



Efecto antiespasmódico de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* sobre íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*)

Iván M. Quispe-Díaz; Daniel Asunción-Alvarez; Roberto O. Ybañez-Julca

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 12/07/2019
Aprobado: 30/08/2019

Autor correspondiente

Iván M. Quispe-Díaz
ivan9867@hotmail.com

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Quispe-Díaz IM; Asunción-Alvarez D; Ybañez-Julca RO. Efecto antiespasmódico de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* sobre íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*). Rev Peru Med Integrativa. 2019;4(4):110-5.

Resumen

Objetivo. El objetivo de este estudio fue investigar el potencial efecto antiespasmódico de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* en íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*). **Materiales y Métodos.** Los segmentos de íleon se precontrajeron con acetilcolina (ACh; 4×10^{-6} M) y cloruro de potasio (KCl; 4×10^{-4} M) luego se evaluó la respuesta de los decoctos de *Rubus roseus* (Rr) *Mentha pulegium* (Mp) en el baño de órganos aislado en concentraciones crecientes (no acumulativas), como controles positivos se utilizaron nifedipino 5×10^{-8} M (antagonista de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes); atropina sulfato $5,5 \times 10^{-9}$ M (antagonista muscarínico no selectivo), y N-butilbromuro de hioscina 3×10^{-3} M (antagonista muscarínico M3 selectivo). Se cuantificó la amplitud y la frecuencia de contracción (durante diez minutos) después de la administración de los decoctos. **Resultados.** Los decoctos de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* reducen las contracciones inducidas por acetilcolina ($p < 0,001$) y KCl ($p < 0,01$) similares a nifedipino (Mp: 4 y 8 mg/mL); atropina sulfato (Rr: 0,2-4 mg/mL; Mp: 0,8 y 1,6 mg/mL) y N-butilbromuro de hioscina (Mp: 2,4 y 8 mg/mL). Por otro lado, ambos decoctos reducen la frecuencia de contracción inducidas por ACh ($p < 0,001$) y KCl ($p < 0,001$). **Conclusión.** Los decoctos de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* tienen efecto antiespasmódico en íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*).

Palabras clave: *Rubus roseus*; *Mentha pulegium*; Cobayo, Antiespasmódicos (Fuente: DeCS).

Antispasmodic effect of *Rubus roseus* and *Mentha pulegium* on guinea pig (*Cavia porcellus*) isolated ileum.

Abstract

Objective. This study aimed to investigate the potential antispasmodic effect of *Rubus roseus* and *Mentha pulegium* on isolated guinea pig (*Cavia porcellus*) ileum. **Materials and Methods.** The ileum segments were pre-contracted with acetylcholine (ACh, 4×10^{-6} M) and potassium chloride (KCl, 4×10^{-4} M) then the response of the *Rubus roseus* (Rr) and *Mentha pulegium* (Mp) decocts was evaluated in the organ bath isolated in increasing concentrations (non-cumulative), as positive controls were used nifedipine 5×10^{-8} M (antagonist of voltage dependent Ca^{2+} channels) atropine sulfate $5,5 \times 10^{-9}$ M (non-selective muscarinic antagonist) and 3×10^{-3} M hyoscine N-butylbromide (selective M3 muscarinic antagonist). The amplitude and the frequency of contraction were quantified (during 10 minutes) after the administration of the decocts. **Results.** The decocts of *Rubus roseus* and *Mentha pulegium* decrease the contractions induced by acetylcholine ($p < 0.001$) and KCl ($p < 0.01$) comparable to nifedipine (Mp: 4 and 8 mg/mL), atropine sulfate (Rr: 0.2 - 4 mg/mL, Mp: 0.8 and 1.6 mg/mL) and hyoscine N-butylbromide (Mp: 2.4 and 8 mg/mL). On the other hand, both decocts reduce the frequency of contraction induced by ACh ($p < 0.001$) and KCl ($p < 0.001$). **Conclusions.** The decocts of *Rubus roseus* and *Mentha pulegium* have an antispasmodic effect on isolated guinea pig ileum (*Cavia porcellus*).

Keywords: *Rubus roseus*; *Mentha pulegium*; Guinea Pig, Antispasmodics (Source: MeSH).

¹ Laboratorio de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS), está especialmente interesada en apoyar el desarrollo de la medicina tradicional (incluido el uso de plantas medicinales) desarrollando políticas y legislaciones nacionales, facilitando el intercambio de información regional sobre estos temas y al respaldar los esfuerzos para certificar la seguridad de los productos y la disponibilidad de recursos humanos formados y cualificados ⁽¹⁾.

Mentha, el género de la familia Labiatae, incluye veinte especies que se extienden por todo el mundo. *Mentha pulegium* L. es una de las especies de *Mentha* comúnmente conocida como «pennyroyal» ⁽²⁾. Las partes aéreas de floración de *Mentha pulegium* L. se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento del resfriado, la sinusitis, el cólera, la intoxicación alimentaria, la bronquitis y la tuberculosis ⁽³⁾. Se ha reportado algunos de los efectos farmacológicos de *Mentha pulegium* L como abortivo en miometrio de rata ⁽⁴⁾; relajante sobre tráquea y vejiga urinaria de rata ⁽⁵⁾; antileishmaniásico, antibacteriano y antioxidante ⁽⁶⁾.

Rubus L. es un género muy polimórfico (nombre en latín cuyo significado es rojo); las especies presentan espinas en tallos y peciolos; flores con igual estructura que la fresa y, por lo tanto, producen frutos agregados (polidrupas) conocidos como frutillas, zarzamoras o moras. Los frutos son utilizados en la alimentación desde la época incaica, muchas son silvestres y otras cultivadas. *Rubus roseus* Poir, también llamado zarzamora, es un arbusto espinoso, con flores rosadas, con frutos que al madurar son de color carmesí o casi negros y de sabor ácido o dulzaino; empleados en la elaboración de jugos, conservas, vinos y aguardiente. Crece en el Perú entre 2000-4000 m de altitud ⁽⁷⁾. Las plantas sintetizan una variedad de fitoquímicos médicamente activos, pero la mayoría son derivados de alcaloides, fenólicos, terpenoides y glucósidos. Los compuestos fenólicos son los metabolitos más activos del género *Rubus* y por ello son usados en aplicaciones etnomedicinales ⁽⁸⁾. Estos compuestos fenólicos incluyen flavonoides; potentes antioxidantes *in vitro*, tales como flavonas, isoflavonas, flavononas, catequinas, y los pigmentos rojos, azul y púrpura conocidos como antocianinas ^(9,10). Muchas culturas, sin el conocimiento de los agentes químicos particulares, han observado propiedades medicinales en *Rubus* y las han aplicado de diferentes maneras ⁽⁸⁾.

El dolor abdominal es una de las razones más comunes por las que las personas buscan atención médica; estos malestares pueden estar relacionados con trastornos autolimitantes transitorios o con enfermedades graves que ponen en peligro la vida y requieren una intervención inmediata. Llegar a un diagnóstico definitivo puede ser difícil, debido a la cantidad de sistemas de órganos en el abdomen, y debido a que una multiplicidad de enfermedades puede causar este síntoma ⁽¹¹⁾. Es por eso que, en vista de los pocos antecedentes, y con la finalidad de revalorar el uso etnofarmacológico para el tratamiento de los cólicos intestinales, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antiespasmódico de *Mentha pulegium* y *Rubus roseus* en músculo liso intestinal aislado de *Cavia porcellus*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las muestras vegetales de *Mentha pulegium* y *Rubus roseus* provinieron de la provincia de Otuzco (La Libertad, Perú) y Pataz (La Libertad, Perú) respectivamente. De *Mentha pulegium* se seleccionaron las hojas y tallos; y de *Rubus roseus* las hojas. Luego, las muestras se secaron a 40 °C para su posterior molienda.

Preparación de los extractos

Se prepararon decoctos (p/v) de *Rubus roseus* al 1; 5; 10; 15, y 20%, mientras que de *Mentha pulegium* fueron al 10 y 20%. El procedimiento consistió en pesar la muestra vegetal debidamente secada y molida, luego se llevó a ebullición 0,1 g (en el caso del decocto al 1%) por diez minutos en 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se filtró y almacenó en un frasco color ámbar.

Animales de experimentación

Se usaron *Cavia porcellus* machos (Mp: n = 7 y Rr: n = 6) con un peso entre 300-350 g, procedentes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, seleccionados aleatoriamente. Los especímenes seleccionados tuvieron un periodo de aclimatación de una semana antes de iniciar el experimento.

Preparación de la muestra y el medio fisiológico

Cada espécimen fue sacrificado por dislocación cervical siguiendo las recomendaciones previamente reportadas ^(12,13). Se extrajo una porción de íleon (3 cm) y se colocó en una placa Petri con solución de tyrode a 37 °C, la cual contenía (en mM): NaCl (136,9); KCl (2,68); CaCl₂ (1,8); MgCl₂ (1,05); NaHCO₃ (11,9); NaH₂PO₄ (0,42), y D (+)-glucosa (5,55). El tejido conectivo se recortó cuidadosamente y se removieron restos de grasa, luego se llevaron al baño de órganos ⁽¹⁴⁾. Se colocó un pequeño gancho de acero inoxidable en un extremo para conectar el tejido al soporte, y un hilo de seda en el otro extremo conectó el tejido a un transductor de fuerza (MLT0210/A, PanLab). Los datos experimentales se registraron a través de un sistema PowerLab 26T (AD Instruments) con el programa Chart v5.5 para Windows (MLS013/W). Los tejidos se mantuvieron en solución tyrode constantemente aireada y a una temperatura de 37 ± 0,5 °C en un baño de órganos de 25 mL (Single Channel Modular Organ Bath, modelo LE 11.100, Panlab s.l, ADInstruments Pty Ltd).

Protocolo de estudio

Los efectos de acetilcolina (4×10^{-6} M) y KCl (4×10^{-4} M) se estudiaron utilizando un régimen de dosis única con un tiempo de preincubación de cinco minutos o hasta que se logre la generación de una meseta contráctil estable. Luego, cada concentración del decocto (dosis no acumulativas) estuvo tres minutos en contacto con el tejido, al final de la administración de cada concentración del decocto se realizaron tres lavados con solución tyrode fresca y luego se dejó estabilizar por diez minutos antes de iniciar la siguiente concentración. Como controles positivos se utilizaron nifedipino 5×10^{-8} M (antagonista de canales de Ca²⁺ voltaje dependiente); atropina sulfato $5,5 \times 10^{-9}$ M (antagonista muscarínico no selectivo), y N-butilbromuro de hioscina 3×10^{-3} M (antagonista muscarínico M₃ selectivo). Los resultados se expresaron usando la concentración final en el baño de órgano aislado, por ejemplo, si se adicionó 0,5 mL del decocto al 1% (p/v) resulta en una concentración final de 0,2 mg/mL.

Análisis estadístico

El software GraphPad Prism (San Diego, USA) fue el empleado, n representa el número de animales estudiados, y los valores se expresaron como la media ± error estándar de la media (SEM). Para el análisis de los datos se realizó la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey como prueba *post hoc*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

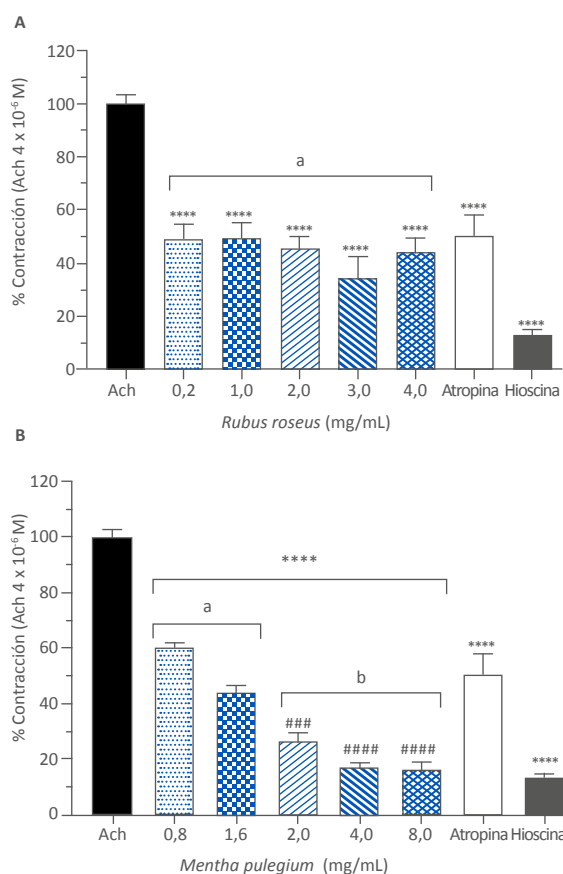
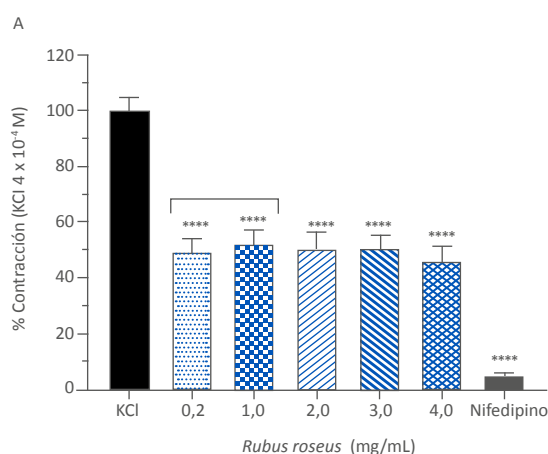


Figura 1. (A) *Rubus roseus* y (B) *Mentha pulegium* reducen la contracción inducida por acetilcolina 4×10^{-6} M sobre íleon de *Cavia porcellus*. Diferencias significativas: **** $p < 0,0001$ vs. acetilcolina (100 % efecto contráctil); *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ vs. atropina sulfato; a = n.s vs. atropina sulfato; b = n.s vs. N-butilbromuro de hioscina; n.s = no significativo.



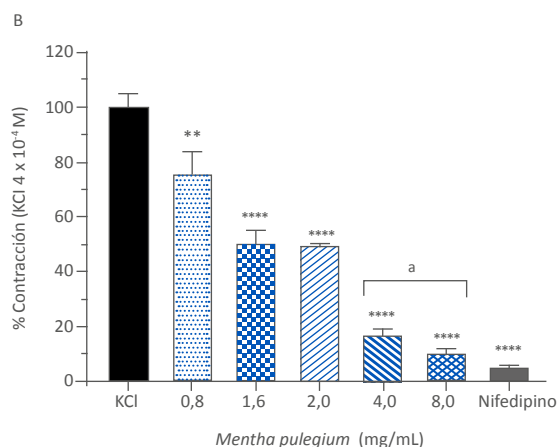


Figura 2. (A) *Rubus roseus* y (B) *Mentha pulegium* reducen la contracción inducida por KCl 4×10^{-4} M sobre íleon de *Cavia porcellus*. Diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. acetilcolina (100% efecto contráctil); a = n.s. vs. Nifedipino. n.s. = no significativo.

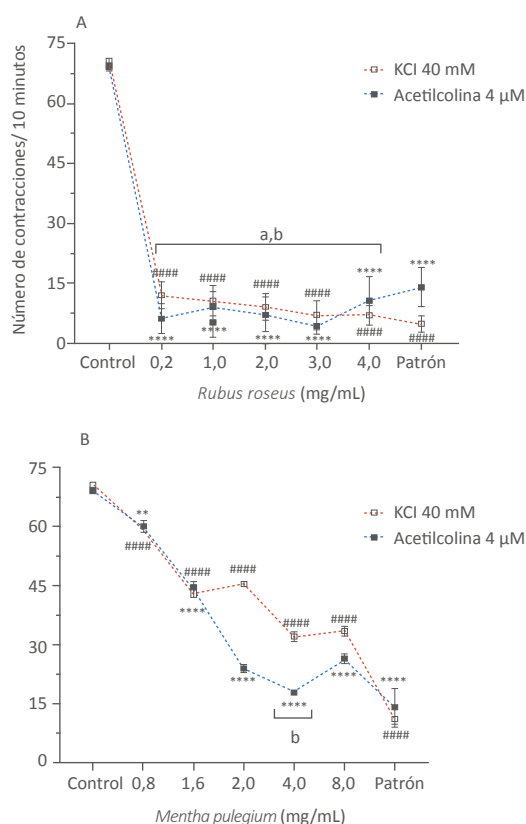


Figura 3. Efecto de (A) *Rubus roseus* y (B) *Mentha pulegium* sobre la frecuencia de contracción en íleon de *Cavia porcellus*. Control: acetilcolina $5 \mu\text{M}$ y/o KCl 40 mM en ausencia del decocto. Patrón: N-butilbromuro de hioscina o nifedipino según corresponda. Diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. control (Ach); ### $p < 0,0001$ vs. control (KCl). a = n.s. vs. nifedipino; b = n.s. vs. Hioscina; n.s. = no significativo.

Discusión

El músculo liso es un tejido heterogéneo que cumple un papel importante en muchos procesos fisiológicos elementales en el cuerpo, como en el sistema vascular, las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal, la vejiga urinaria y el útero ⁽¹⁵⁾.

La distinción importante entre el músculo estriado y el músculo liso es que el calcio media la contracción al regular la disponibilidad de filamentos de actina en el músculo estriado, mientras que en el músculo liso el objetivo es la cadena ligera de miosina (MLC). La fuente del aumento en los niveles de calcio citosólico puede ser extracelular o intracelular, o una combinación de los dos ⁽¹⁶⁾. En el presente trabajo se indujo una meseta contráctil utilizando dos tipos de sustancias, una de ellas fue la acetilcolina, neurotransmisor que en ámbito intestinal activa el receptor M_3 , el cual está acoplado principalmente a la subfamilia $G_{q/11}$ de proteínas G. La activación de la proteína G conduce a la estimulación mediada por $G_{\alpha q}$ de la fosfolipasa- $C\beta$, generando la escisión del fosfatidil inositol 4,5 – bisfosfato (PIP_2) en los dos segundos mensajeros inositol-1, 4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 , se difunde en el citosol y se une a su receptor inositol 1,4,5 trifosfato tipo 1 (ITPR1) en el retículo sarcoplásmico, aumentando así la liberación de calcio (Ca^{2+}) ⁽¹⁷⁾. El Ca^{2+} libre (intracelular) se une a la calmodulina y el complejo se une y activa la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK). Luego, MLCK fosforila la cadena ligera reguladora de miosina (MYL12B) en Ser19 y esto permite que se produzca el ciclo de puentes cruzados. Paralelamente, tanto Ca^{2+} como DAG reclutan proteína quinasa C (PKC) a la membrana. La proteína quinasa activa fosforila un regulador inhibidor de la fosfatasa de cadena ligera de la miosina denominado CPI-17 (o PPP1R14A) en thr-38, potenciando también la contracción ⁽¹⁸⁾.

Otra de las sustancias estudiadas fue el cloruro de potasio (KCl) hipermolar, se cree que el acoplamiento electromecánico de esta sustancia, genera una despolarización y esta media la contracción basada en la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la superficie celular (VGCC), aunque también se ha planteado la participación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} en este mecanismo ⁽¹⁹⁾.

En la Figura 1, se observa que *Rubus roseus* (Rr) y *Mentha pulegium* (Mp), reducen la contracción inducida por acetilcolina (Ach) 5×10^{-6} M, en íleon aislado de *Cavia porcellus*, mostrando ambas diferencias estadísticas ($p < 0,0001$); con relación al grupo control (Ach). Rr, a

las concentraciones de 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/mL, presenta similar efecto al de atropina sulfato (As). Mp, a las concentraciones de 0,8 y 1,6 mg/mL, presenta similar efecto al de As, pero a las concentraciones de 2,0; 4,0; 8,0 mg/mL, presentan diferencias significativas ($p < 0,001$), en relación a As, teniendo similar efecto a N-butilbromuro de hioscina.

Un estudio desarrollado por Estrada S, *et al.*, evaluó el efecto espasmolítico de *Mentha pulegium* L (Mp) en íleon de ratas Wistar, y se concluyó que el extracto diclorometano de Mp, a la concentración de 200 ug/mL, disminuyó las contracciones inducidas por carbachol ($p < 0,05$); indicando que el extracto en mención indujo su efecto espasmolítico a través del bloqueo del influjo de calcio en los canales de calcio voltaje dependiente ⁽²⁰⁾.

Niaz A, *et al.*, evaluaron el efecto espasmolítico de *Mentha longifolia* (MI) en yeyuno de *Orcytolagus cuniculus*, y concluyeron que el extracto crudo de MI, inhibe las contracciones inducidas por acetilcolina; fundamentando en el bloqueo de los canales de calcio voltaje dependiente ⁽²¹⁾.

En la Figura 2 se observa que *Rubus roseus* (Rr) y *Mentha pulegium* (Mp), reducen la contracción inducida por cloruro de potasio (KCl) 4×10^{-4} M, en íleon aislado de *Cavia porcellus*, mostrando ambas, diferencias estadísticas ($p < 0,0001$) y $p < 0,01$ para Mp a la concentración de 0,8 mg/mL, en relación al grupo control (Ach). Mp, a las concentraciones de 4,0 y 8,0 mg/mL, presenta similar efecto al nifedipino.

Niaz A, *et al.*, evaluaron el efecto enterorrelajante de *Rubus fruticosus* (Rf) en yeyuno de *Orcytolagus cuniculus*, y concluyeron que el extracto metanólico de Rf, en contracciones inducidas por KCl, genera relajación; ello se fundamenta debido a que los canales de calcio activados por voltaje regulan los movimientos peristálticos en el ámbito intestinal, permitiendo la despolarización periódica y la repolarización de este. El KCl genera contracción intestinal debido a la entrada de calcio del medio extracelular al intracelular, por lo tanto, los fitoquímicos de Rf, estarían bloqueando dichos canales ⁽²¹⁾.

Estrada S, *et al.*, evaluaron el efecto espasmolítico de *Mentha pulegium* L (Mp) en íleon de ratas Wistar, y

concluyeron que el extracto diclorometano de Mp, a la concentración de 200 ug/mL, disminuyó las contracciones inducidas por KCl (10-100 ug/mL); indicaron que el extracto en mención indujo su efecto espasmolítico a través del bloqueo del influjo de calcio en los canales de calcio voltaje dependiente ⁽²⁰⁾.

Naseri MK, *et al.*, evaluaron el efecto enterorrelajante de *Mentha longifolia* (MI) en íleon de ratas Wistar, y concluyeron que las contracciones inducidas por cloruro de potasio y carbachol, son reducidas por el extracto hidroalcohólico de las hojas de MI; principalmente a través del bloqueo de los canales de calcio y en parte por la activación de los canales de potasio ⁽²²⁾.

En la Figura 3 se observa que *Rubus roseus* (Rr) y *Mentha pulegium* (Mp), reducen la contracción inducida por acetilcolina (Ach) 5×10^{-6} M y cloruro de potasio (KCl) 4×10^{-4} M, en íleon aislado de *Cavia porcellus*, mostrando, ambas, diferencias estadísticas ($p < 0,0001$) con relación al grupo control (Ach y KCl). Rr, a las concentraciones de 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/mL, presenta similar efecto al de nifedipino y N-butilbromuro de hioscina (Nbh). Mp, a la concentración de 4,0 mg/mL, similar efecto a Nbh.

Ghader J, concluye que la esencia de *Mentha longifolia* (MI) tiene un potencial para desarrollarlo como un agente procinético y relajante que puede prevenir o aliviar la disfunción de la motilidad gastrointestinal ⁽²³⁾.

El presente trabajo brinda hallazgos preliminares que permiten conocer el efecto antiespasmódico de las dos especies vegetales estudiadas. Con base en estos resultados, futuros estudios pueden evaluar el mecanismo de acción y los metabolitos implicados en la generación del efecto antiespasmódico. Se concluye que los decoctos de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* tienen efecto antiespasmódico en íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*).

Conclusión

Los decoctos de *Rubus roseus* y *Mentha pulegium* tienen efecto antiespasmódico en íleon aislado de cobayo (*Cavia porcellus*).

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Ginebra 2002. p. 31.
2. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 119(2): 325–327. doi:10.1016/j.jep.2008.07.023.
3. Zargari, A., 1990. Herbal Medicines. Publication of Tehran University, Tehran, pp. 14–18.

4. Soares P, Assreuy A, Souza E, Lima R, Silva T, Fontenele S, Criddle D. Inhibitory effects of the essential oil of *Mentha pulegium* on the isolated rat myometrium. *Planta Medica*. 2005; 71: 214–218. doi: 10.1055/s-2005-837819.
5. Soares P, de Freitas Pires A, de Souza E, Assreuy A, Criddle D. Relaxant effects of the essential oil of *Mentha pulegium* L. in rat isolated trachea and urinary bladder. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 64(12): 1777–1784. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01558.x.
6. Bouyahya A, Et-Touys A, Bakri Y, Talbaui A, Fellah H, Abrini J, Dakka N. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*. 2017; 111: 41–49. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.015.
7. Fernández A, Rodríguez E. Etnobotánica del Perú Pre-Hispano. Ediciones Herbarium Truxillense (HUT), Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú, 2007.
8. Hummer K. *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. *HortScience*. 2010; 45(11): 1587–1591. doi: 10.21273/HORTSCI.45.11.1587.
9. Määttä-Riihinen K, Kamal-Eldin A, Törrönen A. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(20): 6178–6187. doi:10.1021/jf049450r.
10. Moyer R, Hummer K, Finn C, Frei B, Wrolstad R. (2002). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(3):519–525. doi:10.1021/jf011062r.
11. Samuels L. Pharmacotherapy Update: Hyoscine Butylbromide in the Treatment of Abdominal Spasms. *Clinical Medicine. Therapeutics*. 2009;1, CMT.S1134. doi:10.4137/cmt.s1134.
12. Asunción-Alvarez D, Ybañez-Julca R. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. “mango Kent”, sobre memoria espacial y la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas. *Rev Peru Med Integrativa*. 2018;3(1):18–25.
13. American Veterinary Medical Foundation. AVMA Guidelines for the Humane Slaughter of Animals: 2016 Edition. pp: 39, 40.
14. Borrelli F, Borbone N, Capasso R, Montesano D, De Marino S, Aviello G, et al. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 122(3): 434–438. doi:10.1016/j.jep.2009.02.003.
15. Boron, Boulpaep. Medical physiology: a cellular and molecular approach. Oxford: Elsevier; 2005.
16. Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7(2):a006023. doi:10.1101/cshperspect.a006023.
17. Mak DP, McBride S, Foskett JK. Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning to Ca^{2+} inhibition. *PNAS U.S.A.* 1998; 95, 15821–15825. doi: 10.1073/pnas.95.26.15821.
18. Li L, Eto M, Lee MR, Morita F, Yazawa M, Kitazawa T. Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J. Physiol*. 1998; 508, 871–881. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.871bp.x.
19. Kirschstein T, Rehberg M, Bajorat R, Tokay T, Porath K, Köhling R. High K^{+} -induced contraction requires depolarization-induced Ca^{2+} release from internal stores in rat gut smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(8):1123–1131. doi:10.1038/aps.2009.98
20. Estrada S, Gonzales D, Castillo P, Aguirre F, Sánchez J. Spasmolytic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips. *J. Smooth Muscle Res*. 2010; 46 (2): 107–117. doi: 10.1540/jsmr.46.107.
21. Ali N, Aleem U, Ali Shah SW, et al. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 138. doi:10.1186/1472-6882-13-138.
22. Naseri MK, Naseri ZG, Mohammadian M, Birgani MO. Ileal relaxation induced by *Mentha longifolia* (L.) leaf extract in rat. *Pak J Biol Sci*. 2008 Jun 15; 11(12):1594–9. doi: 10.3923/pjbs.2008.1594.1599
23. Jalilzadeh-Amin G, Maham M, Dalir-Naghadeh B, Kheiri F. Effects of *Mentha longifolia* essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. *Journal of Essential Oil Research*. 2012; 24(1), 61–69. doi:10.1080/10412905.2012.646019