



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Farmacología

Evaluación del efecto miorreajador de **14-Deoxiandrografolido**
sobre útero de rata

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

Mario Fabián Loyola Aravales
Valdivia Chile 2001

PROFESOR PATROCINANTE.



Dr. Rafael Burgos A.

PROFESOR COPATROCINANTE.

PROFESORES CALIFICADORES.



Dr. Frederick Ahumada.



Dr. Ricardo Castillo.

FECHA DE APROBACION: 25 de Enero del 2001.

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	10
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSION	19
7. CONCLUSIONES	22
8. BIBLIOGRAFIA	23
AGRADECIMIENTOS	28

*Dedicada a Elena y Mario,
mis padres.*

EVALUACION DEL EFECTO MIORRELAJADOR DE 14-DEOXIANDROGRAFOLIDO SOBRE UTERO DE RATA.

1. RESUMEN

En ésta tesis se evaluó, el efecto miorrelejador uterino y el posible bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje por 14-Deoxiandrografolido, en útero de rata.

Se utilizaron cuernos uterinos de ratas Sprague-Dawley de entre 200-250g de peso, cuya selección y distribución en el bioterio fue al azar. Los animales fueron pretratados con cipionato de estradiol 48 hrs previo a todos los experimentos.

Los cuernos uterinos fueron incubados en una solución Jalón sin CaCl_2 alto K^+ (KCl 45.77 mM) para depolarizar la membrana citoplasmática. La administración de concentraciones crecientes de 14-Deoxiandrografolido (5×10^{-6} - 1×10^{-4} M) redujo la respuesta contráctil de manera dosis dependiente en útero contraído con 0.3 y 3 mM de CaCl_2 e incubado en Jalón alto K^+ . Por otro lado la administración de concentraciones acumulativas de CaCl_2 fue significativamente antagonizada por 5×10^{-5} M de 14-Deoxiandrografolido.

Contracciones uterinas, inducidas por ortovanadato de sodio, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ y oxitocina en solución Locke-Ringer sin CaCl_2 con EDTA, no fueron afectadas por concentraciones acumulativas de 14-Deoxiandrografolido (1×10^{-6} - 3×10^{-4} M), sin embargo la respuesta contráctil fue antagonizada completamente por fenilbutazona e isoproterenol de manera dosis dependiente.

Estos datos sugieren que 14-Deoxiandrografolido inhibe la respuesta contráctil de CaCl_2 en útero de rata depolarizado con potasio. Esto se puede atribuir a una disminución de la entrada de calcio extracelular, por un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje. La ausencia de inhibición de la respuesta contráctil inducida por oxitocina, ortovanadato de sodio y prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ en ausencia de calcio externo, permite descartar un efecto miorrelejador por mecanismos independientes de la presencia de calcio extracelular.

Palabras claves: 14-Deoxiandrografolido, útero, canales de calcio, músculo liso.

EVALUATION OF THE MIORELAXING EFFECT OF 14-DEOXYANDROGRAPHOLIDE IN RAT UTERUS.

2. SUMMARY

The miorelaxing effect and the possible voltage operated calcium channel blocking effect induced by 14-Deoxyandrographolide in uterus from rats, was studied.

Uterine horns from Sprague-Dawley rats weighing between 200-250g and randomly distributed were used. The animals were pretreated with estradiol cypionate 48 hrs before the experiment.

Uterine horns were incubated in CaCl_2 -free Jalon's solution high K^+ (KCl 45.77mM) for depolarisation of the cytoplasmic membrane. The contractile response to cumulative concentrations of CaCl_2 were significantly antagonised with 5×10^{-5} M of 14-Deoxyandrographolide. On the other hand, the administration of 14-Deoxyandrographolide in cumulative concentrations (5×10^{-6} - 1×10^{-4} M) blocked the contractile response in dose-dependent in uterus contracted with CaCl_2 0.3 and 3 mM and incubated in Jalón high K^+ .

Sodium ortovanadate, prostaglandine $\text{F}_{2\alpha}$ and oxytocin produced a tonic contraction in uterus incubated in Ca^{2+} -free Locke-Ringer containing EDTA, which is not affected by cumulative concentrations of 14-Deoxyandrographolide (1×10^{-6} - 3×10^{-4} M) however, the contractile response was completely antagonised by phenylbutazone and isoproterenol in a dose dependent manner.

These results suggest that 14-Deoxyandrographolide blocks the CaCl_2 contractile response in the potassium depolarized rat uterus. This could be due to a decrease in the CaCl_2 influx to the cells as a consequence of a blocking of the voltage operated calcium channels. The absence of inhibition of the contractile response induced by oxytocin, sodium ortovanadate and prostaglandine $\text{F}_{2\alpha}$, in absence of external calcium descarts the miorelaxing effect mediated by mechanism independent from the presence of extracelular calcium.

Key words: 14-Deoxyandrographolide, uterus, calcium channels, smooth muscle.

3. INTRODUCCION

El músculo liso se diferencia del músculo esquelético y cardíaco en que carece de estrías transversales visibles. Posee actina y miosina II, las cuales al deslizarse una sobre la otra producen la contracción (Ganong, 1993). Básicamente el mecanismo de la contracción se produce por un incremento del Ca^{2+} citosólico lo cual aumenta la unión del Ca^{2+} a la proteína calmodulina. El complejo de Ca^{2+} -calmodulina activa a su vez a la miosina de cadena ligera cinasa, con fosforilación resultante de la cadena ligera de la miosina. Esa fosforilación favorece la interacción entre actina y miosina, y la contracción del músculo liso (Robertson y Robertson, 1996). En general el músculo liso se divide en músculo liso visceral y músculo liso multiunitario. El músculo liso visceral forma parte de las paredes de casi todas las vísceras principalmente, intestino, conductos biliares, uréteres, útero y vasos sanguíneos (Guyton y Hall, 1997). Además se caracteriza por la inestabilidad de su potencial de membrana y por el hecho de que muestra contracciones continuas, irregulares e independientes de su innervación. Este estado sostenido de contracción se llama tono (Ganong, 1993).

El músculo liso uterino se caracteriza por su alto grado de actividad eléctrica y contractibilidad espontánea (Kao, 1987). Este músculo es inexcitable durante el diestro y en el animal ovariectomizado, pero durante el estro o en los animales ovariectomizados tratados con estrógenos aumenta la excitabilidad, presentando contracciones espontáneas y tono (Ganong, 1993). Los estrógenos incrementan el ingreso de calcio a las células del miometrio por inducción de la formación de nuevos canales de calcio en la membrana celular (Batra, 1987). Debido a la inestabilidad de su potencial de membrana, el músculo liso uterino se contrae por 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).

Es sabido que la contracción de las células del músculo liso depende de al menos tres mecanismos que modifican la homeostasis del calcio intracelular:

a) canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje que se abren en respuesta a la depolarización de membrana y permiten que el Ca^{2+} extracelular ingrese por su gradiente electroquímico hacia la célula (Robertson y Robertson, 1996). Por ejemplo, una alta concentración de K^+ , induce la depolarización de la membrana, la apertura del canal de calcio y la contracción, b) contracciones inducidas por agonistas que ocurren sin depolarización de la membrana, que 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, 1993a).

El Ca^{2+} es utilizado por las células como un segundo mensajero en el control de muchos procesos celulares incluyendo, contracción muscular, secreción, metabolismo, excitabilidad neuronal, proliferación y muerte celular (Simpson y col, 1995). La concentración intracelular

del Ca^{2+} es la resultante de los procesos de entrada de dicho ion. El aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene lugar a través de diversos mecanismos (Figura 1.): canales de calcio, intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática y liberación desde el principal sitio de almacenamiento de Ca^{2+} intracelular, el retículo endoplásmico. Este depósito contiene dos canales de liberación de Ca^{2+} , distintos, pero relacionados estructuralmente: el receptor IP_3 que se fija con gran selectividad a éste segundo mensajero, y el receptor de rianodina, identificado originalmente en la célula muscular esquelética, pero presente también en otras células. En cuanto a los procesos de salida (Figura 1.) destacan las bombas Ca^{2+} -ATPasas, que extraen el Ca^{2+} hacia el exterior de la célula o lo introducen en los depósitos del retículo endoplásmico, y el propio intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Flórez, 1997). La membrana plasmática posee una variedad de canales de Ca^{2+} que son caracterizados por sus mecanismos de activación ellos son; canales operados por voltaje (VOCs) y canales operados por receptores (ROCs). Los primeros son una familia de canales que se abren en respuesta a depolarización de membrana mediante una selectiva entrada de Ca^{2+} (Mori y col, 1993). Los múltiples tipos (L, T, N y P) están clasificados en base a sus propiedades cinéticas y farmacológicas. Los canales operados por receptores son canales de Ca^{2+} abiertos por la unión de agonistas específicos usualmente neurotransmisores tales como glutamato o ATP (Berridge, 1993b).

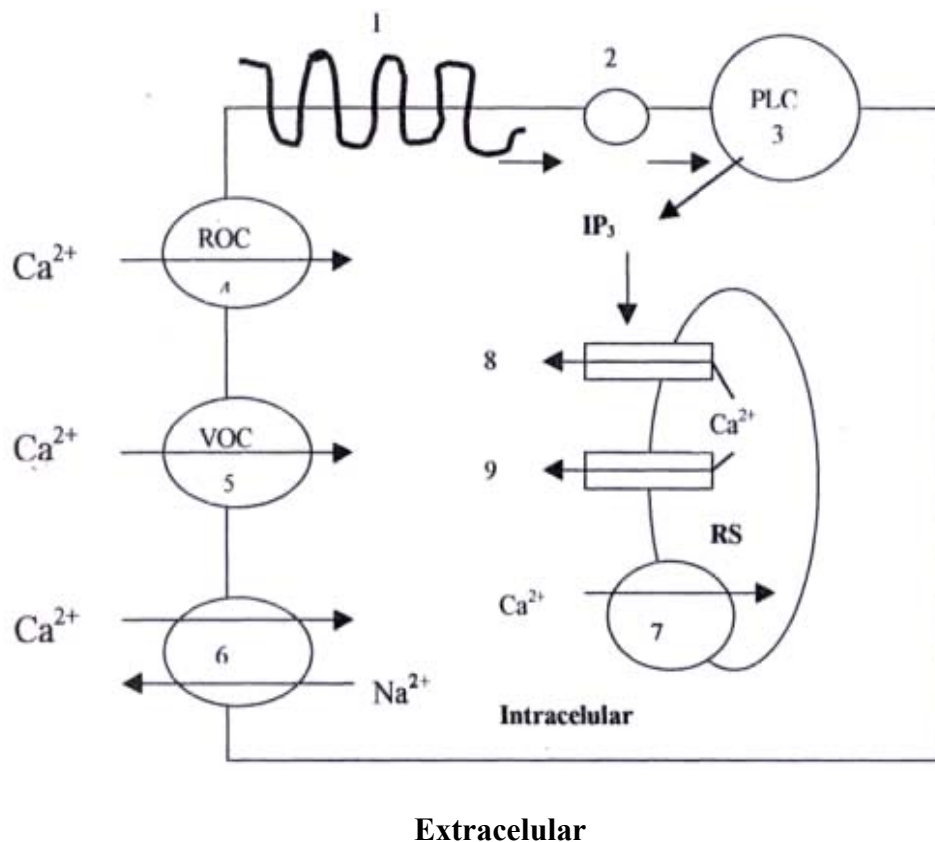


Figura 1. Representación esquemática del flujo de calcio al interior de la célula muscular lisa: 1: receptor acoplado a proteína G; 2: proteína G; 3: fosfolipasa C; 4: canal operado por receptor; 5: canal operado por voltaje; 6: intercambiador Na^{2+} - Ca^{2+} ; 7: Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa; 8: receptor IP_3 ; 9: receptor de rianodina; IP_3 : inositol trifosfato; RS: retículo sarcoplásmico.

Las contracciones de útero de rata en ausencia de calcio han sido descritas por varios autores, se ha señalado que en ausencia de calcio extracelular, el útero aislado de rata puede ser contraído por agonistas tales como acetilcolina, angiotensina II, prostaglandina, vanadato, NaF y oxitocina (Sakai y col, 1981 y 1982; Mironneau y col, 1984; Lalanne y col, 1984; Ashoori y col, 1985). Los mecanismos involucrados en la contracción de útero de rata incubado en solución libre de calcio inducida por oxitocina no están claros, sin embargo se reporta que oxitocina produce liberación de calcio intracelular y prostaglandinas (Poyser, 1987). Además inhibe $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa de la membrana plasmática (Akerman y Wirkstrom, 1979; Carsten y Miller, 1977; Soloff Sweet, 1982). Esta enzima mantiene el gradiente de Ca^{2+} al interior de la célula (Lotersztajn y col, 1981). La inhibición por oxitocina de la actividad de $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa miometral resulta en un incremento del calcio citoplasmático éste puede ser uno de los mecanismos por el cual ésta hormona induce las contracciones uterinas (Black y col, 1980). Además de oxitocina, se ha demostrado que vanadato y prostaglandina $F_{2\alpha}$ tienen un mecanismo en común, el bloqueo de $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa (Soloff Sweet, 1982; Popescu y col, 1984; Nechay, 1984). Vanadato es uno de los más potentes inhibidores enzimáticos entre los conocidos (Cantley y col, 1977). Existen estudios en enzimas del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético, corazón y eritrocitos humanos donde se observó que $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa es varias veces más resistente a vanadato que Na^+ - K^+ ATPasa (Bond y Hudgins, 1980). La $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico requiere a lo menos concentraciones diez veces más altas de vanadato para un 50% de inhibición en eritrocitos (Wang y col, 1979). Fernández y col, (1992) señalan que el bloqueo de $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa está involucrado en las contracciones uterinas en medio libre de calcio. Contracciones inducidas por oxitocina y vanadato en medio libre de calcio no son modificadas por bloqueadores de canales de calcio como nifedipino (Fernández y col, 1992).

Los bloqueadores de canales de calcio 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 calcio tipo L dependientes de voltaje en músculo liso vascular (Hockerman G.H 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 cardíaco (Hockerman G.H y col, 1997). Además los bloqueadores de canales de calcio relajan el miometrio in vitro e inhiben en grado extraordinario la amplitud de las contracciones inducidas por oxitocina (Murray y col, 1992). Por esa razón junto con sulfato de magnesio, agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos e inhibidores de prostaglandina sintetasa se utilizan como tocolíticos (Graves, 1996).

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), control de la producción de aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* (Kumar y Prasad, 1992). También ha sido utilizada como: antiinflamatorio, antidiarreico, antipirético (Subramanian y col, 1995) y antiulcerogénico (Madav y col, 1995).

Andrographis paniculata químicamente está compuesta por lactonas diterpénicas y sesquiterpénicas, flavonoides y azúcares. El principal constituyente de *Andrographis paniculata* es la lactona diterpénica (Andrografolido), ésta 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 *Andrographis paniculata* son las siguientes: andrografolido, deoxiandrografolido, neoandrografolido y 14-deoxi-11-12-dihidroandrografolido. Recientemente han sido aislados y dilucidados algunos constituyentes diterpénicos de *Andrographis paniculata*, como dideoxi- andrografolido, andrographiside, dideoxy- andrographiside. Entre los compuestos flavonoides descubiertos en la planta están: andrographidine A, polimetoxiflavona- andrografin y panicolin (Tang y Eisenbrand, 1992).

Andrographis paniculata tiene propiedades, inmunoestimulante, antiinflamatoria, y hepatoprotectoras efectos atribuidos a la presencia de la lactona andrografolido (Thamlikitkul y col, 1991). La capacidad inmunoestimulante ha sido demostrada, según Puri y col, (1993) debido a la presencia de dos lactonas diterpénicas andrografolido y neoandrografolido, los 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 anti-inflamatoria de andrografolido fue estudiada en comparación con ácido acetil salicílico y fenilbutazona, con diferentes modelos de inflamación en ratas, a las cuales se le administraron soluciones de carragenina, kaolín, nistalin y un extracto de *Mycobacterium 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 *Andrographis paniculata*, la cual disminuye el efecto hepatotóxico inducido por CCl₄ (Choudhury y Poddar, 1984). Andrografolido posee propiedades hepatoprotectoras así lo demostraron Mandan 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 y GPT). 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).

Estudios realizados por el Instituto de Farmacología de la U.A.Ch concluyen que *Andrographis paniculata* induce relajación de la musculatura lisa de útero y conducto

deferente de rata a través del bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje inhibiendo el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el interior de la célula (Burgos y col, 2000 y 2001). Se ha descrito una actividad hipotensiva de *Andrographis paniculata* la que ha sido demostrada con dosis dependientes, observándose el efecto en la presión sistólica, en ratas espontáneamente hipertensas (Zhang y Tan, 1996). También se ha demostrado que 14-Deoxiandrografolido (14-DAP) es capaz de inhibir la contracción inducida por calcio en aorta de rata (Zang y Tan, 1998).

14-Deoxiandrografolido $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$ (figura 2.) es uno de los diterpenoides aislados desde *Andrographis paniculata* (Balmain y Connolly, 1973). Ha sido reportado que posee propiedades antiinflamatorias y antipiréticas (Deng y col, 1982). Además de tener una potente actividad de inducir diferenciación en células de ratón con leucemia mieloide (Matsuda y col, 1994). Algunos experimentos han evidenciado que 14-Deoxiandrografolido relaja en forma considerable la presión arterial en ratas anestesiadas, otros experimentos han demostrado que 14-Deoxiandrografolido relaja contracciones tónicas inducidas por fenilefrina y KCl , éstos resultados sugieren que 14-Deoxiandrografolido puede bloquear el flujo de calcio por interferencia de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y por receptores (Zhang y Tan, 1998). La vasorelajación causada por 14-DAP en aorta persiste en la presencia de Índometacina y glibenclamida, esto implica que éste efecto no fue mediado por PGI_2 o canales de K^+ sensibles a ATP, ya que es sabido que indometacina bloquea la formación de PGI_2 por inhibición de ciclo-oxigenasa, mientras se reporta que glibenclamida bloquea canales de K^+ . Sin embargo, L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) y azul de metileno fueron capaces de inhibir parcialmente el efecto relajante de 14-DAP frente a contracciones inducidas por fenilefrina, pero no por KCl . En conjunto, éstos resultados sugieren que la relajación de aorta de rata causada por 14-DAP puede ser mediada a través de la vía arginina-NOS (óxido nítrico sintetasa) y activación de NO guanilato-ciclase, debido a que como L-NAME es inhibidor competitivo específico de NOS y azul de metileno inhibe la activación de NO guanilato-ciclase (Zhang y Tan, 1998). Este mismo estudio concluye que 14-DAP ejerce su actividad vasorelajante por actividad de NOS y guanilato-ciclase como también por bloqueo de canales de Ca^{2+} operados por voltaje y receptores. Aunque su acción vasodilatadora no parece ser potente, 14-DAP puede servir como molécula para desarrollar otros vasodilatadores más potentes con uso comercial (Zhang y Tan, 1998).

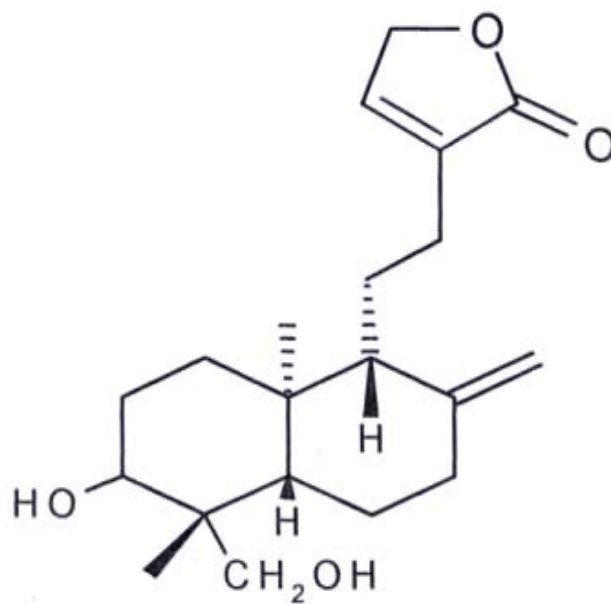


Figura 2. Estructura molecular de 14-Deoxiandrografolido

3.1. OBJETIVOS

- Demostrar que 14-Deoxiandrografolido produce relajación de la musculatura lisa uterina de rata.
- Comprobar que la relajación inducida por 14-Deoxiandrografolido en la musculatura lisa uterina se debe a un bloqueo de la acción del calcio.
- Demostrar que el mecanismo miorelajador de 14-Deoxiandrografolido es similar a un bloqueador de canales de calcio.
- Demostrar que 14-Deoxiandrografolido no afecta contracciones inducidas por mecanismos independientes de calcio extracelular.

3.2. HIPOTESIS

14-Deoxiandrografolido, 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 hembra de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 200-250grs provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la U.A.Ch. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, ciclos de luz-oscuridad alternados de 12 horas. La temperatura constante fue de 22°C y la alimentación fue ad-libitum con pellet estandarizado.

4.1.2. Farmacológico:

Cipionato de estradiol (Lab. Upjohn), CaCl₂ (Lab. Merck), 14-Deoxiandrografolido donado por el Dr Georg Wickman, prostaglandina F_{2α} (Lab. Upjohn), ortovanadato de sodio (Lab. Calbiochem), oxitocina (Lab. Veterquímica), isoproterenol (Lab. Sigma), fenilbutazona (Lab. Chile), uretano al 12% (Lab. Sigma).

4.1.3. Instrumentos:

Baño de órgano aislado, transductor de frecuencias BIOPAC, computador con software ACQ 4.0, tijeras, pinzas, jeringas desechables de 10ml, material de sutura.

4.2. METODOS

48 hrs previo a todos los experimentos las ratas fueron tratadas con cipionato de estradiol (1 mg/kg. i.m.) posteriormente fueron anestesiadas con uretano al 12% (dosis de 1ml/100gr de peso vivo) después de la anestesia se extrajo un cuerno uterino por rata, el cual fue limpiado de grasa y adherencias, siendo utilizada la parte más cercana al ovario (1.5-2cm). Posteriormente se depositaron rápidamente en el baño de órgano aislado gasificado con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de O₂, a 30°C y sometidos a 1g de tensión.

4.2.1. Determinación del efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata depolarizado con KCl y contraído con 0.3 o 3 mM de CaCl₂.

Los cuernos uterinos fueron preincubados en una solución Jalón sin calcio alto K⁺ que contiene (en mM): NaCl 150; KCl 45.77; NaHCO₃ 11.9; D-glucosa 5.55, por 60 min, cambiando la solución cada 10 min. Posteriormente al baño se le agregó 0.3 o 3 mM de CaCl₂, se esperó la respuesta máxima de contracción del tejido y una vez estabilizada se agregó en concentraciones acumulativas la solución de 14-DAP (5x10⁻⁶ a 5x10⁻⁵ M) o (5x10⁻⁶ a 1x10⁻⁴ M) respectivamente y se observó la respuesta.

4.2.2. Determinación de curvas dosis respuesta acumulativa de CaCl₂ en útero de rata depolarizado con KCl en ausencia o presencia de 14-DAP.

El útero fue preincubado en presencia de una solución Jalón sin calcio alto K⁺ que contiene (en mM): NaCl 150; KCl 45.77; NaHCO₃ 11.9; D-glucosa 5.55, por 60 min, cambiando la solución cada 10 min. A continuación se incubó sólo o en presencia de 14-DAP (5x10⁻⁶ o 5x10⁻⁵ M) por 10 min y fue contraído con concentraciones acumulativas de CaCl₂ (0.1 a 10 mM).

4.2.3. Determinación del efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata contraído con Oxitocina y Ortovanadato de sodio en ausencia de calcio externo.

El tejido fue preincubado en una solución Locke-Ringer que contiene (en mM): NaCl 118; KCl 5.63; CaCl₂ 2.16; MgCl₂ 2.1; NaHCO₃ 5.95 y glucosa 5.55. Luego de 60 min, la solución fue sustituida por otra Locke-Ringer libre de calcio con 3 mM de EDTA. Después de 50 min ésta solución fue reemplazada por otra de igual composición, conteniendo 1 mM de EDTA con la cual se realizó el resto del experimento, luego de 30 min se agregó Ortovanadato de sodio (3x10⁻⁴ M) u oxitocina (10 mU/ml) hasta alcanzar la máxima respuesta del tejido, una vez estabilizada la contracción se agregaron en concentraciones acumulativas fenilbutazona (1x10⁻⁶ a 3x10⁻⁴ M) en el caso de Ortovanadato e isoproterenol (1x10⁻⁷ a 1x10⁻⁴ M) en el caso de oxitocina. Luego se reemplazó la solución y se esperó por 60 min lavando el tejido cada 10 min. Finalmente se contrajo nuevamente el tejido y una vez estabilizado se agregó 14-DAP en iguales concentraciones a isoproterenol y fenilbutazona observándose la respuesta. Para el cálculo de la respuesta máxima se consideró la máxima contracción inducida por oxitocina y Ortovanadato de sodio.

4.2.4. Determinación del efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata contraído con Prostaglandina F_{2α} en ausencia de calcio externo.

Los cuernos uterinos fueron preincubados durante 60 min en una solución Jalón que contiene (en mM): NaCl 154; KCl 5.63; CaCl₂ 0.648; NaHCO₃ 5.95 y glucosa 2.77. La solución fue reemplazada por otra libre de calcio con 0.3 mM de EDTA y la incubación se continuó por 10 min, consecutivamente la solución fue sustituida por otra libre de calcio conteniendo 0.1 mM de EDTA por 10 min. Luego de lo cual se agregó prostaglandina F_{2α} (1x10⁻⁶ M), una vez alcanzada y estabilizada la máxima contracción del tejido se aplicó fenilbutazona en concentraciones acumulativas (1x10⁻⁶ a 1x10⁻⁴M). Finalmente se realizó lo mismo pero con 14-DAP y se observó la respuesta. Para el cálculo de la respuesta máxima se consideró la máxima contracción inducida por prostaglandina F_{2α}.

4.3. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos de la respuesta contráctil fueron ajustados mediante una regresión no lineal usando el programa Graphpad 2.0.

Se obtuvieron valores promedios de concentración efectiva 50 y error estándar (EC₅₀ ± E.E) además 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 analizados mediante test de ANOVA o test de students cuando correspondió. Los datos fueron expresados como medias aritméticas ± su error típico. Aquellos datos que no presentaron normalidad u homogeneidad de varianza, fueron analizados con estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis, Test de Dunn y Test de Man - Whitney) utilizando un nivel de significancia del 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata depolarizado con KCl y contraído con 0.3 o 3 mM de CaCl₂

Se observó que 14-DAP redujo la respuesta contráctil inducida por 0.3 o 3 mM de CaCl₂ en una solución Jalón sin calcio alto K⁺ (45.77 mM). Las IC₅₀ (Log M) de 14-DAP en útero contraído con 0.3 o 3 mM de CaCl₂ fueron: -4.905 ± 0.09 y -4.225 ± 0.11 respectivamente, las que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), (figura 3).

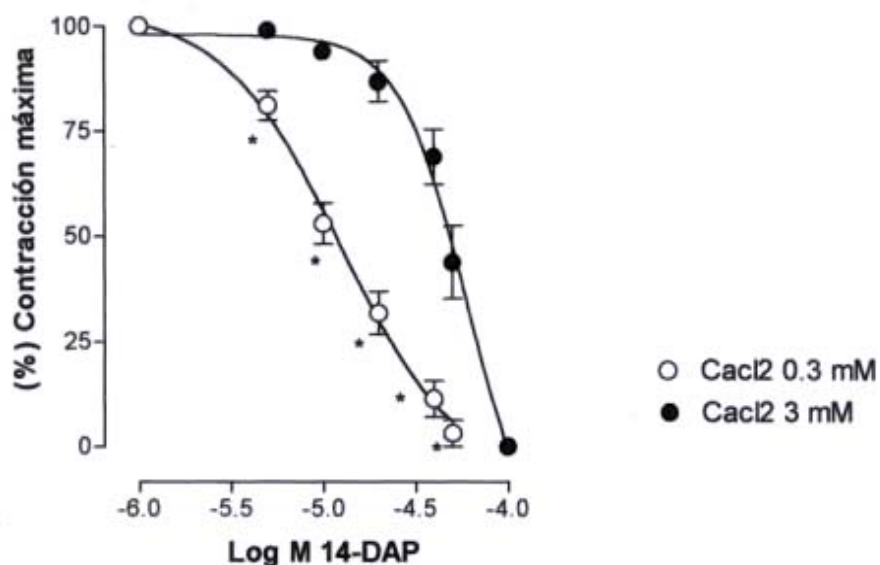


Figura 3: Efecto de 14-DAP en la respuesta contráctil de cuernos uterinos de rata, incubados en una solución Jalón con exceso de K⁺ (45.77 mM) en presencia de 0.3 o 3 mM de CaCl₂. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. *P<0.05 entre tratamientos.

5.2. Curvas dosis respuesta acumulativas de CaCl_2 en útero de rata depolarizado con KCl, en ausencia o presencia de 14-DAP.

Concentraciones de 5×10^{-6} y 5×10^{-5} M de 14-DAP, produjeron un aumento de la EC_{50} (Log M) de CaCl_2 : -3.367 ± 0.04 y -3.215 ± 0.07 respectivamente, presentándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) sólo con la segunda concentración respecto al control (figura 4.). Las respuestas contráctiles máximas (%) fueron: 103.4 ± 2.9 y 73.1 ± 2.2 respectivamente. 5×10^{-5} M de 14-DAP produjo una disminución de la respuesta contráctil máxima, que fue estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.01$), (figura 5.).

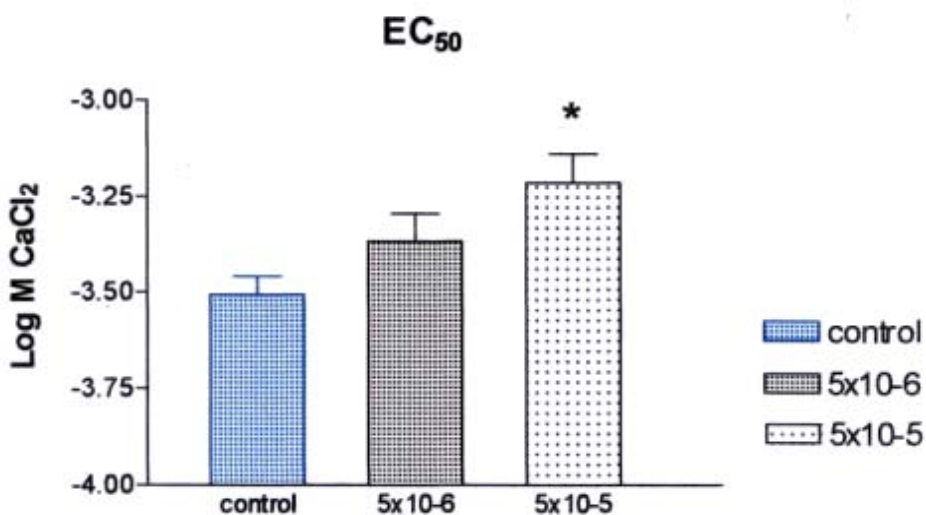


Figura 4: Gráfico de las EC_{50} de útero de rata, contraído con CaCl_2 solo o en presencia de 5×10^{-6} o 5×10^{-5} M de 14-DAP. Cada barra vertical representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. * $P < 0.05$ comparado con el control.

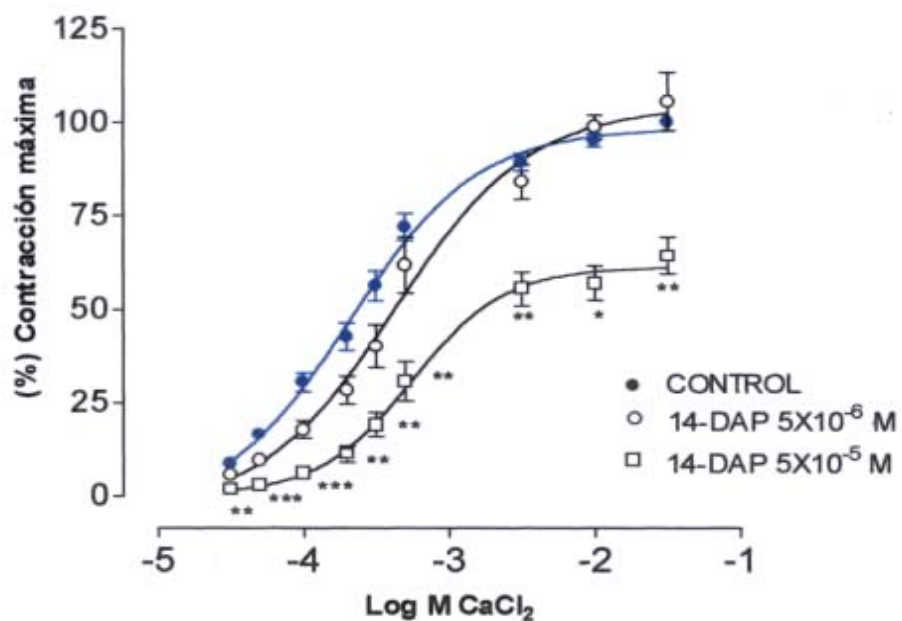


Figura 5: Curvas dosis respuesta acumulativas de CaCl₂ en útero de rata, depolarizado con KCl e incubado solo o en presencia de dos concentraciones de 14-DAP. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. *P<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con el control.

5.3. Efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata contraído con Ortovanadato de sodio y Oxitocina en medio libre de calcio externo.

Oxitocina (10mU/ml) y ortovanadato de sodio (3×10^{-4} M) produjeron contracciones sostenidas en útero de rata incubado en solución libre de calcio conteniendo 1 mM de EDTA. El promedio de la amplitud de las contracciones fue respectivamente para oxitocina y ortovanadato de 102.5 ± 11.03 y 397 ± 51.02 mg.

Se observó que 14-DAP no redujo la respuesta contráctil inducida por oxitocina. Por el contrario isoproterenol redujo la respuesta contráctil en forma notoria siendo su IC_{50} (Log M) : -5.709 ± 0.284 . Además isoproterenol presentó diferencias estadísticamente significativas con 14-DAP en los casos que señala la figura 6.

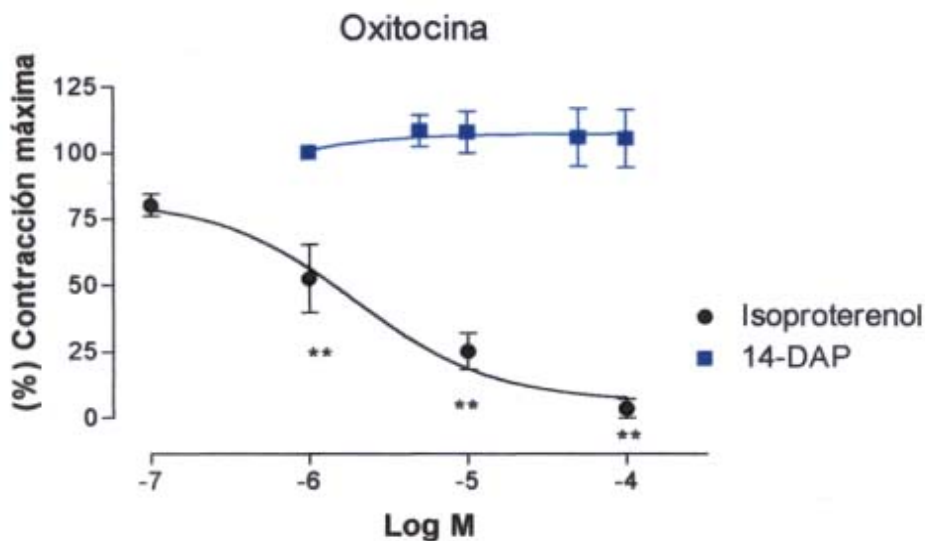


Figura 6: Curvas dosis respuesta de isoproterenol y 14-DAP en útero de rata contraído con oxitocina. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. ** $P < 0.01$ comparados entre tratamientos.

Por otra parte se apreció que 14-DAP no redujo la respuesta contráctil inducida por ortovanadato de sodio. En cambio fenilbutazona disminuyó la respuesta contráctil siendo su IC_{50} (log M): -4.11 ± 0.03 . Además fenilbutazona presentó diferencias estadísticamente significativas con 14-DAP en los casos que señala la figura 7.

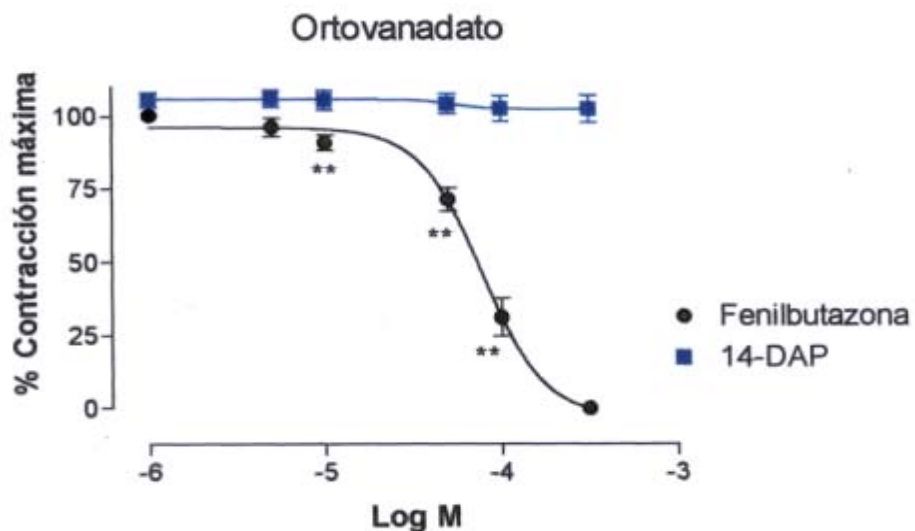


Figura 7: Curvas dosis respuesta de fenilbutazona y 14-DAP en útero de rata contraído con ortovanadato de sodio. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. ** $P < 0.01$ comparados entre tratamientos

5.4. Efecto inhibitorio de 14-DAP en útero de rata contraído con Prostaglandina $F_{2\alpha}$ en medio libre de calcio externo.

Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (1×10^{-6} M) produjo contracciones sostenidas en útero de rata incubado en solución libre de calcio conteniendo 0.1 mM de EDTA. El promedio de la amplitud de las contracciones fue 118.2 ± 19.34 mg.

Por otra parte 14-DAP no redujo la respuesta contráctil inducida por prostaglandina $F_{2\alpha}$. En cambio fenilbutazona redujo fuertemente la respuesta contráctil siendo su EC_{50} (log M): -4.77 ± 0.24 . Además fenilbutazona presentó diferencias estadísticamente significativas con 14-DAP en los casos que señala la figura 8.

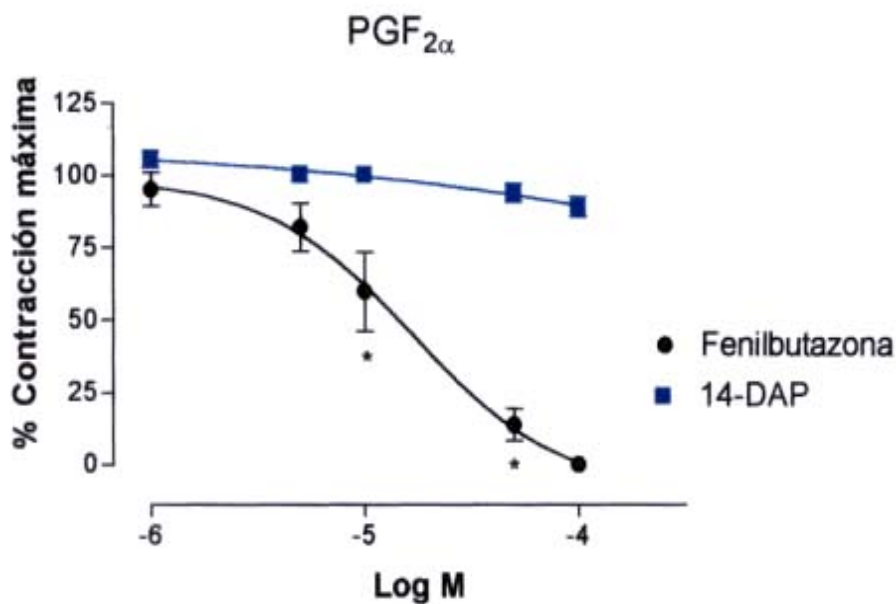


Figura 8: Curvas dosis respuesta de fenilbutazona y 14-DAP en útero de rata contraído con prostaglandina $F_{2\alpha}$. Cada punto representa el promedio \pm error típico de un n de al menos 4 animales. * $P < 0.05$ comparados entre tratamientos.

6. DISCUSION

La actividad hipotensiva de *Andrographis paniculata* ha sido demostrada observando su efecto sobre la presión arterial sistólica, de ratas espontáneamente hipertensas (Zhang y Tan, 1996). Otros experimentos atribuyen ésta propiedad a la presencia de la lactona 14-Deoxiandrografolido ya que se observó que ésta, es capaz de inhibir la contracción inducida por calcio en aorta de rata (Zhang y Tan, 1998). Además se demostró que su efecto vasorelajante estaría dado por la estimulación de la liberación de óxido nítrico (NO) desde las células endoteliales (Zhang y Tan, 1999). El óxido nítrico se sintetiza a partir de L-Arginina y oxígeno molecular por acción de la sintetasa de 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 existen dos tipos de métodos ampliamente utilizados para identificar los cambios de $(Ca^{2+})_i$, K^+ en concentraciones altas que induce depolarización de la membrana y aplicación de agonistas farmacológicos que liberen calcio desde los sitios de almacenamiento intracelular (Karakı y col, 1997). Concentraciones elevadas de K^+ inducen depolarización y una contracción sostenida que es totalmente abolida por la remoción de calcio externo y por agentes bloqueadores de canales de calcio. 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. Fármacos como nifedipino o verapamil pueden bloquear éste efecto (Karakı y col, 1997).

Según resultados de Zhang y Tan, (1998), 14-DAP relajó contracciones tónicas inducidas por fenilefrina y KCl en concentraciones dependientes, también antagonizó la curva dosis respuesta de fenilefrina de manera no competitiva. Además, inhibió la respuesta de anillos de aorta depolarizados con KCl y contraídos con Ca^{2+} en concentraciones dependientes, éstos resultados también sugieren que 14-DAP puede bloquear el flujo de Ca^{2+} por interferencia de canales de Ca^{2+} operados por voltaje o receptores. Sin embargo la EC_{50} mostró que tanto 14-DAP como verapamil, fueron mucho más potentes en relajar preparaciones contraídas con KCl que fenilefrina, esto también puede sugerir que la acción del 14-DAP es el bloqueo de canales de Ca^{2+} activados por voltaje. También evaluaron la posible inhibición de la liberación de calcio intracelular por 14-DAP utilizando norepinefrina y cafeína en medio libre de calcio produciéndose inhibición de ambas contracciones.

Según Burgos y col (2000 y 2001), *A. paniculata* redujo de manera dosis dependiente la respuesta contráctil inducida por $CaCl_2$ (0.3 y 3 mM) en útero incubado en solución Jalón sin calcio alto K^+ , también *A. paniculata* antagonizó de manera no competitiva el efecto contráctil de $CaCl_2$ (1 mM) a diferentes concentraciones de KCl (20-40 mM), verapamil tuvo un efecto similar en éstos experimentos. El ingreso de $^{45}Ca^{+2}$ al interior de la célula fue inhibido por *A. paniculata* y verapamil. *A. paniculata* también antagonizó el efecto de $CaCl_2$ en conducto deferente de rata depolarizado con KCl, pero no afectó la respuesta contráctil de norepinefrina.

Lo anterior permite concluir que *Andrographis paniculata* bloquea canales de calcio operados por voltaje inhibiendo el ingreso de calcio desde el medio externo.

Los resultados de los experimentos de ésta tesis demostraron que concentraciones acumulativas de 14-DAP que oscilaron entre 5×10^{-6} y 1×10^{-4} M disminuyen la respuesta contráctil inducida por 0.3 mM y 3 mM de CaCl_2 en cuernos uterinos incubados en una solución Jalón sin calcio alto K^+ (45.77 mM) (figura 3.). Además se observó que la concentración de 5×10^{-5} M de 14-DAP inhibió la respuesta contráctil de CaCl_2 en tejido incubado en una solución Jalón alto K^+ (45.77 mM) (figura 5.). Lo anterior sugiere que 14-DAP bloquea la entrada de calcio al tejido del músculo liso uterino, éste bloqueo lo produce posiblemente a través de canales de calcio dependientes de voltaje. Se puede señalar que el mecanismo de acción de 14-DAP es similar a un bloqueador de canales de calcio. Porque ellos sólo inhiben la contracción en canales de calcio dependientes de voltaje y no así en la contracción transitoria inducida por agonistas, que estimulan la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (Karaki y col, 1997).

En útero de rata en ausencia de calcio externo oxitocina, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ y ortovanadato de sodio tienen un mecanismo en común el cual es el bloqueo de $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa (Soloff y Sweet, 1982; Popescu y col, 1984; Nechay, 1984; Deliconstantinos y Fotiou, 1986; Garrahan, 1986) y liberación de calcio intracelular produciendo contracciones de manera dosis dependiente (Fernández y col, 1992). Estos mismos autores utilizaron oxitocina y ortovanadato en medio libre de calcio con EDTA en concentraciones únicas, produciéndose contracciones tónicas de los cuernos uterinos de rata. Estas contracciones fueron reducidas por inhibidores de la liberación de calcio intracelular como dantrolene y TMB-8. Por otra parte nifedipino no inhibió estas contracciones. Esto demuestra que las contracciones inducidas por ortovanadato y oxitocina en ausencia de calcio externo no son modificadas por bloqueadores de la entrada de calcio pero sí por inhibidores de la liberación de calcio intracelular. Los inhibidores de calmodulina trifluoperazina, W7, calmidazolium y bepridil relajaron de manera dosis dependiente las contracciones tónicas inducidas por oxitocina y vanadato. Además señalan que oxitocina y prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ podrían ser mediadores de la liberación de calcio intracelular porque tanto TMB-8 como dantrolene (inhibidores de la liberación de calcio intracelular) e indometacina (ciclooxigenasa inhibidor) inhibieron ambas contracciones .

Para evaluar las contracciones inducidas por mecanismos independientes de calcio extracelular, se utilizó en éste trabajo prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (1×10^{-6} M), ortovanadato de sodio (3×10^{-4} M) y oxitocina (10mU/ml) que, produjeron contracciones sostenidas en cuernos uterinos de rata en medio libre de calcio con EDTA, ésto demuestra que en útero se producen contracciones por un mecanismo independiente de calcio extracelular ya que el medio externo no posee Ca^{2+} y además posee EDTA. EDTA es un conocido anticoagulante debido a su capacidad de quelar el calcio, con lo cual la única fuente de Ca^{2+} disponible para la contracción es el calcio del retículo sarcoplásmico, además, la posible inhibición de $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, enzima encargada de ingresar calcio hacia al interior del retículo, incrementaría el calcio citoplásmico disponible para la contracción. Por otro lado se observó

que 14-DAP no fue capaz de inhibir éste tipo de contracciones. Al contrario fenilbutazona disminuyó la respuesta contráctil de prostaglandina $F_{2\alpha}$ y ortovanadato de sodio de manera dosis dependiente porque es un inhibidor de ciclooxigenasa y por lo tanto disminuye la síntesis de prostaglandina. Inhibidores de la síntesis de eicosanoides como, fenidona, diclofenaco sódico y ácido etacrínico reducen la respuesta contráctil inducida por oxitocina y prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Pérez y col, 1991). Por otro lado indometacina independientemente de inhibir la síntesis de eicosanoides, reduce la entrada de calcio extracelular y/o la liberación de calcio intracelular (Cantabrana y col, 1991). Isoproterenol también inhibió la respuesta contráctil de oxitocina en forma categórica y vía dosis dependiente por ser un p-adrenérgico no selectivo los cuales producen relajación de la musculatura lisa uterina, por un aumento de AMP_C (Marshall y Fain, 1984).

Fernández y col, (1992) utilizaron isoproterenol para relajar contracciones tónicas de útero de rata contraído con oxitocina y vanadato, produciéndose relajación en ambos casos. Presumiblemente por estimulación del reingreso de calcio al retículo sarcoplásmico. También utilizaron indometacina (inhibidor de ciclooxigenasa) la cual produjo relajación pero sólo en la contracción inducida por oxitocina lo cual sugiere un mecanismo diferente para ambos mediadores.

En base a todo lo señalado anteriormente se puede concluir que el efecto relajante que produce 14-DAP en la musculatura lisa uterina se debe a un bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje, porque fue capaz de inhibir selectivamente contracciones en útero depolarizado y contraído con calcio. Por otra parte se descarta un efecto inhibitorio sobre útero contraído a través de mecanismos independientes de calcio extracelular, porque 14-DAP no tuvo ningún efecto miorelajante sobre contracciones inducidas por oxitocina, ortovanadato de sodio y prostaglandina $F_{2\alpha}$ en medio libre de calcio externo.

7. CONCLUSIONES

14-Deoxiandrografolido produce un efecto relajante de la musculatura lisa uterina de rata.

14-Deoxiandrografolido bloquea canales de calcio tipo-L dependientes de voltaje, inhibiendo el ingreso de calcio del medio extracelular hacia el interior de la célula.

14-Deoxiandrografolido no produce inhibición de las contracciones inducidas por oxitocina, ortovanadato de sodio y prostaglandina $F_{2\alpha}$ ya que ellas son producidas por mecanismos independientes de calcio extracelular.

Lo anterior indicaría que estamos en presencia de un posible nuevo bloqueador de canales de calcio perteneciente a un grupo químico distinto a los ya conocidos y que podría servir como molécula base para la síntesis de nuevos fármacos.

8. BIBLIOGRAFIA

AKERMAN, K.E.O., K.F. WIRKSTROM. 1979. $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ - stimulated ATPase of rabbit myometrial plasma membrane is blocked by oxytocin. *FEBS. Lett.* 97: 283-287.

ALAGESABOOPATHI, C., S. BALU. 1995. Andrographolide content of some therapeutically important species of *Andrographis* wall. *Crop-res.-Hisar.* 10: 353-355.

ASHOORI, F., A. TAKAI, T. TOMITA. 1985. The response of non pregnant rat myometrium to oxytocin in Ca^{2+} -free solution. *Br. J. Pharmac.* 84: 175-183.

BALMAIN, A., J.D. CONNOLLY. 1973. Minor diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata* Nees. *J. Chetn. Soc.* I: 1247-51

BATRA, S., 1987. Increase by oestrogen of calcium entry and calcium channel density in uterine smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 92: 389-392.

BERRIDGE, M. 1993a. Fármacos usados en el tratamiento de la isquemia miocárdica. En: Goodman y Gilman., Las bases farmacológicas de la terapéutica 1996. 9ª ed. Mc.Graw-Hill Interamericana. Ciudad de México.

BERRIDGE, M.J. 1993b. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361: 553-575.

BLACK, B.L., J.M. McDONALD, L. JARETT. 1980. Characterization of Mg^{2+} and $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase activity in adipocyte endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 92-102.

BOND, G.H., P.M. HUDGINS. 1980. Inhibition of red cell Ca^{2+} -ATPase by Vanadate. *Biochem. Biophys. Acta.* 600: 781-90.

BURGOS, R., M. IMILAN, N. SANCHEZ, J. HANCKE. 2000. *Andrographis paniculata* (Nees) selectively blocks voltage-operated calcium channels in rat vas deferens. *J. of Ethnopharmacology.* 71: 115-121.

BURGOS, R., M.J. AGUILA, E.T. SANTIESTEBAN, N.S. SANCHEZ, J.HANCKE. 2001. *Andrographis paniculata* (Nees) induces relaxation of Uterus by blocking voltage operated calcium channels and inhibits Ca^{2+} influx. *Phytotherapy Res.* 14: 1-5.

CANTABRANA, B., A. FERNANDEZ, A. BAAMONDE, F. ANDRES-TRELLES, A. HIDALGO. 1991. Effects of some inhibitors of arachidonic acid metabolism in rat uterus in vitro. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol* 13: 187-192.

CANTLEY, L.C., L. JOSEPHSON, R. WAGNER, M. YANAGISAWA, C. LECHENE, G. GUIDOTTI. 1977. Vanadate is potent ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol Chem.* 252: 7421-7423.

CARSTEN, M.E., J.D. MILLER. 1977. Effects of prostaglandin and oxytocin on calcium release from a uterine microsomal fraction. *J. Biol. Chem.* 252: 1576-1581.

CHANG, H.M., P.P.H. BUT. 1987. Pharmacology and applications of chinese materia medica. Vol II. World Scientific Publishers. Oxford.

CHOU DHURY, 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.* 6:481-485.

DELICONSTANTINOS, G., S. FOTIOU. 1986. Effect of prostaglandins E_2 and $\text{F}_{2\alpha}$ on membrane calcium binding, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and membrane fluidity in rat myometrial plasma membranes. *J. Endroc.* 110: 395-404.

DENG, W.L., R.J. NIE, J.Y. LIU. 1982. Comparison of pharmacological effect of four andrographolides. *Chem. Pharm. Bull.* 17: 195-8.

ECKENHOFF, R., D. LONGNECKER. 1996. Gases terapéuticos. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 1996. 9ª ed, Mc.Graw-Hill Interamericana. Ciudad de México.

FERNANDEZ, A.I., B. CANTABRANA, A. HIDALGO. 1992. Mediators involved in the rat uterus contraction in calcium-free solution. *Gen. Pharmac.* 23: 291-296.

FLOREZ, J. 1997. Acciones de los fármacos II. Mecanismos moleculares. En: Flórez, J. Farmacología Humana. 3 ed. Masson. Barcelona.

GANONG, W. 1993. Tejido excitable: Músculo. En: Fisiología Médica 14ª ed. El manual moderno. Ciudad de México.

GARRAHAM, P.J. 1986. Inhibitors of the Ca^{2+} pump, In the Ca^{2+} Pump of plasma membranes (Edited by Rega A.F. and Garrahan P. Ja.), pp. 153-164, CRC. Press. Boca Ratón, Florida.

GRAVES, C., 1996. Fármacos que contraen o relajan el útero. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 1996. 9ª ed. Me Graw-Hill interamericana. Ciudad de México.

GUPTA, V., V.K. SRIVASTAVA. 1994. Kalmegh a valuatate NTFP for N.W. *Indian Forest products.* 1-2: 76-78.

GUYTON, A.C., J.E. HALL. 1997. Contracción y Excitación del músculo liso. En: A.C. Guyton and J.E.Hall (Eds.), Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.México.

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: 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^{2+} influxes through voltaje - and receptor - operated Ca^{2+} channels in uterine smooth muscle. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 228: 439-445.

KAO, C.Y., 1987. Fármacos que contraen o relajan el útero. En: Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 1996. 9ª ed: Me. Graw-Hill interamericana. Ciudad de México.

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.* 49:158-229.

KUMAR, S., G. PRASAD. 1992. Efficacy of medicinal plant *Andrographis paniculata* extract on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. *Letters in Appl. Microbiol.* 15: 131-132.

LALANNE, C., C. MIRONNEAU, J. MIRONNEAU, J.P. SAVTNEAU. 1984. Contractions of rat uterine smooth muscle induced by acetylcholine and angiotensin II in Ca^{2+} free medium. *Br. J.Pharmac.* 81:317-326.

LOTERSZTAJN, S., J. HANOUNE, F. PECKER. 1981. A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. Dependence of an endogenous protein activator distinct from calmodulin. *J. Biol. Chem.* 256: 11209-11215.

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

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

MARSHALL, J.M., J.N. FAIN. 1984. Effects of forskolin and isoproterenol on cyclic AMP and tension in the myometrium. *Eur. J. Pharmacol.* 107: 25-34.

MATSADA, T., M. KUROYANAGI, S. SUGIYAMA, K. UMETARA, A. UENO, K. NISHIDA. 1994. Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Ness. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 1216-25.

MEHROTRA, R., RAWAT, D.K. KULSHRESHTLA, G.K. PATNAIK, 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.

MIRONNEAU, C., J. MIRONNEAU, J.P. SAVINEAU. 1984. Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a Ca^{2+} -free solution. *Br. J. Pharmacol.* 82: 735-743.

MISRA, R., N.L. PAL, P.Y. GURU, J.C. KATIYAR, V. SRIVASTAVA and J.S. TANDDON. 1992. Antimalarial activity of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against *Plasmodium berghei* N.K 65 in *Mastomys natalensis*. *Int. J. of Pharmacol.* 30: 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 Pharmaceut. J.* 6:21-24.

MORI, Y., T. NIIDOME, Y. FUJITA, M. MYNLIEFF, R.T. DIRKSEN, K.G. BEAM, N. IWABE, T. MIYATA, D. FURUTAMA, T. FURUICHI. 1995. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 707: 87-108.

MURRAY, C., A.D. HAVERKAMP, M. ORLEANS, S. BERGA, D. PETCH. 1992. Nifedipine for treatment of preterm labor: a historic prospective study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 52-56.

NECHAY, B., 1984. Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 501-524.

PEREZ, J.R., B. CANTABRANA, A. HIDALGO. 1991. Mechanisms involved in the effects of phenidone, diclofenac and ethacrynic acid in rat uterus in vitro. *Gen. Pharmacol.* 22: 435-441.

POPESCU, L.M., C. PANDY, O. NURU, E.C. TOESCU. 1984. Oxitocin and prostaglandins (E_2 and F_2) inhibit Ca^{2+} -extrusion pump of human pregnant myometrium. *Fed. Proc.* 43: 497-502.

POYSER, N.L., 1987. Effects of various factors on prostaglandin synthesis by the guinea-pig uterus. *J. Reprod Fert.* 81: 269-276.

PURI, A., R. SAXENA., R.P. SAXENA, K.C. SAXENA. 1993. Immunoestimulant 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: 813-834. Mc.Graw-Hill Interamericana. Ciudad de México.

- SAKAI, K., T. YAMAGUCHI, M. UCHIDA. 1981. Oxitocin-induced Ca^{2+} -free contraction of rat uterine smooth muscle: effects of divalent cations and drugs. *Archs. Int. Pharmacodyn.* 250: 40-54.
- SAKAI, K., K. HIGUCHI, T. YAMAGUCHI, M. UCHIDA. 1982. Oxitocin induced Ca^{2+} -free contraction of rat uterine smooth muscle with EGTA and drugs. *Gen. Pharmac.* 13: 393-399.
- SHUKLA, B., VISEN, P.K.S. PATNAIK, B.N. DHAWAN. 1990. Choloretic effects of andrographolide in rats guinea pigs. *Planta. Med.* 58: 146-149.
- SIMPSON, P.B., R. CHALLIS, S.R. NAHORSKI. 1995. Neuronal Ca^{2+} stores-activation and function. *Trends. Neurosci.* 18: 299-306.
- SOLOFF, M.S., P. SWEET. 1982. Oxytocin inhibition of $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J.Biol. Chem.* 257: 10687-10693.
- SUBRAMANIAN, A, P, PUSHPANGADAN, S. RAJASEKHARAN, P.G. LATHA. 1995. Anti-pyretic activity for TBR-002, a herbal formulation. *Ann. Sci. Of life.* 15: 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.
- THAMUKITKUL, V., S. THERAPONG, P. BOONROJ, W. EKPALAKORN, S. TAECHAIYA, T. ORN-CHOM-JAN, S. PRADIPASENA, S. HMSARD, 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, T., L.I. TSAI, R.J. SOLARO, A.O. GRASSI DE GENDE, A. SCHWARTZ. 1979. Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 356-61.
- 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. 1998. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by 14-deoxyandrographolide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25: 424-429.
- ZHANG, C.Y., B.K. TAN. 1999. Effects of 14-deoxyandrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide on nitric oxide production in cultured human endothelial cells. *Phytother Res.* 13: 157-159.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible el desarrollo de ésta tesis , en especial:

- Mis padres, ya que sin su esfuerzo y dedicación no hubiese podido finalizar ésta importante etapa de mi vida.
- Dr. Rafael Burgos, profesor patrocinante, por su constante apoyo, estímulo y sugerencias durante el desarrollo de éste trabajo.
- Dr. Frédérick Ahumada, director del Instituto, por sus consejos y sugerencias.
- Sra. Nury Sánchez, por la preparación de algunos materiales utilizados durante la parte práctica de ésta tesis.
- Sr. Sergio Miranda, por su ayuda computacional y durante el desarrollo de la parte práctica de ésta tesis.
- Sr. Luis Améstica, por su asesoría computacional.
- Sr. Darío Salazar, por su ayuda y consejos prácticos en el manejo de los animales.
- Srta. Juanita Vargas, por su excelente disposición y consejos estimulantes.
- Dr. Juan Hancke, por sugerencias y comentarios críticos sobre éste trabajo.
- Sr. Jorge Oyarce, por su ayuda durante la defensa de ésta tesis.