



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Farmacología

Evaluación del efecto Miorelajador de *ANDROGRAPHIS* sobre
PANICULATA conducto deferente de Rata

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

Leonel Marcelo Imilan Ojeda
Valdivia Chile 2000

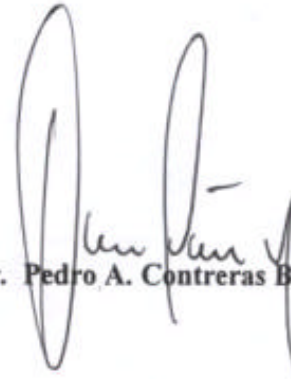
PROFESOR PATROCINANTE.



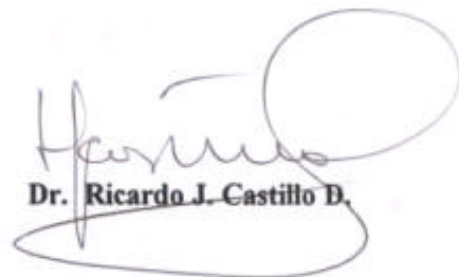
Dr. Rafael Burgos A.

COPATROCINANTE.

PROFESORES CALIFICADORES.



Dr. Pedro A. Contreras B.



Dr. Ricardo J. Castillo D.

FECHA DE APROBACION

13 de enero del 2000

**A MIS QUERIDOS PADRES:
SILVIA Y ENRIQUE.**

INDICE

	Pág
1.- RESUMEN.....	1
2.-SUMMARY.....	2
3.-INTRODUCCION.....	3
4.-MATERIAL Y METODOS.....	11
5.-RESULTADOS.....	15
6-DISCUSION.....	20
7.-CONCLUSIONES.....	23
8.-BIBLIOGRAFIA.....	24
AGRADECIMIENTOS.....	30

EVALUACION DEL EFECTO MIORELAJADOR DE *ANDROGRAPHIS PANICULATA* SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA

1. RESUMEN

En esta tesis se evaluó, el posible bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje por *Andrographis paniculata*, en conducto deferente de rata.

Se utilizaron 40 ratas macho Sprague Dawley de entre 200-250 g. cuya selección y distribución en el bioterio fue al azar. Las ratas fueron divididas en 2 grupos; un grupo recibió reserpina 48 hrs(5 mg/kg.) y 24 hrs (2.5 mg/kg) previo al experimento con el propósito de eliminar el componente adrenergico y el otro grupo no recibió tratamiento.

Los conductos deferentes de ratas tratadas con reserpina fueron incubados en una solución buffer con exceso de KCl sin calcio, por espacio de 60 min a 37 °C en presencia de 95 % O₂ y 5% CO₂. La respuesta contráctil a dosis acumulativas de CaCl₂ fue bloqueada por 0,2 y 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*, de manera similar a lo producido por verapamil. Conductos deferentes sin tratamiento previo con reserpina fueron incubados en una solución krebs bicarbonato por 60 min. a 30 °C con una mezcla de 95 % O₂ y 5% CO₂, en este caso la respuesta contráctil inducida por norepinefrina no fue antagonizada por *Andrographis paniculata*. El posible bloqueo de la entrada de calcio producido por *Andrographis paniculata* se evaluó mediante la incorporación de Ca⁴⁵ en conductos deferentes de ratas tratadas con reserpina, incubados en pH 7, en presencia de 2 concentraciones de KCl (25 mM y 50 mM) solo o en presencia de 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*. La entrada de calcio inducida por KCl fue completamente bloqueada por 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*.

Estos datos sugieren que, *Andrographis paniculata* inhibe la entrada de calcio por un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje, impidiendo la entrada de calcio a la célula desde el medio externo y la contracción.

EVALUATION OF THE MIORELAXING EFFECT OF *ANDROGRAPHIS PANICULATA* IN RAT VAS DEFERENS.

2. SUMMARY

In this thesis the possible voltage operated calcium channel blocking effect, induced by *Andrographis paniculata*, in vas deferens from rats was evaluated.

Forty male Sprague Dawley rats weighing between 200-250 g and randomly distributed were used. The rats were divided in two groups: one group was treated with reserpine 48 hours (5 mg/kg) and 24 hours (2.5 mg/kg) before the experiment with the purpose of eliminate the adrenergic component and other group did not receive treatment.

Conductos deferents from rats treated with reserpine were incubated in a buffer solution with high KCl without calcium, during 60 minutes at 37°C with 95% O₂ and 5% CO₂. The contractile response at accumulative doses of CaCl₂ was blocked by 0.2 and 0.4 mg/ml of *Andrographis paniculata*, similar to what was produced by verapamile. Deferents without previous treatment whit reserpine were incubated in a krebs/bicarbonate solution's during 60 minutes at 30°C with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂, in this case the contractile response induced by norepinephrine was not antagonized by *Andrographis paniculata*. The possible calcium blocking effect produced by *Andrographis paniculata* was evaluated by Ca⁴⁵ uptake in deferent of rats treated with reserpine, with two concentrations of KCl (25 mM and 50 mM), alone or in presence of 0.4 mg/ml of *Andrographis paniculata*. The calcium entry induced by KCl was completely blocked by 0.4 mg/ml of *Andrographis paniculata*.

These data suggest that *Andrographis paniculata* inhibits the uptake of calcium by blocking the voltage operating calcium channel, inhibiting the calcium entry to the cell from the external medium and the contractile response.

3. INTRODUCCION.

3.1. BLOQUEADORES DE CANALES DE CALCIO

Los bloqueadores de canales de calcio son inhibidores selectivos del canal de calcio tipo L (Godfraind. , 1986). En el músculo liso los bloqueadores de canales de calcio inhiben fuertemente el ingreso de calcio inducido por potasio (Sumimoto y Kuriyama, 1986, Hagiwara y col, 1993; Muraki y col, 1993). Ha sido posible evidenciar que la incubación con potasio produce contracción muscular por un incremento en la entrada de calcio, y por otro lado norepinefrina induce la contracción muscular por una vía independiente del calcio extracelular, mediante liberación de calcio intracelular por un aumento de Inositol trifosfato (IP₃) (Khoyi y col. 1988).

La depolarización del tejido arterial esta mediada por dos corrientes iónicas dirigidas hacia adentro. Cuando el potencial transmembrana de una célula arterial alcanza el umbral, hay flujo de entrada rápido del Na⁺. La segunda corriente de entrada depende en gran parte del movimiento del Ca²⁺ hacia la célula a través del canal lento, o canal del calcio. El flujo del Ca²⁺ hacia el interior de las células contribuye a la conservación de la fase de meseta del potencial de acción cardiaco. Debido a que la contracción del músculo liso vascular depende de la concentración intracelular de Ca²⁺, la inhibición del transporte de Ca²⁺ transmembrana debe disminuir la cantidad total de éste en los sitios intracelulares (Goodman y Gilman, 1996). Todos los bloqueadores de canales del Ca²⁺ disminuyen la presión arterial al relajar el músculo liso artereolar y aminorar la resistencia vascular periférica (Lehman y col. 1993).

Ichida y col. (1983) experimentaron con músculos lisos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol, los que fueron preincubados en una solución Ringer pobre en Ca²⁺, y luego inmersos en una solución Ringer pobre en Ca²⁺ con alto

contenido de potasio o tratados con acetilcolina y serotonina no observándose respuesta contráctil. Sin embargo en ambos casos fue inducida la respuesta contráctil cuando se adicionó CaCl_2 la respuesta contráctil fue inducida. La respuesta contráctil inducida por KCl, acetilcolina y serotonina fue inhibida por antagonistas del Ca^{2+} en una relación dosis dependiente, pero esta inhibición se detuvo cuando se adicionó más CaCl_2 . Las características del flujo de Ca^{45} en músculo liso fue estudiada bajo las mismas condiciones que la respuesta contráctil. Los resultados obtenidos indican que la respuesta contráctil de CaCl_2 , acetilcolina y serotonina es producto del influjo de iones Ca^{2+} al interior de la célula del músculo liso uterino.

En experimentos realizados en conductos deferentes de ratas inmersos en una solución libre de Ca^{2+} que contenía 0,5 mM-EGTA se comprobó que la aplicación de noradrenalina (10^{-4} M) cada 20 minutos, por un espacio de 4 minutos, produjo una contracción que fue un 60 - 80 % de la respuesta tónica producida por el control en presencia de 2.4 mM de Ca^{2+} . La respuesta puede ser repetida sucesivamente en una solución libre de Ca^{2+} por mas de 20 hrs. sin un significativo decrecimiento. Una alta concentración de Verapamil (2×10^{-4} M) reduce la respuesta a Noradrenalina en un 70 % aproximadamente después de 30 minutos; según los autores este efecto supresivo puede ser mediado por un incremento en el AMP cíclico intracelular, asociado con una reducción de la fosforilación de la miosina (Ashoori y col, 1983).

Bolton (1979), y Van Breemen (1979), indican que el alto contenido de potasio induce la depolarización de la membrana celular, lo que abre el canal de calcio dependiente de voltaje. Este canal es inhibido por bloqueadores de canales de calcio como verapamil, nifedipino y La^{3+} . Verapamil, un vasodilatador coronario putativo, posee efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos que no se observan al emplear otros vasodilatadores como la nitroglicerina, sugiriéndose que el efecto inotrópico negativo dependía de la inhibición del acoplamiento entre excitación y contracción, por reducción de movimiento de Ca^{2+} hacia los miocitos cardiacos (Goodman y Gilman, 1996).

Khoyi y col (1987) emplearon Ca^{45} para medir influjo – eflujo y contenido de Ca^{2+} en el tejido. La estimulación de deferente con 50 mM de potasio causo rápido influjo de Ca^{45} , por su parte Norepinefrina en concentraciones máximas (1 mM) no produjo influjo de Ca^{45} (pero inhibió el influjo de Ca^{45} estimulado por potasio ($\text{IC}_{50} = 3 \text{ uM}$)). El eflujo de Ca^{45} no es afectado por potasio pero si es estimulado por norepinefrina. La conclusión de este estudio es que norepinefrina no estimula el influjo de Ca^{2+} en el músculo liso del conducto deferente, pero lleva a la liberación de Ca^{2+} desde almacenamientos intracelulares y que el resultante aumento intracelular de Ca^{2+} puede llevar a la inactivación del canal de calcio dependiente de voltaje.

3.2. ANDROGRAPHIS PANICULATA.

3.2.1. ASPECTOS GENERALES Y USOS TERAPEUTICOS.

Andrographis paniculata (Kalmegh) es una planta medicinal mundialmente conocida, existiendo 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 estos países contra, disenterías, dispepsias, decaimiento general, diabetes (Monirunddin y Talukder, 1977), leptospirosis, tuberculosis, cuadros de envenenamiento, abortos (Chang y But, 1987) cuadros de hepatitis viral B (Mehrotra y col, 1990), en desórdenes hepáticos (Thamlikitkul y col, 1991), cuadros de malaria (Misra y col, 1992), control de la producción de aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* (Kumar y Prasad, 1992). También ha sido utilizada como: anti-inflamatorio, antidiarreico, antipirético (Subramaniam y col, 1995) y antiulcerogénico (Madav y col, 1995).

Estudios *in vitro* indican que un extracto obtenido de la cocción de *Andrographis paniculata* fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. áurea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli* (Chang y But, 1987).

3.2.2 COMPOSICION QUIMICA.

Andrographis paniculata, está compuesta por lactonas diterpénicas y flavonoides. Entre las lactonas más importantes están: andrografolido, deoxiandrografolido, neoandrografolido y 14-deoxi-11-12-dihidroandrografolido. Entre los compuestos flavonoides están: polimetoxiflavona-andrografin, andrographidine A, panicolin, etc. Se han descrito además la presencia de compuestos alcalinos, cetónicos y aldehídicos (Tang y Eisenbrand, 1992).

Andrografolido (fig 1), es el principal compuesto aislado, el cual ha sido extraído de la parte aérea de la planta por medio de soluciones alcohólicas (butanol, etanol y metanol) y compuestos alcalinos. La cantidad de andrografolido en hojas y semillas de *Andrographis paniculata*, determinada por espectrofotometría ultravioleta después de la separación en placas de silica gel, varían de 0,1% y 0,4 % en las semillas y hasta 2,6% en las hojas (Tang y Eisenbrand, 1992). Por otro lado, Sharma y col, (1992) determinaron en las hojas concentraciones máximas de 2,39%. Las diferencias en el contenido de esta lactona esta dada por variaciones regionales (características del suelo, clima, etc) y las etapas de floración. Concentración mayor a 2% de andrografolido en hojas, se obtienen antes que la planta florezca, posteriormente el contenido disminuye a 0,5%. (Tang y Eisenbrand, 1992).

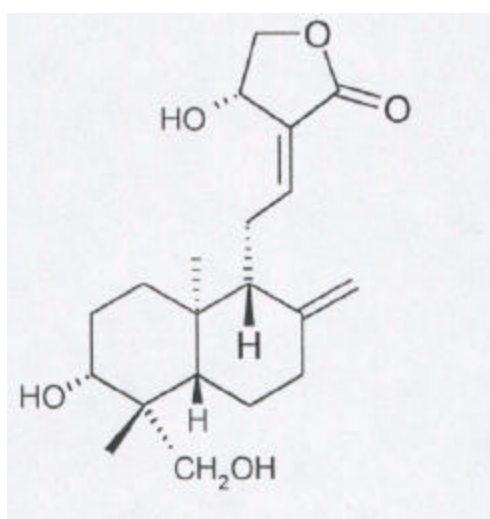


Figura 1. Andrografolido

3.2.3. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Varios autores informan que la administración de 0.5 g/kg de hojas secas de *Andrographis paniculata* es efectivo en reducir el efecto hepatotóxico, inducido por CCL₄ (Choudhury y Poddar, 1984a; Choudhury y Poddar, 1984b). Este efecto también es producido por andrografolido (Choudhury y Poddar, 1984a; Choudhury y Poddar, 1984b). Andrografolido posee actividad protectora contra varios desordenes del hígado inducidos por hepatotoxinas (Handa and Sharma, 1990a,b).

El extracto alcohólico de *Andrographis paniculata* inhibe la respuesta secretoria intestinal inducida por *Escherichia coli* LT (Termosensible) tóxico entérica, la que estimula la adenilciclase, no produciendo un deterioro estructural de los enterocitos. El extracto alcohólico de *Andrographis paniculata* exhibió actividad antidiarreica contra enterotoxinas de *Escherichia coli* en animales (conejos y cobayos), la actividad fue localizada en la fracción n-butanol, lo cual condujo a la aislación de 4 lactonas diterpénicas: andrografolide, neoandrografolide, deoxyandrografolide y andrografiside. Entre las 4 lactonas diterpénicas andrographolide y neoandrographolide demostraron similar actividad a Loperamida contra *E. coli* LT (Termosensible) y LT/ST (Termosensible / termoresistente) tóxico entéricas. Andrografolide fue superior contra ST (estable a temperatura) enterotóxica, la causa más común de epidemias de diarrea neonatal (Gupta y Choudhry, 1990).

La capacidad inmunoestimulante de *Andrographis paniculata* la demostró ya hace años atrás Chang y Yeung (1988), de 27 plantas medicinales chinas *Andrographis paniculata* demostró, *in Vitro*, actividad inhibitoria contra VIH. Esto difiere con otros autores que no encontraron una actividad anti-VIH-1 *in vitro* (Yao y col, 1992). Estas discrepancias se pueden explicar por diferencias en el material utilizado o la metodología empleada en ambos estudios. Según Puri y col, (1993) la capacidad inmunoestimulante de andrografolido aumentaría la respuesta antígeno específico y no específico. También se determinó que había un aumento del 40% de la respuesta humoral y un incremento en la respuesta celular debido a un aumento en la capacidad mitogénica que presentaban los

linfocitos y los macrófagos. Esta capacidad inmunoestimulante de *Andrographis paniculata*, estaría dada por la presencia de 2 lactonas diterpénicas como andrografolido y neoandrografolido. Además con el extracto acuoso de *Andrographis paniculata* (Otake y col, 1995) obtuvieron actividad anti-VIH-1. Dehydroandrografolide un ácido succínico monoéster puede ser responsable de la inhibición de VIH *in vitro*. Este fue tóxico en células H9 en las concentraciones de 50-200 µg/ml Y produjo inhibición de VIH-1 en la concentración de 2.0 (µg/ml. Este efecto inhibitorio puede deberse al cultivo o actividad de células humanas mononucleares. Esta acción subtóxica puede deberse particularmente a la interferencia: en la fusión celular inducida por VIH, en la unión de VIH a la célula H9 y probablemente también interfiere con la replicación de VIH (Chang y col. 1991). Estos antecedentes sobre la propiedad inmunoestimulante de *Andrographis paniculata*, podrían explicar su uso en cuadros de resfrío común, malaria y diarreas de origen bacteriano y/o viral.

La propiedad anti-inflamatoria ha sido demostrada en ratas, a las cuales se le administraron soluciones de carragenina, kaolín, nistalim y un extracto de *Mycobacterium tuberculosis* que les produce artritis . Las dosis de andrografolido fueron entre 100-300 mg/kg. p.v. Se observó disminución del edema inducido por carragenina entre 27.8 a 52.08 %, este ultimo resultado logrado con la dosis más altas de Andrografolido. En este experimento Fenilbutazona disminuyó en 72.22 % el edema. Los resultados obtenidos con kaolín y nistalim fueron muy similares al anterior. El granuloma producido por *Mycobacterium tuberculosis* en ratas, a las cuales se les administró andrografolido en dosis de 100-300 mg/kg disminuyó entre 20-30 % respectivamente. Esto indicaría que Andrografolido posee efectos antiinflamatorios en modelo agudo y subagudos (Madav y col, 1996).

Experimentos en conejos demostraron que extractos acuosos de *Andrographis paniculata*, 10 mg/kg de peso corporal, puede prevenir la inducción de hiperglicemia significativamente ($p < 0.001$), esta hiperglicemia fue inducida por la ingesta oral de 2

mg/kg de glucosa. Probablemente *Andrographis paniculata* previene la absorción de glucosa desde el intestino (Borhanuddin y col, 1994).

Se ha demostrado que un extracto crudo de *Andrographis paniculata* puede prevenir la isquemia miocárdica, en este sentido *Andrographis paniculata* produce una reducción de la isquemia y arritmia (medidas electrocardiográficamente), también reduce el tamaño de los infartos y el daño histológico producido a nivel ultraestructural (Guo y col. , 1996) Se sabe que *Andrographis paniculata* puede reducir la infartación en estenosis arteriosclerótica y restenosis después de angioplastia experimental en conejos, *Andrographis paniculata* reduce significativamente la arteriosclerosis por estenosis de la arteria iliaca inducida por desendotelización y una dieta alta en colesterol de una manera similar a la que produce el aceite de pescado (Wang y Zhao., 1993). Se ha descrito que *Andrographis paniculata* posee un efecto hipotensor cuyo mecanismo no esta dilucidado (Zhang y Tan., 1997).

Dos lactonas diterpénicas constituyentes de *Andrographis paniculata* , 14 - deoxyandrografolide (DA) y 14 - deoxy - 11,12 - didehidroxyandrografolide (DDA), fueron utilizadas en tejidos aislados de rata (aorta torácica y atrio). Se encontró que DA y DDA disminuían significativamente la presión arterial media y el gasto cardiaco, DA pareció ser más potente que DDA en la vasorelajación (Tan y col 1998). Zhang y col (1998) por su parte trabajaron solo con 14 - deoxy - 11,12- didehidroxyandrographolide (DDA), donde demostraron que en ratas anestesiadas DDA produce una significativa caída en la presión sanguínea arterial y disminución del latido cardiaco en una relación dosis dependiente, donde la máxima disminución fue de $37.6 \pm 2.6\%$ y $18.1 \pm 4.8\%$ respectivamente.

3.2.6.HIPOTESIS

En consideración a los antecedentes señalados es posible pensar que *Andrographis paniculata* produce una relajación de la musculatura lisa, debido al bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje. Esta disminución de la acción del calcio debería ser similar a la producida por Verapamil.

Para aceptar o rechazar esta hipótesis se realiza el experimento con los siguientes objetivos:

3.2.7.OBJETIVOS

Se evaluarán tres objetivos de importancia que son:

- 1) Establecer el porcentaje de contracción máximo en musculatura lisa de deferente de ratas, inducido por dosis acumulativas de CaCl_2 en presencia de *Andrographis paniculata* y Verapamil.
- 2) Comprobar que la relajación inducida por *Andrographis paniculata* en la musculatura lisa es debida a una disminución de la acción del calcio similar a la producida por Verapamil.
- 3) Corroborar que la disminución de la acción contráctil del músculo deferente es dependiente de la inactivación de canales de calcio dependientes de voltaje.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL.

4.1.1 Material biológico.

Se ocuparon ratas macho de la cepa Sprague Dawley, provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile; con un peso entre 200 y 250 g. Los animales que se utilizaron para la determinación de la incorporación de Ca^{45} en deferente y para la determinación de curvas dosis respuesta de CaCl_2 en el mismo tejido, fueron tratados previamente con dos dosis de Reserpina a las 48 y 24 hrs. previas al experimento (5 mg/Kg. y 2.5 mg/Kg. respectivamente). Todos los animales consumieron agua y alimento ad-libitum.

4.1.2. Material farmacológico.

Se ocupó un extracto seco de *Andrographis paniculata* fabricado por Swedish Herbal Institute, en suspensión al 10%. Además se utilizó Reserpina (Laboratorio Chile), Calcio⁴⁵ New England Dupont®, Norepinefrina bitartrato y Verapamil (Sigma).

4.1.3. Instrumentos.

Se ocupó un Polígrafo (Grass 7) de propiedad del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile, dos transductores de tensión, un baño temperado (Isolated Organ-Tissue Bath) y un contador de centelleo. También se ocupó material quirúrgico tal como: tijeras, pinzas, Bisturí, etc. así mismo jeringas desechables de 1, 5, y 10 ml.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Determinación de curvas dosis respuesta de CaCl_2 en conducto deferente de rata.

48 hrs. previas a realizar el experimento las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con Reserpina (5 mg/kg), esta inyección se repitió a las 24 hrs. (2.5 mg/Kg.), luego se sacrificaron las ratas y se procedió a retirar los conductos deferentes. Los conductos deferentes fueron preincubados en un buffer con exceso de KCl sin calcio (50 mM), que contenía (en mM): NaCl 77.9; KCL 50; NaHCO_3 15; MgCl 1.25; glucosa 11, por 60 min. a 37 °C, en presencia de una mezcla de 95% O_2 , 5% de CO_2 . Una vez estandarizada la preparación con una tensión inicial del tejido de Ig se realizaron curvas dosis respuesta crecientes de CaCl_2 en presencia de 0.2 y 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata* y Verapamil 10^{-6} M.

4.2.2. Determinación de curvas dosis respuesta de norepinefrina en conducto deferente de rata.

Los deferentes fueron sometidos a una tensión inicial de Ig y se preincubaron en Krebs bicarbonato que contenía (en mM): NaCl 120; KCl 4.69; NaHCO_3 25; CaCl_2 2.43; MgSO_4 1.18; KH_2PO_4 1.02; glucosa 11.1 por 60 min. a 30 °C en presencia de una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 Posteriormente se realizaron curvas dosis respuesta crecientes de norepinefrina sola o en presencia de 0.2, 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata* y verapamil 10^{-6} M.

4.2.3. Determinación de la incorporación de Ca^{45} en conducto deferente.

48 hrs previas a realizar el experimento las ratas se inyectaron intraperitonealmente con Reserpina (5 mg/kg), esto se repitió a las 24 hrs.(2.5 mg/kg), luego se sacrificaron las ratas y se procedió a retirar los conductos deferentes, estos fueron inmediatamente sumergidos en una solución buffer salina compuesta por (en mM) : NaCl 122; KCl 5.9; NaHCO_3 15; CaCl_2 0.2; MgCl_2 1.25; glucosa 11 a pH 7.5 y a una temperatura de

37 °C. Todo esto se realizó en presencia de una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ por 90 min. cambiando el medio cada 10 min. Posteriormente los conductos deferentes fueron cortados en trozos de 3-4 mm. y se incubaron por 10 min. en presencia de 2 concentraciones de KCl 25 mM (NaCl 102.9; KCl 25; NaHCO₃ 15; CaCl₂ 0.2; MgCl₂ 1.25, glucosa 11) y 50 mM (NaCl 77.9; KCl 50; NaHCO₃ 15; CaCl₂ 0.2; MgCl₂ 1.25; glucosa 11). Además otros trozos de tejido fueron incubados en presencia de 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata* agregada a las soluciones con exceso de KCl. En la evaluación de la incorporación de Ca⁴⁵ a los trozos de deferente se utilizó el protocolo descrito por Khoyi y col., (1988). Brevemente los tejidos fueron incubados por 4 min. en buffer con 0.2 uCi/ml de Ca⁴⁵, a 37 °C. Enseguida los tejidos se lavaron dos veces con una solución buffer Tris-lantano-HCl (pH 6) que contenía en mM: NaCl 122; KCl 5.9; LaCl₃ 50; MgCl₂ 1.25; glucosa 11; Trizma 6.

Posteriormente los tejidos fueron llevados a tubos de 10 ml que contenían la solución buffer Tris-lantano-HCl en pH 7.0 a 4 °C por 20 min y paso seguido fueron pesadas y puestas en viales de centelleo plásticos con 1 ml de KOH 0.1 N y se incubaron esta vez por 6 hrs. a 85 °C. Finalmente se agregó a cada vial 0.5 de agua destilada y 4 ml de liquido de centelleo compuesto por 0.5 grs. De popop, 4 grs. De ppo disueltos en 500 ml de tolueno y 250 ml de Tritón x-100. Posteriormente se agitaron y se midió radioactividad en un contador de centelleo beta.

4.2.4. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos de la respuesta contráctil fueron ajustados mediante una

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\log \text{EC50} - X) \times \text{HillSlope}}}$$

con la cual se obtuvo los valores promedios de EC50 y porcentaje máximo de contracción. Los valores de concentración efectiva fueron expresados como logaritmo en base 10, los cuales fueron posteriormente analizados mediante una ANOVA de una vía. Las comparaciones múltiples fueron hechas con el test de DUNNET. Los porcentajes de

contracción máxima fueron analizados con el test no paramétrico de MANN WHITNEY. Todos los análisis fueron hechos con el programa Graphpad Prism 2.0 (1995), utilizándose un nivel de significancia del 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de curvas dosis respuesta de CaCl₂ en conducto deferente de rata.

Las ratas fueron tratadas 48 hr (5 mg/kg) y 24 hr (2.5 mg/kg) con reserpina, ya que esta droga fue utilizada para agotar la norepinefrina endógena y así reducir su potencial efecto indirecto con K⁺ según lo realizado por Khoyi y col (1988). Al realizar curvas en presencia de concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata* se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) de la respuesta contráctil máxima (%): $78,64 \pm 5,61$ y $47,06 \pm 5,35$ respectivamente.

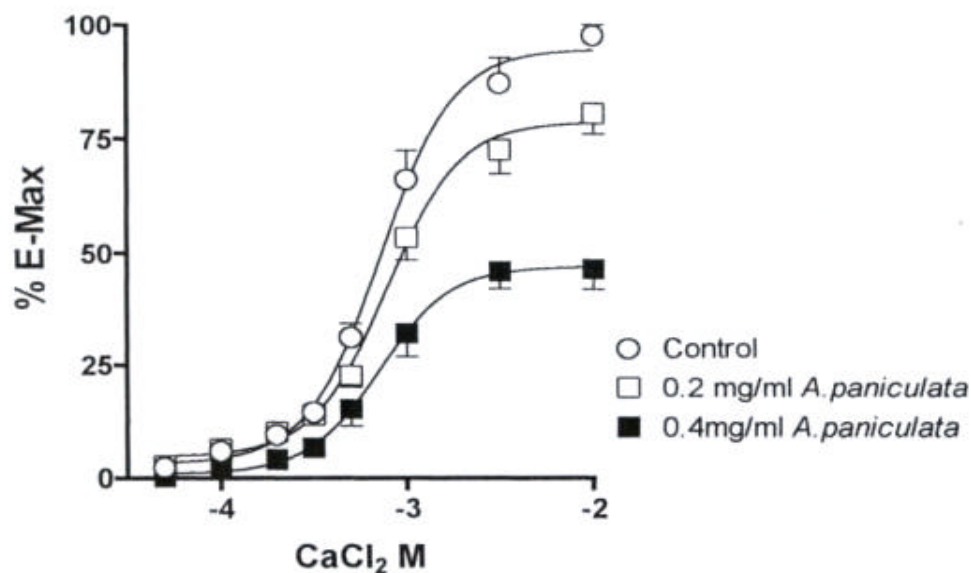


Figura 2. Efecto del extracto de *Andrographis paniculata* sobre la contracción máxima inducida por dosis acumulativas de CaCl₂ en deferente de rata $n = 7$, cada punto representa promedios \pm E. E; % E-Max = Porcentaje de contracción máxima.

La figura 3. muestra el efecto de Verapamil 5×10^{-8} M y 1×10^{-7} M sobre la EC_{50} : (Log M) $-2,836 \pm 0,064$ y $-2,537 \pm 0,405$ observándose una disminución estadísticamente significativas en ambas concentraciones de Verapamil ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) respectivamente. También produjo una disminución significativa ($p < 0.001$) de la respuesta contráctil máxima: $72,92 \pm 4,85$ y $64,34 \pm 26,99$ respectivamente.

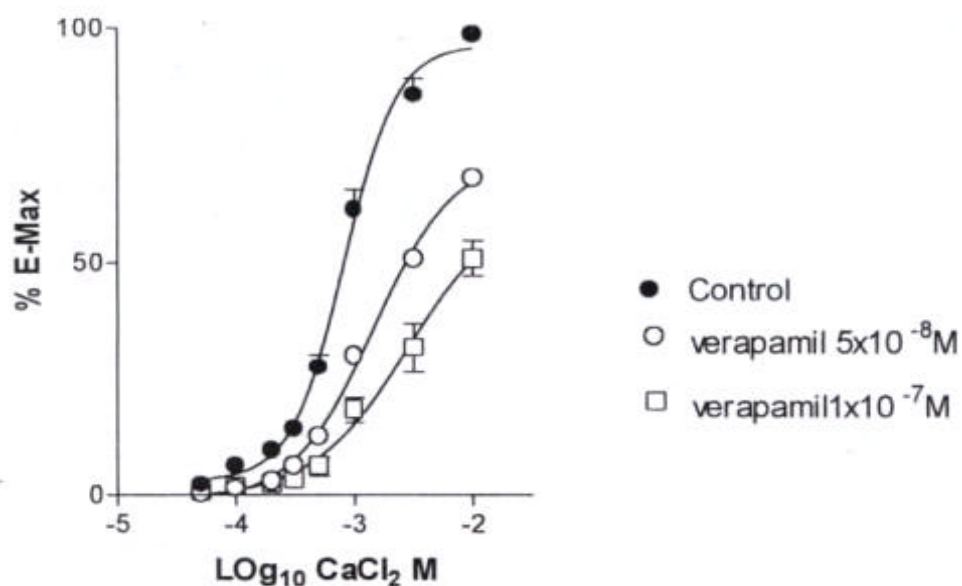


Figura 3. Efecto de verapamil sobre la contracción máxima inducida por dosis acumulativas de $CaCl_2$. $n = 8$. % E-Max = Porcentaje de contracción máxima.

5.2. Determinación de curvas dosis respuesta de norepinefrina en conducto deferente de rata.

Concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/ml. de *Andrographis paniculata* no produjeron una disminución de la EC50: (Log M) -5.489 ± 0.193 y -5.651 ± 0.248 , de igual forma no ocurrió disminución de la respuesta contráctil máxima a norepinefrina %: 130.4 ± 12.8 y 104.3 ± 11.39 respectivamente; no existiendo por lo tanto diferencias estadísticamente significativas (Figura 4).

Cosa similar ocurrió con Verapamil 10^{-6} donde no existieron diferencias estadísticamente significativas (Fig 5), esto debido a la ausencia de cambios en la EC50: (Log M) $-5,748 \pm 0,323$ y $-5,544 \pm 0,384$.

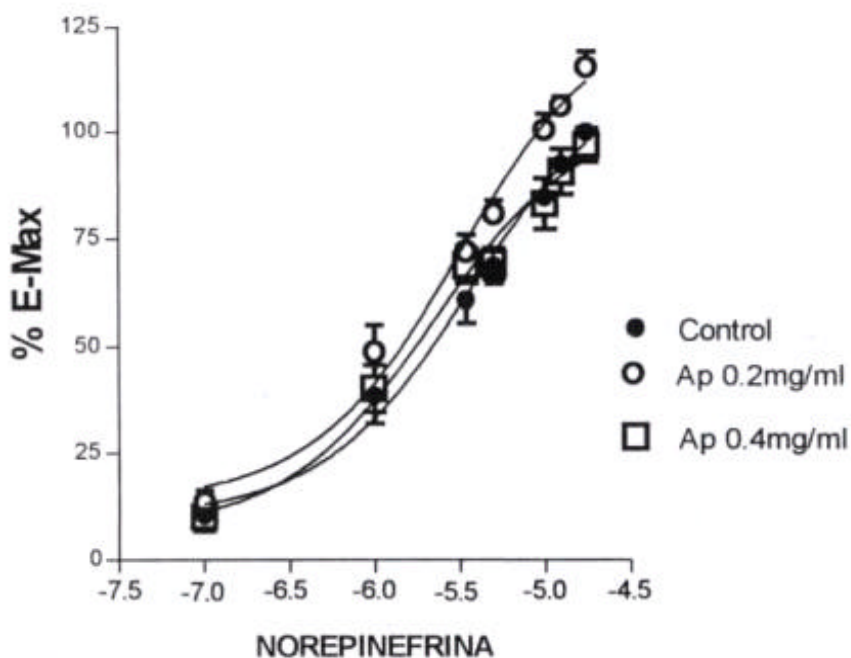


Figura 4. Efecto del extracto de *A. Paniculata* en la contracción máxima inducida por dosis acumulativas de Norepinefrina. n =7. % E-Max = Porcentaje de contracción máxima.

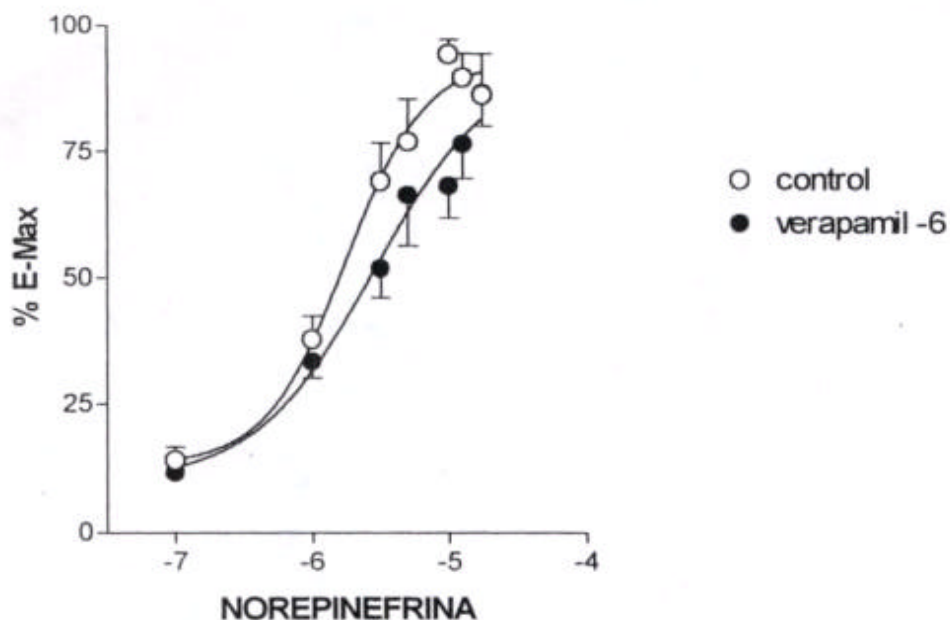


Figura 5 Efecto de Verapamil 1×10^{-6} M sobre la contracción máxima inducida por dosis acumulativas de Norepinefrina. $n = 7$. % E-Max = Porcentaje de contracción máxima.

5.3. Determinación de la incorporación de Ca^{45} en conducto deferente.

La entrada de calcio a la célula aumento en presencia de KCl 25 mM y este ingreso fue aún mayor con KCl 50 mM. La aplicación combinada con *Andrographis paniculata* produjo una disminución de la entrada de calcio inducida por potasio, produciéndose una marcada reducción del total de calcio que ingreso a la célula la que fue estadísticamente significativa. Esta disminución en el ingreso de calcio producido por *Andrographis paniculata* supone un bloqueo de la entrada de calcio a la célula, a nivel de canales de calcio pues potasio favorece la entrada de calcio a este nivel (Khoyi y col, 1988).

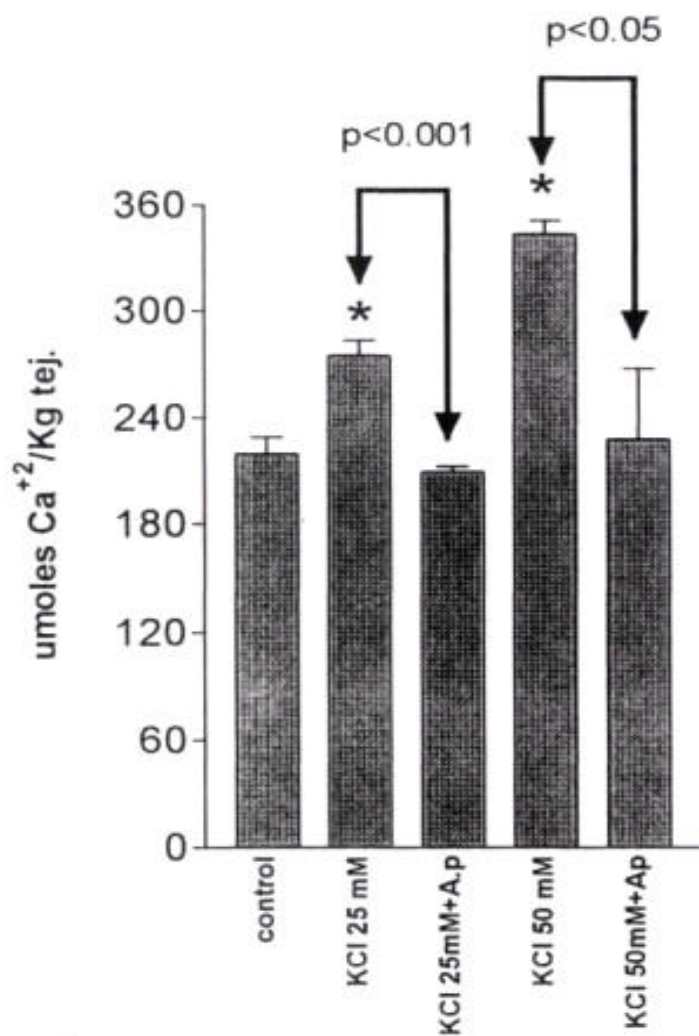


Figura 6. Efecto del extracto de *Andrographis paniculata* (Ap) (0.4 mg/ml) en la entrada de Ca⁴⁵ mediada por potasio a la célula del músculo liso deferente, n = a lo menos tres, media ± E.E. * p<0.05 comparado con el control.

6. DISCUSION

En esta tesis *Andrographis paniculata*, produjo una disminución, dosis dependiente, de la respuesta contráctil producida por concentraciones acumulativas de CaCl_2 en conducto deferente de una manera no competitiva. Los resultados demostraron una disminución de la respuesta contráctil al aplicar concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/ml de *Andrographis paniculata*, similar respuesta se observó con concentraciones de 5×10^{-8} y 1×10^{-7} M de verapamil, lo que demuestra un efecto bloqueador de la respuesta contráctil de *Andrographis paniculata*, en presencia de una solución buffer sin calcio con exceso de KCl (50 mM). La depolarización producida por KCl favorece la apertura de canales de calcio operados por voltaje y la entrada de calcio al músculo liso deferente produciendo de esta forma la contracción del mismo (Karakı y col., 1997). Para evaluar la incorporación de Ca^{45} a los trozos de deferente se utilizó el protocolo descrito por Khoyi y col.(1988), los resultados obtenidos con KCl fueron similares a los descritos por Khoyi en lo que se refiere a la entrada de Ca^{45} a la célula del músculo liso con concentraciones de KCl de 25 y 50 mM, donde la entrada de Ca^{45} aumentó de manera dependiente a la concentración de KCl.

Andrographis paniculata bloquea la entrada de calcio al tejido del músculo liso deferente, este bloqueo lo produce impidiendo la entrada de calcio a la célula posiblemente en respuesta a un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje. Al aplicar *Andrographis paniculata* en presencia de altas concentraciones de potasio (KCl 25 y 50mM), el ingreso de calcio disminuyo lo cual es otro motivo más que nos lleva a pensar que el efecto de *Andrographis paniculata* es a nivel de canales de calcio dependientes de voltaje. En la metodología empleada se utilizó reserpina la cual se une de manera estrecha a vesículas de almacenamiento y neuronas adrenérgicas centrales y periféricas permaneciendo en esos sitios durante períodos prolongados. El agotamiento (inducido por reserpina) de aminos biógenas se correlaciona con datos de disfunción simpática y efectos antihipertensivos (Giachetti y Shore, 1978). Reserpina fue utilizada en

este trabajo, por tanto se necesitaba eliminar la acción de la norepinefrina endógena, para que la entrada de calcio a la célula solo sea vía canales de calcio y mediada por la depolarización de membrana producida por potasio.

El efecto del potasio es directo y no depende de la liberación de norepinefrina ya que el efecto ocurre después que la norepinefrina endógena es agotada por reserpina, esto ha sido descrito por Saad y Huddart (1981) y Hay y Wadsworth (1984) en conductos deferentes de ratas y Khoiyi y col (1987) en conductos deferentes de cobayos. Además efectos similares a los anteriormente expuestos sobre potasio han sido obtenidos con músculo liso vascular (Van Bremen y col 1972; Karaki y Weiss, 1980). Sin embargo otros estudios con músculo liso vascular mostraron diferencias en comparación con músculo liso deferente, ya que al aplicar norepinefrina en músculo liso vascular esta aumentó el influjo de calcio y fue aditivo al influjo de calcio inducido por potasio (Meisheri y col., 1981); sin embargo en conducto deferente norepinefrina no es capaz de promover el influjo de calcio por si misma y además atenúa el influjo inducido por potasio, promoviendo el eflujo por liberación de calcio desde retículo sarcoplásmico (Khoiyi y col., 1988).

A pesar que norepinefrina no induce el influjo de calcio, este agonista alfa adrenoreceptor causa contracción del deferente. Khoiyi y col. 1988 suponen que norepinefrina produce este efecto por liberación de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular. El organelo celular desde el cual el calcio es liberado por norepinefrina parece ser el retículo sarcoplásmico (Bond y col., 1984). Como ha sido demostrado por muchos estimulantes en varias células tipo, la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares es mediada por un segundo mensajero el inositol-1-4-5-trifosfato (IP_3), que es producto de la hidrólisis del lípido de la membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), dicha reacción es catalizada por una fosfolipasa C. Inositol-1-4-5-trifosfato es la principal señal para que el retículo sarcoplásmico libere calcio (Goodman y Gilman, 1996). Al intentar bloquear el efecto contráctil de norepinefrina en conducto deferente con *Andrographis paniculata* y Verapamil, estos no tuvieron éxito, debido a que Verapamil

sería preferentemente un bloqueador selectivo de canales de calcio (Peiper y col., 1971) acción que fue similar a la producida por *Andrographis paniculata*.

Tradicionalmente la contracción inducida por incremento del contenido de potasio es totalmente abolida por la remoción del calcio del medio externo y también por agentes bloqueadores de canales de calcio, incluidos Cinnarizine (Godfraind y Kaba, 1969), B-diethylaminoethyldiphenylpropil acetate (SKF525A) (Kalsner y col., 1970), Verapamil (Peiper y col., 1971), y La^{3+} (Goodman y Weiss., 1971a,b; Van Breemen y col., 1972). El efecto de *Andrographis paniculata*, en este estudio fue porcentual mente mayor al de Verapamil, sin embargo no es posible saber si es más potente, para lo cual es necesario caracterizar el o los compuestos activos.

Verapamil reduce la acción de norepinefrina solo en altas concentraciones ($1-2 \times 10^{-4}$), (Blackmore, y col, 1979) probablemente la acción de verapamil no es producto del bloqueo del flujo de calcio a través de la membrana plasmática porque la concentración de calcio en el medio externo es muy baja y por ende puede deberse a otros mecanismos tales como la interferencia en el receptor alfa adrenérgico (Blackmore y col. 1979), o la inhibición de fosfodiesterasa (Epstein y col. 1982).

7. CONCLUSIONES

Andrographis paniculata produce un efecto relajante sobre la contracción de la musculatura lisa de deferente inducida por calcio, no modifica la contracción inducida por norepinefrina y reduce la entrada de Ca^{45} . Esta acción de *Andrographis paniculata* es similar a la producida por un bloqueador de canales de calcio reconocido, como lo es el verapamil. Lo anterior sugiere que la disminución de la respuesta contráctil producida por *Andrographis paniculata* es a nivel extracelular mediante un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje, similar a la producida por verapamil.

Analizando los objetivos planteados:

1- La contracción máxima en musculatura lisa deferente inducida por dosis acumulativas de CaCl_2 es disminuida por la adición de *Andrographis paniculata*.

2- La disminución de la contracción muscular producida por *Andrographis paniculata* es similar a la producida por Verapamil, sometidos ambos a las mismas condiciones.

3- La disminución de la acción contráctil producida por *Andrographis paniculata* es a través de una inactivación de canales de calcio dependientes de voltaje.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALAGESABOOPATHI, C. y S. BALU. 1995. Andrographolide content of some therapeutically important species of *Andrographis* Wall. *Crop-res.-Hisar*. 10:3,353-355.
- ASHOORI BY. F., y T. TOMITA 1983. Mechanical response to noradrenaline in calcium-free solution in the rat vas deferens. *J. Physiol.*: 338: 165-178.
- BLACKMORE, P.F. EL REFAI, M.F. y EXTON, J.H. 1979. Alfa-adrenergic blockade and inhibition of A23187 mediated Ca^{2+} uptake by the calcium antagonist Verapamil in rat liver cell. *Mol. Pharmacol.* 15: 598-606.
- BOLTON, T.B. 1979. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718.
- BOND, M., KITAZAWA, T., SOMLYO, A.P. y SOMLYO A.V. 1984 . Release and recycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig portal vein smooth muscle. *J. Physiol.(Lond.)*. 355: 677-695.
- BORHANUDDIN, M., SHAMSUZZOHA, M., HUSSAIN, A.H. 1994. Hypoglycaemic effects of *Andrographis paniculata* nees on non-diabetic rabbits. *Bangladesh. Med. Res.Counc. Bull.* 20: 24-26.
- CHANG, H.M. y P.P.H. BUT. 1987. Pharmacology and applications of chinese materia medica. Vol II. World Scientific Publishers. Oxford.
- CHANG, R. S., YEUNG, H. W. 1988. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. *Antiviral Res.* 9: 163-176.
- CHANG, R.S., DING, L., CHEN, G Q., PAN, Q. C., ZHAO, Z. L , SMITH, K. M. 1991. Dehydroandrographolide succinic acid monoester as an inhibitor against the human immunodeficiency virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197:59-66.
- CHOUDHURY, B. R. & PODDAR, M. K. 1984 a. Andrographolide and kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract: in vivo and in vitro effect on hepatic lipid peroxidation. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 6: 481-485.
- CHOUDHURY, B. R. & PODDAR, M. K. 1984 b. Andrographolide and kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract: effect on rat liver and serum transaminases. *IRCS Med. Sci.* 12:466-467.

- DE FEO, T. T., y MORGAN, K. G. 1985. Calcium-force relationships as detected with aequorin in two different vascular smooth muscles of the ferret. *J. Physiol.(Lond.)* 369: 269-282.
- DE FEO, T. T., y MORGAN, K. G. 1989. Calcium-force coupling mechanism during vasodilator-induced relaxation of ferret aorta. *J. Physiol.(Lond.)* 412: 123-133.
- EPSTEIN, P.M., FISS, K., HACHISU, R. y ANDRENYAK, D.M. 1982. Interaction of calcium antagonists with cyclic AMP phosphodiesterases and calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 1142-1149.
- GODFRAIND, T., y KABA, A. 1969. Blockade or reversal the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 36: 549-560.
- GODFRAIND, T., MILLER, R., y WIBO, M. 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38: 321-416.
- GOODMAN, L. S. y A. GILMAN. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica 9ª edición. McGraw-hill Interamericana editores, S. A. México.
- GOOMAN, F.R. y WEISS, G.B. 1971. Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 220: 759-766 (a).
- GOOMAN, F.R. y WEISS, G.B. 1971. Effects of lanthanum on Ca^{45} movements and on contractions induced by norepinephrine, histamine and potassium in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177: 415-425 (b).
- GUO, Z. L, ZHAO, H., FU, L. 1996. Protective effects of APIO 134on myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Tongji Med. Univ.* 16: 193-197.
- GUPTA, S , CHOUDHRY, M.A., YADAVA, J.N.S., SRIVASTAVA, V., y TANDON, J.S. 1990. Antidiarrhoeal activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* (Kal-Megh) against *Escherichia coli* enterotoxin in in vivo models. *Int. J. Crude. Drug. Res.* 28: 273-283.
- GUPTA, V. y V.K. SRIVASTAVA. 1994. Kalmegh a valuable NTFP for N.W. Indian. *Forest Products.* 2: 1-2, 76-78
- HAGIWARA, S., MITSUI, M., AND KARAKI, H. 1993. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 234: 1-7.

- HANDA, S. S y SHARMA, A. 1990 a. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride. *Indian. J. Med. Res.* 92: 276-283.
- HANDA, S. S. y SHARMA, A. 1990 b. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine & paracetamol intoxication in rats. *Indian. J. Med. Res.* 92: 284-292.
- HAY, D.W.P. y WADSWORTH, R.M. 1984. Effects of KCl on ^{45}Ca uptake and efflux in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 81: 441-447.
- ICHIDA, MORIYAMA y TERAQ. 1983. Characteristics of Ca in infuxes through voltaje- and receptor- operated Ca channels in uterine smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 439-442.
- KALSNER, S., NICKERSON, M., y BOYD, G.N. 1970 . Selectiva blockade of potassium-induced contractions of aortic strips by b-diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate (SKF.525A). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174: 500-508.
- KARAKI, H., y WEISS,, G.B. 1980. Effects of stimulatory agents on movilization of high and low affinity site ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 450-455.
- KARAKI, H., OZAKI, H, HORI, M., MITSUI-SAITO, M., AMANO, K.I., HARADA, K.I., MIYAMOTO, S., NAKAZAWA, H., WON, K.J., SATO, K. 1997. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacol. Rev.* 49: 157-239.
- KHOYI M.A., D.P. WESTFALL, I.L.O.BUXTON, F.AKHTAR-KHAUARI, E. REZAEI, M. SLAICES, y P. SANCHEZ-GARCIA. 1988. Norepinephrine and potassium induced calcium traslocation in rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 917-923.
- KHOYI M.A., WESTFALL, D.P. y GERTHOFFER, WT. 1987. Effects of potassium and norepinephrine on calcium influx in guinea-pig vas deferens *Eur. J. Pharmacol.* 140: 55-62.
- KUMAR; S. y G. PRASAD. 1992. Efficacy of medicinal plant *Andrographis paniculata* extract on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. *Letters in Appl. Microbiol.* 15:4, 131-132.
- LEHMANN, G., REINIGER, G., BEYERLE, A., y RUDOLPH, W. 1993. Pharmacokinetics and additional anti-ischaeamic effectiveness of amlodipine, a once-daily calcium antagonist during acute and long-term therapy of stable angina pectoris in patients pretreated with a beta-blocker. *Eur. Heart J.* 14: 1531-1535.

- MADAV, S., H.C. TRIPATHI, TANDAM y S K. MISHRA.1995 Analgesia, antipyretic and antiulcerogenic effect of andrographolide. Indian J. Pharm. Sci. 57:3, 121-125.
- MADAV, S., TANDAN, S. K., LAL, J., TRIPATHI H.C. 1996. Anti-inflammatory activity of andrographolide. Fitoterapia. LXVV, 452-458.
- MEHROTRA, R., S. RAWAT, D.K. KULSHRESHTLA, G.K. PATNAJK and 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.
- MEISHERI, K.D., HWANG O.K., VAN BREEMEN C. 1981. Evidence for two separate Ca^{+2} pathways in smooth muscle plasmalemma. J. Membr. Biol. 59: 19-25.
- MISRA, R, N.L. PAL, P.Y. GURU, J.C. KATIYAR, V. SRIVASTAVA and J.S. TANDOM. 1992. Antimalarial activity of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against *Plasmodium berghei* NK 65 IN *Mastomys natalensis* Int. J. Pharmacol. 30:4, 263-274.
- MONIRUDDIN, A. y S.A. TALUKDER.1977. Studies on the Hypoglycemic activity of Kalmegh (*Andrographis paniculata* nees.) on the Blood-Sugar Level of rats. Bangladesh Pharm. J. 6: 21-24
- MURAKI, K., BOLTON, T. B., IMAIZUMI, Y., y WATANABE, M. 1993. Effects of isoprenaline on Ca^{2+} channel current in single smooth muscle cells isolated from taenia of the guinea-pig caecum. J. Physiol. 471: 563-582.
- OTAKE, T., MORI, H., MORITOMO, M., UEBA, N, SUTARDJO, S., KUSUMOTO, Y. T., HATTORI, M., NAMBAJ. 1995. Screening of Indonesian plant extracts for anti-human immunodeficiency virus tyoe 1 (HTV-) activity. Phytother. Res . 9: 6-10.
- PEIPER, U., GRIEBEL, L., AND WENDE, W. 1971. Activation of vascular smooth muscle of rat aorta by noradrenaline and depolarization: two different mechanisms. Pfluegers Arch. 330: 74-89.
- PURI, A., SAXENA, R., SAXENA, R. P., SAXENA, K.C., SRIVASTAVA, V., TANDON, J. S. 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata* . J. Nat. Prod. 56: 995-999.
- SAAD , K.H.M. y HUDDART, H. 1981. Influence of noradrenaline and KC1 on calcium traslocation in rat vas deferens smooth muscle and its subcellular fractions. Gen. Pharmacol. 12: 373-380.

- SHARMA, A., LAL, K., HANDA S.S. (1992). Standardization of the indian crude drug Kalmegh by high pressure liquid chromatographic determination of andrografolide. *Phytochem. Anal.* 3, 129-131.
- SUBRAMANIAN, A., P. PUSHPANGADAN, S. RAJASEKHARAN y P.G LATHA. 1995. Anti-pyretic activity for TBR-002, a herbal formulation. *Ann. Sci. Of Life.* 15:1, 7-14.
- SUMIMOTO, K., y KURIYAMA, H. 1986. Mobilization of free Ca^{2+} measured during contraction-relaxation cycles in smooth muscle cells of the porcine coronary artery using quin2. *Pfluegers Arch.* 406: 173-180.
- TANG, W., y G. EISENBRAND. 1992. Chinese drugs of plant origin. 1st ed. Springer-Verlag. London.
- TAN, B.K.H; ZHANG, C.Y. 1998. Pharmacological mechanisms of cardiovascular actions of diterpenoids of *Andrographis paniculata*. Presented at INABIS 98-5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, Dec 7-16th.
- THAMLIKITKUL, V., S. THEERAPONG, 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 y E.D. TENANBERGEN. 1991. Efficacy of *Andrographis paniculata*, Nees for pharyngotonsillitis in adults. *J. Med. Assoc. Thai.* 74: 437-442.
- VAN BREEMEN, C., AARONSON, P., AND LOUTZENHISER, R 1979. Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 30: 167-208.
- VAN BREEMEN, C., FARINAS, B.R., GERBA, G. AND McNAUGHTON, E.D. 1972. Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Circ. Res.* 30: 44-54.
- WANG, D.W. y H.Y. ZHAO. 1993. Experimental studies on prevention of atherosclerotic arterial stenosis and restenosis after angioplasty with *andrographis paniculata* nees y fish oil. *J Tongji.Med.Univ.* 13:193-198.
- YAO, X. J., WAINBERG, M. A., PARNIAK, M. A. 1992. Mechanism of inhibition of hiv-1 infection in vitro by purified extract of *prunella vulgaris*. *Virology.* 187: 56-62.
- ZHANG, C., KUROYANGI, M. Y B.K. TAN. 1998. Cardiovascular activity of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide in the anaesthetized rat and isolated right atria. *Pharmacol. Res.* 38: N° 6.

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

9. AGRADECIMIENTOS

Son la 1:00 de la madrugada de un día lunes 21 de enero, y recuerdo todos mis momentos pasados, todos los amigos, todas las personas lindas que tanto quiero.

Primero agradezco a Dios por que siempre estuvo conmigo y a mis padres que con todas sus limitaciones económicas se las arreglaron para tenderme la mano cuando así lo necesité porque sin ellos no lo habría logrado y por que el amor que siempre me han entregado es el que un día espero entregar a mis hijos,

También quiero agradecer a mis amigos Rodrigo, Juanchi, Jano. Hoy recuerdo lo lindo que fue nuestra vida Universitaria y cuanto la extraño. Al Dr Rafael Burgos por su incondicional ayuda y comprensión y finalmente a todas aquellas personas que me ayudaron y que me quieren, en especial a una a la cual quiero mucho.

Marcelo Imilán Ojeda.