



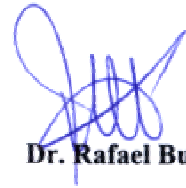
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Farmacología

Caracterización de la respuesta de *ANDROGRAPHIS PANICULATA* sobre el bloqueo de los canales de calcio dependiente de voltaje en musculatura lisa uterina

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA

Marcela Juliana Aguila Garcés
Valdivia Chile 2000

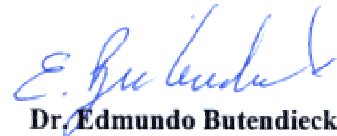
PROFESOR PATROCINANTE.



Dr. Rafael Burgos A.

COPATROCINANTE.

PROFESORES CALIFICADORES.



Dr. Edmundo Butendieck B.



Dr. Gerold Sievers P.

FECHA DE APROBACION

13 de Enero del 2000.

*Con mucho cariño a mis Padres, Hermanas
y a mi nueva familia César y Sebastián
por su gran apoyo y confianza.*

INDICE

	Pág.
1.-RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.- INTRODUCCION	3
4.- MATERIAL Y METODOS	7
5.- RESULTADOS	10
6.- DISCUSION	19
7.- CONCLUSIONES	22
8.-BIBLIOGRAFIA	23
AGRADECIMIENTOS	26

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA DE *ANDROGRAPHIS PANICULATA* SOBRE EL BLOQUEO DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE EN MUSCULATURA LISA UTERINA.

1. RESUMEN

La posible relajación del extracto seco de *Andrographis paniculata* vía bloqueo de canales de calcio operados por voltaje en musculatura lisa uterina fue investigada en ratas.

Los cuernos uterinos pretratados con estradiol fueron incubados en una solución Jalón sin CaCl_2 y estimulados con KCl (20-60 mM), en orden produjeron la depolarización de la membrana. La respuesta contráctil isométrica de 1mM de concentraciones acumulativas de CaCl_2 fueron bloqueadas por 0.2 y 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*.

La respuesta contráctil máxima inducida por acetilcolina fue moderadamente antagonizada por *Andrographis paniculata*.

El posible bloqueo de la entrada de CaCl_2 por *Andrographis paniculata* fue evaluado con la incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en trozos de útero incubados en una solución Ringer sin calcio y una solución alto K^+ (KCl 40mM). La incorporación fue completamente bloqueada por 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*.

Estos resultados fuertemente sugieren que *Andrographis paniculata* bloquea los canales de CaCl_2 operados por voltaje inhibiendo por lo tanto la entrada de CaCl_2 desde el medio externo

Palabras claves: *Andrographis paniculata*, útero, canales de calcio, $^{45}\text{CaCl}_2$, acetilcolina, músculo liso.

CHARACTERIZATION OF THE RESPONSE OF *ANDROGRAPHIS PANICULATA* ON THE BLOCKADE OF VOLTAGE OPERATED CALCIUM CHANNELS IN UTERINE SMOOTH MUSCLE.

2. SUMMARY

The possible relaxation of uterine smooth muscle by *Andrographis paniculata* dried extract via a blockade of voltage operated calcium channels were investigated in rats.

Uterine horns pretreated with estradiol were incubated in CaCl_2 -free-Jalon's solution and stimulated with KCl (20-60 mM) in order to produce the depolarization of the membrane. The isometric contractile response to 1 mM or cumulative concentrations of CaCl_2 were blockaded by 0.2 and 0.4 mg/ml of *Andrographis paniculata*.

The maximum contractile response induced by acetylcholine was moderately antagonised by *Andrographis paniculata*.

The possible blockade of CaCl_2 entry by *Andrographis paniculata* was evaluated with $^{45}\text{CaCl}_2$ uptake in uterine rings incubated with free- CaCl_2 -Ringer's solution high in K^+ (KCl 40 mM). The influx was completely blockaded with 0.4 mg/ml of *Andrographis paniculata*.

This results strongly suggest that *Andrographis paniculata* blockades voltage operated calcium channels inhibiting hence the entry of CaCl_2 from the external medium.

Key words: *Andrographis paniculata*, uterus, calcium channels, $^{45}\text{CaCl}_2$, acetylcholine, smooth muscle

3. INTRODUCCION

El músculo liso del útero se caracteriza por su alto grado de actividad eléctrica y contractilidad espontánea (Kao, 1987). El músculo liso visceral se caracteriza por la inestabilidad y por el hecho que muestra contracciones continuas, irregulares independientes de su inervación. El músculo liso uterino es relativamente inexcitable durante el diestro y en el animal ovariectomizado, pero durante el estro o en los animales ovariectomizados tratados con estrógenos aumenta la excitabilidad, presentándose contracciones espontáneas y tono (Ganong, 1984). Debido a la inestabilidad de su potencial de membrana, el músculo liso uterino se contrae por la depolarización de la membrana, y también por la activación de receptores. En ambos casos, la respuesta contráctil se debe principalmente a la entrada de calcio extracelular, a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Ichida y col., 1983).

La contracción de células de músculo liso depende al menos de tres mecanismos: a) canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje que se abren en respuesta a la depolarización de la membrana y permiten que el Ca^{2+} extracelular se mueva por su gradiente electroquímico hacia la célula (Robertson y Robertson, 1996). Por ejemplo, una alta concentración de K^+ , induce la depolarización de membrana, la apertura del canal de calcio y la contracción, b) contracciones inducidas por agonistas que ocurren sin depolarización de la membrana, dependen de la hidrólisis del fosfatidilinositol, con la formación de inositol trifosfato (IP_3), que actúa como un segundo mensajero para liberar el Ca^{2+} intracelular desde el retículo sarcoplásmico. c) canales de Ca^{2+} operados por receptores activados por neurotransmisores y hormonas (Berridge, 1993). Norepinefrina, libera Ca^{2+} desde los sitios de almacenamiento intracelular e induce inicialmente una contracción transitoria, además favorece la apertura de los canales de Ca^{2+} dependiente de receptores.

Los bloqueadores de canales de Ca^{2+} constituyen un importante grupo de fármacos en la terapéutica de hipertensión arterial. Los grupos más utilizados son fenilalquilaminas (Verapamil), benzotiazepinas (Diltiazem), dihidropiridinas (Nifedipino). Verapamil es la droga clásicamente usada para el tratamiento de hipertensión. Bloquea los canales de Ca^{2+} tipo-L dependientes de voltaje en músculo liso vascular (Hockerman y col., 1997), uterino (Ichida y col., 1983) y deferente (Hata y col., 1992), siendo también efectivo en el tratamiento de arritmias en el músculo cardiaco (Hockerman y col., 1997). Los canales de Ca^{2+} tipo-L, dependientes de voltaje activados por una alta concentración de K^+ , son bastantes sensibles a los bloqueadores de canales de Ca^{2+} . En estos tejidos la respuesta contráctil es abolida por la remoción del Ca^{2+} externo, en cambio norepinefrina induce su contracción que es resistente a la remoción de Ca^{2+} externo y su respuesta no es inhibida por los bloqueadores de canales de Ca^{2+} debido a la liberación de Ca^{2+} intracelular almacenada en el retículo sarcoplásmico (Karaki y cois., 1997). Sin embargo en el útero la estimulación mediada por acetilcolina produce contracción del tejido, que es dependiente de la presencia de calcio extracelular (Ichida y cols, 1983). Por lo tanto se sugiere que en útero la respuesta contráctil inducida por acetilcolina y K^+ depende de la apertura de canales de calcio.

Andrographis paniculata Ness, es una planta medicinal mundialmente conocida como Kalmegh. Existen 19 especies de *Andrographis* pertenecientes a la familia *acanthaceae* (Alagesaboopathi y Balu, 1995). Es originaria de Asia, principalmente de China, India y Korea (Gupta y Srivastava, 1994), siendo utilizada tradicionalmente en éstos países contra: disenterías, dispepsias, decaimiento general, diabetes (Moniruddin y Talukder, 1977), leptospirosis, tuberculosis, cuadros de envenenamiento, abortos (Chang y But, 1987) cuadros de hepatitis viral B (Mehrotra y col., 1990), en desordenes hepáticos (Thamlikitkul y col., 1991), cuadros de malaria (Misra y col., 1992), también ha sido utilizada como: antiinflamatorio, antidiarreico, antipirético (Subramanian y col., 1995), antiulcerogénico (Madav y col., 1995).

A. paniculata químicamente está compuesta por lactonas diterpénicas y sesquiterpénicas, flavonoides y azúcares. El principal constituyente de *A. paniculata* es la lactona diterpénica andrografolido, esta lactona puede ser extraída de la parte aérea de la planta por medio de soluciones alcohólicas o alcalinas. Las lactonas más importantes que se han descubierto de *A. paniculata* son las siguientes: andrografolido, deoxiandrografolido, neoandrografolido y 14-deoxi-11-12-dihidroandrografolido. Recientemente han sido aislados y dilucidados algunos constituyentes diterpénicos de *A. paniculata* como: dideoxi - andrografolido, andrographiside, dideoxy - andrographiside. Entre los compuestos flavonoides descubiertos en la planta están: andrographidine A, polimetoxiflavona- andrografin, panicolin, etc. (Tang y Eisenbrand, 1992).

A. paniculata posee propiedades inmunoestimulante, antiinflamatoria y hepatoprotectora debido a la presencia de la lactona andrografolido (Thamlikitkul y cols, 1991). La capacidad inmunoestimulante a sido demostrada, según Puri y col., (1993) debido a la presencia de dos lactonas diterpénicas andrografolido y neoandrografolido, las cuales estimularían la respuesta inmune específica y no específica, además determinó un aumento del 40% de la respuesta humoral y un incremento de la respuesta celular, debido al aumento de la capacidad mitogénica de los linfocitos y macrófagos.

La actividad antiinflamatoria de la lactona diterpénica (andrografolido) fue estudiada comparándola con el ácido acetilsalicílico y fenilbutazona, en diferentes modelos de inflamación en ratas a las cuales se le administraron soluciones de carragenina, kaolín, nistalin y un extracto de *M. tuberculosis* que produce artritis en ratas. Por ejemplo dosis de 30,100 y 300 mg/kg de andrografolido (p.o.) disminuyeron el edema producido por carragenina en un 11.81, 27.81 y 52.08 % respectivamente. Sin embargo fenilbutazona disminuyó el edema en un 72.2%. Dosis de 100 a 300 mg/kg de andrografolido disminuyeron el granuloma producido por *Mycobacterium tuberculosis* entre un 20 - 30 % respectivamente, lo que indicaría un moderado efecto antiinflamatorio en modelos de inflamación agudos, sub -agudos y crónicos. (Madav y col., 1996).

La propiedad hepatoprotectora se ha evidenciado en la administración de hojas secas de *A. paniculata*, la cual disminuye el efecto hepatotóxico inducido por CCl₄ (Choudhury y Poddar, 1984). Andrografolido posee propiedades hepatoprotectoras, así lo demostraron Handan y Sharma, (1990) con dosis de 200 y 400 mg/kg. Se observó que la mayor concentración produjo una marcada disminución de las transaminasas (GOT, GPT, etc.). También dosis de 1.5 a 12 mg/kg de andrografolido por vía oral, aumentaron el flujo biliar de 4.8 a 76% respectivamente (Shukla y col., 1990).

Es posible que *A. paniculata* impida la acción contráctil del músculo liso debido a la presencia de flavonoides, que en general han demostrado ser potenciales compuestos bloqueadores de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Hammad y Abdala, 1997).

Se ha descrito una actividad hipotensiva de *A. paniculata* la que ha sido demostrada con dosis dependientes, observándose el efecto en la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensivas (Zhang y Tan, 1996). Recientemente a sido demostrado un efecto hipotensivo en ratas normotensas con una ED_{50} de 5.0 - 11.4 mg/kg del extracto acuoso y fracción butanol. El mecanismo del efecto hipotensor no ha sido demostrado (Zhang y Tan, 1997), éste efecto podría ser atribuido a una relajación de la musculatura lisa vascular.

El extracto crudo de *A. paniculata* puede prevenir la isquemia miocárdica, produciendo una reducción de la isquemia y arritmia medida E.C.G., también reduce el tamaño de los infartos y el daño ultraestructural (Guo y col., 1996). Este efecto ha sido asociado a la disminución de la sobrecarga de calcio involucrado en el proceso de reperfusión isquémica miocárdica (Guo y col., 1995). Se ha descrito que *A. paniculata* alivia la severidad de la aterosclerosis producida por una estenosis de la arteria iliaca inducida por una dieta alta en colesterol y por una desendotelización y puede disminuir marcadamente el grado de estenosis después de la angioplastia experimental en conejos (Wang y Zhao, 1994). También se ha demostrado que 14-deoxyandrografolido es capaz de inhibir la contracción inducida por calcio en aorta de rata (Zhang y Tan, 1998).

Existen pocos antecedentes sobre la farmacocinética del andrografolido Wuxi, (1979) determinó el metabolismo de ^{35}S - NaHSO_3 -andrografolido administrado vía endovenosa en ratas. La mayor concentración se observó en recto, riñones, médula espinal y en menor proporción en pulmones. Se detectó que a las 2 horas de la administración de ^{35}S - NaHSO_3 - andrografolido, hay una disminución del casi 50% de la dosis inicial, lo que indicaría su corta vida media en éstos experimentos.

La toxicidad y efectos adversos fueron estudiados con la administración de 1g/kg (p.o) de andrografolido en ratas albino y conejos, por 7 días, lo cual no produjeron cambios significativos en el crecimiento, función hepática, renal e histología de órganos importantes (Chang y But, 1987). Se ha descrito que *A. paniculata* produce una disminución del crecimiento de células trofoblásticas coriónicas humanas in vitro que podría explicar el efecto abortivo que ha sido descrito en conejas y ratas preñadas (Chang y But, 1987).

3.1 OBJETIVOS

- Determinar que *Andrographis paniculata* produce relajación del músculo liso uterino.
- Comprobar que el efecto inhibitorio de *Andrographis paniculata* es debido al bloqueo de la respuesta contráctil, inducida por la administración de CaCl_2 .
- Corroborar que *Andrographis paniculata* bloquea canales de calcio tipo - L dependiente de voltaje, similar a la producida por Verapamil.
- Estimar que *Andrographis paniculata* bloquea la entrada de $^{45}\text{CaCl}_2$ hacia el interior de la célula.

3.2 HIPOTESIS

Andrographis paniculata bloquea los canales de Ca^{2+} tipo-L dependientes de voltaje, produciendo relajación de la musculatura lisa del útero.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Biológico:

40 ratas hembras Sprague - Dawley con un peso de 200 g. provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la U.A.Ch.

4.1.2. Farmacológico:

Acetilcolina (Lab. Sigma), Calcio⁴⁵ New England Dupont®, Cipionato de Estradiol (Lab. Upjohn), Cloruro de Calcio (Merck), Extracto seco de *Andrographis paniculata* fabricado por Swedish Herbal Institute, Verapamil (Lab. Sigma).

4.1.3. Instrumentos:

Baño de órganos aislados, contador de centelleo, instrumental quirúrgico (pinzas, tijeras), polígrafo, traductor de tensión, tubos de vidrio de 5cc y 10cc.

4.2 METODOS

Las ratas fueron tratadas dos días antes con cipionato de estradiol (1mg/kg. i.m.) con el fin de aumentar la excitabilidad y motilidad del músculo liso uterino e incrementar el ingreso del calcio al interior de la célula.

Los cuernos uterinos posteriormente fueron incubados en un baño de órganos aislados gasificado con una mezcla de 5% de CO₂ en oxígeno, a 30°C.

4.2.1 Determinación del efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata contraído con 0.3mM y 3mM de CaCl₂.

Los cuernos uterinos fueron preincubados en una solución Jalón sin calcio alto K⁺ que contiene: NaCl 115.7mM, KCl 40 mM, NaHCO₃ 11.9 mM, Glucosa 5.55mM. por 60 min. y sometidos a una tensión de un gramo. Posteriormente al baño se le adicionó una concentración de 0.3mM y 3mM de CaCl₂ cuando correspondió y se esperó la respuesta máxima de contracción del tejido. A continuación se le agregó concentraciones acumulativas de *A. paniculata* (0.1mg *Ap.*/ml a 2.8 mg *Ap.*/ml) o de Verapamil (1x10⁻⁸ a 1x10⁻⁵ M) y se observó la respuesta.

4.2.2 Determinación del efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata contraído con concentraciones acumulativas de CaCl_2 .

El tejido se preincubó en una solución Jalón sin calcio alto K^+ : NaCl 92.3mM, KCl 57.7mM, NaHCO_3 11.9 mM , Glucosa 5.55mM. por 60 min. y sometidos a una tensión de un gramo. Posteriormente el tejido se incubó sólo o en presencia de *A. paniculata* (0.2mg/ml, 0.4mg/ml) o Verapamil (5×10^{-8} , 1×10^{-7} M) y fue contraído con concentraciones acumulativas de CaCl_2 (0.1 a 10 mM).

4.2.3 Determinación del efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata estimulado con KCl y contraído con 1mM de CaCl_2 .

El útero se preincubó en una solución Jalón sin calcio: NaCl 150 mM, KCl 5.77 mM, NaHCO_3 11.9 mM, Glucosa 5.55 mM. por 60 min. y sometidos a una tensión de un gramo. A continuación el tejido se incubó en concentraciones crecientes de KCl (20 a 60 mM), sólo o en presencia de *A. paniculata* (0.2mg/ml, 0.4mg/ml) o Verapamil (1×10^{-8} , 1×10^{-7} M) y se contrajo con 1mM de CaCl_2 .

4.2.4 Determinación del efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata estimulado con Acetilcolina.

Los cuernos uterinos fueron preincubados en una solución de Krebs que contiene: NaCl 120 mM, KCl 4.69 mM, NaHCO_3 25 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.18mM, KH_2PO_4 1.02 mM, Glucosa 11.1 mM, CaCl_2 2.43 mM, por 60 min. y sometidos a una tensión de un gramo. A continuación al baño se le adicionó concentraciones acumulativas de Acetilcolina (1×10^{-7} a 5×10^{-4} M) y se observó la respuesta. Luego el tejido fue incubado en una solución de Krebs que contenía concentraciones de *A. paniculata* (0.2 mg/ml, 0.4mg/ml) o Verapamil (1×10^{-7} , 1×10^{-6} M). Posteriormente al baño se le agregó concentraciones acumulativas de Acetilcolina y se observó la respuesta.

4.2.5 Determinación de la incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en útero de rata depolarizado con 40mM de KCl.

Los cuernos uterinos fueron preincubados en una solución Ringer sin calcio que contiene (en mM): NaCl 135.6 mM, KCl 5.4mM, MgCl_2 0.2mM, NaHCO_3 20 mM, KH_2PO_4 0.6mM, Glucosa 2.8 mM por 60 min. a 30°C.

Para medir la incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en el tejido depolarizado con KCl, se utilizaron trozos (12-20 mg), que fueron incubados por 5 min. en una solución Ringer sin calcio y en una solución Ringer sin calcio alto K^+ (40mM KCl).

Para determinar los efectos de *A. paniculata* y Verapamil algunos trozos de tejido fueron incubados en una solución Ringer sin calcio como control y en una solución Ringer sin calcio alto

K⁺ (40 mM KCl), en presencia de una concentración de 0.4 mg/ml de *A.paniculata* o de 10⁻⁵ M de verapamil, durante 5 minutos. Posteriormente a todos los tubos se le agregó 1mM de CaCl₂ y 0.5 μCi ⁴⁵CaCl₂. El volumen final de la reacción fue de 3 ml. Los tejidos fueron lavados 2 veces con un volumen de 5 ml con una solución buffer Tris- lantano- ácido acético (pH 6.0) que contiene (en mM): NaCl 122mM, KCl 5.9 mM, LaCl₃ 50mM, MgCl₂ 1,25 mM, Glucosa 11 mM, Trizma 6 mM. Luego los tejidos se llevaron a tubos de vidrio de 10 ml. que contienen la solución buffer Tris-Lantano a 4°C por 20 min. Posteriormente fueron pesados y colocados en viales de centelleo y a cada tubo se le adicionó 500 ul del detergente Sani T- 10 y se incubó por 2 hrs. a 60°C. Finalmente a cada vial se le agregó 5 ml de líquido de centelleo, y se midió la radioactividad en un contador β de centelleo.

4.3 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos de la respuesta contráctil fueron ajustados mediante una regresión logística usando el programa Graphpad 2.0.

Se obtuvieron valores promedios de concentración efectiva 50 (EC₅₀ ± E.E) y de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀ ± E.E.), cuando correspondió y porcentajes máximos de contracción. Los valores promedios de concentración efectiva fueron expresados como logaritmo en base 10 y fueron analizadas mediante test de Anova o test de students cuando correspondió. Los porcentajes máximos de contracción fueron transformados en su valor arcoseno (Steel y Torne, 1985), y posteriormente fueron analizadas mediante Anova o el test de comparaciones múltiples de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata contraído con 0.3mM y 3mM de CaCl₂.

(Fig. 1) Se observó que *A. paniculata* redujo la respuesta contráctil inducida por 0.3mM y 3mM de CaCl₂ en una solución Jalón sin calcio alto K⁺ (40 mM). Las IC₅₀ (mg/ml) de *A. paniculata* en útero contraído con 0.3mM y 3mM de CaCl₂, fueron: 0.32 ± 0.02 y 1.7 ± 0.45 respectivamente. Las que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

En la Figura 2, se observa el efecto inhibitorio de Verapamil sobre la contracción inducida por calcio en útero en una solución Jalón sin calcio alto K⁺(40 mM). Las IC₅₀ de Verapamil en úteros contraídos con 0.3 y 3 mM CaCl₂ fueron (log M): -6.897 ± 0.2470 y -6.032 ± 0.0738 respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

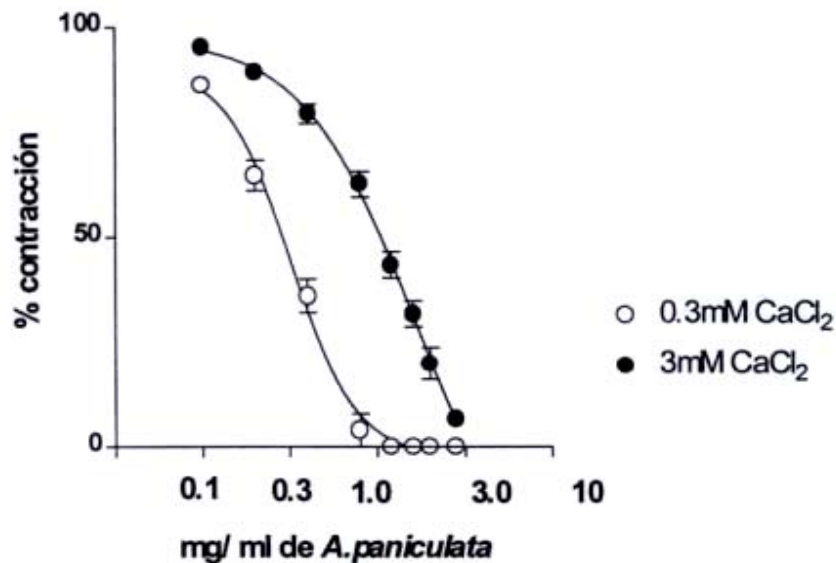


Fig. 1: Efecto de *Andrographis paniculata* en la respuesta contráctil de cuernos uterinos incubados en una solución Jalón con exceso de K⁺(40mM) en adición de 0.3 y 3 mM de CaCl₂ (n=4).

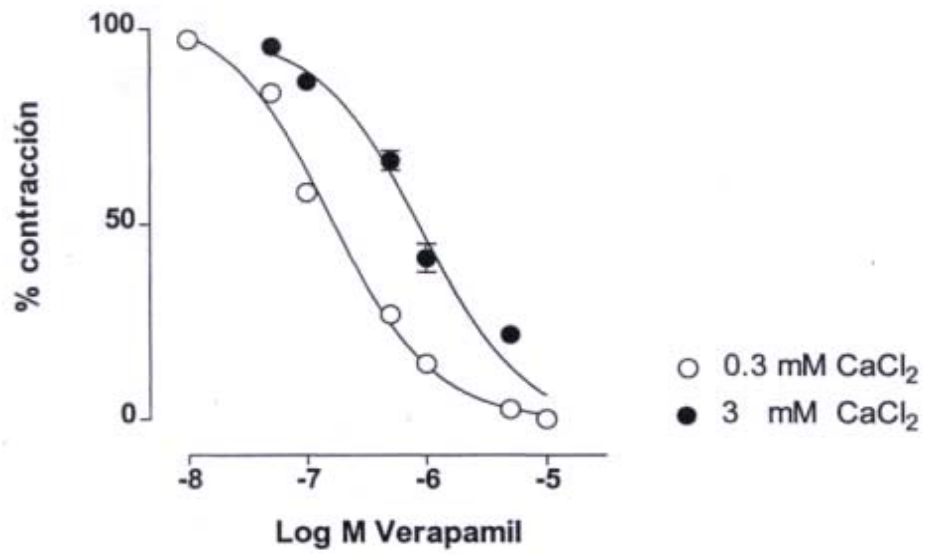


Fig. 2: Efecto de Verapamil en la respuesta contráctil de cuernos uterinos incubados en una solución Jalón con exceso de K^+ (40mM) en adición de 0.3 y 3 mM de $CaCl_2$, (n=4).

5.2. Efecto inhibitorio de *Andrographis paniculata* y Verapamil en útero de rata contraído con concentraciones acumulativas de CaCl_2

Concentraciones de 0.2mg/ml y 0.4mg/ml de *A. paniculata*, produjeron una disminución de la EC_{50} (Log M de CaCl_2): -3.11 ± 0.05 y -2.86 ± 0.06 respectivamente, las que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Las respuestas contráctiles máximas (%) fueron: 100.7 ± 1.97 y 88.51 ± 2.73 respectivamente. 0.4 mg/ml de *A. paniculata* produjo una disminución de la respuesta contráctil máxima, que fue estadísticamente significativa con respecto al control. ($p < 0.0001$), (Fig.3.).

$5 \times 10^{-8} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de Verapamil produjeron una disminución de la EC_{50} (Log M de CaCl_2): -2.71 ± 0.09 y -2.5 ± 0.05 respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$). Las respuestas contráctiles máximas (%) fueron: 106 ± 0.6 , 90.3 ± 4.3 respectivamente, esta última fue estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.01$), (Fig.4).

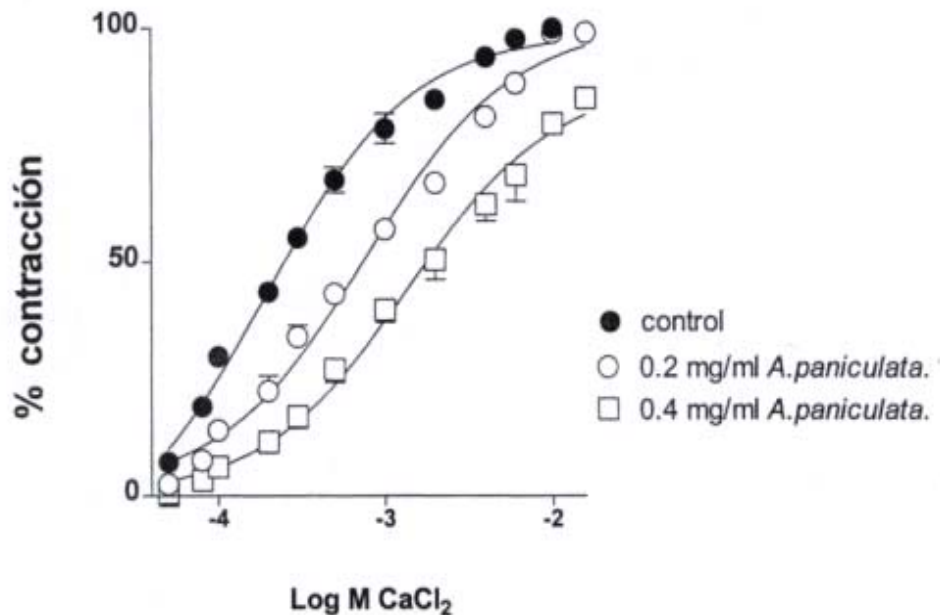


Fig.3: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de *Andrographis paniculata* sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, inducida por concentraciones acumulativas de CaCl_2 ,-(n=4).

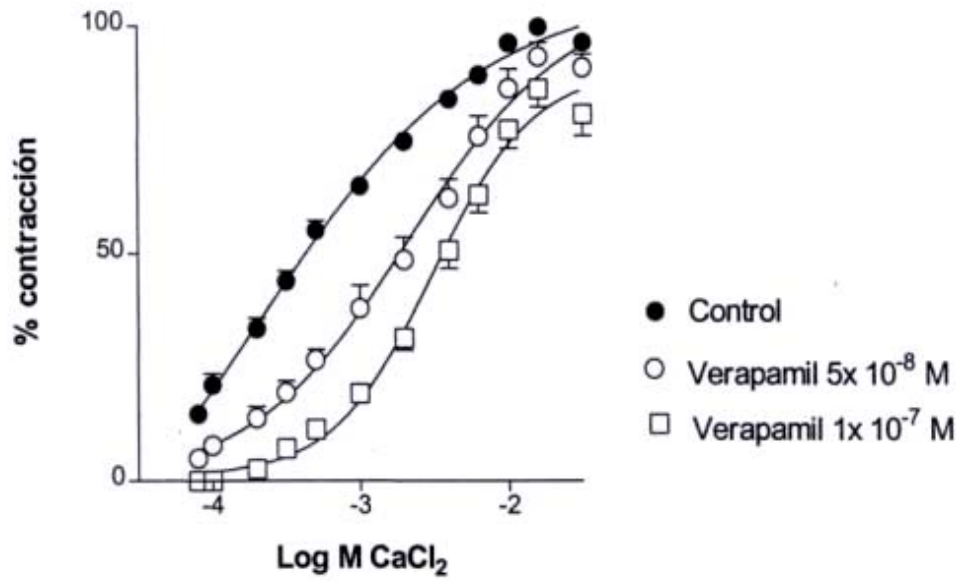


Fig. 4: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, inducida con concentraciones acumulativas de CaCl₂, (n=5).

5.3 Efecto inhibitorio de *A. paniculata* y verapamil en útero de rata estimulado con KCl y contraído con 1mM de CaCl₂.

(Fig.5) muestra la respuesta contráctil en función a la adición de 1mM CaCl₂. La contracción fue estimulada por concentraciones de KCl (20 a 60 mM).

0.2mg/ml y 0.4mg/ml de *A. paniculata* no produjeron una disminución de las EC₅₀, pero sí una disminución de la respuesta contráctil máxima(%): 75.04%±3.10, 59.27%±3.92 las cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas con el control (p<0.05) y (p<0.001) respectivamente.

Por otra parte concentraciones de 1x10⁻⁸M y 1x10⁻⁷M de Verapamil no produjeron disminución de las EC₅₀, pero si de las respuestas contráctiles máximas (%): 77.83% ±4.61, 40%± 2.26 las cuales fueron estadísticamente significativas con respecto al control, (p<0.05) y (p<0.0001) respectivamente (Fig.6).

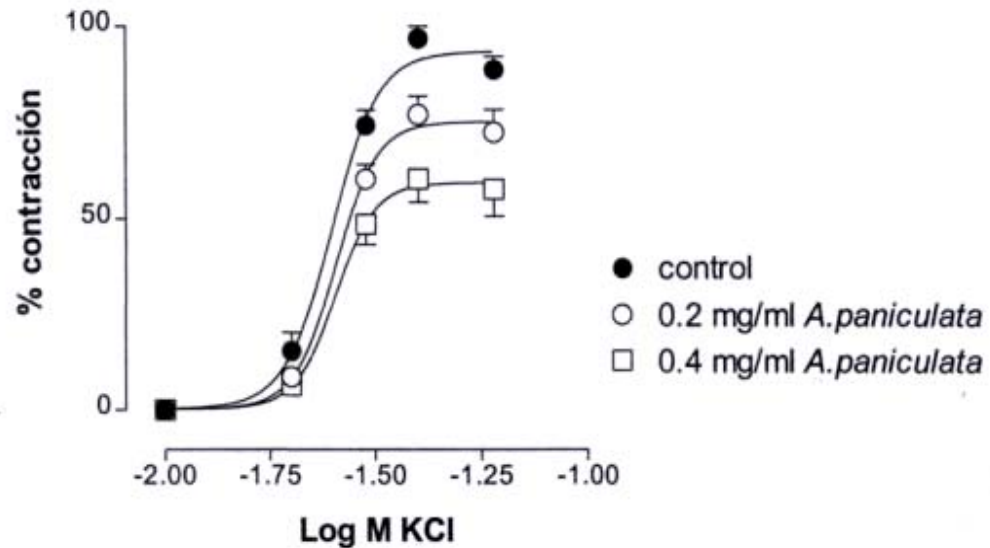


Fig.5: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de *Andrographis paniculata* sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, inducida con 1mM de CaCl₂ en distintas concentraciones de KCl, (n=5).

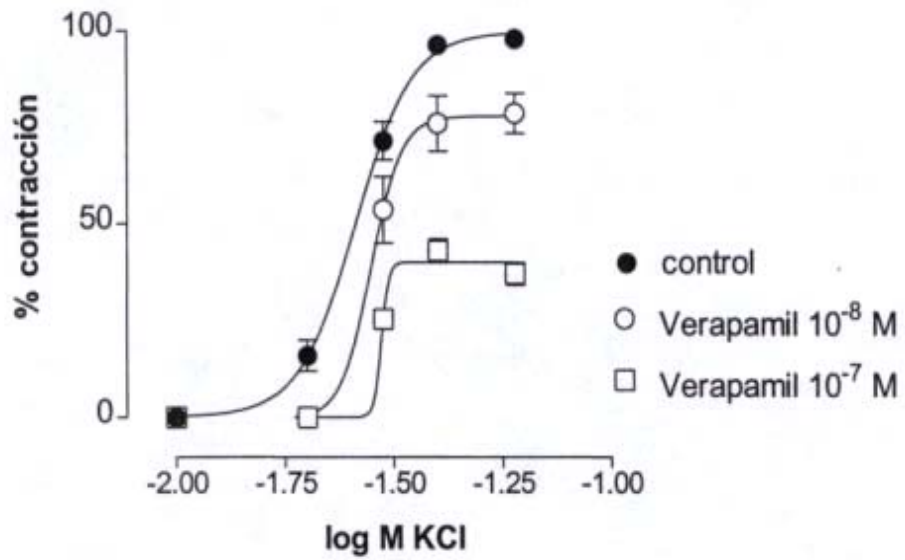


Fig.6: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, inducida con 1mM de CaCl_2 en distintas concentraciones de KCl, (n=4)

5.4 Efecto inhibitorio de *A. paniculata* y Verapamil en útero de rata estimulado con acetilcolina.

Las EC_{50} de acetilcolina sólo o en presencia de 0.2mg/ml, 0.4mg/ml de *A. paniculata* fueron: (log M Ach) -5.450 ± 0.06843 , -5.504 ± 0.089 respectivamente. Las cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas, ($p > 0.05$) con respecto al control (-5.82 ± 0.05). Las respuestas contráctiles máximas (%) de Ach. en presencia de 0.2 y 0.4 mg/ml de *A. paniculata* fueron: $99.32 \% \pm 2.27$ y $86.24 \% \pm 2.96$, respectivamente. Sólo se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$), de la respuesta contráctil máxima con la concentración de 0.4 mg/ml de *A. paniculata* con respecto a su control. (Fig. 7).

Las EC_{50} de Acetilcolina obtenidas sólo o en presencia de 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M de Verapamil fueron (logM Ach): -6.07 ± 0.06 , -6.06 ± 0.11 , -5.43 ± 0.07 respectivamente. La disminución de la EC_{50} de Ach. obtenida con 1×10^{-7} M de Verapamil fue estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.0001$). Además se observó una disminución estadísticamente significativa de las respuestas contráctiles máximas (%) de Ach. en presencia de 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M de Verapamil: $76.65 \% \pm 2.55$, $63.90 \% \pm 1.80$ ($p < 0.001$) y ($p < 0.001$) respectivamente con respecto a su control (Fig. 8).

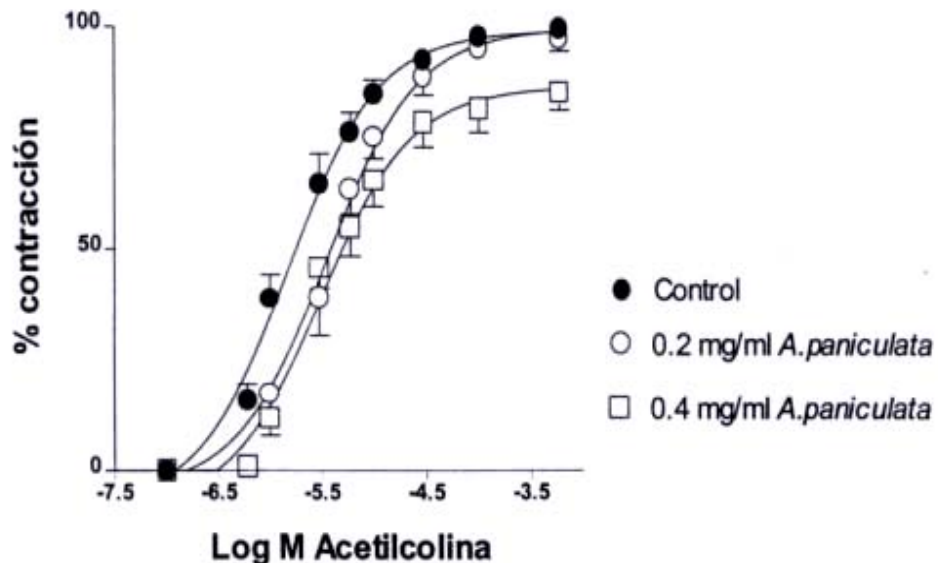


Fig. 7: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de *Andrographis paniculata* sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, estimulada por concentraciones acumulativas de Acetilcolina, (n=4).

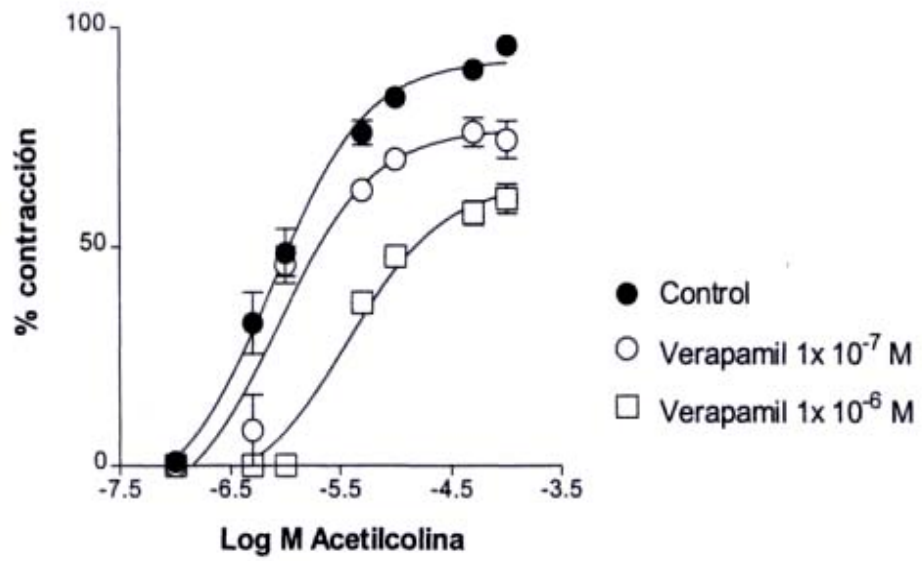


Fig.8: Efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la respuesta contráctil de la musculatura lisa uterina, estimulada por concentraciones acumulativas de Acetilcolina (n=4).

5.5. Incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en útero de rata depolarizado con 40mM de KCl.

La incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en tejido depolarizado fue aumentada cuando los trozos uterinos fueron incubados en una solución Ringer sin calcio y posteriormente estimulados con una alta concentración de KCl (40 mM) (Fig.9). Al agregar la concentración de 0.4mg/ml de *A. paniculata* y 1×10^{-5} M de Verapamil a los trozos de útero que fueron incubados solamente en una solución Ringer sin calcio, no se observaron mayores diferencias en la incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$, con respecto a su control. Sin embargo cuando los tejidos fueron incubados en una solución Ringer sin calcio y estimulado con una alta concentración de KCl (40 mM), la adición de 0.4mg/ml de *A. paniculata* o de 1×10^{-5} M de Verapamil, produjeron una disminución de la incorporación de $^{45}\text{CaCl}_2$ del medio externo hacia el interior de la célula. Estas disminuciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), con respecto a su control (fig. 9).

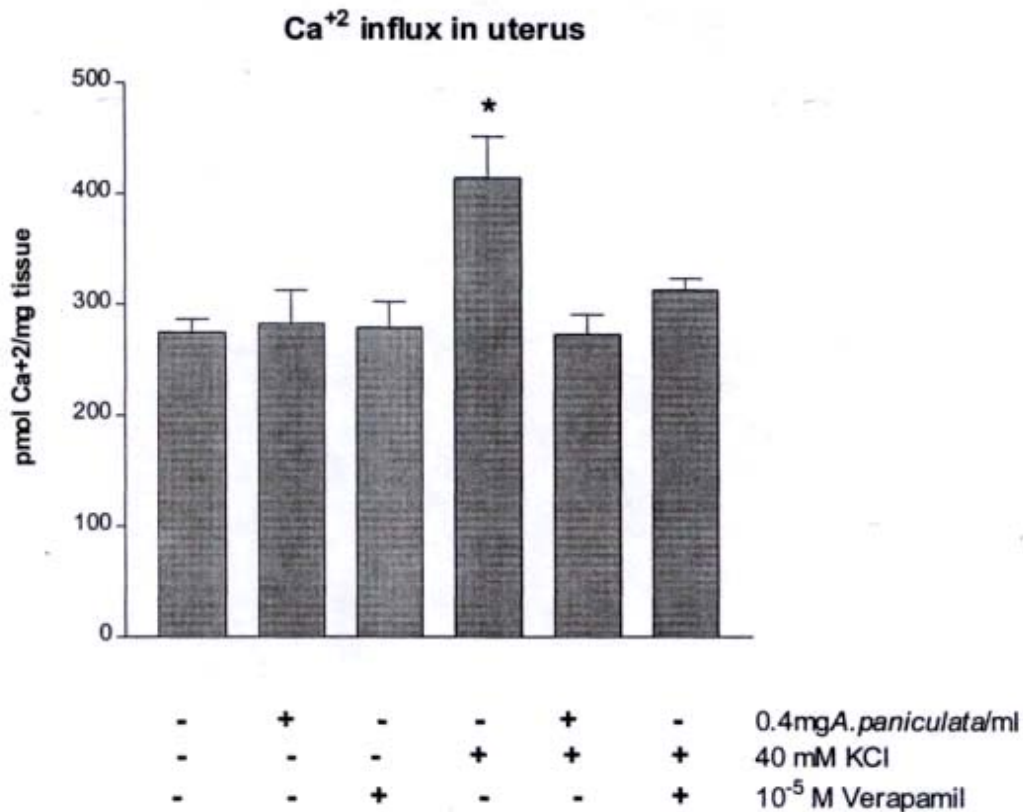


Fig. 9 Efecto inhibitorio de la entrada de Ca^{2+} inducida por *A. paniculata* y Verapamil.
 * $p < 0.05$ comparado con las otras series (n = 4, en duplicado)

6. DISCUSION

El componente activo de *Andrographis paniculata* relacionado al efecto de relajación de la musculatura lisa es desconocido. Según Zhang y col. (1997), andrografolido, el principal constituyente de la planta, no posee un efecto hipotensivo. Sin embargo se ha aislado un componente de *A. paniculata*, 14- deoxiandrografolido el cual posee un efecto vasorelajante ésto se demuestra en experimentos realizados en aortas torácica de ratas, que previamente fueron estimuladas con KCl y norepinefrina, los resultados indicaron que la actividad vasorelajante de 14- deoxiandrografolido podría ser mediada vía óxido nítrico sintasa o vía guanilato ciclasa o también bloqueando canales de calcio dependientes de voltaje y receptores (Zhang y Tan, 1998).

Recientes estudios demostraron que el efecto vasorelajante de 14- deoxiandrografolido es debido a que estimulan el óxido nítrico liberado desde células endoteliales (Zhang y Tan, 1999). El óxido nítrico se sintetiza a partir de L-Arginina y del oxígeno molecular por acción de la sintetasa del óxido nítrico. Se produce normalmente en muchos tipos de células, entre ellas las endoteliales, que tienen funciones que varían desde la neurotransmisión hasta la vasodilatación (Eckenhoff y Longnecker, 1996).

En músculo liso vascular existen dos tipos de estimulantes ampliamente usados para identificar los cambios de $(Ca^{2+})_i$; alto K^+ induce depolarización de la membrana y norepinefrina que libera calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular (Karaki y col., 1997). Concentraciones elevadas de K^+ inducen depolarización y una contracción sostenida que es totalmente abolida por la remoción del calcio externo y por agentes bloqueadores de canales de calcio (Karaki y col., 1997). Esta depolarización inducida por KCl estaría encargada de abrir los canales de calcio dependientes de voltaje y el posterior ingreso de calcio provocando la contracción del músculo. En éste trabajo los experimentos estuvieron basados en la utilización de K^+ en distintas situaciones (concentraciones únicas de K^+ y crecientes de K^+), lo cual estaría indicando un posible efecto bloqueador de canales de calcio dependiente de voltaje por *A. paniculata*, lo cual disminuiría la contracción anulando el efecto depolarizante.

Los resultados de los experimentos demostraron que la concentración de 0.4mg/ml de *A. paniculata*, inhibe la respuesta contráctil de $CaCl_2$ en tejido incubado en una solución Jalón alto K^+ (57.7 mM) (fig. 3). Concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/ml de *A. paniculata* antagonizan la contracción inducida por 1mM de $CaCl_2$ en cuernos uterinos previamente estimulados con dosis crecientes de KCl (20-60 mM) (fig. 5). Además se observó que concentraciones acumulativas de *A. paniculata* que oscilan entre 0.32 ± 0.02 y 1.7 ± 0.45 mg/ml redujeron la respuesta contráctil inducida por 0.3 y 3 mM de $CaCl_2$ en cuernos uterinos incubados en una solución Jalón sin calcio alto K^+ (40mM) (fig. 1).

Los resultados obtenidos con el extracto de *A. paniculata* se compararon con los resultados obtenidos de Verapamil, los cuales demostraron tener un efecto similar al antagonizar la respuesta

contráctil de los cuernos uterinos (fig. 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8). Verapamil es un bloqueador de canales de calcio tipo- L dependiente de voltaje. Los bloqueadores de canales de calcio sólo inhiben la contracción en canales de calcio dependiente de voltaje y no así en la contracción transitoria inducida por norepinefrina, que estimula la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (Karakı y col., 1997).

En experimentos recientemente realizados en conducto deferente de rata, *A. paniculata* también antagoniza el efecto contráctil inducida por KCl al igual que en Verapamil, pero no afectó la respuesta contráctil estimulada por Norepinefrina, debido a que en una solución libre de calcio a la cual se le adicionaron concentraciones crecientes de CaCl₂ no produjeron una disminución de la contracción del músculo liso, debido a la liberación del calcio intracelular pero cuando la Norepinefrina endógena fue agotada con Reserpina, en una solución libre de calcio a la cual se le agregaron concentraciones crecientes de CaCl₂ la contracción disminuyó. Lo que indicaría que podría existir un efecto bloqueador de canales de calcio por parte de *A. paniculata* y Verapamil(*).

El bloqueo producido por *A. paniculata* y Verapamil en canales de calcio operados por receptores, se evaluó mediante la respuesta contráctil estimulada por Acetilcolina. Con *A. paniculata* no se observaron mayores diferencias de la EC₅₀, ya que no fueron estadísticamente significativas, en cambio con Verapamil la disminución de la respuesta contráctil se evidenció más claramente. En base a ésto podemos decir que existe una mayor selectividad por parte de *A. paniculata* por canales de calcio operados por voltaje (fig. 7 y 8).

Según Ichida y col., (1983) la inhibición provocada por Verapamil, Diltiazem y CoCl₂ de la respuesta contráctil inducida por KCl, ACh y 5-HT es similar. Bolton (1979), reportó que los dos tipos de canales de calcio presentes en músculo liso (operados por voltaje y receptores), no se observan diferencias en las características de la respuesta contráctil liberada por K⁺, ACh y 5-HT. Estos autores indicarían que los bloqueadores de canales de calcio no son capaces de diferenciar la activación de canales de calcio operados por receptores y por voltaje.

Para confirmar que *A. paniculata* bloquea la incorporación de calcio, se realizaron experimentos midiendo la incorporación de ⁴⁵CaCl₂ desde el medio externo hacia el interior de la célula. Los resultados ratificaron más esta idea, ya que hubo una disminución de la incorporación de ⁴⁵CaCl₂ hacia el interior del tejido uterino, que fue estadísticamente significativa, al adicionar 0.4 mg/ml de *A. paniculata* y 10⁻⁵ M de Verapamil, sólo en trozos uterinos que previamente fueron incubados en una solución Ringer sin Calcio y estimulados con K⁺ (40mM) y contraído con 1mM de CaCl₂ conteniendo ⁴⁵CaCl₂.

En el experimento realizado por Ichida y col., (1983), fue descrito que al usar bloqueadores de canales de calcio como Verapamil y Diltiazem, inhibieron la respuesta contráctil inducida por KCl, ACh y 5-HT, los cuales estimulan la incorporación de ⁴⁵CaCl₂ desde el medio externo hacia el interior de la célula.

(*) Información obtenida de experimentos realizados en el instituto de farmacología de la U. A.Ch. para tesis de grado del alumno Marcelo Imilán O.

En base a todo lo mencionado anteriormente se puede concluir que el efecto relajante que produce *A. paniculata* en la musculatura lisa uterina, es debido a un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual descartaría un bloqueo inespecífico de la respuesta contráctil.

7. CONCLUSIONES

- *Andrographis paniculata* produce un efecto relajante de la musculatura lisa uterina.
- El efecto inhibitorio de *Andrographis paniculata* es debido al bloqueo de la respuesta contráctil, inducida por la administración de CaCl_2
- *Andrographis paniculata* bloquea canales de calcio dependiente de voltaje, inhibiendo la entrada de calcio del medio extracelular hacia el interior de la célula.
- *Andrographis paniculata* no produce un bloqueo de canales de calcio dependiente de receptores en forma selectiva.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALAGESABOOPATHI, C., S. BALU. 1995. Andrographolide content of some therapeutically important species of *Andrographis wall.* *Crop-res.-Hisar.* 10(3) :353-355.
- BATRA, S. 1987. Increase by oestrogen of calcium entry and calcium channel density in uterine smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 92: 389-392.
- BERRIDGE. 1993. Fármacos usados en el tratamiento de la isquemia miocárdica. En: Goodman y Gilman., *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 1996. 9ª ed. 32(1) :813-834
- BOLTON, T.B. 1979. Mechanisms of action of transmitters and substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718.
- CHANG, H.M., P.P.H. BUT. 1987. Pharmacology and applications of chinese materia médica. *World Scientific.* 918-928.
- CHOUDHURY, B., M.K. PODDAR. 1984. Andrographolide and Kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract: In vivo and in vitro effects on hepatic lipid peroxidation. *Meth. and find. Exp.Clin. Pharmacol.* 6 (9): 481-485.
- ECKENHOFF, R., D. LONGNECKER. 1996. Gases terapéuticos. En: Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 1996. 9ª ed. 16 (I): 381
- GANONG, W. 1984. Tejido excitable: Músculo. En: *Fisiología Medica* 9ª edición. 3: 60
- GUO, Z.L., H.Y. ZHAO, X.H. ZHENG. 1995. An experimental study of the mechanism of *Andrographis paniculata* Nees (APN) in alleviating the Ca²⁺-overloading in the process of myocardial ischemic reperfusion. *J. tongji. Med. Univ.* 15: 205-208.
- GUO, Z.L., H.Y. ZHAO, L. FU. 1996. Protective effects of APIO134 on myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. tongji. Med. Univ.* 16: 193-197.
- GUPTA, V., V.K. SRTVASTAVA. 1994. Kalmegh a valuate NTFP for N.W. *Indian. Forest products.* 1-2 (2), 76-78.
- HAMMAD, H.M., S.S. ABDALA. 1997. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure - activity relationship. *Gen Pharmacol.* 28: 767-771.
- HANDAN, S.S., A. SHARMA. 1990. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine and paracetamol intoxications in rats. *Indian J. Med. Res.* 92: 284-292.

HATA F., A. FUJITA., K. SAEKI, I. KISHI, T. TAKEUCHI, O.YAGASAKI. 1992. Selective inhibitory effects of calcium channel antagonists on the two components of the neurogenic response of guinea pig vas deferens. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1): 214-220.

HOCKERMAN, G.H., B.Z. PETERSON, B.D. JOHNSON, W.A. CATTERALL. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:361-396.

ICHIDA, S., M. MORIYAMA, M. TERAQ. 1983. Characteristics of Ca influxes through voltage - and receptor - operated Ca channels in uterine smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228 (2) :439-445.

KAO.1987. Fármacos que contraen o relajan el útero. En: Goodman y. Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 1996. 9ª ed. 39 (1):1005-1013.

KARAKI, H., H. OZAKI, M. HORI, M. MITSUI-SAITO, A. KEN-ICHI, H. KEN-ICHI, S. MIYAMOTO, H. NAKAZAWA, K. WON, K. SATO. 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol.* : 49 (2): 157-239.

MADAV, S., H.C. TRIPATHI, S.K. TANDAN, S.K. MISHRA. 1995. Analgesic, antipyretic and antiulcerogenic effect of andrographolide. *Indian J. Of pharmaceut. Sci.* 57 (3): 1211-125.

MADAV, S., S.K. TANDAN, J. LAL, H.C TRIPATHI. 1996. Anti-inflammatory activity of andrographolide. *Fitoterapia.*67: 452-458.

MEHROTRA, R., RAWAT, D.K. KULSHRESHTLA, G.K. PATNADC, B.N. DHAWAN. 1990. In vitro studies on the effect of certain natural products against hepatitis B virus. *Indian J. Med. Res.* 92:133-138.

MISRA, R., N.L. PAL, P.Y. GURU, J.C. KATIYAR, V. SRTVASTAVA, J.S. TANDDON. 1992. Antimalarial activity of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against *Plasmodium berghei* N.K 65 in *Mastomys natanlensis*. *Int. J. Of Pharmacol.* 30 (4): 263-274.

MONIRUDDIN, A., S.A. TALUKDER. 1977. Studies on the hypoglycemic activity of Kalmegh (*Andrographis paniculata* Ness.) on the blood- sugar level of rats. *Bangladesh Pharnaceut. J.* 6:21-24.

PURI, A., R. SAXENA, R.P. SAXENA, K.C. SAXENA. 1993. Inmunoestimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. of Natural products.* 56: 995-999.

ROBERTSON R.M., D. ROBERTSON. 1996. Fármacos usados en el tratamiento de la isquemia miocárdica. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 1996. 9ª ed. 32 (I) :813-834.

SHUKLA, B., VISEN, P.K.S. PATNAIK, B.N. DHAWAN. 1990. Choloretic effects of

andrographolide in rats guinea pigs. *Planta Med.* 58: 146-149.

STELL, R., J. TORRIE. 1985. Análisis de la varianza II clasificaciones múltiples. En: Principios y procedimientos. Mc. Graw-Hill latinamericana, S.A. 9: 228.

SUBRAMANIAN, A., P. PUSHPANGADAN, S. RAJASEKHARAN, P.G LATHA. 1995. Anti-pyretic activity for TBR-002, a herbal formulation. *Ann. Sci. Of life.* 15 (1):7-14.

TANG, W., G. EISENBRAND. 1992. Chinese drugs of plant origin. chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine. Springer- Verlag Berlin. 14:97-103.

THAMLIKITKUL, V., S. THERAPONG, P. BOONROJ, W. EKPALAKORN, S. TAECHAIYA, T. ORN-CHOM-JAN, S. PRADIPASENA, S. TIMSARD, T. DECHATIWON-GSE, C. CHATRAKUL, W. PUNKRUT, N. BOONTAENG, S. PETCHAROEN, W. RIEWPAIBOON, A. RIEWPAIBOON, E.D.TENANBERGEN. 1991. Efficacy of *Andrographis paniculata*, Nees for pharyngotonsillitis in adults. *J. Med. Assoc. Thai.* 74:437-442.

WANG, D., H. ZHAO. 1994. Prevention of atherosclerotic arterial stenosis and restenosis after angioplasty with *Andrographispaniculata* nees and fish oil. *Chinese Med. J.* 107 (6): 464-470.

WUXI. 1979. Research in to the metabolism of NaHSO₃-Andrographolide by the use of ³⁵S. *Acta Biochim. et Biophys. Sinica* .11: 1-13.

ZHANG, C.Y., B.K TAN. 1996. Hypotensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 675-678.

ZHANG, C.Y., B.K TAN 1997. Mechanisms of cardiovascular activity of *Andrographis paniculata* in the anaesthetized rat. *J. Ethnopharmacology.* 56: 97-101.

ZHANG, C.Y., B.K TAN. 1998. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by 14-deoxyandrogapholide. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* 25 (6): 424-429.

ZHANG, C.Y., B.K TAN. 1999. Effects of 14-deoxyandrogapholide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrogapholide on nitric oxide production in cultured human endothelial cells. *Phytother Res.* 13(2):157-159.

9. AGRADECIMIENTOS.

- Mi más sincero agradecimiento al Dr. Rafael Burgos Aguilera, por su enorme apoyo, comprensión y estímulo recibido.