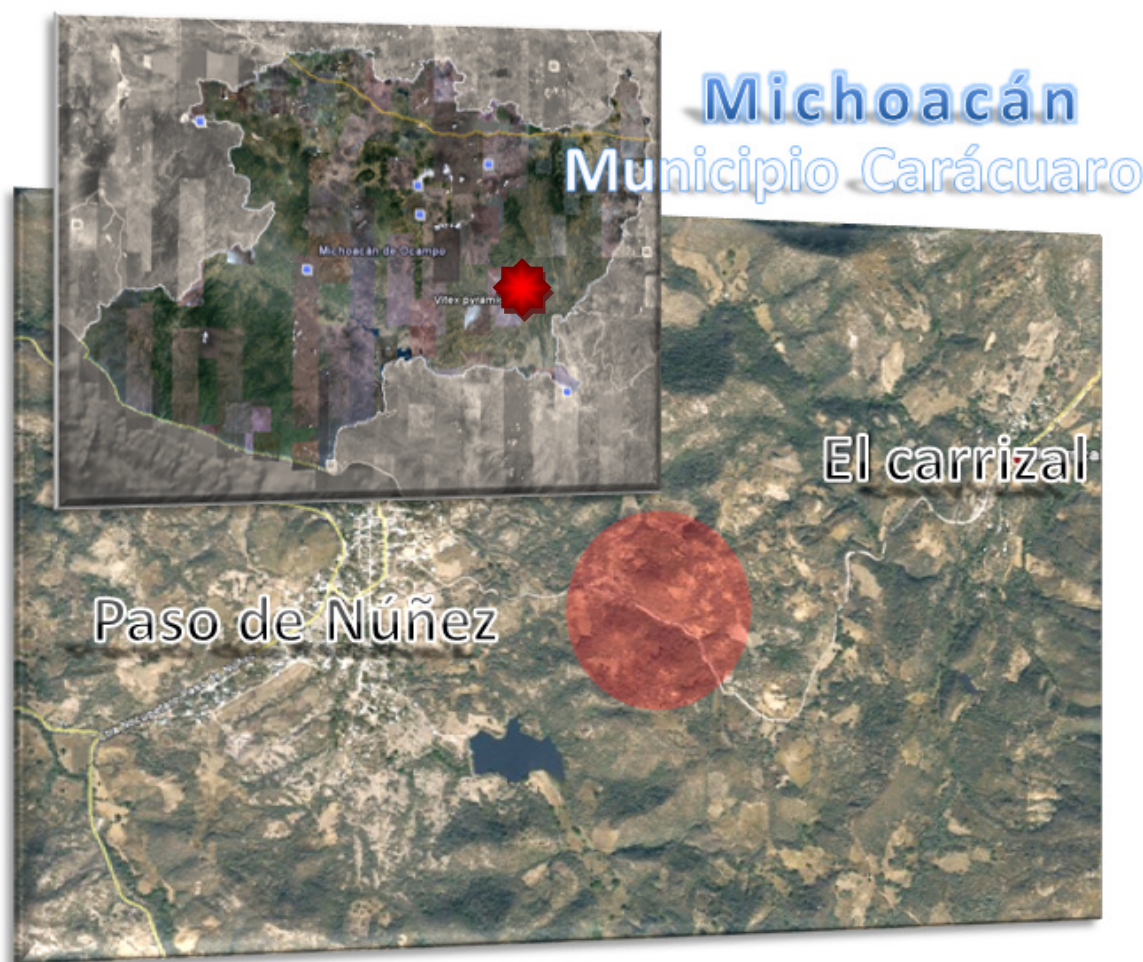


Figura 3. Mapa del estado de Michoacán; con la marca la localidad donde se obtuvo el material vegetal, y detalle del camino entre la población Paso de Núñez y El Carrizal (Modificado de Google Maps).

8.4 Preparación de los extractos

Las hojas, corteza y frutos se pusieron a secar por varias semanas a temperatura ambiente, sin luz directa del sol y en un lugar ventilado hasta que se secaron completamente. Posteriormente se molieron por separado las tres partes vegetales hasta obtener un polvo grueso del que se tomaron 50, 90 y 71 g respectivamente para obtener cada uno de los extractos.

Se prepararon tres extractos para cada parte vegetal usándose disolventes orgánicos de diferentes polaridades; hexano, diclorometano y metanol (polaridad creciente). Utilizando un equipo Soxhlet en el que se colocó el material vegetal previamente molido en un cartucho de

papel filtro, realizándose la extracción durante ocho horas dos veces con cada solvente. Los extractos fueron concentrados por medio de un rotavapor; una vez completamente secos, se calcularon sus rendimientos usando la expresión: $\text{rendimiento} = (\text{peso del extracto seco (g)} / \text{peso del material vegetal (g)}) \times 100$ (Fig. 4).

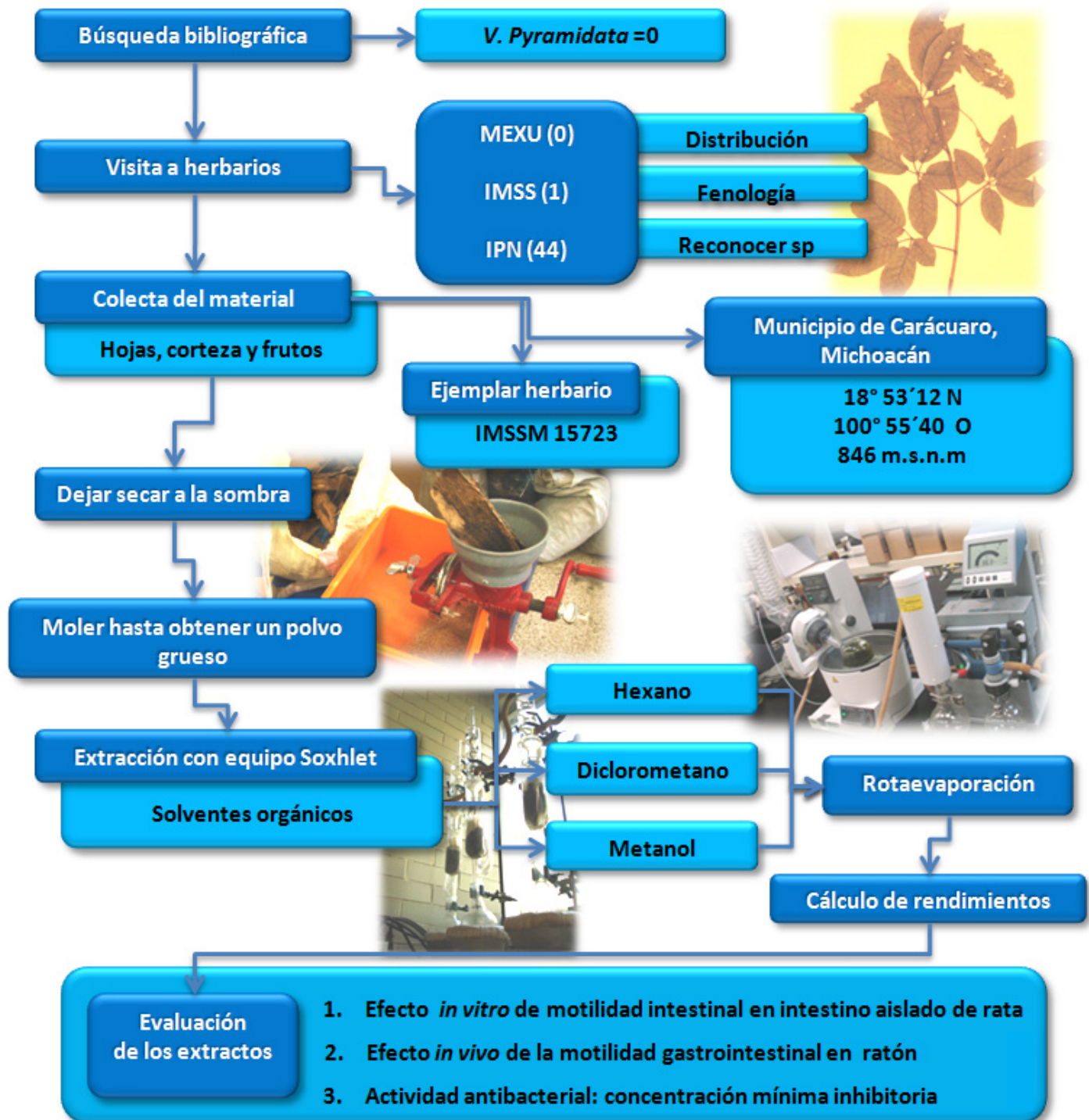


Figura 4. Diagrama del procedimiento general llevado a cabo en el presente estudio.

9. Selección de los extractos con mayor actividad antimotílica *in vitro* en intestino aislado de rata

Las pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología de Animales II de la Facultad de Ciencias de la UNAM bajo la asesoría del M. en C. Enrique Moreno Sáenz, para seleccionar los extractos de hoja, corteza y fruto con mayor actividad en reducir los movimientos peristálticos en un modelo farmacológico *in vitro* en intestino aislado de rata.

9.1 Animales utilizados

Se usaron ratas Wistar y Long-Evans macho con un peso aproximado de 150 a 200 g provenientes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular siguiendo la Norma Oficial Mexicana sobre la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999, criadas en condiciones estándar, manteniéndolas a temperatura ambiente con libre acceso a agua y alimento; exceptuando este último las 6 horas previas al experimento.

9.2 Obtención de la muestra y montaje de la preparación

Las ratas se sacrificaron por medio de dislocación cervical previo adormecimiento con éter. Inmediatamente después se realizó la disección del animal localizándose el primer segmento del intestino; se seccionaron 5 a 6 cm del tejido separándolo del mesenterio con el que está unido procurando no afectar al tejido, manteniéndolo en todo momento inmerso en solución fisiológica Krebs (Anexo A).

El tejido se colocó en una caja petri que contenía solución Krebs a 37 °C, donde se limpió cuidadosamente de tejido adiposo y conjuntivo, de este tejido se seleccionaron los primeros 3 cm de la parte proximal al estómago. La preparación se suspendió en la cámara de tejidos aislados mediante hilos de algodón que atravesaban los extremos del intestino sin ocluir la luz

intestinal; la parte proximal al estómago se colocó hacia la parte superior de la cámara, sujetándola a un traductor de fuerza de 10 g, mientras que la parte inferior fue atada a la base de la cámara (Fig. 5). El transductor de fuerza estaba conectado a un Bridge 8.

La preparación se sometió a una tensión moderada, misma que se mantuvo durante el experimento; se dejó la preparación hasta que los movimientos peristálticos se estabilizaran; aproximadamente de 15 a 30 minutos, cambiándose la solución Krebs a 37 °C al menos cada 15 minutos. Así mismo, para evitar pérdidas de calor durante el desarrollo del experimento, se añadió agua a 37°C en el compartimento externo de la cámara con el mismo intervalo de tiempo y entre la evaluación de cada extracto.

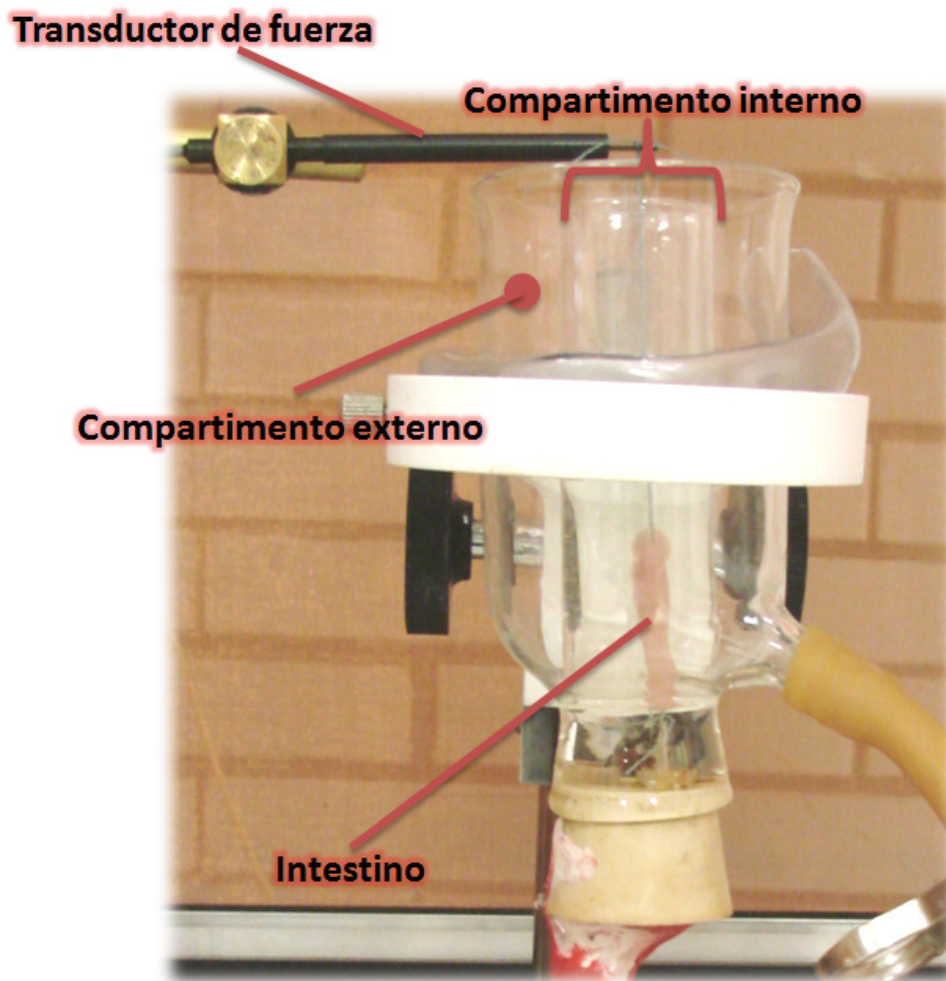


Figura 5. Cámara de órganos aislados con una muestra de intestino conectado al transductor de fuerza.

9.3 Evaluación de los extractos de *V. pyramidata*

Se expuso el tejido a los diferentes extractos; hexano, diclorometano y metanol de hoja, corteza y fruto de *V. pyramidata* en una concentración de 150µg/ml, la que se consideró como una dosis media con base en la revisión bibliográfica en modelos similares. Se uso como vehículo solución Krebs con 20µL de Tween 80, y el control negativo fue la solución Krebs con tween 80.

9.4 Toma de registros

El extracto se colocó después de que se retiraron 20 ml de solución de la cámara de 40 ml en la que estaba inmersa la preparación, posteriormente se adicionó 20 ml de solución Krebs con el extracto disuelto. Entre la prueba de cada extracto se hicieron dos lavados con solución Krebs de tres minutos cada uno, después de los cuales se llenó la cámara con 40 ml y se esperó a que la actividad de la preparación se normalizara para probar un nuevo extracto. Con cada preparación se ensayaron de tres a cuatro extractos, tomándose un total de cuatro registros por extracto (Fig 6).

Las respuestas de la actividad intestinal se capturó mediante la ayuda del software AcqKnowledge ® para ser analizados posteriormente. Los datos consistieron en un registro basal preaplicación con duración de 5 minutos y un registro postaplicación del extracto correspondiente de igual duración.

Se evaluaron tres parámetros: frecuencia, tensión basal y amplitud de las contracciones (Fig. 7). Los registros pre-aplicación (A) fueron considerados el estado normal del intestino y los post-aplicación (B) un reflejo del efecto de la sustancia evaluada -extracto o vehículo- sobre la actividad del intestino, calculándose de esta forma los porcentajes de actividad con respecto a los valores pre-aplicación para cada uno de estos tres parámetros después de aplicar la

sustancia. Para esto se empleó la expresión: % actividad respecto a pre-aplicación= $(B/A) \times 100$. A dichos porcentajes se les restó 100 para calcular el porcentaje de cambio, en el que se obtienen valores negativos en caso de que la sustancia evaluada haya disminuido el parámetro o positivos en caso contrario.

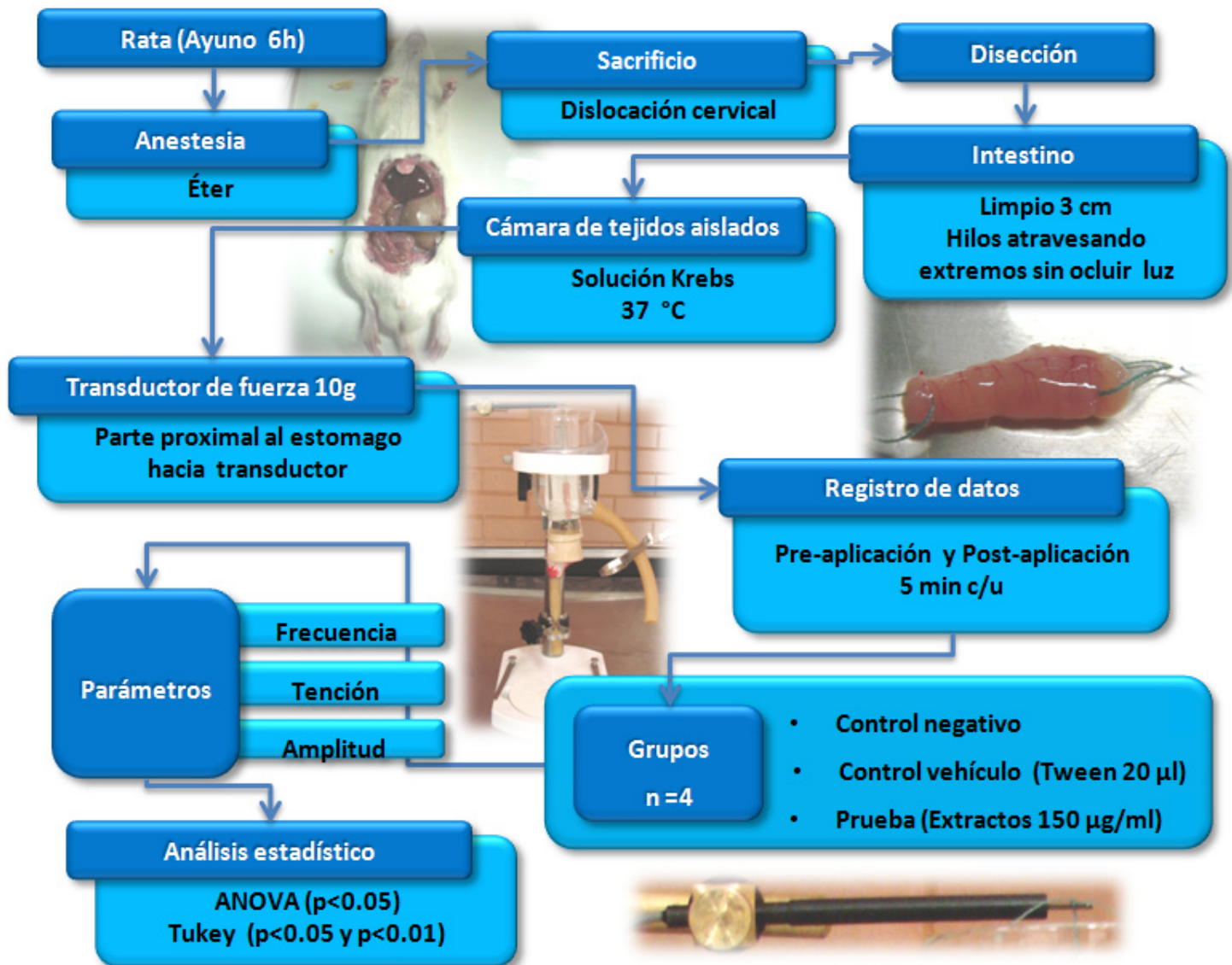


Figura 6. Diagrama del procedimiento para la selección de los extractos con mayor actividad antimotilica *in vitro* en intestino aislado de rata.

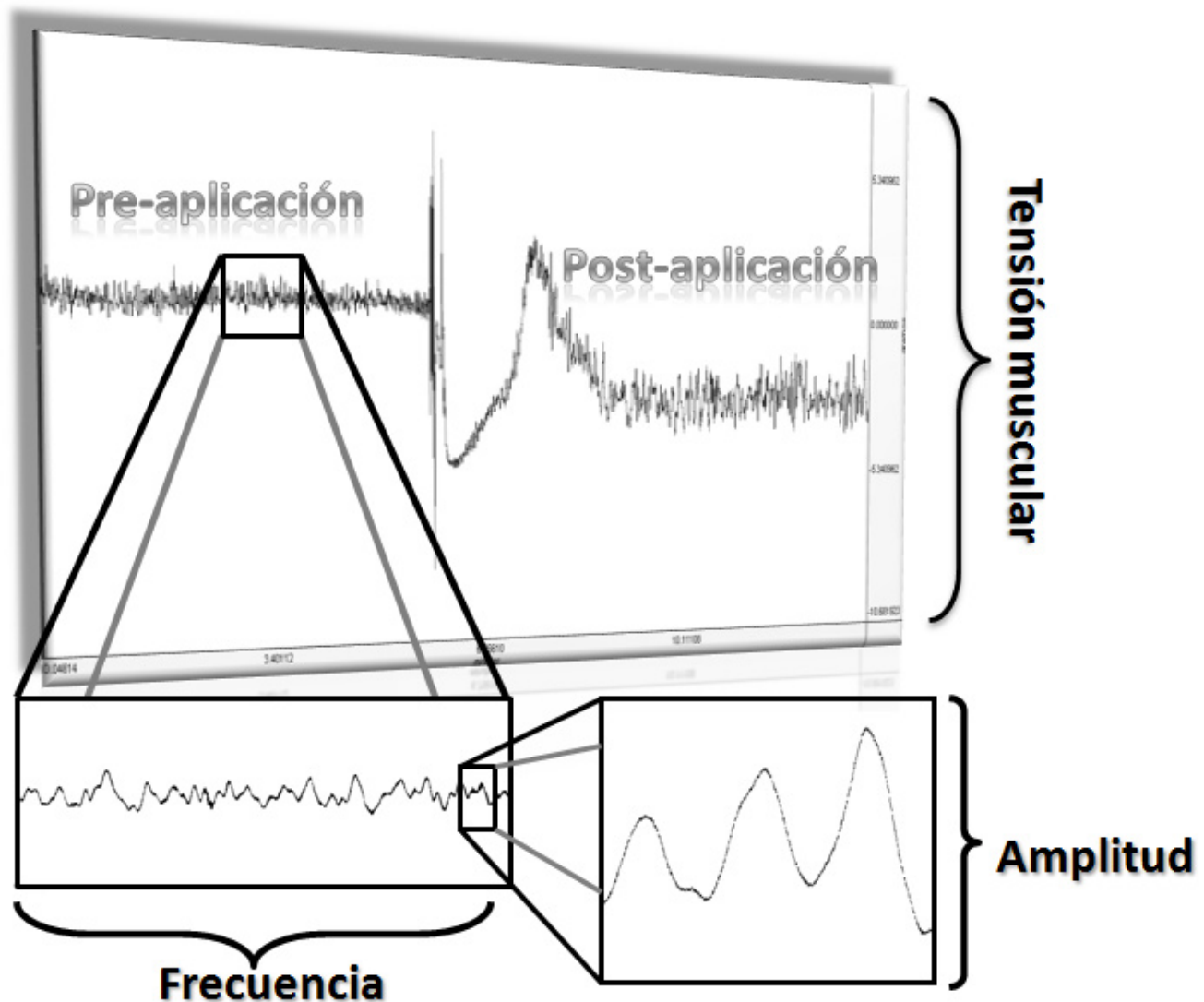


Figura 7. Ejemplo de uno de los registros obtenidos mostrando los tres parámetros evaluados en el modelo *in vitro*: frecuencia, amplitud y tensión.

9.5 Análisis estadístico

Los valores presentados son las medias de los porcentajes de cambio $\pm$ ESM (error estándar de la media), los cuales fueron calculados en Excel ®. Los datos de porcentaje de cambio se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje sobre cien, a fin de normalizar los datos y aplicar las pruebas estadísticas paramétricas correspondientes. Se realizó un análisis de varianza de una vía ($p < 0.05$), seguido por la prueba de *Tukey*, obteniendo el valor de la

probabilidad con una $p < 0.01$ y $p < 0.05$ de los parámetros ya mencionados para comparar el efecto de los diversos extractos. Dichas pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI.

10. Modelo farmacológico *in vivo* de los extractos seleccionados sobre la motilidad gastrointestinal en ratón

Se utilizó un modelo en ratones a fin de evaluar el efecto en la motilidad intestinal *in vivo* de los extractos que tuvieron mayor actividad en el modelo *in vitro*. La metodología está basada en la usada en “Antidiarrhoeal activity of aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots” por Abdullahi *et al.* (2001) y adaptado en “Propiedades antidiarreicas de *Diospyros peregrina* en el modelo del efecto en la motilidad gastrointestinal” de Rouf *et al.* (2006).

10.1 Animales utilizados

Se usaron ratones macho de la cepa Balb/C de aproximadamente ocho semanas de edad con un peso de 20 a 25 g procedentes del Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General de México, siguiendo la Norma Oficial Mexicana sobre la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999, en condiciones estándar, manteniéndolas a temperatura ambiente con libre acceso a agua y alimento; exceptuando este último las 17 horas previas al experimento.

10.2 Método

Se dividieron los ratones en grupos de control, control positivo y de prueba, incluyéndose seis ratones en cada grupo. Se administró el vehículo (1% Tween 80 en agua) por vía oral mediante cánula al grupo control en una dosis de 0.01 ml/g de peso corporal; a los grupos de prueba se les administraron los extractos vía oral en dosis de 250mg/kg, mientras que al control positivo se le puso vía intraperitoneal Atropina (0.1mg/kg).

Pasados 30 minutos se administró a los ratones de cada grupo 1.0 ml de preparado de carbón que sirvió como marcador (3% suspensión de carbón activado en suspensión acuosa de acacia al 5%), transcurridos 40 minutos tras la administración del preparado de carbón, se adormeció

con cloroformo y se sacrificaron los animales de cada grupo. Se midió la longitud del intestino desde el esfínter pilórico hasta el ciego (A) y la distancia recorrida por el carbón (B). El movimiento del carbón –marcador- en el intestino se expresó como el porcentaje de avance de este, empleando la expresión: $\% \text{ avance del marcador} = (B/A) \times 100$ (Fig. 8).

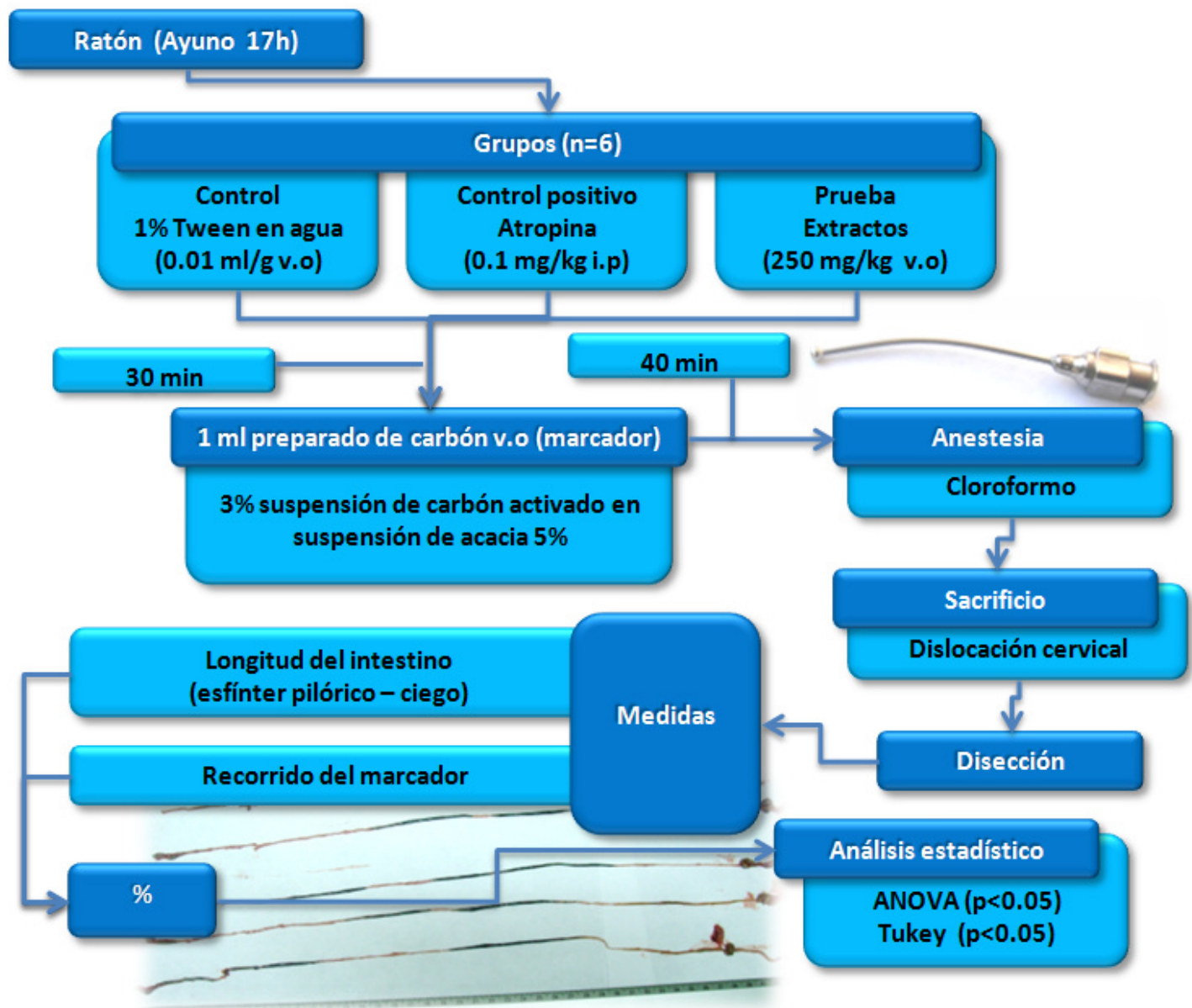


Figura 8. Diagrama del procedimiento del modelo farmacológico del efecto *in vivo* de la motilidad gastrointestinal en ratón.

10.3 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media de los porcentajes de avance del marcador $\pm$ ESM calculados en Excel ®. Para el análisis estadístico se transformaron los datos de porcentaje del avance del marcador en el intestino al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje sobre cien a fin de normalizarlos y aplicar las pruebas estadísticas paramétricas correspondientes. Se realizó un análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de *Tukey*, obteniendo el valor de la probabilidad con una $p < 0.05$ para comparar el efecto de los diversos extractos. Dichas pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI.

11. Pruebas microbiológicas: método de dilución en agar

Las pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento El Hombre y su Ambiente de la UAM Xochimilco bajo la asesoría de la Dra. María Teresa Núñez Cardona. La actividad antibacteriana fue evaluada usando el método de dilución en agar descrito por Rojas *et al.* (2001) y Ríos *et al.* (1988) para calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC). En este ensayo se evaluaron todos los extractos: hexánico, diclorometánico y metanólico de hoja, corteza y fruto de *V. pyramidata* (Fig. 9).

11.1 Microorganismos usados

La actividad antibacteriana fue evaluada en trece cepas diferentes: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dos cepas de *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri* y cuatro cepas de *Escherichia coli*; dos sin serotipo específico, una serotipo enteropatógena –EPEC- y otra serotipo enterotoxigénica –ETEC- (Ver Anexo B para mayor información de las cepas utilizadas y el Anexo C para las características generales y epidemiológicas de las especies bacterianas utilizadas). La mayoría de dichas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Armando Navarro Ocaña del Cepario de Bacterias Entéricas del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

11.2 Método

Se hicieron soluciones stock de cada uno de los extractos, disolviendo éstos en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo y agua destilada en una relación de 80 mg: 300 µL: 1200 µL respectivamente, quedando el extracto a una concentración de 53 mg/ml. Los stocks fueron agregados en cajas petri a las cuales posteriormente se les colocó agar Mueller-Hinton

quedando con concentraciones finales de 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 mg/ml. Una vez preparados los medios se dejaron en una incubadora a 35 °C durante 24 h para descartar contaminación.

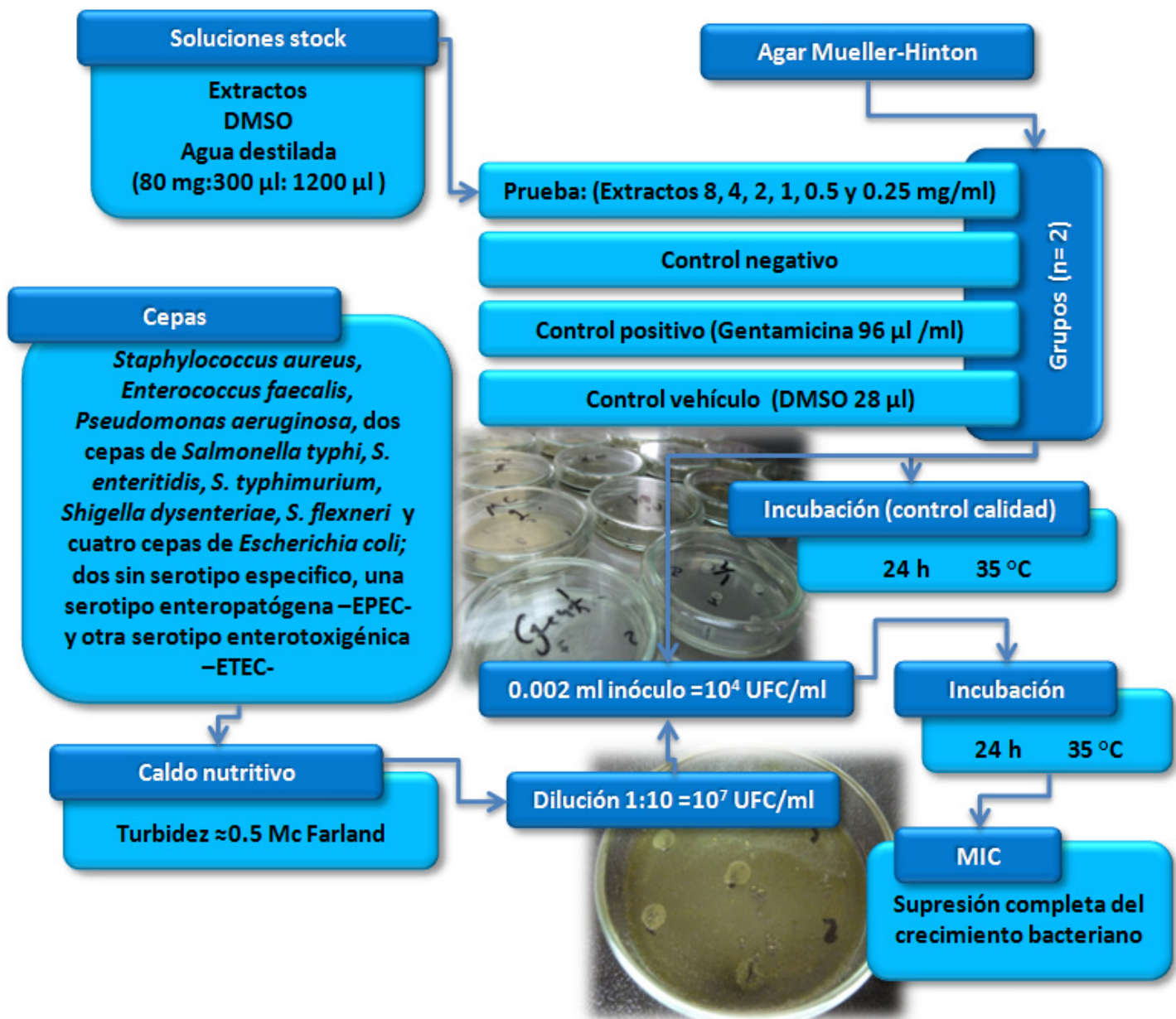


Figura 9. Diagrama del procedimiento de las pruebas microbiológicas mediante el método de dilución en agar.

Posteriormente se hicieron suspensiones de los microorganismos en caldo nutritivo dejándolos crecer hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 del estándar de McFarland. Dichas suspensiones fueron posteriormente diluidas 1:10 en agua destilada para obtener una

concentración de 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Se colocaron 0.002 ml de inóculo diluido en los medios de cultivo depositándose por tanto 10^4 UFC. Se incubaron 24 h a 35°C . Se uso medio Mueller-Hinton como control negativo, 96 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de gentamicina como control positivo y 28 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de DMSO como control vehículo. Las pruebas se hicieron por duplicado y los resultados fueron expresados como la mínima concentración del extracto que produjo una completa supresión del crecimiento bacteriano, esto es, la concentración mínima inhibitoria.

12. Resultados

12.1 Rendimientos

Como se observa en el cuadro 2, los extractos metanólicos fueron los de mayores rendimientos, seguidos por los hexánicos y los diclorometánicos, en las tres partes vegetales. Por parte vegetal, los mayores rendimientos se obtuvieron en los frutos ($\approx 46\%$ en total), seguidos por las hojas ($\approx 30\%$) y finalmente la corteza ($\approx 13\%$).

Cuadro 2. Rendimientos de los diferentes extractos orgánicos.

Parte vegetal	Hoja		Corteza		Fruto	
	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	1.78	3.56	0.36	0.40	0.42	0.59
Diclorometano	1.07	2.13	0.25	0.28	0.33	0.46
Metanol	12.17	24.33	10.93	12.14	31.90	44.94

12.2 Selección preliminar de extractos de hoja, corteza y fruto; modelo farmacológico del efecto antimotílico *in vitro* en intestino aislado de rata

Como se observa en la figura 10, los extractos analizados redujeron la frecuencia de las contracciones del intestino. Se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza (Anexo D, Cuadro D1). La prueba de *Tukey* mostró significancia en la frecuencia con respecto al control negativo, en los extractos hexánico y metanólico de hoja, diclorometánico y metanólico de corteza ($p < 0.01$), y diclorometánico de hoja y fruto ($p < 0.05$). Así mismo, en comparación con el control vehículo ($P < 0.01$), se encontraron diferencias significativas de los extractos hexánico de hoja y metanólicos de hoja y de corteza (Anexo D, Cuadro D2).

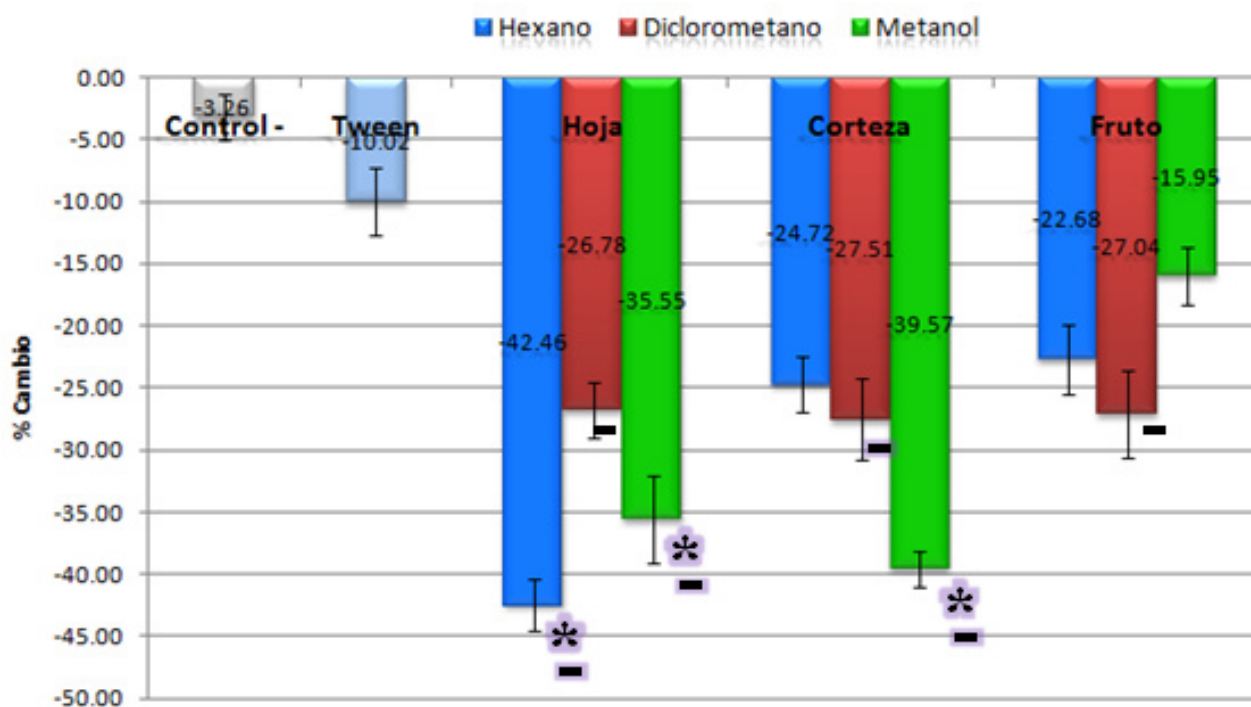


Figura 10. Efecto de los extractos orgánicos de *V. pyramidata* sobre la frecuencia de las contracciones del intestino. – diferencias significativas con control negativo ($p < 0.05$ y morado $p < 0.01$), * diferencias significativas con control vehículo ($p < 0.05$ y morado $p < 0.01$).

Se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza en la tensión del intestino (Anexo D, Cuadro D3), el efecto donde se encontraron diferencias significativas en la prueba de *Tukey* en relación al control negativo, fue producido por los extractos diclorometánico y metanólico de corteza, y hexánico de fruto ($P < 0.01$) disminuyendo la tensión del intestino. Se encontraron diferencias significativas con el control vehículo, de los extractos diclorometánico de corteza ($P < 0.01$), metanólico de corteza y hexánico de fruto ($P < 0.05$) (Anexo D, Cuadro D4). Los extractos hexánico de hoja y corteza aumentaron la tensión, sin embargo los valores obtenidos no resultaron ser significativos (Fig. 11).

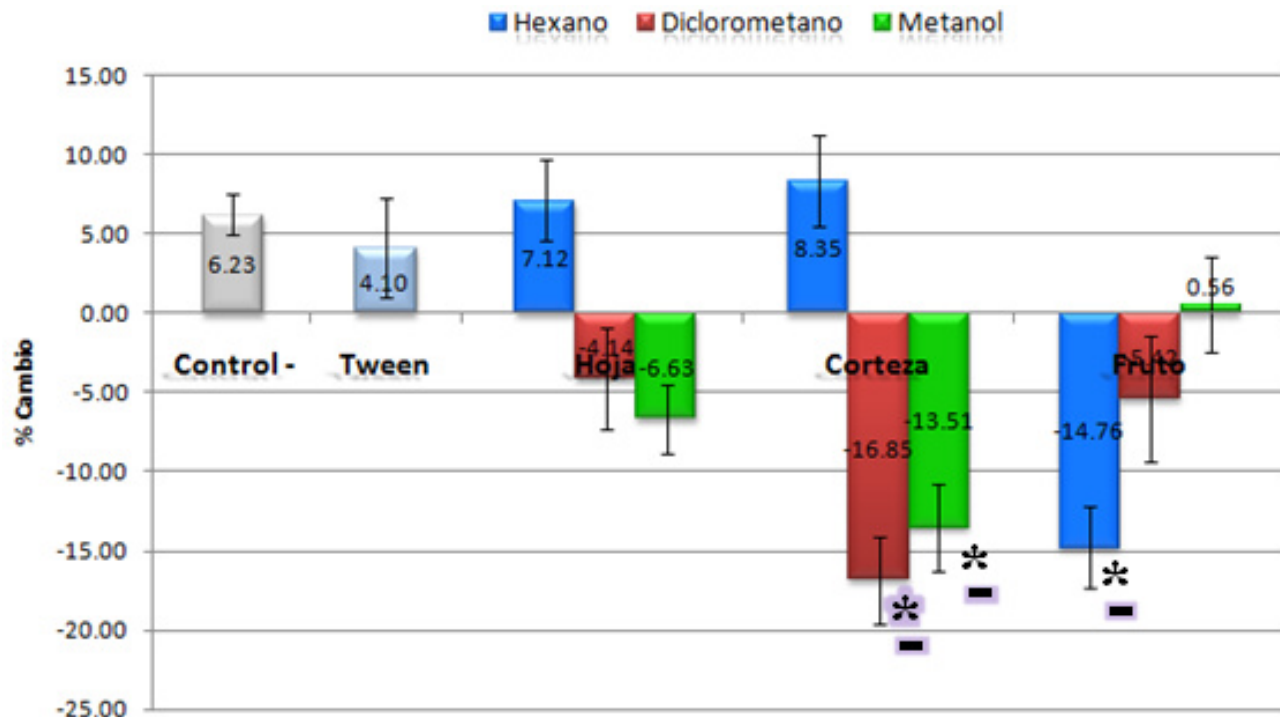


Figura 11. Efecto de los extractos orgánicos de *V. pyramidata* sobre la tensión basal del intestino. – diferencias significativas con control negativo ($p < 0.05$ y morado $p < 0.01$), * diferencias significativas con control vehiculo ($p < 0.05$ y morado $p < 0.01$).

En cuanto a la amplitud de las contracciones del intestino, también se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza (Anexo D, Cuadro D5). El mayor efecto lo produjo el extracto metanólico de corteza produciendo una mayor diferencia de fuerza entre las contracciones y relajaciones, sin embargo no se encontraron diferencias significativas con la prueba de *Tukey* (Anexo D, Cuadro D6), ya que éste es más estricto que la prueba ANOVA. Éste fue seguido por el extracto metanólico y diclorometánicos de hoja -sin significancia estadística- (Figura 12). Al no presentarse diferencias estadísticas significativas en el estadístico de *Tukey* en este parámetro, no fue utilizado para seleccionar los extractos que se evaluaron en el modelo *in vivo*.

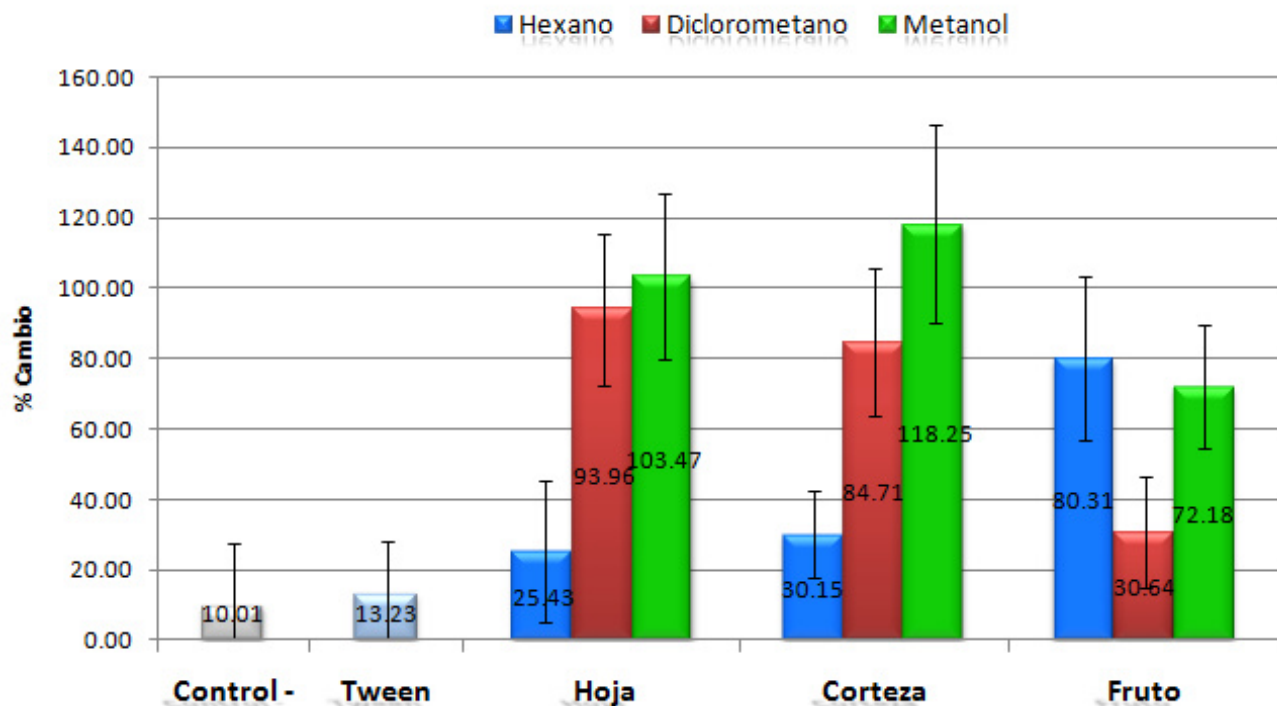


Figura 12. Efecto de los extractos orgánicos de *V. pyramidata* sobre la amplitud de las contracciones del intestino.

12.3 Efecto *in vivo* de los extractos seleccionados sobre la motilidad gastrointestinal en ratón.

En la prueba *in vivo* se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza ($p < 0.05$) (Anexo D, Cuadro D7). Con la prueba de *Tukey* no se encontraron diferencias significativas entre el control (Tween) y el control positivo (Atropina), ni con el control y los extractos, sólo se encontraron diferencias significativas entre el control positivo y el extracto metanólico de hoja ($p < 0.05$), sin embargo, dicha diferencia no es relevante (Anexo D, Cuadro D8). Aun así, se debe notar que el control positivo fue donde el marcador avanzó menos en el intestino con respecto al control como se esperaba. De los tres extractos, el metanólico de hoja fue el que produjo un mayor avance del marcador seguido por el metanólico de corteza, sin que esto fuera significativo. El hexánico de hoja mostró una ligerísima disminución no significativa (Fig. 13). Se debe decir que este experimento *in vivo* se repitió modificando los tiempos de

administración del marcador, a pesar de esto, los resultados fueron muy parecidos sin que se encontraran diferencias significativas entre los extractos y el control.

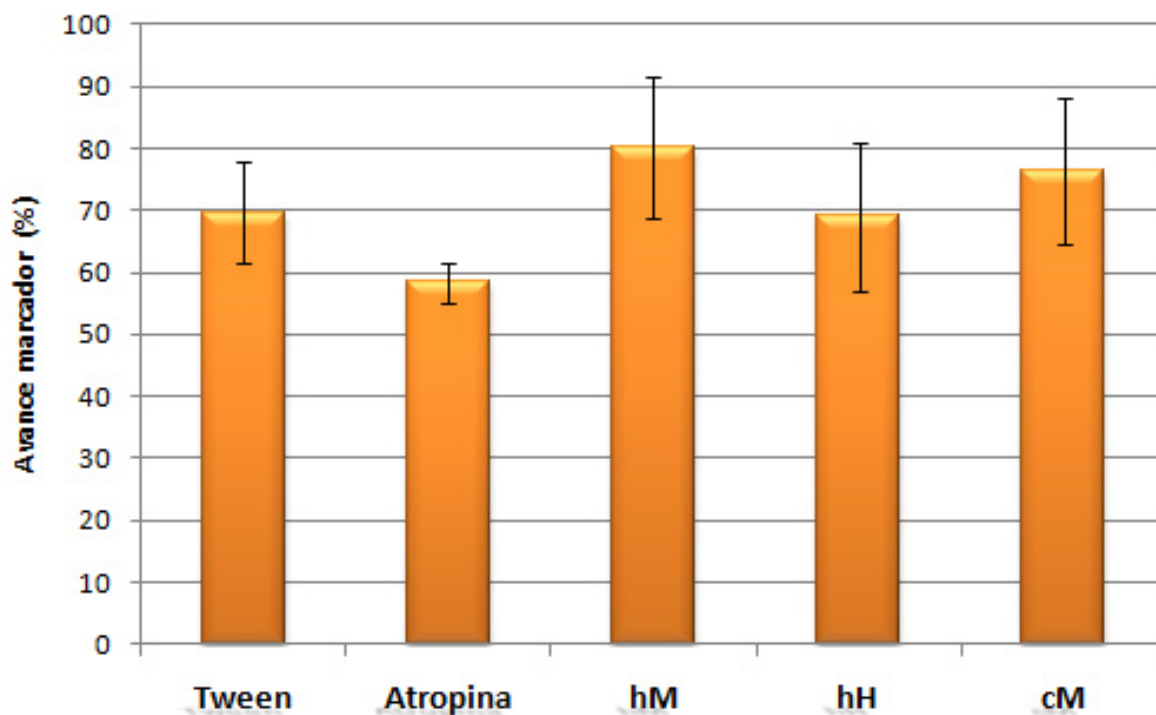


Figura 13. Efecto de los extractos orgánicos de *V. pyramidata* en el modelo *in vivo*.

12.4 Pruebas microbiológicas: método de dilución en agar

Se encontró actividad antibacteriana en algunos de los extractos de *V. pyramidata* (Cuadro 3). Todas las cepas ensayadas en las pruebas microbiológicas fueron inhibidas a una concentración menor o igual a 8.0 mg/ml por al menos uno de los extractos utilizados. Ningún extracto de fruto inhibió el crecimiento de las bacterias ensayadas, mientras que los extractos diclorometánico y metanólico de corteza, y hexánico y metanólico de hoja fueron los que presentaron actividad. Los extractos metanólicos de corteza y hoja fueron los que presentaron mayor actividad inhibiendo ocho y siete cepas respectivamente, éstos fueron seguidos por el diclorometánico de corteza que inhibió a seis y por último el hexánico de hoja que inhibió a cuatro.

S. aureus fue inhibida por los cuatro extractos que presentaron actividad, fue seguida de *S. typhi* (ATCC 06539) que fue inhibida por tres de los extractos. De las demás cepas seis fueron inhibidas por dos de los extractos: *E. faecalis*, *E. coli* (ATCC 25922), *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *S. typhi* (FMU 00190). Las restantes: *E. coli* (ATTC 8937), *P. aeruginosa*, ETEC y EPEC fueron inhibidas por un extracto. Las concentraciones mínimas inhibitorias menores que se registraron fueron del extracto hexánico de hoja en *S. typhi* (ATCC 06539) y *E. coli* (ATCC 25922), y corresponden a concentraciones menores o iguales a 0.25 mg/ml, misma que fue la concentración mínima ensayada.

Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria encontrada de las diferentes cepas bacterianas (mg/ml).

		Microorganismo													
		Aeróbicas facultativas													
		Bacilos Gram -													
		Cocos Gram +		Enterobacteriaceae											No Entero
Parte vegetal	Solvente	E. faecalis	S. aureus	E. coli	E. coli 2	ETEC	EPEC	S. ent	S. typhi	S. typhi 2	S. typm	S. dys	S. flex	P. aeru	
Hoja	Hexano	1	1	≤0.25	>8	>8	>8	>8	>8	≤0.25	>8	>8	>8	>8	
	Diclorometano	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
	Metanol	>8	1	>8	>8	>8	>8	2	2	8	8	4	2	>8	
Corteza	Hexano	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
	Diclorometano	8	2	4	8	>8	>8	>8	>8	4	>8	>8	>8	4	
	Metanol	>8	1	>8	>8	8	4	1	2	>8	2	1	2	>8	
Fruto	Hexano	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
	Diclorometano	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
	Metanol	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	

13. Discusión

El rendimiento de los extractos fue mayor con metanol -el extracto más polar- en las tres partes vegetales de *V. pyramidata*, debido a que las plantas en general presentan compuestos polares como los glucósidos, glucósidos fenólicos, flavonoides y ácidos orgánicos (Goldhaber, 2004), además de metabolitos primarios como los péptidos. El rendimiento bajo con los otros dos solventes, indica una menor cantidad de compuestos de mediana y baja polaridad.

Los resultados de la actividad de los extractos orgánicos en el modelo *in vitro* con intestino aislado de rata fue buena, ya que seis de los nueve extractos disminuyeron significativamente la frecuencia de las contracciones del intestino, que fue el parámetro evaluado más relevante en dicho modelo. Se debe resaltar que tres de estos extractos: el hexánico de hoja, y los metanólicos de hoja y corteza, son los que mostraron una mayor actividad, ya que además de tener diferencias significativas con el control negativo, la prueba de *Tukey* mostró que estadísticamente entre ellos, no existen diferencias significativas y sí con otros extractos con menor actividad ($p < 0.05$). Además, estos tres extractos fueron los que mostraron diferencias significativas con el control vehículo ($p < 0.01$).

Al comparar los resultados de la frecuencia con los de la tensión, que fue el otro parámetro donde se encontraron diferencias estadísticas, se observó que los extractos diclorometánico y metanólico de corteza son los únicos extractos que tuvieron actividad en los dos parámetros, mostrando diferencias significativas con el control negativo ($p < 0.01$) y con el control vehículo ($p < 0.05$ y $p < 0.01$). Los extractos hexánico y metanólico de hoja, que mostraron muy buena actividad reduciendo la frecuencia, no mostraron diferencias significativas en la tensión, por lo que se puede decir que en el modelo *in vitro*, el extracto metanólico de corteza fue el que presentó mayor actividad.

En el caso de la hoja, que presentó dos de los tres mejores extractos evaluados en el modelo *in vitro*, cabe señalar que éstos son de polaridades muy diferentes: el extracto hexánico es de baja polaridad y el metanólico de alta polaridad, por lo que seguramente la actividad antimotílica de estos dos extractos se debe al menos a dos compuestos diferentes, sin embargo se requiere de estudios fitoquímicos de los extractos para corroborarlo.

Los posibles mecanismos de acción de los extractos de *V. pyramidata* como antimotílico encontrado en la prueba *in vitro* sobre el intestino son numerosos, entre estos están: alterar o inhibir alguno de los pasos de la contracción inducida por canales que dependen del voltaje al bloquear los canales de calcio o limitar la disponibilidad de éste, modificando la polaridad de la membrana por ejemplo; alterando la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{K}^+$, activación de los canales de cloruro y la inversión de la secreción de cloruro o afectando la función de los componentes intracelulares implicados en la contracción del músculo liso intestinal, entre muchos otros mecanismos. Sin embargo, se requiere de diferentes modelos para encontrar el/los mecanismos de acción de los extractos probados en el presente estudio.

En el modelo *in vivo* se analizaron los tres mejores extractos del modelo *in vitro*: hexánico de hoja, y los metanólicos de hoja y corteza. No se encontraron diferencias estadísticas significativas relevantes aún entre el control y el control positivo atropina, debido quizá a que ésta fue diluida en solución salina para su aplicación para poder administrar la dosis indicada en el protocolo, por la falta de una jeringa microlítica, por lo que a pesar de disminuir el avance del marcador de carbón en el intestino como se esperaba, dicha disminución no fue estadísticamente significativa.

La discrepancia entre los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* donde se encontró actividad antimotílica con los extractos y el modelo *in vivo* donde no se encontró, se puede deber a varias razones:

Una de estas y que es una de las razones de mayor importancia para realizar los modelos *in vivo*, es la serie de procesos y cambios a los que están expuestas las sustancias activas, al tener que pasar por el sistema digestivo, como en el caso de este experimento. Durante este recorrido, la droga puede ser destruida por el ácido gástrico, enzimas digestivas, enzimas en la pared intestinal o cualquier proceso de degradación en otro lugar. Además, los procesos de biotransformación: cambios químicos de un xenobiótico dentro de un organismo vivo, que generalmente se dan por medio de reacciones catalizadas por enzimas, pueden generar metabolitos inactivos más polares, que se excretan fácilmente, o en otros casos, los compuestos activos pueden perder parte de su eficacia (Bertram, 2002; Kalant y Roschlau, 2002 Griffith *et al*, 2003). Además, se debe considerar que el conducto enterogástrico es uno de los órganos principales en llevar a cabo reacciones de biotransformación, lo cual ocasiona que muchos medicamentos administrados por vía oral, sufran modificaciones antes de llegar a la circulación sistémica (Kalant y Roschlau, 2002), dicho efecto limita mucho la biodisponibilidad de algunas sustancias ingeridas, además, los microorganismos intestinales pueden catalizar también reacciones de biotransformación (Bertram, 2002; Kalant y Roschlau, 2002).

Otro aspecto que se debe considerar al llevar una prueba de un modelo *in vitro* a uno *in vivo*, es que dependiendo del modo de acción, el fármaco disuelto debe ser absorbido en la sangre porta cuando se administra por vía oral, como en este trabajo (Bertram, 2002; Kalant y Roschlau, 2002). Dicha absorción puede implicar mecanismos que le permitan atravesar las membranas celulares como las del tracto gastrointestinal. Para este proceso influyen mucho el tamaño y forma molecular, solubilidad en las fases acuosa y lipídica, grado de disociación y otras propiedades fisicoquímicas (Kalant y Roschlau, 2002). Además, la absorción del fármaco desde la porción superior del tubo gastrointestinal, depende de muchos factores como pH, vaciamiento gástrico, motilidad intestinal, solubilidad de medicamentos sólidos, concentración de soluciones de drogas, estabilidad de las sustancias en líquidos gastrointestinales y fijación a contenidos enterogástricos (Bertram, 2002; Kalant y Roschlau, 2002). Condiciones a las que no se ven expuestos los compuestos probados en los modelos *in vitro*.

Un aspecto más, que se debe considerar sobre la falta de actividad significativa, y hasta cierto punto una actividad contraria en el modelo *in vivo* en comparación con el *in vitro*, es el hecho de que en los dos modelos probados, se utilizaron animales diferentes: en el caso del modelo *in vitro* se utilizaron ratas y en el *in vivo* ratones. Aunque el atribuir las diferencias encontradas a este aspecto, debe ser tomado con cautela.

Una cuarta posibilidad puede ser la hormesis, que es un fenómeno de relación entre la dosis y la respuesta (Calabrese y Baldwin, 2003). Esta es descrita por una curva con efectos a dosis bajas contrario a altas dosis, por lo tanto, la curva hormética no es monotónica, de tal manera que la variable dependiente -respuesta- cambia en más de una dirección, con un cambio unidireccional en la variable independiente -dosis- (Davis y Svendsgaard, 1994), y muestra un punto equivalente a cero, que no implica un umbral en el sentido clásico (Hoffmann, 2009). La curva bifásica hormética es a menudo descrita gráficamente como en forma de *J* o en forma de *U* invertida (Davis y Svendsgaard, 1994; Calabrese, 2002; Conolly y Lutz, 2004), dependiendo del efecto que se esté evaluando (Perez *et al.*, 2009). Existen otros términos que se han usado para describir estas curvas incluido el de hormesis: tipo U, tipo J, curva- β , campana, bifásica, difásica, bitónica, bidireccional, bimodal, sinusoidal, gradiente de subvención, antagonismo funcional, respuesta dual, estimulante-inhibitorio, no monotónica, Ley de Arndt-Schulz, regla de Hueppe, respuesta adaptativa, preconditionamiento, antagonismo funcional, hormologosis, sobrecompensación, efecto de rebote, Ley de Yerkes-Dodson, entre otras (Calabrese y Baldwin, 2002; Calabrese *et al.*, 2007; Calabrese, 2008b).

Sobre su mecanismo, hoy en día no se conocen muy bien los procesos bioquímicos y/o fisiológicos que conducen al comportamiento tipo hormesis. Numerosas investigaciones sugieren que no existe uno solo, más bien muchos mecanismos que producen las características comunes de la relación dosis-respuesta hormética (Calabrese, 2008a). Cada evaluación considerada en un análisis hormético puede verse afectada por diferentes sistemas de receptores o por interacción entre los sistemas de receptores (Calabrese y Baldwin, 2003). La hormesis es

un fenómeno natural que aparece literalmente en todo el espectro biológico (Calabrese, 2009). Una amplia variedad de agentes físicos, químicos y biológicos exhiben dosis-respuesta horméticas. Aunque con otros nombres, ha sido observada en los campos de la Medicina, biología molecular, farmacología, microbiología, inmunología y toxicología por mencionar algunos. Además se encuentra reportado en la literatura para diversos estudios de farmacología de productos naturales (Calabrese, 2004; Dudekula *et al.*, 2005; Thayer *et al.*, 2005; Cook y Calabrese, 2006; Palacios *et al.*, 2008; Rosales *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009). Hernández (2009) estudió extractos de ocho plantas de la herbolaria mexicana usando un modelo *in vivo* de diarrea osmótica inducida con un bolo de lactosa-azul de metileno en rata; encontró que siete de los ocho extractos estudiados tenían un comportamiento de tipo hormesis. Así mismo *Acacia nilotica*, planta usada para tratar diarrea, en un modelo *in vitro* con yeyuno de conejo mostró efectos bifásicos (Agunu *et al.*, 2005).

El modelo de hormesis no sólo desafía los modelos lineales dosis respuesta y el umbral, también y más importante aún, sugiere que a medida que la dosis disminuye no sólo hay cambios cuantitativos en la respuesta medida, sino también cambios cualitativos (Calabrese, 2004). Es decir, en el caso estudiado, y suponiendo que los extractos funcionen modificando la actividad intestinal en un organismo vivo, a bajas concentraciones de los extractos la actividad del intestino disminuirá o aumentará y a concentraciones mayores tendrán un efecto contrario, llegando a un punto en que, en vez de funcionar como antidiarreico funcionen como laxantes. Lo que podría explicar la falta de significancia en el efecto de los extractos en el modelo *in vivo* y hasta cierto punto -no significativo estadísticamente-, en una actividad contraria en comparación con el modelo *in vitro*. A todo esto, se tiene que decir que lo expuesto anteriormente es una de las posibles explicaciones de las discrepancias entre el modelo *in vitro* y el modelo *in vivo*, y que al no haberse probado diferentes concentraciones en el presente estudio, no es posible demostrar dicho comportamiento.

Otra explicación que se encontró sobre las diferencias del modelo *in vitro* con el *in vivo*, es que a pesar de que se utilizó una dosis más o menos intermedia en comparación con estudios

similares, que examinaron el efecto de extractos vegetales en el mismo modelo, existe la posibilidad, de que dicha concentración para los extractos de *V. pyramidata* resultara ser muy grande, lo que pudo provocar efectos tóxicos y/o irritantes para el epitelio intestinal o el conducto enterogástrico en general, que ocultaron el efecto antimotílico que pudieron mostrar los extractos si se hubieran probado en dosis más bajas. Enzo (2006), reporta que algunos de los ingredientes activos de las plantas medicinales y hierbas que se usan en el tratamiento de la diarrea son potencialmente tóxicos, y que en algunos casos, los ingredientes activos pueden ser los responsables de la toxicidad. Además, se ha visto que en dosis grandes la actividad de algunas plantas disminuye, sin que necesariamente tenga que ver con efectos tóxicos, tal es el caso de una especie del mismo género que la estudiada en el presente trabajo: *V. doniana*, que no presenta actividad *in vitro* relajando el músculo liso a dosis altas y sí en dosis bajas, situación compartida con *Gmelina arborea* y *Acanthospermum hispidum* (Agunu *et al.*, 2005).

A pesar de las posibles explicaciones dadas para la falta de actividad de los extractos en el modelo *in vivo*, se debe decir como señaló Astudille-Vazquez *et al.* (2009) “Es importante recordar la necesaria complementación de la experimentación *in vitro* e *in vivo* en el estudio de una especie medicinal, porque no siempre se encuentra la correlación en los resultados de ambos tipos de investigación”.

Por último, algo muy importante que se debe tomar en cuenta, es que existen diversos mecanismos que producen diarrea. En función de estos la diarrea se puede clasificar en varias áreas patofisiológicas principales: diarrea secretora, diarrea osmótica/malabsorción y diarrea infecciosa/inflamatoria (Hardman y Limbird, 1996). Por ejemplo, se cree que el efecto terapéutico de la loperamida se debe a sus propiedades antisecretoras y antimotílicas (Couper, 1987). Y aunque no se encontró actividad *in vivo* como antimotílico, no se puede decir que *V. pyramidata* sea usada tradicionalmente como antidiarreico sólo por la actividad antimicrobiana encontrada, sino que también, podría desempeñar otra función en el tratamiento de ésta, por ejemplo como agente antisecretor o estimulando la absorción de agua y electrolitos, para lo que existen otros modelos farmacológicos como el de diarrea inducida por aceite de ricino para el

primer caso (Galvez *et al.*, 1993; Agbor *et al.*, 2004), o el modelo de intestino ligado para el segundo caso (Oi *et al.*, 2002; Agbor *et al.*, 2004). Por ejemplo, en estudios con *Camellia sinensis* (té negro) se ha visto que sus extractos acuosos afectan la función gastrointestinal aumentando el tránsito gastrointestinal, a pesar de esto, en los mismos estudios se probó que inhibía la diarrea inducida con aceite de ricino e inhibía la acumulación de fluidos en el intestino, validándose de esta forma la utilización de esta planta como antidiarreico (Besra *et al.*, 2003).

Cabe señalar que no se descarta terminantemente el que *V. pyramidata* pudiera tener alguna actividad sobre la función del intestino *in vivo* como antimotílico, ya que se debe considerar que los extractos acuosos (forma más fiel de cómo se usa tradicionalmente la planta), no han sido evaluados. Además, es importante probar otras concentraciones además de la ensayada en el presente estudio y probar con algún modelo que permita el efecto prolongado de los extractos, ya que una de sus formas de empleo como antidiarreico es como “agua de uso”, donde se utilizan las hojas remojadas en agua (Argueta *et al.*, 1994; Gispert y Rodríguez, 1998). Además, una posible implicación de ésta última forma de empleo en contraste con la infusión, es que podría estar indicando la presencia de compuestos termolábiles, por lo que sería importante probar el extracto acuoso sin calentar.

Sobre las pruebas microbiológicas, se debe hacer énfasis, en que todos los microorganismos ensayados presentaron susceptibilidad al menos frente a alguno de los extractos en las concentraciones utilizadas, siendo la mayor de éstas la de 8 mg/ml, considerada como una actividad antibacteriana significativa para los extractos de las plantas (Fabry *et al.*, 1998). Y que nueve de las trece cepas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *Escherichia coli* (ATCC 3512), presentaron inhibición a concentraciones menores o iguales a 2 mg/ml para al menos un extracto, por lo que de manera general los extractos orgánicos de *V. pyramidata* presentan buena actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana frente a algunos de los microorganismos ensayados ya se había encontrado en otras especies del género *Vitex*: Hossain *et al.* (2001) reportaron actividad moderada de los extractos de *V. trifolia* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *Sh. boydii*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *P. aeruginosa*. Mientras que Aranda *et al.* (1999) reporta inhibición del 100% para la misma especie de *Vitex* a concentraciones de 2.5 mg/ml de hoja y tallo en hexano, diclorometano y metanol sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. typhi* y para una especie diferente del género *Shigella* (*Sh. sonnei*). Valsaraj *et al.* (1997) reportaron baja actividad de *V. leucoxylon* y *V. negundo* en extractos etanólicos de corteza y hoja frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Se ha observado que los extractos de las partes aéreas de *V. rehmannii*, *V. obovata* ssp. *obovata*, *V. obovata* ssp. *wilmsii* y *V. zeyheri* han mostrado actividad frente a patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. typhimurium* (Nyiligira *et al.*, 2008). Para el caso de *V. negundo*, Srinivasan *et al.* (2002) reportan nula actividad del extracto acuoso de hojas frente a *E. coli*, *S. typhi* y *S. aureus*, así mismo Ahmad *et al.* (1998) no encontraron actividad de los extractos de hoja: acuoso, hexánico y etanólico frente a *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, esto en contraste con los resultados de Samy *et al.* (1998) quienes encontraron una actividad significativa de los extractos acuosos de *V. negundo* frente a *E. coli* y otras bacterias. Dimayuga *et al.* (1998) reporta nula actividad frente a *S. faecalis*, *E. coli* y *S. aureus* para el extracto metanólico de corteza de *V. mollis*.

Es interesante notar que *S. aureus* que en el presente estudio fue la cepa que fue inhibida por un mayor número de extractos (cuatro), es reportada como sensible frente a los extractos de la mayoría de las especies de *Vitex* cuya actividad antibacteriana se ha estudiado. Así mismo, en varias de las especies de *Vitex* se ha encontrado actividad frente a *E. coli* y *S. typhi*, que fueron las cepas que fueron inhibidas con la concentración ensayada más baja (≤ 0.25 mg/ml), ambas por el extracto hexánico de hojas. En varios de los estudios que se han realizado con especies del género, se ha reportado una actividad mayor frente a las bacterias Gram negativas (Aranda *et al.*, 1999 y Nyiligira *et al.*, 2008), mismo fenómeno que se ha observado en los extractos de otras plantas (Grosvenor *et al.*, 1995; Martin, 1995; Valsaraj *et al.*, 1997). En el presente estudio no se observó algo parecido, sin embargo, no se puede asegurar que esto no se cumpla

en el caso de *V. pyramidata*, ya que sólo se ensayaron dos cepas de bacterias Gram negativas, por lo que se deben ampliar las pruebas en un futuro para ver si esta condición se cumple también en esta especie.

Llama la atención que los extractos del fruto no hayan inhibido a ninguno de los microorganismos utilizados, esto se puede deber desde la etapa de maduración en la que se colectaron y que en las fuentes etnobotánicas consultadas no se especifica. El hecho de que se molió completo el fruto, con la semilla y no sólo su pulpa, y/o a la gran cantidad de sustancias que fueron extraídas de éstos -recuérdese que los frutos fueron la estructura vegetal que presentó un mayor rendimiento de entre las tres estudiadas-, esto pudo causar que se “diluyeran” los compuestos activos con otros con nula actividad, por lo que no se alcanzaron concentraciones suficientes de los compuestos activos para presentar actividad antibacteriana, o simplemente al hecho de que esta estructura no pose compuestos con actividad bacteriostática y/o bactericida. También se debe considerar que tradicionalmente los frutos se utilizan acompañados de hojas, por lo que cabría la posibilidad de que los compuestos de estos, tuvieran actividad sinérgica con los de las hojas, o bien, que debido a su sabor dulce, sólo sirvan para hacer más agradable el remedio al gusto –los frutos son comestibles-. Aun así, el hecho de que los extractos de fruto no presentaran actividad antibacterial no desacredita la función que esta parte de la planta tiene para el tratamiento de la diarrea, ya que sí presentó actividad significativa en el modelo *in vitro* en el intestino aislado.

Algo que se debe mencionar, es que al comparar la actividad *in vitro* de los extractos en el intestino con las pruebas microbiológicas, los extractos hexánico y metanólico de hoja, y metanólico de corteza, que fueron los que presentaron mayor actividad en el modelo *in vitro*, son tres de los cuatro extractos que presentaron actividad antibacteriana, y que de éstos, los dos metanólicos que son ricos en compuestos polares, destacan por la gran cantidad de cepas que inhibieron, lo que apoya el uso tradicional antidiarreico de esta planta como infusión, ya que el agua utilizada para ésta, tiene una polaridad cercana a la del solvente utilizado para obtener estos extractos. Por otro lado, los extractos metanólicos fueron los que presentaron mayores

rendimientos, lo que puede facilitar tanto estudios próximos, como su comercialización y utilización futura como fitomedicamento.

Así mismo, el hecho de que la hoja haya presentado buena actividad en las dos pruebas realizadas, avala el conocimiento –mediante la experiencia- y el uso tradicional de esta planta, ya que ésta es la estructura vegetal más comúnmente empleada como antídairreico. El hecho de que sea rara la utilización de la corteza -que demostró tener muy buena actividad como las hojas en ambas pruebas-, podría indicar que posee un sabor desagradable, que evitan usarla porque el extraerla resulta una práctica perjudicial para la planta, o simplemente que la curiosidad o necesidad humana no han hecho que sea muy ensayada.

Es notable el hecho de que en la medicina tradicional mexicana otro de los usos de *V. pyramidata* sea el de regular la menstruación (Argueta *et al.*, 1994), dicho efecto se ha encontrado en varias plantas del género como *V. negundo*, *V. rotundifolia* y *V. agnus-castus*. Entre las actividades probadas se encuentra la de algunos compuestos parecidos a estrógenos en *V. negundo*, por lo que puede ser usada para remplazo hormonal (Hu *et al.*, 2007a). Actividad parecida en los frutos de *V. rotundifolia*, donde estudios demuestran que la planta puede servir en el tratamiento de ciertas enfermedades dependientes de hormonas (Hu *et al.*, 2007b) y para el síndrome premenstrual (Hu *et al.*, 2007c). Así mismo, los frutos de *V. agnus-castus* como infusión, son un remedio popular usado para tratar desordenes del ciclo menstrual (Kartnig *et al.*, 1986; Roeder., 1994) y síntomas premenstruales (Loch *et al.*, 2000), en dicha especie se ha encontrado que hay presencia de ácido linoleico como compuesto estrogénico (Liu *et al.*, 2004), y actividad dopaminérgica (Hubertus *et al.*, 2003). Además, esta última especie se ha probado clínicamente para tratar el síndrome premenstrual, donde quedó demostrada su eficacia (Berger *et al.*, 2000). Y están disponibles en el mercado varios fitomedicamentos creados a partir de sus frutos como: MESTRODOL®, PREMEDOL®, LIFEMIN®, AGNOLYT®, DISMEGYN®, GINEVIX®, FEMIPLANTE® y VITELAF® (AEMPS, 2011). En realidad, en la extensa búsqueda bibliográfica realizada para el presente trabajo, parece ser que ésta es la única especie del género *Vitex* de la que se han elaborado fitomedicamentos. Por

lo anterior, es probable que *V. pyramidata* tenga compuestos químicos que produzcan efectos similares a los ya descritos, sin embargo, esto debe ser corroborado con estudios futuros. Aun así, esto demuestra la importancia y veracidad que en muchos casos tiene la medicina tradicional sobre los remedios vegetales y los padecimientos para los cuales pueden ser usados, y la importancia que tiene la etnobotánica para seleccionar plantas candidatas para estudios fitoquímicos y/o farmacológicos.

Otro aspecto interesante es el referente a la distribución de *V. pyramidata* en el país (figura 1), ya que la población de esta especie en la Península de Yucatán, parece por la distancia, estar aislada de la(s) del resto del país, por lo que sería interesante investigar si existen diferencias en cuanto al número de metabolitos secundarios presentes en ambas poblaciones o las cantidades de estos. Diferencias que podrían significar una mayor o menor actividad de los extractos de las plantas provenientes de dicho lugar. Además, estas posibles diferencias no sólo podrían deberse a diferencias genéticas causadas por sus distribuciones disyuntas y su resultante aislamiento, sino también por las características ambientales donde crecen, ya que condiciones del suelo como el pH, humedad, disponibilidad de fósforo y nitrógeno, entre otros factores externos como la presencia de contaminantes, actividad antropogénica, interacciones bióticas y la época de colecta pueden modificar esto (Osuna *et al.*, 2006).

Finalmente, cabe señalar que el presente estudio resulta importante porque además de validarse el uso tradicional como antidiarreico de *V. pyramidata*, representa la primera investigación farmacológica de esta especie. Es evidente que en el futuro, el presente trabajo tendrá que ser apoyado con estudios fitoquímicos, ya que no han sido realizados en esta especie. Además será necesario aislar, purificar y caracterizar los compuestos fitoquímicos responsables de los efectos encontrados en este estudio. También queda claro que se deben probar un mayor número de concentraciones de los extractos, probar los extractos acuosos, utilizar nuevos modelos farmacológicos que validen el potencial antidiarreico *in vivo* de los extractos y la utilización de nuevas cepas bacterianas que provocan diarrea, así como evaluar efectos antiprotozoarios contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* y actividad antihelmíntica.

Además, no se debe dejar de lado la investigación sobre la toxicidad aguda y crónica, efecto mutagénico y carcinógeno de esta planta entre otras muchas, todo esto con la finalidad de realizar investigación completa, precisa y de calidad para que ésta y otras plantas utilizadas tradicionalmente como medicinales sean usadas de una manera adecuada, segura y eficaz.

14. Conclusiones

Se encontró actividad antimotílica *in vitro* sobre intestino aislado de rata con seis de los nueve extractos evaluados de *V. pyramidata*: hexánico y metanólico de hoja, diclorometánico y metanólico de corteza, y diclorometánico de hoja y fruto, siendo los mejores el hexánico de hoja, y los metanólicos de hoja y corteza.

No se encontró actividad antimotílica *in vivo* con los extractos probados: hexánico de hoja, y los metanólicos de hoja y corteza a una concentración de 250 mg/kg.

Los extractos diclorometánico y metanólico de corteza, y hexánico y metanólico de hoja mostraron una actividad antibacteriana significativa.

Los resultados de este estudio validan el conocimiento y uso medicinal tradicional que se tiene de *V. pyramidata* como antidiarreico.

15. Literatura citada

1. Abdullahi A., M. Agho, S. Amos, K. Gamaniel y C. Wambebe. 2001. Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots. *Phytotherapy Research*. 15: 431–434.
2. Achterrath-Tuckermann U., R. Kunde, E. Flaskamp, O. Isaac y K. Thiemer. 1980. Pharmakologische untersuchungen von kamillen-Inhaltsstoffen. V. Untersuchungen über die spasmolytische wirkung von kamillen-inhalts-stoffen und von Kamillosan® am isolierten meerschweinchen-ileum. *Planta Medica*. 39: 38-50.
3. AEMPS, 2011. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. <http://www.aemps.es/buscador/home.jsp> [Consultado 2011]
4. Agbor G., T. Leopold y N. Jeanne. 2004. The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Phytotherapy Research*. 18(11):873–876.
5. Aguilar C. y A. Martínez. 1993. Los herbarios medicinales de México. En: *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Secretaria de Salud. México, D.F. pp. 89-102.
6. Agunu A., S. Yusuf, G. Onyiloyi, A. Umar y E. Mukhtar. 2005. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*. 101(1): 27-30.
7. Ahmad F. y D. Holdsworth, 1995. Traditional medicinal plants of Sabah State Malaysia. Part III. *International Journal of Pharmacognocny*. 33: 262-264.
8. Ahmad I., Z. Mehmood y F. Mohammad. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62(2):183-193.
9. Álvarez M. 2008. Investigación y desarrollo de nuevas vacunas frente a infecciones bacterias entéricas. *Bol. SPAO* 2(3): 210-229.
10. Álvarez-Larrauri S. 1998. Las prácticas maternas frente a la enfermedad diarreica infantil y la terapia de rehidratación oral. *Salud Pública de México*. 40: 256-264.
11. Ammon H., O. Kelber y S. Okpanyi. 2006. Spasmolytic and tonic effect of Iberogast® (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine*. 13: 67-74.

12. Ankli A., O. Sticher y M. Heinrich. 1999. Medical ethnobotany of the yucatec maya: healers consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany*, 53: 144-160.
13. Argueta A., L. Cano, y M. Rodarte. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. pp. 1200.
14. Astudille-Vazquez A., R. Mata y A. Navarrete. 2009. El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamericana de Química* 37: 7-44.
15. Bafna P. y S. Bodhankar. 2003. Gastrointestinal effects of Mebarid®, an ayurvedic formulation, in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 86:173-176.
16. Bajpai A., Ojha J. y Sant H. 1995. Medico botany of the Varanasi District Uttar Pradesh, India. *International Journal of Pharmacognosy*. 33: 172-176.
17. Baqar S., A. Applebee y A. Bougeois. 1995. Immunogenicity and protective efficacy of a prototype *Campylobacter* Killed whole cell vaccine in mice. *Infection and Immunity*. 63:3731-3735.
18. BDMTM, 2011. Biblioteca digital de la medicina tradicional de México, UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/> [Consultado 2011]
19. Berger D., W. Schaffner, E. Schrader, B. Meier y A. Brattström. 2000. Efficacy of *Vitex agnus castus* L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 264(3): 150-153.
20. Bertram G. 2002. Farmacología básica y clínica. Manual Moderno, 8° Edición. México D.F.
21. Besra S., A. Gomes, D. Ganguly y J. Vedasiromoni. 2003. Antidiarrhoeal activity of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Phytotherapy Research*. 17(4): 380-384.
22. Calabrese E. y L. Baldwin. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43(1): 5-9.
23. Calabrese E. 2002. Hormesis: Changing view of the dose response; a personal account of the history and current status. *Mutation Research*. 511:181-189.
24. Calabrese E. 2004. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine; re-framing the dose-response relationship. *EMBO Reports*. Vol 5 Special issue. pp. 37-40.

25. Calabrese E. 2008a. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 27:1451-1474.
26. Calabrese E. 2008b. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Research Reviews*. 7: 8-20.
27. Calabrese E. 2009. Getting the dose-response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Archives of Toxicology*. 83: 227-47.
28. Calabrese E. y L. Baldwin. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*. 21:91-97.
29. Calabrese E., Baldwin L. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43:175-197.
30. Calabrese E., K. Bachmann, A. Bailer, P. Bolger, J. Borak, L. Cai, N. Cedergreen, M. Cherian, C. Chiueh, T. Clarkson, R. Cook, D. Diamond, D. Doolittle, M. Dorato, S. Duke, L. Feinendegen, D. Gardner, R. Hart, K. Hastings, A. Hayes, G. Hoffmann, J. Ives, Z. Jaworowski, T. Johnson, W. Jonas, N. Kaminski, J. Keller, J. Klaunig, T. Knudsen, W. Kozumbo, T. Lettieri, S. Liu, A. Maisseu, K. Maynard, E. Masoro, R. McClellan, H. Mehendale, C. Mothersill, D. Newlin, H. Nigg, F. Oehme, R. Phalen, M. Philbert, S. Rattan, J. Riviere, J. Rodricks, R. Sapolsky, B. Scott, C. Seymour, D. Sinclair, J. Smith-Sonneborn, E. Snow, L. Spear, D. Stevenson, Y. Thomas, M. Tubiana, G. Williams, M. Mattson. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222:122-128.
31. Capasso R., F. Savino y F. Capasso. 2007. Effects of the herbal formulation ColiMil® on upper gastrointestinal transit in mice *in vivo*. *Phytotherapy Research*. 21: 999-1001.
32. Ciro A. 2004. Vacunas; Prevención de enfermedades y protección de la salud. *Revista Española de Salud Pública*. 79(3): 1135-5727.
33. Conolly R. y W. Lutz. 2004. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Society of Toxicology*. 77:151-157.
34. Cook R., y E. Calabrese. 2006. The importance of hormesis to Public Health. *Environmental Health Perspectives*. 114(11): 1631-1635.
35. Coria L., S. Villalpando, D. Gómez y A. Treviño. 2001. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Revista Mexicana de Pediatría*. 68: 200-215.

36. Couper I. 1987. Opioid action on the intestine: the importance of the intestinal mucosa. *Life Sciences*. 41: 917-925.
37. Davis J. y D. Svendsgaard. 1994. Nonmonotonic dose-response relationships in toxicological studies. In: Calabrese E. (ed), *Biological Effects of Low Level Exposures: Dose-Response Relationships*, Chap 5, pp 67-85. Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton, USA.
38. Dimayuga R., M. Virgen y N. Ochoa. "Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Formerly International Journal of Pharmacognosy*. 1998; 36(1): 33-43.
39. DLIFE, 2011. Discover Life, de la University of Georgia y Missouri Botanical Garden <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Vitex+pyramidata> [Consultado 2011]
40. Dudekula N., V. Arora y Z. Callaerts. 2005. The temporal hormesis of Drug Therapies. *Dose Response*. 3(3): 414-424.
41. EMDM, 2010. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_michoacan
42. Enzo A. 2006. Traditional Plants and Herbal Remedies Used in the Treatment of Diarrheal Disease: Mode of Action, Quality, Efficacy, and Safety Considerations. pp. 247-269, En: Ahmad I., F. Aqil y M. Owais. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. WILEY-VCH Weinheim, Alemania.
43. Escobar-Picaso E., E. Espinosa-Huerta y M. Moreira-Ríos. 2006. Tratado de pediatría; El niño enfermo. Manual moderno, II: 425-430.
44. Estrada L. y N. Quezada. 1994. Chamanismo y plantas medicinales. En: Estrada, L. E. (ed.). *Plantas medicinales de México. Introducción a su estudio*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 1-12.
45. Fabry W., P. Okemo y R. Ansorg. 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 79-84.
46. Farthing M. 2000. Diarrhoea a significant worldwide problem. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 14: 65-69.
47. Flores F. 1982. Historia de la medicina en México desde la época de los indios hasta el presente. Ed. Facsimilar 4 Vol. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F.

48. Frei B., M. Baltisberger, O. Sticher y M. Heinrich. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 149-165.
49. Galvez J., A. Zarzuelo, M. Crespo, M. Lorente, M. Ocete y J. Jiménez. 1993. Anti-diarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Medica*. 59: 333-336.
50. Ganapaty, S. y K. Vidyadhar. 2005. Phytoconstituents and biological activities of *Vitex* -a review. *Journal of Natural Remedies*. 5(2): 5-95.
51. Georgopadakoü N. 2002. Antibiotic resistance in enterobacteria. pp. 405-406, En: K. Lewis, A. Salyers, H. Taber y R. Wax. *Bacterial resistance to antimicrobials*. Marcel Dekker Inc. New York.
52. Gilmore M. 2002. The enterococci; Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM PRESS. Washington, D.C. pp. 104.
53. Gispert M. y H. Rodríguez. 1998. Los Coras: plantas alimentarias y medicinales de su ambiente natural. INE. México, D.F.
54. Goldhaber G. 2004. Actividad Antibacteriana de *Piqueria Trinervia* Cav. sobre algunas bacterias enteropatógenas. Tesis profesional. Facultad de estudios superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
55. Goodman L. y Gilman G. 1991. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Panamericana 8ª ed. México D.F.
56. Griffith J., E. Lee y A. Gilman. 2003. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica V1. Mc. Graw Hill. México, D.F.
57. Grosvenor P., A. Supriono y D. Gray. 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2, Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 45: 97-111.
58. Guerra-Godínez J., A. Larrosa-Haro, P. Coello-Ramirez, H. Rodríguez, E. Rivera-Chavez, Y. Castillo de León, M. Bojórquez y S. Aguilar-Benavides. 2003. Changing trend in prevalence, morbidity and lethality in persistent diarrhea of infancy during the last decade in Mexico. *Archives of Medical Research*. 34: 209-213.
59. Gutiérrez Y., M. Miranda, O. Bilbao, J. Naranjo y L. Rodríguez. 2000. Suspensión oral antidiarreica de *Psidium guajava* L. *Revista Cubana de Farmacia*. 34: 44-49.

60. Gutiérrez-Camacho C., F. Mota-Hernández, R. Cabrera-Martínez y F. Orozco-Peralta. 1997. Antimicrobianos en diarrea aguda. *Boletín Médico del Hospital Infantil*. 54: 409-505.
61. Gutstein, H.B., Akil, H. 2003. Analgésicos opioides. En: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman, A. (eds). Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10ª edición. Volumen I. México. pp. 577-628.
62. Hardman J. y L. Limbird. 1996. Goodman Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edition. McGraw- Hill, USA., pp. 925.
63. Hashimoto K., K. Satoh, P. Murata, B. Makino, I. Sakakibara, Y. Kase, A. Ishige, M. Higuchi y H. Sasaki. 2003. Components of Panax ginseng that improve accelerated small intestinal transit. *Journal of Ethnopharmacology*. 84: 115-119.
64. Hernández T. 2009. Determinación del potencial antidiarreico de los productos derivados de ocho especies vegetales de la herbolaria mexicana usando un modelo de diarrea osmótica inducida con un bolo de lactosa-azul de metileno en rata. Tesis profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 69 pp.
65. Hoar W. y C. Hickman, 1978. Manual de Laboratorio para Fisiología General y Comparada. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. pp. 23.
66. Hoffmann G. 2009. A perspective on the scientific, philosophical and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response*. 7:1-51.
67. Holmgren J., A. Svennerholm, M. Jertborn, J. Clemens, D. Sack y R. Salensted. 1992. An oral B subunit: whole cell vaccine against cholera. *Vaccine*. 10: 911-914.
68. Hossain M., N. Paul, M. Sohrab, E. Rahman y M. Rashid. 2001. Antibacterial activity of *Vitex trifolia*. *Fitoterapia*. 72: 695-697.
69. Hu Y., H. Hou, X. Hai-Liang, Z. Qiao-Yan, Z. Han-Chen, R. Khalid y Q. Lu-Ping. 2007b. Estrogen-like activity of volatile components from *Vitex rotundifolia* L. *Indian Journal of Medical Research*. 126(1): 68-72.
70. Hu Y., Q. Zhang, T. Hou, H. Xin, H. Zheng, K. Rahman y L. Qin. 2007a. Estrogen-like activities in *Vitex* species from China determined by a cell based proliferation assay. *Pharmazie*. 62(11): 872-875.

71. Hu Y., T. Hou, Z. Qiao-Yan, Z. Qiao-Yan, H. Zheng, K. Rahman y Q. Lu-Ping. 2007c. Evaluation of the estrogenic activity of the constituents in the fruits of *Vitex rotundifolia* L. for the potential treatment of premenstrual syndrome. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59(9): 1307-1312.
72. Hubertus J. B. Spengler, A. Porzel, J. Schmidt, W. Wuttke y V. Christoffel. 2003. Evidence for estrogen receptor β -selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. *Planta Medica*. 69(10): 945-947.
73. Huycke M., D. Sahm, y M. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*. 4:239-249.
74. Jafri, S., Pasricha P. 2003. Fármacos usados para diarrea, estreñimiento y enfermedad inflamatoria intestinal; fármacos usados para enfermedades biliar y pancreática. pp 1051-1072, En: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman, A. (eds). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10ª edición. Volumen I. México.
75. Jawetz E., Melnick J. y E. Adelberg. 2007. Microbiología médica. Manual Moderno. México, D.F. pp. 268, 269, 271.
76. Kalant H. y W. Roschlau. 2002. Principios de farmacología médica. OXFORD University Press, 6ª Edición. México, D.F.
77. Kartnig T. 1986. *Vitex agnus castus* Mönchspfeffer oder Keuschlamm, Eine Heilpflanze mit indirect-luteotroper Wirkung. *Zeischr. Phytotherapy*. 7: 119-122.
78. Kasper D., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J. 2006. Harrison. Principios de Medicina Interna. 16ª Edición. Mac-Graw-Hill. México, D.F.
79. Krieg R. y J. Holt. 1984. Bergey's Systematic Bacteriology. Vol 1. Williams & Wilkins Baltimore, USA. pp. 447.
80. Kyerematen G. y F. Sandberg. 1986. Preliminary pharmacological studies of pecarin, a new preparation from *Ribes nigrum* fruits. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 23: 101-106.
81. Ladeji O., F. Udoh y Z. Okoye. 2004. Activity of aqueous extract of the bark of *Vitex doniana* on uterine muscle response to drugs. *Phytotherapy Research*. 19: 804-806.
82. Larracilla A. 2002. México pionero de la hidratación oral voluntaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 40: 4621-464.

83. Lee L., E. Burg, S. Baqar, A. Bourgeois, D. Burr y C. Ewing. 1999. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*. 67: 5799-5805.
84. Levine M. y J. Kaper. 1995. Live oral cholera vaccine: from principle to product. *Bulletin de l'Institut Pasteur*. 93: 243-253.
85. Levine M. y R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea. *Epidemiologic Reviews*. 6: 31-51.
86. Liu J., J. Burdette, Y. Sun, S. Deng, S. Schlecht, W. Zheng, D. Nikolic, G. Mahady, R. van Breemen, H. Fong, M. Pezzuto, J. Bolton y N. Farnsworth. 2004. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chaste-berry). *Phytomedicine*. 11(1): 18-23.
87. Loch E., H. Selle y N. Boblitz. 2000. Treatment of premenstrual syndrome with a phytopharmaceutical formulations containing *Vitex agnus castus*. *Journal of womens health and gender-based medicine*. 9: 315-320.
88. Lozoya X. 1990. An overview of the system of traditional medicine currently practised in Mexico. En: *Economic and medicinal plant research*, Vol. 4, Plants and traditional medicine. Ed. Por H. Wagner y N. R. Fransworth. Academic Press. Pp. 71-93.
89. Lozoya X., A. Aguilar y J. Camacho, 1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 25:283-290.
90. Lozoya X., H. Reyes-Morales, M. Chávez-Soto, M. Martínez-García, Y. Soto-González y S. Doubova. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 83: 19-24.
91. Martin G. 1995. *Ethnobotany: People and Plants Conservation Manual*. Chapman and Hall, London, UK.
92. Martínez M. 1969. *Las Plantas medicinales de México*. Ediciones Botas, México.
93. Mata R., 1993. Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. En: Secretaria de Salud. (ed.). *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. México. pp. 143-156.

94. Meena A., U. Singh, A. Yadav, B. Singh y M. Rao. 2010. Pharmacological and Phytochemical Evidences for the extracts from plants of the Genus *Vitex*- A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2(1): 01-09.
95. Mejía E. 2002. Estudio etnobotánico sobre *Vitex* spp. Tesis profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
96. Mossel A., B. Moreno y C. Struik. 2003. Microbiología de los alimentos. Acribia. España, Zaragoza. Pp 153, 182 y 184.
97. Mota F. 2002. Diarrea aguda e infecciones respiratorias: caras nuevas de viejos conocidos. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 45(3): 103-109.
98. Mota-Hernández F. 2006. Intoxicación por alimentos. En: *Foro Inter-académico en Problemas de Salud Global*. Becerra Posada F., pp 105-114.
99. Murray P. 2003. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, D.C. pp 422, 423.
100. Murray P., K. Rosenthal y M. Pfaller, 2009. Medical microbiology. Mosby Elsevier. Canada, pp. 310 y 311.
101. Murtagh J., 2007. Práctica general de medicina. Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F.
102. Nataro J. y J. Kaper, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Reviews Clinical Microbiology*. 11: 142-201.
103. NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/031ssa29.html> [Consultado 2011]
104. NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743> [Consultado 2011]
105. Nyiligira E., A. Viljoenb, F. Van Heerdenc, R. Van Zyla, S. Van Vuurena y P. Steenkampd. 2008. Phytochemistry and *in vitro* pharmacological activities of South African *Vitex* (Verbenaceae) species. *Journal of Ethnopharmacology*. 119(3):680-685.
106. Oi, H., D.Matsuura, , M.Miyake, , M.Ueno, , I.Takai, , T.Yamamoto, M. Kubo, J. Moss y M. Noda. 2002. Identification in traditional herbal medications and confirmation by synthesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 3042–3046.
107. OMS, 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js2299s/> [Consultado 2011]
 108. OMS, 2003a. Nota descriptiva N° 272: Ambientes saludables para los niños. <http://www.who.int/world-health-day/previous/2003/facts/es/> [Consultado 2011]
 109. OMS, 2003b. Día Mundial de la Salud. Documento de antecedentes N° 3: Ambientes saludables para los niños. <http://www.who.int/world-health-day/previous/2003/backgrounder/es/> [Consultado 2011]
 110. OMS, 2005. Nota descriptiva N°284: El medio ambiente y la salud de los niños. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs284/es/> [Consultado 2011]
 111. OMS, 2008. Boletín de la Organización Mundial de la Salud, Vol. 86. Mortalidad en la niñez por diarrea en los países en desarrollo. <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054-ab/es/> [Consultado 2011]
 112. Osuna L., M. Tapia y A. Aguilar. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales; Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. I Edicions. Barcelona, España. pp. 16-17.
 113. Osuna L., M. Tapia-Perez, O. Figueroa, E. Jimenez-Ferrer, M. Garduño-Ramirez, M. Gonzalez-Garza, P. Carranza-Gonzalez y D. Cruz-Vega. 2006. Micropropagation of *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), a plant with antiprotozoal activity. *In vitro cell development biology*. 42: 596-600.
 114. Padmalatha K., K. Jayaram, L. Raju, V. Prasad y R. Arora. 2009. Ethnopharmacological and biotechnological significance of *Vitex*. *Global Science Books*. 3(1): 6-14.
 115. Palacios F. M. Déciga y R. Mata. 2008. Atinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *Journal of ethnopharmacology*. 118(3): 448-454.
 116. Paton A., R. Harley y T. Harvey. 2000. *Vitex*: A Newsletter for Lamiaceae & Verbenaceae Research, Formerly Lamiales Newsletter. Issue I. ISSN 1470-0123.
 117. Pérez G., R. Restrepo y G. Martínez. 2009. Hormesis: Antecedentes e implicaciones en los sistemas biológicos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 28(6): 954-60.

118. Ramírez M., M. Macías, J. Ramos y E. Palacios. 2006. Tratamiento de la diarrea aguda en el paciente pediátrico. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. XX(78).
119. Ramiro M., J. Halabe, A. Lifshitz y J. López., 2002. El internista; medicina interna para internistas. Mc Graw-Hill Interamericana. México., D.F. pp. 985-996.
120. Ríos J., M. Recio y A. Villar. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* . 23:127–149.
121. Ritter J., L. Lewis, T. Mant. 1999. A textbook of clinical pharmacology. Arnold, España. 4° ed. pp. 380-381.
122. Roeder D. 1994. Therapie von Zyklusstörungen mit *Vitex agnus-castus*. *Zeitschrift für Phytotherapie*. 15:155–159.
123. Rojas G., J. Lévaro, J. Tortoriello y V. Navarro. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 74(1): 97–101.
124. Romero O., H. Reyes, I. Torres, A. Herrera y J. Tortoriello. 2005. Conocimiento sobre fitofármacos en médicos de atención primaria del estado de Morelos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 43: 281-286.
125. Romero R. e I. Herrera. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. *Editorial Médica Panamericana*. 23(29): 38-51.
126. Rosales T., M. De la Garza y C. Arias. 2008. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a mexican medicinal plant, decrease the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 115(3): 381-386.
127. Rouf R., S. Uddin, J. Shilpi, M. Toufiq-ur-rahman, M. Ferdous y S. Sarker. 2006. Propiedades antidiarreicas de *Diospyros peregrina* en el modelo de diarrea inducida con aceite de ricino en ratones. *Ars Pharmaceutica*. 47(1): 81-89.
128. Ruiz R. 2007. Estudio bacteriológico y químico de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades diarreicas. Tesis profesional de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.

129. Ryu S., C. Park, H. Baek, S. Baek, S. Hwang y W. Chung. 2004. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula. *Journal of Ethnopharmacology*. 91: 75-80.
130. Sáenz, 2005. Vacunas para el nuevo milenio ante el desafío de las enfermedades infecciosas: de la viruela al sida y al bioterrorismo. Universidad de salamanca. http://campus.usal.es/web-usal/Universidad/Gobierno___/secretaria/Leccion_inaugural_2005-06.pdf [Consultado 2011]
131. Sahm D. 2000. Antimicrobial resistance among enterococci: a view from US. Clinical laboratorios. First Internacional ASM Conference on Enterococci, Banff Canada.
132. Samy R., S. Ignacimuthu y A. Sen. 1998. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62:173-182.
133. Sghir A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart y J. Dore. 2000. Quantification of bacterial groups within the human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 123: 99-106.
134. Shu Y. 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical Industry perspective. *Journal of Natural Products*. 61: 1053-1071.
135. Silvia F., 2000. Capítulo 6, La diarrea: Uno de los grandes asesinos de niños. En Warner D. y Sanders D., 2002. *Cuestionando la solución: Las políticas de Atención Primaria de Salud y Supervivencia Infantil*. Healthwrigths.
136. Soejarto D., C. Gyllenhaal y N. Farnsworth. 1996. Preface. *Journal of Ethnopharmacology* 51: ix-x.
137. Srinivasan D., N. Sangeetha, T. Suresh y P. Lakshmanaperumalsamy. 2002. Antimicrobial activity of certain Indian Medicinal Plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 217-220.
138. Standley C. 1912. Trees and shrubs of Mexico (Passifloraceae-Scrophulariaceae), En: Contributions from the United States National Herbarium, Vol 23, Parte 4. pp. 1236.
139. Taddei-Bringas G., M. Santillana-Macedo, J. Romero-Cancio y M. Romero-Téllez. 1999. Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México*. 41: 216-220.

140. Tapia-Conyer R. 1994. La salud de los Pueblos Indígenas. Serie cuadernos de Salud, Secretaria de Salud. México. 65p.
141. Terrés A. y L. Casas. 2002. Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 40(4): 329-341.
142. Thayer K., R. Melnick y K. Burns. 2005. Fundamental Flaws of hormesis for public health decisions. *Environ Health Perspect*. 113: 1271-1276.
143. Tortoriello J., M. Meckes-Fischer, M. Villarreal, B. Berlin y E. Berlin. 1995. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the Highland of Chiapas. *Phytomedicine*. 2: 57-66.
144. Trinidad J. y J. Tay. 2003. Fundamentos de microbiología y parasitología médicas. Méndez Editores. México, D.F. pp. 316, 317 y 225.
145. Tropicos, 2011. Tropicos®: Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/> [Consultado 2011]
146. Valsaraj, R., P. Pushpangadan, U.W. Smitt, A. Adsersen y U. Nyman, 1997. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology*. 58: 75-83.
147. Verpoorte R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*. 3: 232-238.
148. Waller D. 1993. Methods in ethnopharmacology. *Journal of ethnopharmacology*. 38: 189-195.

Anexos

Anexo A. Solución fisiológica Krebs

Stocks:

Cloruro de sodio 1.0 M.....	118 ml
Cloruro de potasio 0.1 M.....	48 ml
Cloruro de calcio 0.1 M.....	26 ml
Bicarbonato de sodio 1.0 M.....	25 ml
pH.....	7.4

Indicaciones:

- 1.- Los stocks fueron elaborados con agua desionizada y mantenidos en refrigeración en todo momento hasta su utilización.
- 2.- La solución se prepara agregando los stocks en 300 ml de agua desionizada en el orden y cantidades en que aparecen mencionados arriba, aforando hasta llegar a un volumen de 1 litro.
- 3.- La solución fisiológica se calienta hasta una temperatura de 37 °C. Temperaturas mayores a 42 °C pueden provocar que algunos compuestos de la solución reaccionen y se precipiten enturbiándola, por lo que tendrá que ser renovada.
- 4.- Un litro de solución fisiológica es suficiente para hacer un máximo de cinco registros con la metodología utilizada en el presente trabajo, incluidos los lavados.

Fuente: Hoar y Hickman, 1978

Anexo B. Información de las cepas bacterianas utilizadas

Cepas obtenidas del Cepario de Bacterias Entéricas del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Por el Dr. Armando Navarro Ocaña.

Escherichia coli enteropatógena

Número FMU: E. coli EPEC 107730

Formula antigénica: O111ab:H-.

Origen: Aislamiento clínico.

Escherichia coli enterotoxigénica

Número FMU: E. coli ETEC 107525

Formula antigénica: O8:H9.

Origen: Aislamiento clínico.

Salmonella enteritidis

Número FMU: 113245.

Nombre: *Salmonella enterica* subsp *enterica*.

Serovariedad: *S. Enteritidis*.

Formula antigénica: O9:g,m:-.

Origen: Aislamiento clínico.

Salmonella typhi

Número FMU: 00190

Nombre: *Salmonella enterica* subsp *enterica*.

Serovariedad: *S. Typhi*.

Formula antigénica: O9:d:-

Origen: Aislamiento clínico.

Salmonella typhimurium

Número FMU: 113259.

Nombre: *Salmonella enterica* subsp *enterica*.

Serovariedad: *S. Typhimurium*.

Formula antigénica: O4, 5, 12:i:1,2

Origen: Aislamiento clínico

Shigella dysenteriae

Número FMU: *S. dysenteriae* 1

NCTC 8379.

Shigella flexneri.

Número FMU: *S. flexneri* 1ª.

NCTC 8516

Cepas obtenidas del Centro de Investigación Biomédica del Sur del IMSS, Xochitepec.
Laboratorio de Microbiología.

Enterococcus faecalis
ATCC 29212

Escherichia coli
ATCC 25922
ATCC 8937 (*E. coli* 2)

Pseudomonas aeruginosa
ATCC 27853

Salmonella typhi
ATCC 06539 (*S. typhi* 2)

Staphylococcus aureus
ATCC 29213

Anexo C. Características generales y epidemiológicas de las especies bacterianas utilizadas

a) *Enterococcus faecalis*

Estudios de taxonomía molecular del género *Streptococcus* han contribuido a que se realicen cambios en la clasificación de estos organismos en las últimas dos décadas, dividiendo al género *Streptococcus* y reconociendo a los *Enterococcus* como un género separado. Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos anaerobios facultativos (Murray, 2003). *E. faecalis* es una de las bacterias más comúnmente aislada del tracto gastrointestinal del humano, estudios muestran que esta bacteria representa más del 1% de la microflora de un adulto (Sghir *et al.*, 2000; Murray, 2003). Son comensales que actúan como patógenos oportunistas, particularmente en pacientes mayores con enfermedades serias y en pacientes inmunocomprometidos hospitalizados por largos periodos. *E. faecalis* es usualmente el enterococo recuperado de humanos representando del 80 al 90% de los aislamientos (Murray, 2003) y es el causante de la mayoría de las infecciones enterococcales en humanos (Gilmore, 2002) y causa del 65 al 80% de las infecciones enterococcales nosocomiales (Huycke *et al.*, 1998; Sahm, 2000).

b) *Escherichia coli*

Es el bacilo Gram negativo más predominante en la microbiota del colon, no obstante algunas cepas de *E. coli* han evolucionado y ahora son exclusivamente patógenas intestinales, originando gastroenteritis, enterocolitis y colitis por una gran variedad de mecanismos patogénicos únicos, cuando el hospedero que no ha tenido contacto las ingiere en cantidad suficiente (Kasper *et al.*, 2006). Los biotipos de *E. coli* son: enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatógena y enterohemorrágica (Levine y Edelman, 1984). Estos microorganismos se transmiten a través de la vía fecal-oral, básicamente por alimentos y agua contaminados (Kasper *et al.*, 2006).

E. coli enterotoxigénica (ETEC)

En los países tropicales o subdesarrollados ETEC constituye una causa importante de diarrea endémica, éste es el microorganismo más común en la diarrea del turista y causa entre 25 y 75% de los casos. A nivel mundial es después de los rotavirus, el segundo agente etiológico en importancia (Sáenzs, 2005). El espectro de esta enfermedad varía desde una afección leve hasta un trastorno grave similar al cólera, generando principalmente diarrea acuosa, para lo cual elabora una proteína de adherencia denominada antígeno factor de colonización que es necesario para que este microorganismo pueda colonizar la parte alta del intestino delgado antes de producir la enterotoxina. Aunque los síntomas desaparecen solos (típicamente desaparecen en tres días), la infección puede causar una morbilidad y mortalidad considerables cuando la atención sanitaria es deficiente y enferman niños pequeños o desnutridos (Kasper *et al.*, 2006). Se considera endémica en México y es la principal causa de diarrea en este país según la serie del Hospital Infantil de México (Ramiro *et al.*, 2002)

E. coli enteropatógena (EPEC)

EPEC fue la primera variedad patógena de *E. coli* reconocida como causa de diarrea. Es patógena principalmente en niños pequeños, incluyendo a los neonatos. En la actualidad la infección por EPEC es rara en los países desarrollados, por el contrario, en los subdesarrollados este microorganismo es causa importante de diarrea infantil, tanto brotes epidémicos como casos aislados. Aunque la diarrea por EPEC es autolimitada; dura cinco a 15 días, en ocasiones persiste varias semanas (Kasper *et al.*, 2006). Produce determinantes de virulencia que permite a estos microorganismos adherirse y desintegrar el borde en cepillo del epitelio intestinal, efecto denominado de adherencia y esfacelación o desprendimiento (Mossel *et al.*, 2003; Kasper *et al.*, 2006).

c) *Pseudomonas aeruginosa*

Patógeno Gram negativo ubicuo y oportunista, que pertenece a la familia Pseudomonadaceae (Kasper *et al.*, 2006). Es la única bacteria Gram negativa productora de pigmento azul de fenacina piocianina, responsable del característico pus azul observado en las heridas infectadas por este microorganismo. *P. aeruginosa* rara vez produce enfermedad en el hospedero sano, afecta a pacientes inmunodeprimidos con heridas traumáticas o quemaduras o que requieren cateterismo o intubación. Su naturaleza ubicua incrementa su diseminación, está presente no sólo en suelos y agua, también lo está en la piel de individuos sanos y heces normales (Trinidad y Tay, 2003). La mayor parte de las infecciones por *P. aeruginosa* se adquieren en el medio hospitalario. De acuerdo con el sistema del *National Nosocomial Infections Surveillance* entre 1992 y 1999, fue la segunda causa de frecuencia de neumonía y la cuarta en infecciones de las vías urinarias (Kasper *et al.*, 2006), también se ha reportado como la segunda causa principal de infección de quemaduras (Trinidad y Tay, 2003). En los pacientes hospitalizados, la colonización aumenta de acuerdo al tiempo de internación, la pérdida de la microbiota normal del cuerpo por el empleo de antibióticos de amplio espectro incrementa la tasa de colonización (Trinidad y Tay, 2003). Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se suelen iniciar con la adherencia bacteriana y la colonización de las superficies cutáneas o mucosas, evolucionando hacia la invasión bacteriana local y la lesión de los tejidos subyacentes. La infección puede permanecer anatómicamente delimitada, o bien, puede diseminarse por extensión directa a las estructuras contiguas. A este proceso puede seguir la invasión del torrente sanguíneo, la diseminación, el síndrome de reacción inflamatoria sistémica, la difusión multiorgánica y en última instancia, el fallecimiento del paciente (Kasper *et al.*, 2006).

d) *Salmonella* spp.

Las salmonelas integran un género de bacilos Gram negativos dentro de la familia Enterobacteriaceae que contiene más de 2 300 tipos serológicos, extraordinariamente bien adaptados para proliferar en seres humanos y en animales, y causando enfermedades de índole diversa (Kasper *et al.*, 2006). En 1983 se concluyó que todas las especies de *Salmonella* consideradas entonces, conforman un género y especie única; *Salmonella choleraesuis*, por la estrecha similitud de su material genético. Sin embargo por conveniencia clínica y por el amplio uso de clasificaciones previas se ha optado por seguir llamando a las salmonelas por el nombre de su serotipo con categoría de especie (Ramiro *et al.*, 2002).

S. typhi y *S. paratyphi* proliferan exclusivamente en humanos causando fiebre entérica (tifoidea), el resto de los serotipos denominados *Salmonella* no tifóidicas son prevalentes en el aparato digestivo de un gran número de animales mamíferos, reptiles, aves e insectos. Más de 200 de estos serotipos son patógenos para el ser humano, ocasionando gastroenteritis y en ocasiones infecciones circunscritas, bacteriemia, o ambas. De estas la mayor parte de los casos reportados en Estados Unidos se deben a *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Todas las infecciones por *Salmonella* comienzan con la ingestión de los microorganismos en agua o alimentos contaminados (Kasper *et al.*, 2006).

S. typhi

Prolifera exclusivamente en hospederos humanos en quienes causa fiebre entérica (tifoidea). Una vez que las salmonelas llegan al intestino delgado, se topan de nuevo con innumerables defensas del hospedero, las salmonelas penetran la capa mucosa y luego cruzan las paredes para lo cual utilizan células fagocíticas en los micropliegues. Una vez dentro del macrófago después de fagocitadas, las salmonelas se diseminan en todo el cuerpo en tales células a través de los linfáticos y colonizan los tejidos reticuloendoteliales (Kasper *et al.*, 2006).

S. typhimurium

Ubicua, frecuentemente causa infecciones en el hombre y animales, es el agente más frecuente de *Salmonella* en gastroenteritis en humanos (Krieg y Holt, 1984). Su adquisición guarda relación con la exposición a animales de granja enfermos y a diversos productos cárnicos (Kasper *et al.*, 2006). En EU *S. typhimurium* y *S. enteritidis* son de los microorganismos causales de enterocolitis, aunque esta puede ser causada por cualquier serotipo de *Salmonella* del grupo I (Jawetz *et al.*, 2007).

S. enteritidis

Frecuentemente se encuentra en humanos y animales (Krieg y Holt, 1984), y vinculada al huevo de gallina se está convirtiendo en la principal causa de enfermedad transmitida por alimentos. Esta *Salmonella* infecta los ovarios y el tejido del oviducto superior de la gallina, contaminando el contenido de los huevos antes de que se deposite la cáscara (Kasper *et al.*, 2006).

e) *Shigella* spp.

Bacilos delgados, inmóviles Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y a la tribu Escherichieae. Su relación con *E. coli* es tan íntima que los dos géneros no pueden distinguirse mediante técnicas de hibridación de DNA, de hecho puede considerarse como una *E. coli* patógena diferenciada (Kasper *et al.*, 2006). Se reconocen cuatro especies con diferencias en antígenos y en propiedades bioquímicas: *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* y *Sh. sonnei* (Ramiro *et al.*, 2002; Kasper *et al.*, 2006). El género de microorganismos se identifica por su capacidad de invadir las células del epitelio intestinal y originar infección y enfermedad a humanos –y primates superiores–, incluso con un número pequeñísimo de bacterias. Se ha calculado que en el mundo ocurren cada año por lo menos 200 millones de casos clínicos de shigelosis, que causa la muerte de 650 000 personas predominantemente en países en desarrollo y en particular en niños menores de cinco años (Kasper *et al.*, 2006).

Se transmite por vía fecal-bucal, por lo común por contacto interpersonal directo, aunque pueden participar vectores intermediarios, como alimentos agua, moscas y objetos inanimados. La disentería grave causada por este género suele entrañar infección por *Sh. dysenteriae* de tipo I, y con menor frecuencia por *Sh. flexneri*, ocupan el tercer lugar *Sh. sonnei* o *Sh. boydii* (Kasper *et al.*, 2006). La más frecuente en México es *Sh. flexneri*, seguida por *Sh. boydii*, *Sh. sonnei* y *Sh. dysenteriae*. En las escasas series de diarrea con sangre en este país (14 a 22%), se sabe que *Shigella* es el agente causal (Ramiro *et al.*, 2002).

Sh. dysenteriae

Es una especie particularmente virulenta ocurre en África y en América Central, con tasas de fatalidad del 5 al 15%. Produce una exotoxina (Toxina Shiga), que daña el epitelio intestinal, y en algunos pacientes puede mediar daño en las células endoteliales del glomérulo resultando en fallo renal (Murray *et al.*, 2009). También actúa como enterotoxina y produce diarrea. En los humanos también inhibe la absorción de azúcar y aminoácidos en el intestino delgado. Actúa como “neurotoxina”, esta sustancia puede contribuir a la gravedad extrema y a la naturaleza mortal de las infecciones por *Sh. dysenteriae*, así como a las reacciones del sistema nervioso central observadas en ellas (Jawetz *et al.*, 2007).

Sh. flexneri

Predomina en países subdesarrollados a diferencia de *Sh. sonnei* que es responsable de más del 85% de las infecciones en EU (Murray *et al.*, 2009). *Sh. flexneri* y *Sh. sonnei* producen una antitoxina que neutraliza *in vitro* la exotoxina de *Sh. dysenteriae*. La toxina produce diarrea inicial abundante, no sanguinolenta, y la invasión del intestino grueso produce después disentería con sangre y pus en las heces (Jawetz *et al.*, 2007).

f) *Staphylococcus aureus*

Bacterias Gram positivas inmóviles dispuestas en racimos individuales de la familia Micrococcaceae (Trinidad y Tay, 2003). Es la más virulenta de las muy diversas especies de estafilococos, ha demostrado su versatilidad al seguir siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a pesar de contarse con innumerables antibióticos antiestafilocócicos eficaces para combatirlo. *S. aureus* es un patógeno pluripotente que origina enfermedad por mecanismos tanto mediados como no mediados por toxinas. Este microorganismo origina infecciones nosocomiales (causa más frecuente) y de origen comunitario, que varían desde procesos relativamente menores de la piel y partes blandas, hasta trastornos generalizados que pueden ser mortales. Ocupa el segundo lugar en producir bacteriemia primaria. También produce intoxicación alimentaria estafilocócica, en EU constituye una de las principales causas de brotes de infección de origen alimentario (Kasper *et al.*, 2006). Dicha intoxicación alimentaria se caracteriza por vómito violento y diarrea profusa, que aparece de 2-8 horas después de la ingestión del alimento que contenía la enterotoxina. Aunque realmente no es grave en el sentido clínico y solo rara vez termina en muerte, la intoxicación alimentaria es, no obstante, muy desagradable causando incapacidad total durante un corto periodo de tiempo. Al parecer no todas las cepas de *S. aureus* son capaces de producir enterotoxinas. La mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica son producidos por carnes cocidas frías, especialmente las provenientes de aves y productos cárnicos curados. Los alimentos implicados a veces incluyen productos tales como los pasteles rellenos de nata, alimentos marinos y menos frecuentemente, conservas vegetales y de pescado que están contaminados por manipulación (Mossel *et al.*, 2003).

Anexo D. Pruebas estadísticas

Cuadro D1. ANOVA de la frecuencia por el tratamiento en el modelo *in vitro*, las diferencias significativas están marcadas con color rojo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Inter-grupos	0.24785	10	0.024785	12.39	0.0000
Intra-grupos	0.0620143	31	0.00200046		
Total (Corr.)	0.309865	41			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de la frecuencia en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La Razón-F, que en este caso es igual a 12.39, es un cociente de la estimación entre grupos a la estimación dentro del grupo. Dado que el Valor-P de la prueba F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia media de un nivel del tratamiento a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

Cuadro D2. Prueba de Tukey (HSD) de la frecuencia por el tratamiento en el modelo *in vitro*: los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p < 0.01$) y verde ($p < 0.05$).

		-	Tween	Hoja			Corteza			Fruto		
				H	D	M	H	D	M	H	D	M
	-											
	Tween	-0.030										
Hoja	H	-0.255	-0.224									
	D	-0.124	-0.094	0.130								
	M	-0.192	-0.162	0.063	-0.068							
Corteza	H	-0.111	-0.080	0.144	0.014	0.081						
	D	-0.131	-0.101	0.124	-0.007	0.061	-0.020					
	M	-0.230	-0.200	0.024	-0.106	-0.038	-0.120	-0.099				
Fruto	H	-0.100	-0.070	0.155	0.024	0.092	0.011	0.031	0.131			
	D	-0.125	-0.095	0.129	-0.001	0.067	-0.014	0.006	0.105	-0.025		
	M	-0.059	-0.029	0.195	0.065	0.133	0.051	0.072	0.171	0.040	0.066	

Cuadro D3. ANOVA de la tensión por el tratamiento en el modelo *in vitro*, las diferencias significativas están marcadas con color rojo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Inter-grupos	0.0550394	10	0.00550394	7.31	0.0000
Intra-grupos	0.0233388	31	0.000752866		
Total (Corr.)	0.0783782	41			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de la tensión en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La Razón-F, que en este caso es igual a 7.31, es un cociente de la estimación entre grupos a la estimación dentro del grupo. Dado que el Valor-P de la prueba F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la tensión media de un nivel del tratamiento a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

Cuadro D4. Prueba de Tukey (HSD) de la tensión por el tratamiento en el modelo *in vitro*: los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p < 0.01$) y verde ($p < 0.05$).

		-	Tween	Hoja			Corteza			Fruto		
				H	D	M	H	D	M	H	D	M
		-	-0.008									
Tween		-0.008										
Hoja	H	0.002	0.011									
	D	-0.040	-0.032	-0.043								
	M	-0.050	-0.042	-0.052	-0.010							
Corteza	H	0.006	0.015	0.004	0.046	0.056						
	D	-0.100	-0.092	-0.103	-0.060	-0.050	-0.107					
	M	-0.083	-0.074	-0.085	-0.043	-0.033	-0.089	0.017				
Fruto	H	-0.089	-0.081	-0.092	-0.049	-0.039	-0.095	0.011	-0.006			
	D	-0.047	-0.038	-0.049	-0.006	0.003	-0.053	0.054	0.036	0.043		
	M	-0.021	-0.013	-0.024	0.019	0.029	-0.028	0.079	0.061	0.068	0.025	

Cuadro D5. ANOVA de la amplitud por el tratamiento en el modelo *in vitro*, las diferencias significativas están marcadas con color rojo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Inter-grupos	0.154258	10	0.0154258	2.35	0.0335
Intra-grupos	0.203448	31	0.00656283		
Total (Corr.)	0.357705	41			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de la amplitud en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La Razón-F, que en este caso es igual a 2.35, es un cociente de la estimación entre grupos a la estimación dentro del grupo. Dado que el Valor-P de la prueba F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la amplitud media de un nivel del tratamiento a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

Cuadro D6. Prueba de Tukey (HSD) de la amplitud por el tratamiento en el modelo *in vitro*: los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p < 0.01$) y verde ($p < 0.05$).

		-	Tween	Hoja			Corteza			Fruto		
				H	D	M	H	D	M	H	D	M
	-											
	Tween	0.021										
Hoja	H	0.043	0.022									
	D	0.159	0.138	0.116								
	M	0.165	0.143	0.121	0.006							
Corteza	H	0.079	0.058	0.036	-0.080	-0.086						
	D	0.152	0.131	0.109	-0.007	-0.012	0.073					
	M	0.166	0.145	0.123	0.007	0.001	0.087	0.014				
Fruto	H	0.144	0.123	0.101	-0.015	-0.020	0.065	-0.008	-0.022			
	D	0.073	0.051	0.030	-0.086	-0.092	-0.006	-0.080	-0.093	-0.071		
	M	0.144	0.123	0.101	-0.015	-0.020	0.065	-0.008	-0.022	0.000	0.072	

Cuadro D7. ANOVA del avance del marcador por el tratamiento en el modelo *in vivo*, las diferencias significativas están marcadas con color rojo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Inter-grupos	0.00157628	4	0.000394071	4.27	0.0166
Intra-grupos	0.00138329	15	0.000092219		
Total (Corr.)	0.00295957	19			

El cuadro ANOVA descompone la varianza del avance en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La Razón-F, que en este caso es igual a 4.27, es un cociente de la estimación entre grupos a la estimación dentro del grupo. Dado que el Valor-P de la prueba F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre el avance medio de un nivel del tratamiento a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

Cuadro D8. Prueba de Tukey (HSD) del avance del marcador por el tratamiento en el modelo *in vivo*: los datos son las diferencias entre los tratamientos, las diferencias significativas están marcadas con color rojo ($p < 0.01$) y verde ($p < 0.05$).

		Tween	+	Hoja		Corteza
				H	M	M
Tween						
+		0.015				
Hoja	H	-0.005	0.010			
	M	0.013	0.028	-0.018		
Corteza	M	-0.002	0.013	-0.003	0.015	