

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON
PROPIEDADES RELAJANTES SOBRE LA
MUSCULATURA LISA DEL ILEON DE COBAYO

in vitro

287419

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARTHA MENDEZ DURAN



IZTACALA MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

M.C. GUILLERMO AVILA ACEVEDO

Q.B.P. IRMA DELFIN ALCALA

Q. MARIANA MECKES FISCHER

BIOL. JOSE LUIS MUÑOZ LOPEZ

M.C. BEATRIZ VAZQUEZ CRUZ

El desarrollo experimental del estudio se llevó a cabo en la **Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales** del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con la asesoría de la Esp. Química *Mariana Meckes Fischer*

AGRADECIMIENTOS

Debo un amplio reconocimiento al personal de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), que en formas diversas expresaron su apoyo al tema de estudio desarrollado en esta tesis. En especial a los *Químicos Daniel Paz y Jacqueline Acosta* que colaboraron en este proyecto de manera cercana enseñándome la implementación de las pruebas biológicas y guiando constantemente mis observaciones experimentales.

A la *Dra. Rachel Mata* de la Facultad de Química (UNAM) que proporcionó los compuestos puros aislados de *Teloxys graveolens*

Honor a quien honor merece: A la Química *Mariana Meckes Fischer* por la motivación, apoyo, paciencia, comprensión y amistad que me brindó en el desarrollo del proyecto de investigación

A todas las personas que de manera directa o indirecta participaron en este pequeño trabajo **GRACIAS:**

Dedico este trabajo, fruto de un esfuerzo compartido con mi familia:

- A mis padres **María del Carmén Durán Ramírez y Fidel Méndez Alvarez** quienes me alentaron con cariño a lo largo de mi carrera, brindándome siempre su apoyo moral y económico. Mi deuda hacia ellos es infinita.
- A mis hermanos **Sergio y María de Jesús**, con mucho cariño por su aliento y el amor fraternal que nos une y muy especialmente a la **memoria** de mi hermano † **Héctor**.
- A mi esposo **Miguel Angel Jiménez Arias** con mi más profundo Amor y admiración por ser mi complemento. Por su comprensión y el apoyo sincero y sólido que me ha brindado para la realización del presente trabajo
- A mis hijos **Miguel Angel y Elizabeth Paola Jiménez Méndez** con Amor motivo de nuestra alegría y superación.
- A mis **sobrinas y sobrinos** por su apoyo y motivación
- A mis **amigas y compañeros** por todo lo que vivimos juntos y nunca olvidaremos
- A mis **maestros** que participaron en mi formación académica.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	
1.1 Papel fisiológico del calcio	5
1.2 Canales de calcio	6
1.3 Participación del calcio en el tejido muscular liso del intestino	7
1.4 Agentes bloqueadores del calcio	9
1.5 Antagonistas de calcio en plantas	
1.5.1 Revisión bibliográfica	9
1.5.2 Selección de las plantas (criterio etnobotánico)	17
1.6 Descripción de las plantas seleccionadas	19
JUSTIFICACION	24
OBJETIVOS	25
METODOLOGIA	
2.1 Material vegetal	26
2.2 Preparación de las muestras para pruebas biológicas	27
2.3 Modelo biológico	27
2.3.1 Efecto de los extractos metanólicos sobre la contracción del músculo liso intestinal inducida por despolarización con K^+	30
2.3.2 Curvas concentración-respuesta del calcio	31

RESULTADOS		33
DISCUSION		53
CONCLUSIONES		58
PROYECCIONES FUTURAS		61
BIBLIOGRAFIA		62
APENDICE		69
TABLAS		
<i>Tab 1</i>	Plantas seleccionadas para el estudio	18
<i>Tab 2</i>	CI ₅₀ de los extractos metanólicos sobre la respuesta contráctil inducida con K ⁺ (60mM) en el ileon de cobayo	36
<i>Tab 3</i>	Efecto antagonista sobre el calcio de <i>Teloxys graveolens</i> y de los flavonoides crisina y pinostrobinina	43
<i>Tab 4</i>	CI ₅₀ del extracto de <i>Teloxys graveolens</i> y sus flavonoides crisina y pinostrobinina en el ileon de cobayo	49
FIGURAS		
<i>Fig 1</i>	Efecto relajante de los extractos vegetales en el ileon de cobayo contraído con K ⁺	35
<i>Fig. 2</i>	Curva de relajación del extracto de <i>Teloxys graveolens</i>	38
<i>Fig 3 y 4</i>	Curvas de relajación de la crisina y pinostrobinina	39
<i>Fig 5</i>	Curvas concentración-respuesta de calcio	41
<i>Fig 6</i>	Efecto del extracto de <i>Teloxys graveolens</i> sobre la curva concentración respuesta del calcio.	44
<i>Fig 7</i>	Efecto de la crisina sobre la curva concentración-respuesta del calcio	45
<i>Fig. 8</i>	Efecto de la pinostrobinina sobre la curva concentración-respuesta del calcio	46
<i>Fig. 10, 11</i>	Reversibilidad del efecto de la crisina y pinostrobinina	51, 52

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la valoración de la actividad relajante *in vitro* de los extractos metanólicos de 13 plantas utilizadas en la medicina tradicional de México para tratar padecimientos gastrointestinales. Se demostró que los extractos metanólicos de *Brickellia paniculata*, *Ruta graveolens*, *Bocconia gracilis*, *Salvia cinnabarina*, *Piper sp.*, *Teloxys graveolens*, *Litsea glaucescens*, *Smallanthus macullatus* y *Archibaccharis androgyna* inhiben la respuesta contráctil inducida con K^+ en el íleon de cobayo *in vitro*. Asimismo, se valoró el efecto antagonista de calcio del extracto de *Teloxys graveolens* y de crisina (1) y pinostrobina (2), dos compuestos flavonoides contenidos en el extracto. La revisión bibliográfica de los antecedentes etnobotánicos reportadosa sobre estas plantas o especies cercanas en el género, permite establecer una correlación entre las propiedades curativas que la población atribuye a estas plantas y los efectos relajantes demostrados con sus extractos. Finalmente, se concluye que *Teloxys graveolens* y los flavonoides crisina y pinostrobina se comportan como antagonistas no-competitivos sobre el calcio, presentando la pinostrobina el mayor efecto

INTRODUCCION

Algunos compuestos clasificados como antagonistas de calcio tienen importante aplicación clínica en la terapia de la hipertensión, de las arritmias cardíacas o en la angina vasoespástica. Por sus efectos relajantes sobre el músculo liso intestinal han sido propuestos como antiespasmódicos (Samueli y col., 1984; Kachur y col., 1986). También se ha demostrado experimentalmente que estos fármacos tienen efecto analgésico (Saavedra y Paeile, 1990) y las observaciones realizadas con tejido aislado de íleon de cobayo señalan que algunos anestésicos locales bloquean la entrada de calcio al interior de la célula (Spedding y Berg, 1985).

El avance logrado en el conocimiento de los mecanismos que median la acción antagonista sobre el calcio y la posibilidad de contar con fármacos más selectivos (Murad, 1990), ha propiciado el interés por encontrar otros compuestos con estas propiedades y la herbolaria puede ser una fuente que proporcione nuevas moléculas activas.

Se refleja en la literatura científica la inquietud por impulsar el desarrollo de programas de rastreo farmacológico sobre extractos de plantas medicinales que pudieran ofrecer expectativas en la búsqueda de antagonistas de calcio y destacan los estudios realizados con varios preparados herbolarios de la medicina tradicional oriental. Los principios activos encontrados corresponden a estructuras químicas diversas y algunos compuestos han sido aislados de plantas que son

utilizadas para tratar problemas gastrointestinales, en especial la diarrea y los dolores abdominales; aunque otros, provienen de plantas usadas para la hipertensión y las arritmias cardíacas (Ichikawa y col., 1989).

Con relación a la búsqueda de compuestos antagonistas de calcio en plantas de la herbolaria medicinal mexicana, es importante señalar que hasta la fecha no se han llevado a cabo rastreos sistemáticos basados en estudios etnobotánicos para validar las propiedades atribuidas a las especies utilizadas en los padecimientos cardiovasculares. Por ello, se propuso llevar a cabo la valoración de probables propiedades bloqueadoras de calcio utilizando un grupo de plantas ya reportadas como espasmolíticas (Tortoriello y col., 1995)

De estas plantas fueron seleccionadas 13 especies que corresponden a géneros diferentes y cuyas propiedades se demostraron en un rastreo farmacológico previo sobre las 150 plantas representativas en la medicina tradicional maya de los Altos de Chiapas para resolver problemas gastrointestinales y de las vías respiratorias (Berlin y col., 1990, Tortoriello y col., 1995; Meckes y col., 1995). Los extractos metanólicos presentaban a una concentración fija de 250 µg/ml, potente actividad inhibidora del peristaltismo del ileon aislado de cobayo y estimulado eléctricamente (Tortoriello y col., 1995)

Por otra parte, el comportamiento calcio-antagonista que poseen algunos flavonoides ha sido motivo de estudios anteriores (Abdalla y Abu-Zarga, 1987, 1989; Capasso y col., 1991; Morales y col., 1994). *Teloxys graveolens* es una planta importante en la medicina tradicional de México y desde épocas precolombinas ha sido ampliamente utilizada para tratar diversos padecimientos gastrointestinales: dolor abdominal, diarrea, como antihelmíntico etc. De esta especie se han aislado flavonoides; entre ellos pinostrobin y crisina (Mata y col., 1987). Tomando en consideración que crisina es un compuesto ya reportado por sus propiedades antagonistas de calcio (Capasso y col., 1991), se propuso rastrear este efecto con pinostrobin.

El análisis de los resultados obtenidos sentó las bases para el fraccionamiento químico biodirigido de *Brickellia paniculata*.

* * * * *

ANTECEDENTES

1.1 Papel fisiológico del Ca^{2+}

El calcio es un elemento que se distribuye en el organismo de manera prioritaria en los huesos y en pequeñas concentraciones en el fluido extracelular, en la estructura y en el citoplasma de la célula. Es esencial para la integridad funcional de los nervios y de los músculos y juega un papel predominante como mensajero celular ya que participa en las reacciones biológicas relacionadas con la secreción de neurotransmisores, la activación de enzimas clave y en el complejo proceso de la contracción muscular.

Regula la tensión del músculo liso, siendo la contracción del tejido un proceso mediado por el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol y para ello, su contenido en el plasma se mantiene en un rango muy estrecho que se logra gracias a los mecanismos de control que se ejercen en los sitios de entrada del Ca^{2+} al sistema (intestino delgado) y de salida (riñón) y por medio de depósitos que se almacenan en el esqueleto para cubrir los requerimientos del sistema periférico.

A nivel celular, la concentración de Ca^{2+} también se regula controlando el intercambio de este ión entre el medio intracelular y el fluido extracelular (Haynes, 1990). El incremento del ion en el citosol tiene como propósito transmitir información desde el exterior al interior de la célula y el concepto del calcio como

señal- como un mediador celular- es adoptado ampliament en la actualidad. El calcio es la señal para regular la permeabilidad de la membrana, la salida de la glucosa del hígado, la activación del crecimiento y la división celular, también el proceso de la muerte de la célula.

La concentración de calcio en el plasma es 10,000 veces mayor que la correspondiente en el citosol. La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol de la célula del músculo liso es de aproximadamente $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ en el estado de reposo de la célula y durante la excitación aumenta hasta $1 \times 10^{-6} \text{ M}$. Este gradiente se establece por medio de bombas en la membrana y sitios de almacenamiento intracelular (mitocondrias, retículo sarcoplásmico). Agentes endógenos como la histamina, acetilcolina y serotonina entre otros, estimulan el influjo de calcio a través de los llamados "canales de calcio," que operan por receptores mientras que concentraciones elevadas de K^+ y la despolarización de la membrana celular por estímulos eléctricos, aumentan el influjo de calcio extracelular a través de los "canales voltaje-dependientes".

1.2 Canales de calcio

Los canales iónicos son poros formados por macromoléculas que se encuentran en las membranas celulares. Los canales de calcio voltaje-dependientes pertenecen a una familia de proteínas que se clasifican en tres subtipos. L, N y T de acuerdo a la conductancia y sensibilidad al voltaje. En general sólo el tipo L es

sensible a la mayoría de los agentes antagonistas de Ca^{2+} en uso clínico. Los canales L son abundantes en el músculo cardíaco y músculo liso (Murad, 1990).

1.3 Participación del calcio en el tejido muscular liso

La contracción del tejido muscular liso es una respuesta al aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La célula modula esta concentración, regulando el influjo del calcio a través de los canales de calcio que se localizan en la superficie de la membrana plasmática. En el músculo liso hay canales de calcio que dependen del voltaje y canales de calcio que se activan al interactuar las drogas con el receptor. Los cambios que experimenta el potencial de voltaje en la superficie de la membrana plasmática alteran la concentración del calcio en el citosol del tejido muscular liso. En estado de reposo, el potencial de la membrana es de -40 a -70 mV, valor negativo respecto al potencial de voltaje en el espacio extracelular. Cuando este potencial se hace más positivo (despolarización) se abren los canales de calcio voltaje-dependientes. Así, la despolarización del tejido muscular liso con una solución alta en potasio (60 mM) aumenta la permeabilidad de la membrana al calcio, la concentración de este último se incrementa y la maquinaria contráctil se activa.

El incremento de la concentración del Ca^{2+} en el citosol puede, de manera secundaria, movilizar el calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico y en las mitocondrias (Bolton, 1979). Por otro lado, la unión de hormonas y de

neurohormonas a sus receptores (canales de calcio dependientes de los receptores) aumenta la permeabilidad de la membrana a los iones de Ca^{2+} y de Na^{2+} , se produce un cambio en el potencial de membrana y consecuentemente, se abren los canales de calcio. Sin embargo, la activación de estos canales dependientes de receptores ocurre vía una proteína G, misma que activa la fosfolipasa C de la membrana plasmática y forma 1,4,5 inositol trifosfato (InP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El InP_3 se une a su receptor en el retículo sarcoplásmico y libera del depósito al calcio almacenado (Berridge, 1987).

La liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares ocurre además por la acción del propio calcio en el citosol, corresponde al proceso denominado " Ca^{2+} -induce la salida de calcio" (Iino, 1989). Por otro lado, la disminución del contenido de calcio en los depósitos de almacenamiento intracelular, puede abrir una vía para volver a llenarlos a través del aumento del influjo de calcio desde el medio extracelular, proceso que se conoce como la "entrada capacitativa del calcio" (Putney, 1990).

El citoplasma es el compartimento en la célula donde se encuentran la mayoría de las enzimas sensibles al calcio y que son las encargadas de regular la interacción del calcio con las proteínas contráctiles. La unión del calcio con la calmodulina forma un complejo Ca^{2+} -calmodulina el cual activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina, produce la fosforilación de la serina en la cadena

ligera de la miosina, la que en su forma fosforilada activa a la ATPasa de la actina-miosina y el músculo se contrae.

1.4 Agentes bloqueadores del calcio

Los agentes bloqueadores de calcio son sustancias químicamente heterogéneas que interfieren con la disponibilidad del ión calcio intracelular, necesario para que se produzca el acoplamiento entre el estímulo y la contracción muscular. Inhiben la contracción del tejido bloqueando la entrada de calcio a través de la membrana plasmática, de la salida del calcio de los depósitos de almacenamiento intracelular o compitiendo con el calcio en la unión a las proteínas como la calmodulina (West, 1982). Todos los fármacos clasificados como "antagonistas del calcio" inhiben la contracción inducida con soluciones altas en K^+ . Si bien, la acción de estos agentes puede estar mediada por los diferentes mecanismos anteriormente señalados por West (Broekaert y Godfraind, 1979).

1.5 Antagonistas de calcio en plantas

1.5.1 Revisión bibliográfica

Los programas de rastreo de plantas medicinales de China y de Japón, y más recientemente, los estudios realizados en Alemania, (Ichikawa y col., 1986; Rauwald y Brehm, 1991, 1994), han dado por resultado la identificación de numerosas especies cuyos extractos íntegros presentan propiedades antagonistas de calcio. También se han aislado e identificado compuestos

bloqueadores de calcio que pertenecen al grupo de alcaloides tipo indólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides y terpenos.

La hirsutina (3) es un alcaloide indólico presente en algunas de las especies del género *Uncaria*. Estas plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional china para tratar la hipertensión. Se ha demostrado que hirsutina tiene efecto vasodilatador por un mecanismo asociado al bloqueo de los canales de calcio. Los estudios sobre el mecanismo de acción involucrado, presuponen que el bloqueo ocurre principalmente por inhibición del influjo del calcio a través de los canales voltaje-dependientes y que es de tipo competitivo (Yano y col., 1991).

De las raíces de una especie botánica de la herbolaria medicinal china que es utilizada para tratar afecciones de los bronquios y dolor del pecho se aisló praeruptorina A (4), una cumarina que tiene actividad relajante de la musculatura lisa intestinal del íleon de cobayo y que inhibe el influjo del calcio al interior de la célula (Kozawa y col., 1981).

En un programa de rastreo para evaluar la actividad farmacológica de algunos preparados de la medicina tradicional china se demostró que 17 extractos crudos presentaron actividad inhibitoria de la respuesta contráctil inducida con K^+ . Sólo algunas de estas plantas han sido utilizadas para tratar padecimientos cardiovasculares (Ichikawa y col., 1989). Conclusiones similares sobre el uso de

plantas no relacionadas con padecimientos cardiovasculares y que tienen propiedades antagonistas del calcio habían sido reportadas anteriormente por otros grupos de investigadores (Harmala, y col., 1991). El alcohol de patchouli (5), sesquiterpeno aislado de *Pogostemon cablin* tiene actividad antagonista del calcio. La planta es utilizada como un remedio para tratar dispepsia, vómitos y diarreas. Asimismo, de la fruta de *Prunus mume* que tiene uso terapéutico como antitusígeno, antidiarreico y para tratar el vómito, se obtuvo el compuesto 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (6) que tiene también actividad antagonista del calcio (Ichikawa y col., 1989). La actividad ha sido reportada también para osthol (7), una cumarina aislada de *Cnidii mannieri* que inhibe la contracción inducida por K^+ en preparaciones *in vitro* con aorta de rata (Harmala y col., 1991), para el alcaloide crichina (8) que relaja la aorta de la rata actuando a nivel de los canales de calcio voltaje-dependientes y canales que operan por receptores (Ko y col., 1993) y para un grupo de derivados de la papaverina (9), norarmepavina (10), reticulina (11) y coclaurina (12), compuestos con actividad antiespasmódica (Martín y col., 1993).

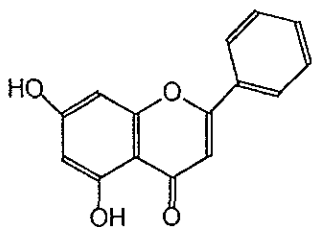
Hasta la fecha no se ha podido establecer una estrecha relación estructura-actividad entre los compuestos antagonistas de calcio identificados (Ichikawa, 1989). Sin embargo, existen reportes sobre la actividad antagonista de calcio de un grupo de lignanos y sobre la relación estructura molecular y los efectos antihipertensivos que presentan dichos compuestos. Los lignanos evaluados

farmacológicamente pertenecen a la clasificación de los compuestos bis-tetrahidrofuranos, butanólidos, ariltetrahidronaftalenos, tetrahidrofuranos y esteaganos. Los resultados en estos estudios demostraron que de 33 lignanos, 17 estructuras se caracterizaban por su potente efecto Ca-antagonista, siendo los butanólidos las estructuras que demostraron mayor potencia. De los compuestos mencionados, traqueologenina (13) presentó la mayor actividad. Es un lignano aislado de la fruta de *Arctium lappa*, tiene un importante efecto antihipertensivo y se asume que esta propiedad biológica está relacionada con un mecanismo de acción antagonista del calcio (Ichikawa y col., 1989).

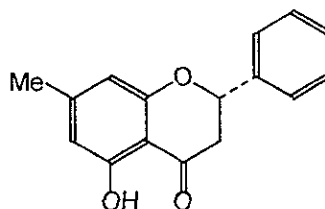
Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos de importante actividad biológica y se ha reportado la actividad antagonista de calcio en algunos de ellos. Cirsimaritina (14), una flavona aislada de *Artemisia judaica* y de *Teucrium polium*, plantas que son usadas para tratar padecimientos gastrointestinales, demostraron efecto inhibitorio de la contracción fásica y del tono en el íleon de cobayo, por un probable mecanismo de interferencia en el influjo del Ca^{2+} extracelular y/o en la liberación del ion de los depósitos intracelulares (Abdalla y Abu-Zarga, 1987) Se ha reportado que la flavona, crisina (1) y algunos flavonoles, entre ellos quercetina (15), inhiben la contracción del ileon estimulado eléctricamente y que el efecto espasmolítico se asocia probablemente con la interferencia en la disponibilidad del Ca^{2+} , más que con una acción inhibitoria de la ciclooxygenasa (Capasso y col., 1991; Morales y col.,

1994). Se ha reportado un estudio comparativo sobre el efecto antagonista del calcio que presenta quercetina en aorta e íleon de cobayo. En ambos tejidos, concentraciones bajas de quercetina producen una respuesta contráctil transitoria que se explica como la acción inhibitoria que ejerce el flavonoide sobre la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana plasmática y sobre la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ del retículo sarcoplásmico, produciendo consecuentemente un aumento transitorio del Ca^{2+} en el citosol y activando así la maquinaria contráctil. A concentraciones mayores, se comporta la quercetina como antagonista de calcio, impidiendo el influjo del Ca^{2+} al interior de la célula. El íleon resultó un tejido más sensible a la acción del flavonoide que la aorta (Morales y col., 1994). De lo anteriormente expuesto se desprende que una serie de compuestos de estructuras moleculares muy diversas poseen efecto antagonista de calcio y las plantas que contienen este tipo de compuestos, no siempre son utilizadas para tratar problemas cardiovasculares siendo frecuente el reporte del uso relacionado con disturbios gastrointestinales como la diarrea y el dolor abdominal.

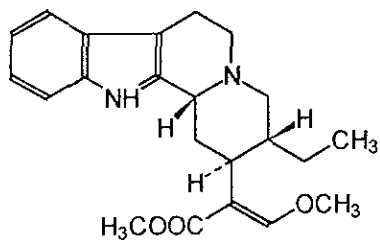
ESTRUCTURAS MOLECULARES



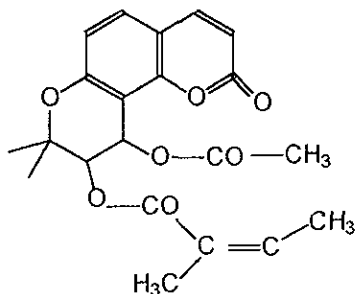
(1) Crisina



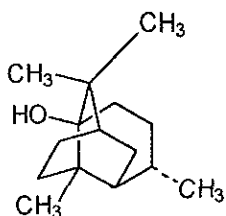
(2) Pinostrobin



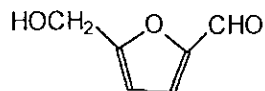
(3) Hirsutina



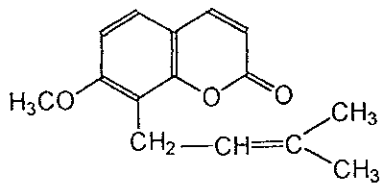
(4) Praeruptorina



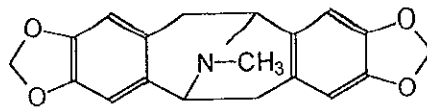
(5) Patchouli



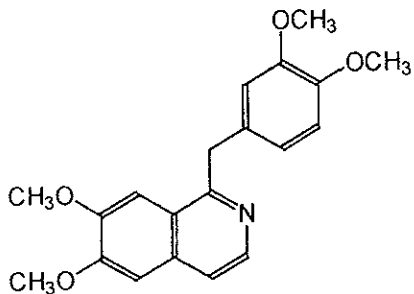
(6) 5-(hidroximetil)-2-furaldehido



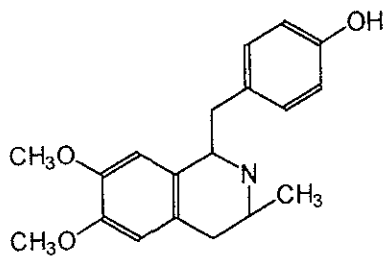
(7) Osthol



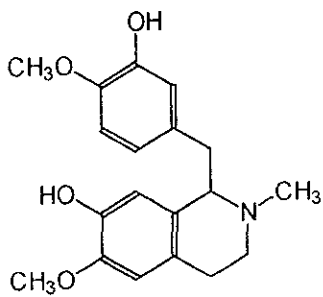
(8) Crichina



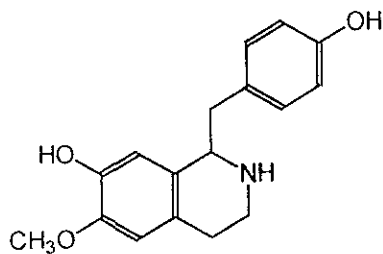
(9) Papaverina



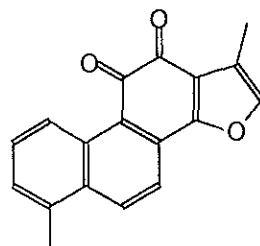
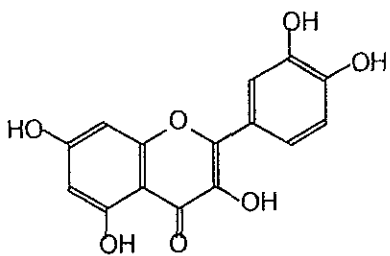
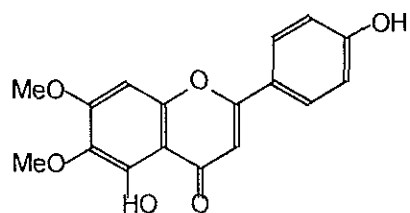
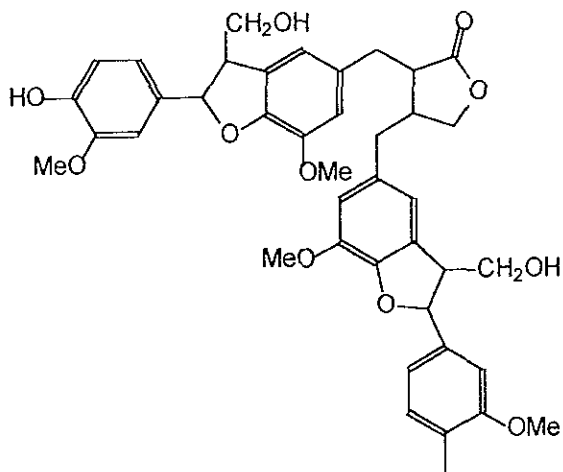
(10) Norarmepavina



(11) Reticulina



(12) Coclaurina



1 5.2 Selección de las plantas (criterio etnobotánico):

En México, la flora medicinal es extensa y se registran alrededor de 4,000 especies botánicas utilizadas con fines terapéuticos. Sin embargo, sólo un escaso número de ellas ha sido evaluado experimentalmente.

Para el presente estudio, la selección de las plantas se abordó tomando como base los resultados del proyecto sobre etnomedicina y herbolaria medicinal de las poblaciones tzeltal y tzotzil de Chiapas, iniciado en 1987 por el Programa de Colaboración Sobre Medicina Indígena Tradicional y Herbolaria (PROCOMITH, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste CIES, Edo. de Chiapas, México). El análisis de la información obtenida en este estudio, permitió seleccionar las especies relevantes en el tratamiento de problemas gastrointestinales, especialmente para tratar disentería y diarrea, así como de las vías respiratorias (Berlin y col., 1996; Berlin y Berlin, 1996). La evaluación experimental de los efectos de estas plantas en un rastreo preliminar condujo a la selección de las 13 especies incluidas en el presente estudio (Tabla 1).

Tabla 1

PLANTAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO

FAMILIA	ESPECIE BOTANICA	PARTE USADA	CODIGO*
Asteraceae	<i>Smalanthus maculatus</i> (k'ail, p'ilix)	hoja	226
Asteraceae	<i>Brickellia paniculata</i> (ch'ail pox)	hoja	935
Asteraceae	<i>Archibaccharis androgyna</i> (sakil tunisno té de monte)	tallo	1661
Chenopodiaceae	<i>Teloxys graveolens</i> (epazote del zorrillo)	hoja	11133
Fabaceae	<i>Acacia angustissima</i> (xaxib pukuji, zorra de caballo palo)	tallo	203
Fabaceae	<i>Calliandra portoricensis</i> (ch'ic'ni')	raíz	1023
Labiatae	<i>Salvia cinnabarina</i> (yaxal)	tallo	931
Lauraceae	<i>Litsea glaucescens</i> (tziltzil ujch', laurel)	hoja	1574
Papaveraceae	<i>Bocconia gracilis</i> (tzemen té)	hoja	965
Piperaceae	<i>Piper sp.</i>	hoja, tallo	223
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i> (lula, ruda)	hoja	1593
Solanaceae	<i>Brugmansia candida</i> (kampana jomol)	hoja	214
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> (ch'il te'vet, hierba dulce, cinco negritos)	corteza	912

* HERBARIO PROCOMITH

1.6 Descripción de las plantas seleccionadas (Berlin y Berlin, 1996)

Acacia angustissima: arbusto que pertenece a la familia Fabaceae. Al igual que en otros países, esta especie es utilizada en la medicina tradicional para tratar enfermedades gastrointestinales; especialmente la diarrea infecciosa, el dolor abdominal asociado a la gastroenteritis y el dolor estomacal. Los nombres populares más frecuentemente utilizados en la zona maya son *me'ja'te*, *árbol de xabib*, *árbol de zorra*, *xaax o bién*, *palo de pulque* y *coro-te* en Oaxaca.

Archibaccharis androgyna: especie de la familia Asteraceae, conocida en los Altos de Chiapas como *sakil turisno té*, *turisno womol*, *kaxlan turisno*, *turasnu womol*. Se usa la planta para tratar afecciones relacionadas con procesos inflamatorios.

Bocconia gracilis: especie de la familia Papaveraceae, se conoce como *tzem en té* y *tzajal* en lengua tzeltal y se reporta el uso del fruto y de las hojas para tratar la diarrea con sangre y el dolor de orina,

Brickellia paniculata : *ch'ail pox* y *tuxnuk' ch'o* son los nombres populares mayas que con mayor frecuencia se aplican a esta especie de la familia Asteraceae. Se usa la hoja para tratar el dolor de estómago y en ciertos casos para las torceduras.

Brugmansia candida es una especie difundida en la República y conocida ampliamente como *floripondio* y *florifundio*. En la región de los Altos de Chiapas, se la denomina *kampana jomol* y se usan la hoja y la flor para combatir la diarrea, tratar el abultamiento del estómago el edema.

Calliandra portoricensis: de la familia Fabaceae. Las especies *Calliandra* en general se denominan como *ch'ic'ni'* y el género es importante entre los mayas tzotzil y tzeltal para tratar problemas gastrointestinales, en especial la diarrea y los dolores abdominales También se usan estas plantas para problemas urinarios, infecciones de la boca y para combatir la tos.

Lantana camara: arbusto de la familia Verbenaceae que se propaga extensamente en los Altos de Chiapas. Se le conoce como *cinco negritos*, *ch'ili vet* y más comúnmente como *hierba dulce* y *orozuz* en muchas regiones del país. Las hojas y los frutos son referidos como *remedio para el tratamiento de las diarreas severas con sangre y moco*. Se le atribuyen también propiedades antitusígenas y febrífugas.

Litsea glaucescens De la familia Lauraceae, conocida entre los mayas de los Altos de Chiapas con los nombres *tzilzil ujch'* en lengua tzeltal y *tzis uch*, *tzij uch té* y *teiji uch* en lengua tzotzil. Esta planta es reportada para tratar el dolor de

orina, de cabeza, de estómago, y algunos síndromes de filiación cultural, principalmente para mal de ojo, frío y coraje.

Piper sp. Las especies ***Piper*** son recursos herbolarios muy difundidos en las prácticas médicas de muchos países. Los usos medicinales reportados para estas plantas son diversos, aunque destacan sus aplicaciones en el tratamiento de bronquitis, asma, inflamación, edema, reumatismo y para combatir el dolor y la fiebre. A ciertas especies se les atribuyen también *propiedades como abortivos y emenagogos (NAPRALERT)*.

Ruta graveolens Las especies ***R. chalepensis*** y ***R. graveolens*** son usadas con frecuencia en las medicinas tradicionales del mundo para tratar padecimientos diversos. Tienen uso como abortivo, emenagogo e inductor del parto. Son plantas que se emplean también ampliamente para aliviar los dolores de estómago, de la cabeza y para bajar la temperatura corporal. En los Altos de Chiapas, a esta especie se la denomina *lula* aunque *ruda* es el nombre popular más extendido en el país.

Salvia cinnabarina: Especie que pertenece a la familia Lamiaceae y al género de mayor relevancia en la medicina tradicional en los Altos de Chiapas. Esta planta es utilizada para tratar padecimientos *gastrointestinales*, la diarrea y el dolor de estómago. La información en los bancos de datos registra usos para

cólicos, calentura, escalofrío, colecistitis y dolor de corazón (IMSS-ETNODATA). En general, las especies *Salvia* se denominan *yaxal*.

Smallanthus maculatus: es un arbusto semiherbáceo, abundante en la zona. La planta es reconocida por sus propiedades medicinales y se usa en los Altos de Chiapas para tratar los dolores abdominales, las diarreas inespecíficas y para curar heridas. Los tzotziles le denominan *k'ail*, *p'ilix momol* en tanto que los tzeltales la llaman *k'in*. En algunas localidades, se le conoce también por *girasol* o *mirasol*.

Teloxys graveolens (Chenopodium graveolens): pertenece a la familia Chenopodiaceae; la especie es menos frecuente que *Chenopodium ambrosioides* en los Altos de Chiapas; sin embargo, es ampliamente utilizada en la medicina tradicional de México y su uso es consistente en toda la República: la refieren fundamentalmente para tratar padecimientos gastrointestinales, como vermífugo, antipirético y para aliviar los dolores de cabeza. El nombre popular más reconocido en el país es *epazote de zorrillo*.

La planta ha sido motivo de estudios químicos y farmacológicos recientes, buscando los principios activos responsables de la actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Velázquez C. Tesis de Maestría , 2000)

El efecto relajante observado con el extracto íntegro de *Teloxys graveolens* y el interés que representa el estudio relacionado con el mecanismo de acción de algunos flavonoides antagonistas del calcio, más recientemente el caso de la quercetina, llevó a evaluar las propiedades antagonistas del calcio de dos flavonoides aislados de esta planta (crísina y pinostrobina, compuestos obtenidos por la Dra. Mata, Fac. Química, UNAM).

JUSTIFICACION

Existe una constante búsqueda de agentes terapéuticos que tengan alta especificidad y menos efectos colaterales; las fuentes naturales son una alternativa para encontrar estas nuevas estructuras con actividad biológica. En este sentido, las plantas medicinales constituyen un recurso que está siendo contemplado con estos propósitos y para ello, es necesario considerar estrategias que permitan rastrear las especies que ameritan ser investigadas con el objeto de aislar los principios activos, como en este caso, plantas medicinales con propiedades relajantes sobre la musculatura lisa intestinal por mecanismos antagonistas sobre el calcio.

OBJETIVO

Evaluar el efecto relajante de los extractos metanólicos de 13 plantas medicinales sobre la musculatura lisa del íleon de cobayo en preparaciones *in vitro* y el probable efecto antagonista sobre Ca^{2+} de la crisina y de la pinostrobina, dos flavonoides aislados *Telexys graveolens*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1 Estandarizar los modelos biológicos para la evaluación del efecto relajante de las plantas en estudio sobre el íleon de cobayo en preparaciones *in vitro*.
- 2 Evaluar la inhibición que producen los extractos metanólicos sobre la contracción del íleon aislado inducida con K^{+} (60 mM)
3. Evaluar la inhibición que producen los flavonoides crisina y pinostrobina sobre la contracción del íleon aislado inducida con K^{+} (60 mM)
4. Determinar la potencia del efecto relajante de los extractos y flavonoides (CI_{50})
5. Hacer curvas concentración-respuesta al Ca^{2+} en el íleon aislado en preparaciones con y en ausencia de diferentes concentraciones de pinostrobina y crisina y determinar CE_{50} .
6. Seleccionar los extractos para posterior fraccionamiento químico biodirigido.

METODOLOGIA

2.1 Material vegetal

Las especies botánicas incluidas en el estudio (Tabla 1) fueron colectadas en los Altos de Chiapas, en la región sureste del país. La colecta del material y la identificación botánica de los ejemplares fue labor del Programa de Colaboración sobre Medicina Indígena Tradicional y Herbolaria (PROCOMITH) del Estado de Chiapas. Los ejemplares de colecta (donativo de PROCOMITH al Herbario IMSSM) se encuentran depositados en ambos herbarios.

Las plantas se secaron a temperatura ambiente expuestas a la corriente de aire y protegidas de la acción directa de la luz. Parte del material vegetal seco y molido de cada especie (10 g) fue sometido a extracción exhaustiva con metanol (5 x 200 ml) por maceración a temperatura ambiente y agitación continua. Los extractos obtenidos de una misma planta se mezclaron y se concentraron hasta un volumen aproximado de 100 ml, a presión reducida (40 °C y 337 milibares de presión)*. Se determinó el rendimiento de los extractos para cada planta, evaporando alícuotas (4 x 1 ml) hasta sequedad completa bajo corriente de nitrógeno y el valor promedio del peso de los sólidos (equivalente a 1 ml), se extrapoló con el del volumen total del extracto.

2.2 Preparación de las muestras para pruebas biológicas

Para la valoración de los efectos farmacológicos, alícuotas de los extractos libres del solvente orgánico (12.5 mg) se preservaron en viales sellados a temperatura de 4 °C, los cuales se redisolieron en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al momento del estudio.

2.3 Modelo biológico

Se utilizaron cobayos Hartley machos y hembras de 400 a 650 g los cuales se mantuvieron en ayuno previo de 18 horas con acceso libre al agua. Los animales se sacrificaron por golpe en la nuca y dislocación cervical y por disección se obtuvo la parte distal del íleon. El íleon se colocó en una caja Petri con solución Tyrode (I) a 37 °C, pH 7.4 y burbujeo continuo de 95%O₂-5% CO₂. La composición de la solución Tyrode fue la siguiente (en mM): NaCl 127; KCl 2.7; Ca₂Cl 1.8; NaH₂PO₄ 0.36; MgCl₂ 0.88; NaHCO₃ 12.0; glucosa 5.5. Luego de lavar cuidadosamente el lumen para extraer restos de materia fecal, se cortaron segmentos de 1.5 cm atando de manera independiente ambos extremos con hilo de seda (no.5/0). Los tejidos se dispusieron longitudinalmente en cámaras de vidrio verticales para tejidos aislados, con 10 ml del medio Tyrode (I) a temperatura de 37 °C manteniendo el burbujeo de O₂-CO₂ en forma continua. El hilo de uno de los extremos se enlazó a un transductor FTO3 acoplado al polígrafo previamente calibrado a una sensibilidad de 2 mV/cm, siendo el desplazamiento de la plumilla de 2 cm para la tensión de 1 g del tejido. Durante

todo el experimento los tejidos se mantuvieron a 1g de tensión (Apéndice). Las observaciones se realizaron de manera paralela en 5 segmentos (esquema 1).

* Rotavapor Buchi Re-140/EL-141 automático acoplado a una bomba Vacobox B-160 con control de vacío entre la presión atmosférica y 10 milibares.

**Los animales fueron donados por el Dpto. de Bioterios del Inst. Nac. de Higiene y por el Bioterio del Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (IMSS) y el cuidado y mantenimiento de los mismos estuvo a cargo del Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

*** Polígrafo multicanal Grass modelo 7D

Ver en APENDICE la preparación de las soluciones.

Esquema 1

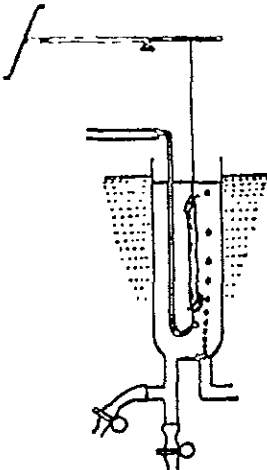
TRATAMIENTO DEL TEJIDO Y MONTAJE DE LA PREPARACION CON EL TEJIDO DE COBAYO AISLADO



a) Una vez identificada la unión ileocecal, se corta un segmento del ileon, descartando los primeros 10cm del tejido



b) se limpia el tejido perfundiendo intraluminalmente con solución Tyrode pH 7.4 a 37°C y burbujeo de 95% O₂ -5%CO₂



c) se coloca el segmento de ileon verticalmente en baño de tejido en solución Tyrode a 37°C y 95%O₂-5%CO₂, atados a un transductor FTO3 que se acopla al polígrafo multicanales Grass-7D

"figuras tomadas del libro" Pharmacological Experiments on Isolated Preparation", del Dpto. de Farmacología de la Universidad de Edimburgo, 2da.edición, 1970

2.3.1 Método para evaluar los extractos metanólicos sobre la contracción del músculo liso intestinal inducida por despolarización con K^+ .

Los tejidos se dejaron estabilizar en la solución Tyrode (I) durante 45 minutos cambiando la solución Tyrode cada 20 minutos. A continuación se sustituyó el medio en el baño por una solución despolarizante Tyrode (II) alta en potasio (60 mM K^+). La concentración elevada en K^+ se logró sustituyendo el NaCl por concentraciones equimolares de KCl para conservar la isotonicidad de la solución. Transcurridos 15 min. se lavaron los tejidos con solución Tyrode (I) y la operación se repitió otras dos veces, 15 min. antes de la última despolarización se adicionó una solución acuosa de atropina para inhibir la acetilcolina liberada por la manipulación del tejido (1×10^{-4} M como concentración final en el baño) seguido de la solución Tyrode con K^+ (II) en la que se mantuvieron los tejidos por espacio de 50-60 min. Se procedió al registro de la respuesta máxima de contracción midiendo el efecto (mm de tensión) al término de los 60 min, valor que se consideró como el 100 % de la respuesta tónica.

De manera secuencial se adicionaron cada 3 min, concentraciones acumulativas (5 μ l) del extracto vegetal disuelto en DMSO (12.5 μ g/ μ l), es decir 6.25 μ g por 1 ml del medio en el baño. En el estudio se hicieron curvas control con el disolvente (DMSO). La inhibición de la contracción para cada concentración del extracto aplicada fue calculada como valor porcentual respecto al efecto máximo

alcanzado con K^+ . Se expresaron los valores como la media \pm desviación estándar (DS) de 10 segmentos de tejido para cada punto y por regresión no lineal se calculó la concentración de los extractos que inhibieron el 50% de la respuesta máxima del tejido (CI_{50} $\mu\text{g/ml}$).

2.3.2 Curvas concentración-respuesta al Ca^{2+}

Para determinar la actividad del extracto íntegro de *Teloxys graveolens* y los flavonoides crisina y pinostrobinina sobre la contracción inducida con Ca^{2+} , las preparaciones de íleon de cobayo estabilizadas en Tyrode normal se incubaron en una solución Tyrode (III) libre de Ca^{2+} , tensando los tejidos a 1g. Se procedió a la despolarización del músculo liso con una solución Tyrode sin Ca^{2+} y alto en K^+ (60 mM) (IV), se adicionó al baño una alícuota de 100 μl de atropina (1×10^{-2} M) y de manera secuencial cada 3 min, concentraciones acumulativas de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0, 1, 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 y 30 mM) y el máximo de la respuesta contráctil se alcanzó con concentraciones de $CaCl_2 > 10$ mM. Luego de obtener los registros de las curvas controles se lavaron las preparaciones de íleon y restablecidas las condiciones iniciales se procedió a valorar el efecto con concentraciones variables de los extractos y de los compuestos puros (crisina y pinostrobinina) siguiendo el procedimiento arriba descrito. Las concentraciones del extracto de *Teloxys graveolens*, 5, 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$, de crisina, 5×10^{-6} , 1×10^{-5} y 2×10^{-5} M y de pinostrobinina 2×10^{-5} , 4×10^{-5} y 5×10^{-5} M se incubaron con el tejido 10 minutos antes de aplicar el $CaCl_2$

Para el estudio de cada una de las concentraciones aplicadas se utilizaron de manera paralela 5 tejidos, repitiendo la observación una segunda vez con segmentos de íleon de un nuevo animal. La contracción de los tejidos con cada concentración de CaCl_2 (media \pm ESM; $n=10$) se expresó como valor porcentual respecto a la respuesta de contracción máxima del tejido en la curva control (100%). Se determinó la concentración de CaCl_2 que produjo una respuesta contráctil igual al 50% del efecto máximo (CE_{50}) para cada curva dosis-respuesta, así como las concentraciones respectivas del extracto de *Teloxys graveolens*, crisina y pinostrobina, capaces de inhibir el 50% de la contracción máxima (CI_{50}).

La diferencia significativa entre los valores CE_{50} obtenidos en la curva control y con la adición del extracto de *Teloxys graveolens*, crisina y pinostrobina se determinó por medio de la prueba t-Student.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las plantas que fueron estudiadas en el presente trabajo. Las plantas pertenecen a diferentes familias botánicas y en las fichas de colecta, se encuentran incluidos los nombres populares en idioma maya que fueron aportados por los informantes tzeltal y tzotzil.

Con el objeto de definir el disolvente apropiado para solubilizar los extractos y los compuestos puros se hicieron estudios preliminares utilizando etanol y dimetilsulfóxido (DMSO). El volumen de etanol necesario para la disolución total de los productos resultaba notablemente más elevado que el de dimetilsulfóxido, aunque las curvas concentración-respuesta de calcio se comportaron de manera similar por lo que en el estudio se utilizó DMSO para disolver los productos vegetales. Después de lavar las preparaciones y recuperadas las condiciones iniciales, se repitió la curva control inicial sin agregar DMSO. El análisis comparativo entre las curvas indicó la diferencia entre los valores CE_{50} no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El valor CE_{50} de la curva control se tomó como referencia para analizar el desplazamiento de las curvas con la adición de los productos vegetales (datos no ilustrados).

En la figura 1 se ilustra el registro clásico de la respuesta contráctil del intestino aislado de cobayo de acuerdo al procedimiento diseñado para el presente estudio. En 1A se observa el registro de la contracción del tejido al

aplicar la solución 60 mM K⁺ (a) así como la respuesta contráctil máxima (100%) alcanzada después de 50-60 min. (b). El valor promedio de la respuesta máxima en el total de las preparaciones fue de 2.86 ± 0.38 g de tensión (n=114). El volumen de DMSO en el baño fue variable dependiendo de la solubilidad de los extractos vegetales (entre 0.4-1%); a estas concentraciones del vehículo no se observaron diferencias significativas con respecto a la contracción máxima inducida con K⁺ (p < 0.05).

En la figura 1B se ilustra la inhibición de la respuesta máxima que produce la adición de concentraciones acumulativas del extracto metanólico de *Teloxys graveolens* (c).

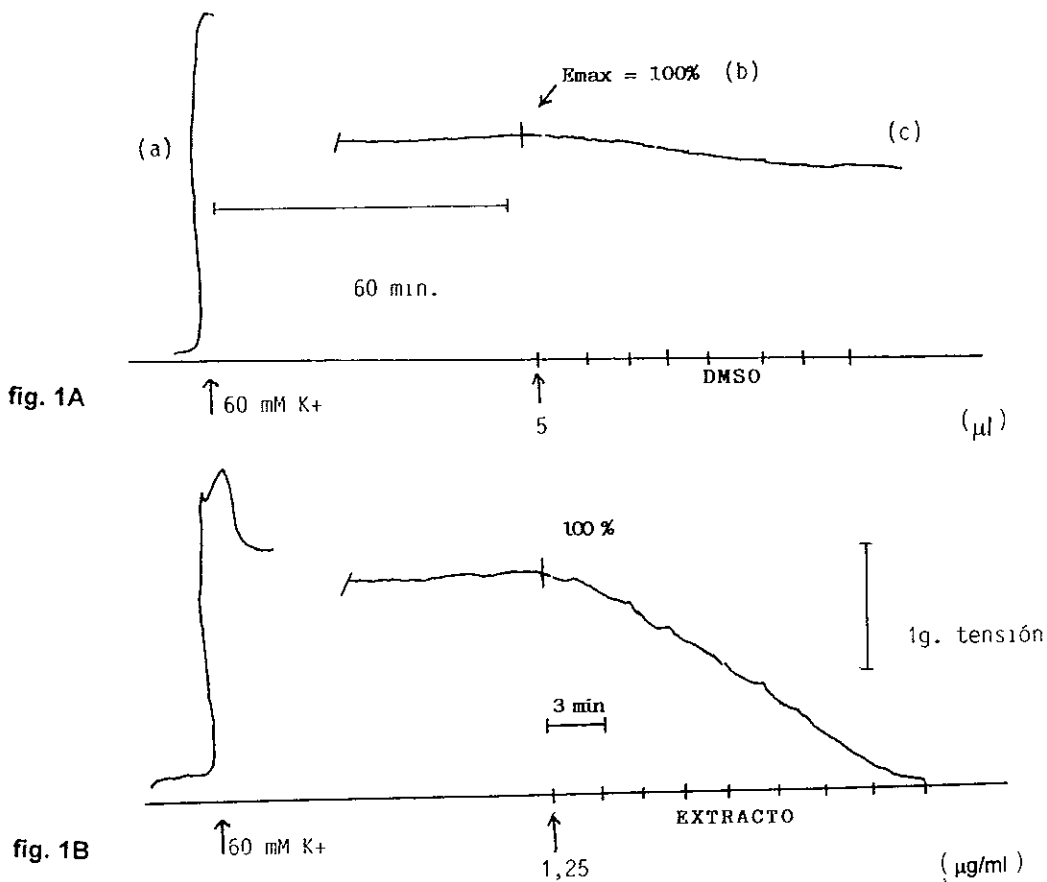


Fig. 1 Registro típico de la contracción del ileon aislado de cobayo, inducida con solución despolarizante de K⁺ (60 mM)

b) efecto máximo de la respuesta contráctil después de 50-60 min; c) acción sobre el efecto máximo por la adición acumulativa de DMSO (1A) y del extracto (1B)

Tabla 2

EXTRACTOS METANOLICOS, POTENTES INHIBIDORES DE LA RESPUESTA CONTRACTIL INDUCIDA CON K⁺ (60 mM) EN EL ILEON DE COBAYO in vitro

EXTRACTOS METANOLICOS	CI₅₀ (µg / ml)
<i>Brickellia paniculata</i>	11.82 ± 1.06
<i>Ruta graveolens</i>	12.84 ± 2.46
<i>Bocconia gracilis</i>	13.16 ± 1.38
<i>Salvia cinnabarina</i>	17.17 ± 3.35
<i>Piper sp.</i>	23.60 ± 3.21
<i>Teloxys graveolens</i>	29.71 ± 1.97
<i>Litsea glaucescens</i>	49.06 ± 5.96
<i>Smilax maculatus</i>	50.19 ± 2.98
<i>Archibaccharis androgyna</i>	53.03 ± 5.80

Se consideraron en la tabla los extractos de las plantas que produjeron valores CI₅₀ inferiores a 100 µg / ml. Los valores se presentan como promedio ± DS (n=10)

Los extractos metanólicos que inhibieron la contracción inducida con K^+ (60 mM) pertenecen a las especies ***Brickellia paniculata*** que resultó la más activa (11.82 $\mu\text{g/ml}$) y los de ***Ruta graveolens***, ***Bocconia gracilis***, ***Salvia cinnabarina***, ***Piper sp.***, ***Teloxys graveolens***, ***Litsea glaucescens***, ***Smallanthus maculatus*** y ***Archibaccharis androgyna***. En la tabla 2 se ilustran los valores CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) calculados para cada extracto. Este parámetro indica la concentración del producto vegetal que disminuyó la respuesta máxima del tejido en un 50% y que para las plantas arriba mencionadas mostraron valores entre 11.82 $\mu\text{g/ml}$ y 53.03 $\mu\text{g/ml}$. Los extractos íntegros de ***Acacia angustissima***, ***Calliandra portoricensis***, ***Brugmansia candida*** y ***Lantana camara*** produjeron inhibición de la contracción con valores $CI_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$.

El efecto de relajación producido con ***Teloxys graveolens*** y los compuestos puros crisina (1) y pinostrobinina (2) obtenidos de esta planta (Mata y col., 1987) se ilustran en las figuras 2-4. Para el extracto metanólico se calculó un valor $CI_{50} = 29.71 \pm 1.97 \mu\text{g/ml}$; para el flavonoide crisina $CI_{50} = 11.22 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ (44.14 μM) y para pinostrobinina $CI_{50} = 3.65 \pm 0.70 \mu\text{g/ml}$ (13.49 μM)

EFECTO RELAJANTE DEL EXTRACTO DE *TELOXYS GRAVEOLENS*

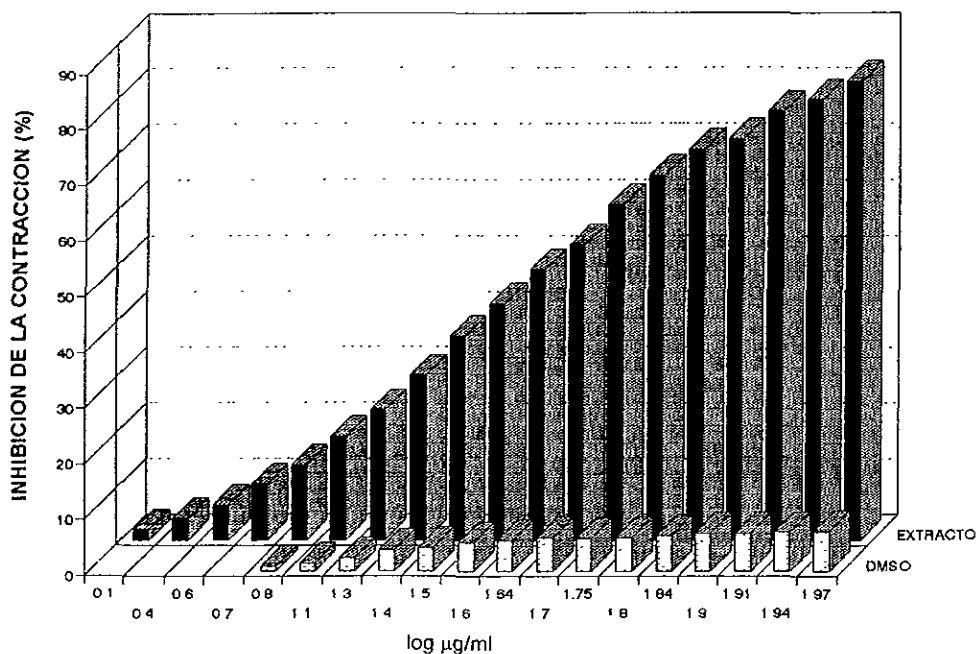


fig.2 Inhibición de la contracción máxima inducidaa con K^+ (60 mM) en el íleon aislado de cobayo.

Concentraciones acumulativas del extracto metanólico de *Teloxys graveolens* . Cada determinación es el promedio de n=10 con una desviación estándar > 10% respecto al promedio.

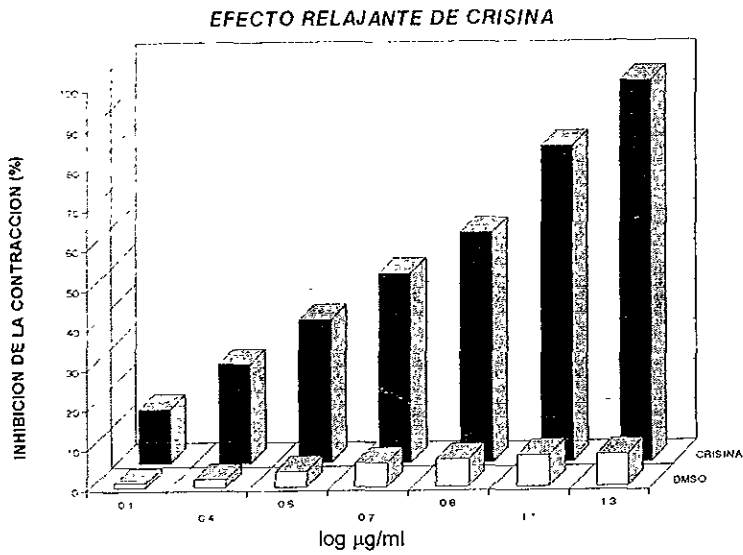


fig. 3

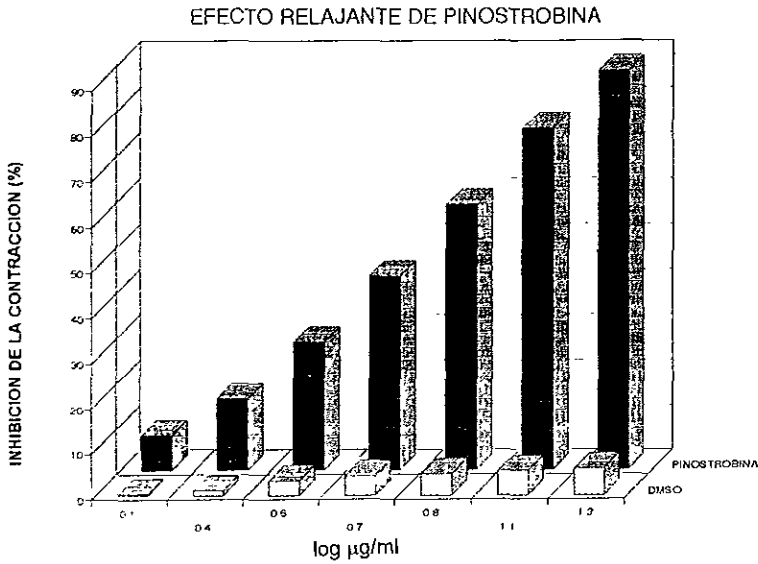


fig. 4.

Inhibición de la contracción máxima inducida con K^+ (60 mM) en el íleon de cobayo aislado con concentraciones acumulativas de crisina (fig. 3) y de pinostrobin (fig. 4).

En una siguiente serie de experimentos se valoró el comportamiento del extracto de *Teloxys graveolens* y de los flavonoides crisina y pinostrobina sobre las curvas concentración-respuesta del calcio. En cada caso, la eficacia del extracto y de los compuestos puros se determinó por medio de las curvas concentración-respuesta, comparando el efecto producido con las respectivas curvas control.

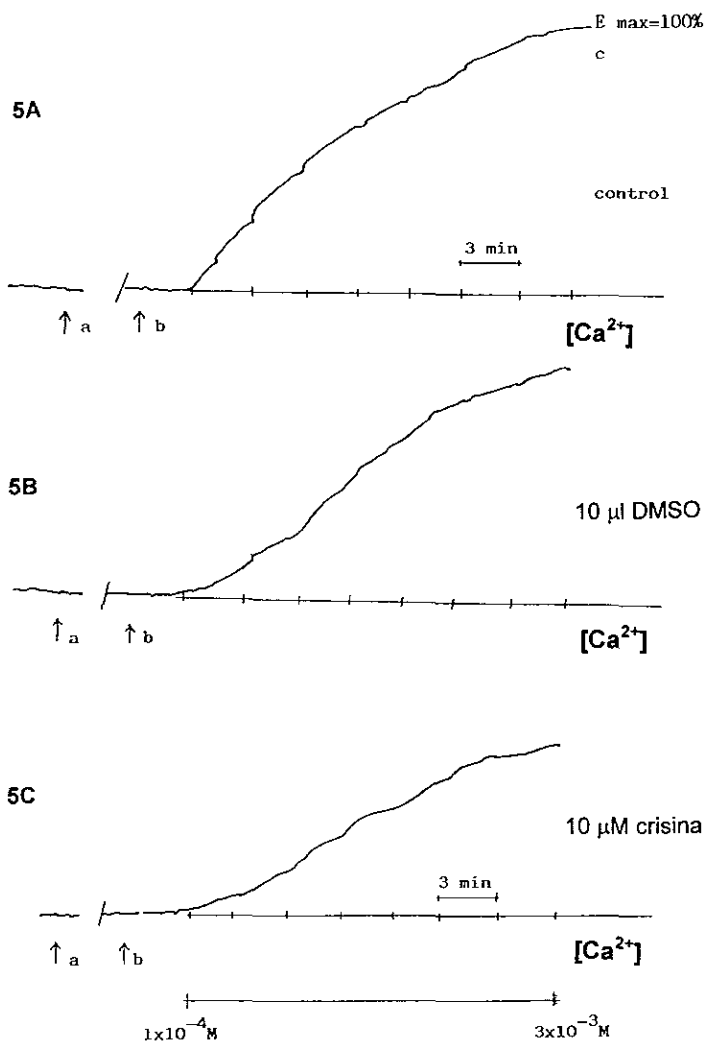


fig. 5 Curvas concentración-respuesta de calcio

a) despolarización del tejido con K⁺ (60 mM), sin Ca²⁺; b) adición acumulativa del CaCl₂; c) registro de la respuesta máxima de contracción (5A). Se ilustra como ejemplo la curva control (5A); con la adición de 10 µl de DMSO (5B) y con 10 µM de crisina (5C)

La figura 5A ilustra el registro típico para la obtención de las curvas concentración-respuesta de calcio en musculatura lisa intestinal de cobayo. Las preparaciones estabilizadas en el medio sin calcio se despolarizaron con una solución alta en K^+ (60 mM), libre del catión (a). Se adicionaron concentraciones acumulativas de $CaCl_2$ hasta alcanzar el máximo de la respuesta contráctil (b) y posteriormente se lavaron los tejidos dejando estabilizar las preparaciones hasta recuperar las condiciones iniciales. Se repitió el procedimiento anterior adicionando los volúmenes de DMSO, equivalentes al de las respectivas alícuotas del extracto o de los compuestos puros (curva control con DMSO, figura 5B).

En la figura 5C se ilustra el efecto producido por la adición de crisina .

Tabla 3

EFFECTO ANTAGONISTA SOBRE EL CALCIO DEL EXTRACTO DE *TELOXYS GRAVEOLENS* Y DE LOS FLAVONOIDES CRISINA Y PINOSTROBINA

PRODUCTO	CE ₅₀ (mM)	%E
<i>Teloxys graveolens</i> (extracto metanólico)		
Control	1.08±0.01	100
5.0 µg/ml	1.74±0.11	89.99± 3.77
10 µg/ml	5.54±0.74	62.15± 0.20
30 µg/ml	9.83±0.23	50.77± 2.04
Crisina		
Control	0.60±0.03	100
5 x 10 ⁻⁶ M	5.49±0.24	76.82±3.25
1 x 10 ⁻⁵ M	6.85±0.20	67.00±3.13
2 x 10 ⁻⁵ M	7.95±0.20	49.41±4.12
Pinostrobinina		
Control	0.76±0.06	100
2 x 10 ⁻⁵ M	11.38±0.46	69.00±2.34
4 x 10 ⁻⁵ M	15.85±0.79	66.84±2.44
5 x 10 ⁻⁵ M	19.25±0.88	36.40±1.93

La respuesta del tejido con la adición de concentraciones acumulativas de Ca²⁺, se expresó como valores porcentuales respecto a la contracción máxima del tejido registrada con Ca²⁺. Por regresión lineal se calculó la concentración efectiva del 50% (CE₅₀) para las curvas control y con las diferentes concentraciones del extracto y de los compuestos puros. Se reporta el % de la respuesta contráctil a las concentraciones de Ca²⁺ (3 x 10⁻² M) que produjeron la respuesta máxima en la curva control.

EFFECTO DEL EXTRACTO INTEGRADO DE *TELOXYS GRAVEOLENS* SOBRE LA CURVA CONCENTRACION - RESPUESTA DE Ca^{2+}

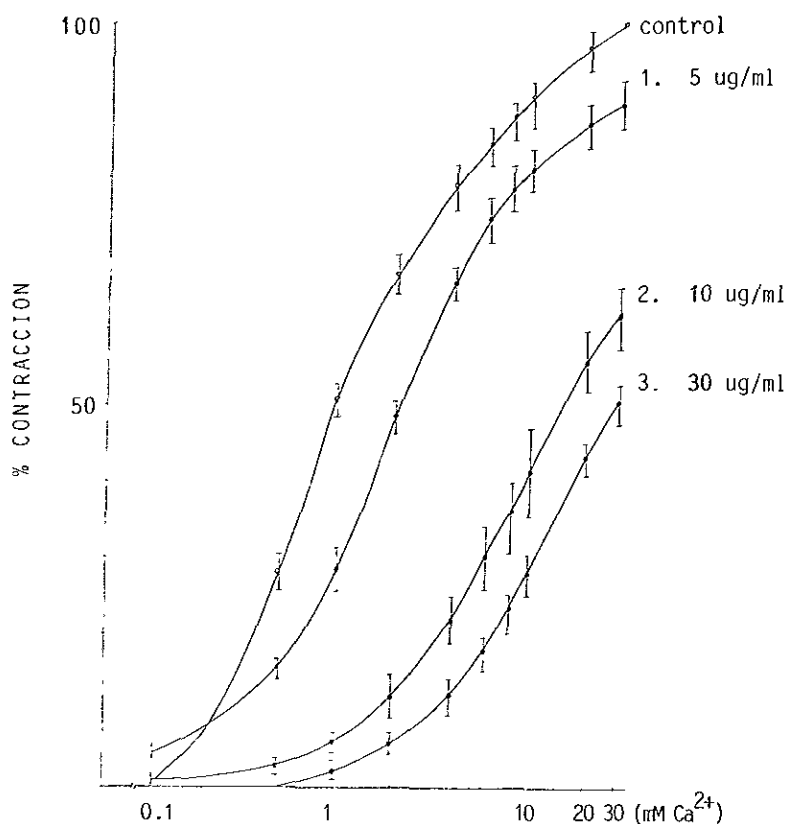


fig. 6

A los tejidos despolarizados con solución Tyrode libre de Ca^{2+} y K^+ (60 mM) se agregaron concentraciones acumulativas de Ca^{2+} . Las curvas se obtuvieron antes (○) y después (●) de adicionar el extracto a las concentraciones indicadas (1-3). La respuesta se expresó como % de la contracción máxima sin el extracto vegetal.

EFFECTO DE CRISINA SOBRE LA CURVA CONCENTRACION - RESPUESTA DE Ca^{2+}

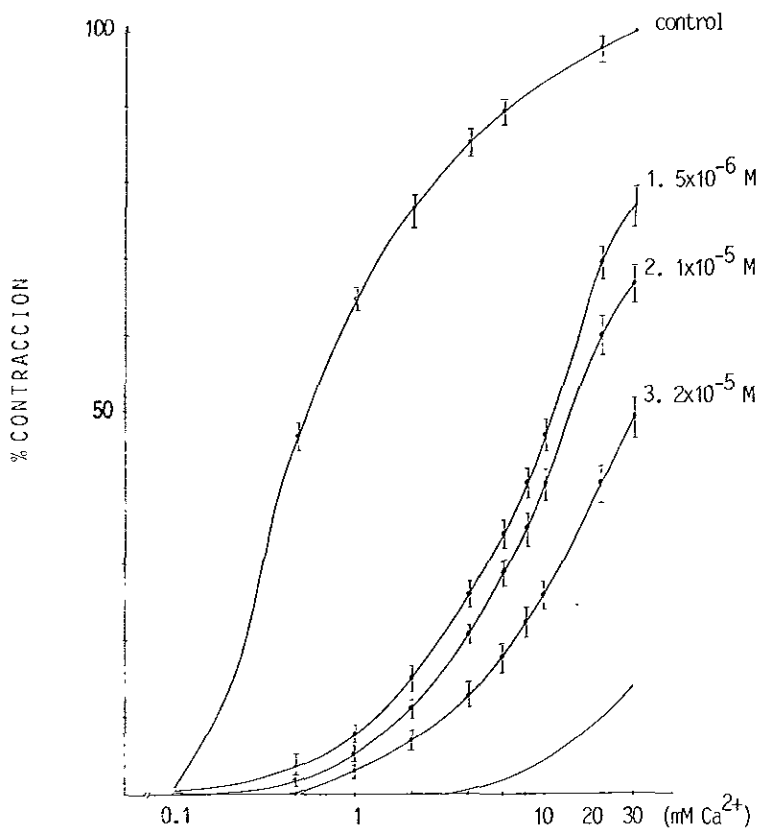


fig. 7

A los tejidos despolarizados con solución Tyrode libre de Ca^{2+} y K^+ (60 mM) se agregaron concentraciones acumulativas de Ca^{2+} . Las curvas se obtuvieron antes (○) y después (●) de adicionar crisina a las concentraciones indicadas (1-3). La respuesta se expresó como % de la contracción máxima sin el compuesto.

EFFECTO DE PINOSTROBINA SOBRE LA CURVA CONCENTRACION - RESPUESTA DE Ca^{2+}

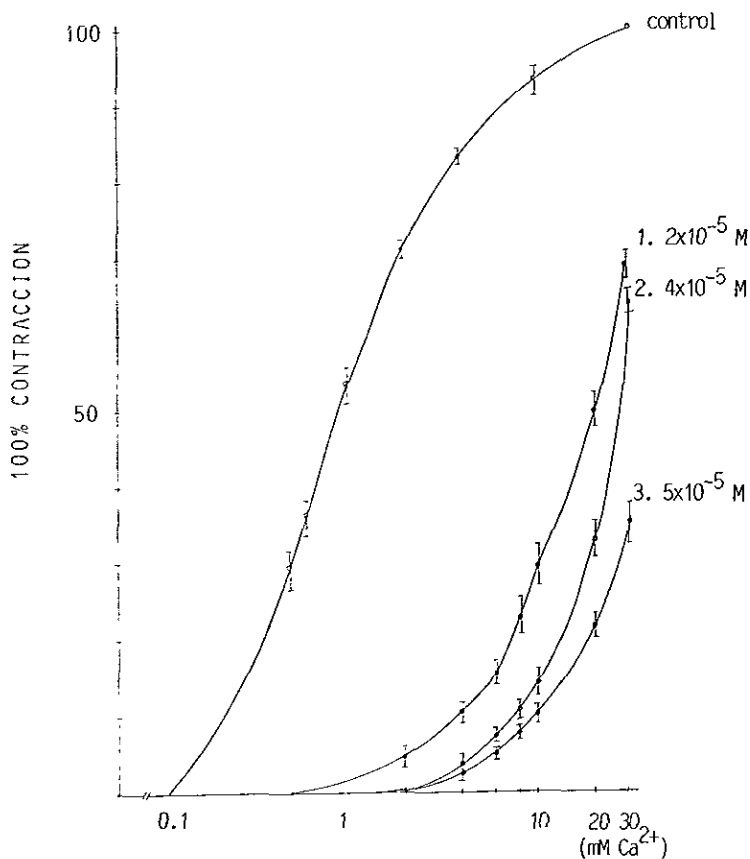


fig. 8

A los tejidos despolarizados con solución Tyrode libre de Ca^{2+} y K^+ (60 mM) se agregaron concentraciones acumulativas de Ca^{2+} . Las curvas se obtuvieron antes (○) y después (●) de adicionar pinostrobin a las concentraciones indicadas (1-3). La respuesta se expresó como % de la contracción máxima sin el compuesto.

Las figuras 6-8 muestran las curvas concentración-respuesta del intestino aislado de cobayo al calcio en presencia del extracto metanólico de *Teloxys graveolens*, crisina y pinostrobina respectivamente. El promedio de la respuesta máxima del total de los tejidos (a 30 mM de calcio) en los estudios fué de $5.31 \pm 0.97g$.

Las concentraciones variables del extracto íntegro *Teloxys graveolens* (5, 10 y 30 $\mu g/ml$) produjeron desplazamiento de las curvas hacia la derecha con valores $CE_{50} = 1.74 \pm 0.11$ mM; 5.54 ± 0.74 mM; y 9.83 ± 0.23 mM respectivamente. Se observó un decremento de la respuesta máxima dependiente de las concentraciones del extracto aplicadas igual a $89.99 \pm 3.77\%$; $62.15 \pm 0.20\%$; y $50.77 \pm 2.04\%$ (tabla 3). La concentración del extracto vegetal que produjo inhibición de la respuesta contráctil máxima en un 50% fué de 21.18 $\mu g/ml$ (CI_{50})

Como se ilustra en las figuras 7 y 8, las curvas concentración-respuesta de los compuestos puros se comportaron de manera similar al del extracto (fig 6), observándose desplazamiento de los valores CE_{50} , concentración-dependientes. Concentraciones variables de crisina (5×10^{-6} , 1×10^{-5} y 2×10^{-5} M) produjeron desplazamiento de las curvas con valores $CE_{50} = 5.49 \pm 0.24$ mM, 6.85 ± 0.20 mM y 7.95 ± 0.20 mM respectivamente. Por otra parte, se observó un decremento de la respuesta máxima dependiente de las concentraciones adicionadas del flavonoide ($76.82 \pm 3.25\%$, $67.00 \pm 6.25\%$ y $49.41 \pm 4.12\%$) y la concentración

del compuesto que inhibió la respuesta máxima en un 50% fue igual a $20.7\mu\text{M}$ ($5.28\mu\text{g/ml}$) con una concentración de 30mM de Ca^{+2} (fig.8, tabla 3).

En la fig.8 se muestran las curvas concentración-respuesta de calcio con la adición de concentraciones variables de pinostrobin ($2 \times 10^{-5}\text{ M}$; $4 \times 10^{-5}\text{ M}$ y $5 \times 10^{-5}\text{ M}$). A estas concentraciones del producto la respuesta máxima obtenida en la curva control se reduce a $69.00 \pm 2.34\%$, $66.84 \pm 2.44\%$ y $36.40 \pm 1.93\%$, siendo el desplazamiento del valor CE_{50} calculado para las curvas con pinostrobin igual a $11.38 \pm 0.46\text{ mM}$; $15.85 \pm 0.79\text{ mM}$ y $19.25 \pm 0.88\text{ mM}$ respectivamente. La adición del producto muestra por lo tanto un comportamiento de carácter no-competitivo ya que se produce un decremento de la respuesta máxima concentración-dependiente y la pendiente en la expresión matemática de Schild es diferente a la unidad (Arunlakshana, 1959).

Tabla 4

CONCENTRACION INHIBITORIA (CI_{50}) DEL EXTRACTO DE *TELOXYS GRAVEOLENS*, DE CRISINA Y DE PINOSTROBINA EN ILEON DE COBAYO.

PRODUCTO	TEJIDO DESPOLARIZADO CON K^+ (60 mM)	
	1.8 mM Ca^{2+} (contracción tónica)	30 mM Ca^{2+} *
	$\mu\text{g/ml}$	
Extracto de <i>T. graveolens</i>	29.71	21.18
<i>Crisina</i>	11.22	5.28
<i>Pinostrobina</i>	3.65	-

* concentraciones acumulativas de $CaCl_2$ de 0.1 a 30 mM

En la tabla 4 se muestran las concentraciones del extracto de *Teloxys graveolens* y de los flavonoides que inhiben la respuesta máxima contráctil de los tejidos en un 50%. Se observa que pinostrobina inhibe el efecto contráctil inducido con K^+ con una potencia mayor que la crisina siendo la relación entre los valores CI_{50} pinostrobina/crisina= 0.33

Las observaciones sobre la reversibilidad del efecto en los tejidos tratados con crisina y pinostrobina se ilustran en las figuras 9 y 10. La adición de 1×10^{-4} M de los compuestos a las preparaciones, reduce la capacidad de respuesta

contráctil de los tejidos en aproximadamente un 50 % cuando éstos han sido bloqueados con crisina y en 40 % en el caso de ser tratados con pinostrobin.

REVERSIBILIDAD DEL EFECTO POR ACCION DE
LA CRISINA SOBRE EL TEJIDO

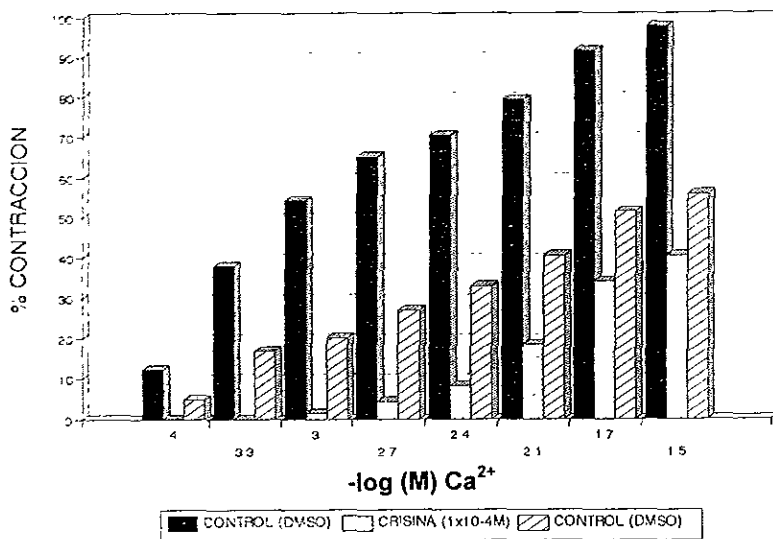


fig. 9

REVERSIBILIDAD DEL EFECTO POR ACCION DE
LA PINOSTROBINA SOBRE EL TEJIDO

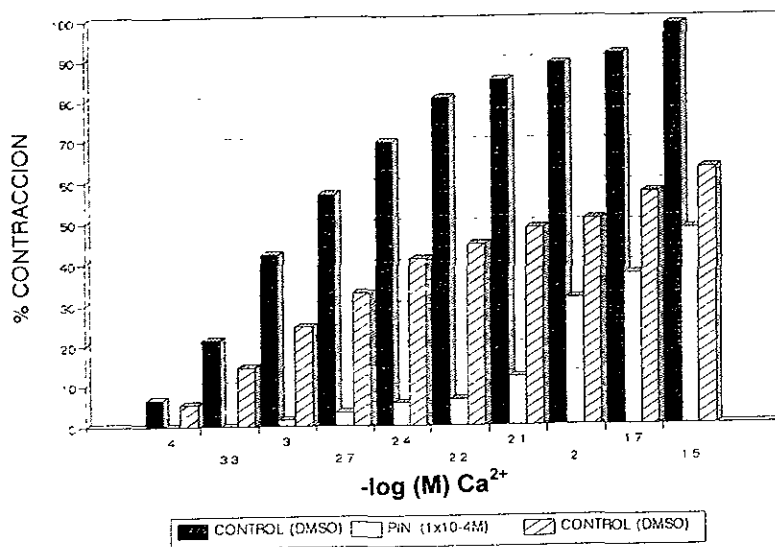


fig. 10

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que de los 13 extractos metanólicos evaluados, los de *Brickellia paniculata*, *Ruta graveolens*, *Bocconia gracilis*, *Salvia cinnabarina*, *Piper sp.*, *Teloxys graveolens*, *Litsea glaucescens*, *Smalanthus maculatus* y *Archibaccharis androgyna*, presentaron actividad inhibitoria de la contracción del ileon de cobayo *in vitro* inducida con K⁺ con valores de Cl₅₀<100 µg/ml. Las plantas son utilizadas en la medicina tradicional del país para tratar afecciones gastrointestinales.

La revisión sobre los antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de estas especies botánicas dan un cuadro general sobre algunos de los vegetales y permite en cierta medida sustentar los resultados encontrados.

Sobre la especie *Salvia cinnabarina* en particular, no se encontraron antecedentes reportados en la literatura científica; sin embargo, la revisión del género muestra que *S. officinalis*, *S. milthioriza* y *S. sclarea* han sido evaluadas como antihipertensivos; siendo la especie *S. milthioriza* uno de los fármacos importantes en China para tratar la hipertensión y la angina pectoris. También se ha demostrado la actividad antiisquémica y depresora del SNC que posee esta planta. Son numerosas las especies *Salvia* que se utilizan como antiespasmódicos, para tratar la diarrea y los dolores abdominales (Darias y col.,1989; Esquivel y col.,1989; Weniger y col.,1986) y se ha demostrado actividad

espasmolítica en extractos de *S. glutinosa*, *S. lanata*, *S. miltiorrhiza* y en el aceite esencial de *S. officinalis* (Bhakuni y col., 1969; Dhar y col., 1968; Lei y Chiou, 1986; Taddei y col., 1988).

Los estudios químicos sobre las diferentes especies de *Salvia* registrados en la literatura, muestran claramente la abundancia de compuestos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, siendo notable un grupo de diterpenos aislados de *S. miltiorrhiza* (tanshinonas) (16) con actividad antihipertensiva (Gao y col., 1979; Chen y col., 1979).

Los estudios fitoquímicos sobre el género *Piper* señalan que estas plantas contienen monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, lignanos y alcaloides. Entre los alcaloides cabe mencionar la presencia de piperina, alcaloide del tipo amida, alcaloides tipo isoquinolinas y piperolactamos. Son abundantes los reportes en la literatura científica sobre las actividades biológicas detectadas con los extractos crudos de estas plantas. Se ha demostrado actividad analgésica en *P. abutiloides*, *P. cincinnatoris* y *P. methysticum*, actividad hipotensora en las especies *P. aduncum*, *P. aurantiacum* y *P. betle*; depresora cardíaca en *P. aurantiacum* y espasmolítica en *P. amalago*, *P. autitum*, *P. betle*, *P. longum* y *P. nigrum*. El extracto etanólico de los frutos de *Piper nigrum* demostró en el ileon de cobayo, fuerte actividad espasmolítica (NAPRALERT).

Ruta graveolens es una especie medicinal muy conocida en las prácticas médicas populares del mundo y se usa con frecuencia en problemas relacionados con la reproducción. Se ha demostrado que el extracto integro presenta actividad antiinflamatoria (Mascolo y col., 1987) y que el extracto etanólico de las partes aéreas de ***R. chalepensis*** produce depresión del SNC e hipotermia (Mansour, 1990). El extracto de la raíz de ***R. graveolens*** demostró poseer efecto antagonista del calcio en pruebas *in vitro* utilizando anillos aórticos contraídos con K^+ (Rauwald y Brehm, 1994) y los estudios dirigidos a la evaluación de las propiedades farmacológicas de esta planta demostraron que los aceites esenciales y algunos de los alcaloides tienen actividad espasmolítica.

Las especies del género ***Ruta*** se caracterizan por su contenido en derivados alcaloides quinolínicos del tipo acridonas, flavonoides (rutina) y cumarinas (alloimperatorina). Tanto la rutina como algunos derivados de la imperatorina (Rauwald y Brehm 1991), son compuestos anteriormente citados por sus propiedades antagonistas del calcio.

La especie ***Litsea cubeba*** es utilizada en la medicina tradicional de China para tratar el vómito, la flatulencia y la diarrea. De la planta se aisló el alcaloide aporfirínico laurotetanina que en la musculatura lisa vascular *in vitro* expuesta a concentraciones elevadas de K^+ , inhibe el influjo del calcio extracelular actuando

como bloqueador de los canales de calcio voltaje-dependientes y los que operan por receptores (Chen y col., 1994).

El uso de *Litsea glaucescens* en México es variable; la planta es reportada para tratar la diarrea con moco y sangre entre la población tzotzil y tzeltal de Chiapas (banco de datos PROCOMITH) aunque en el Estado de Oaxaca, esta misma especie se usa para tratar la dismenorrea, infertilidad y para acelerar la recuperación postparto (Browner, 1985). Se ha demostrado efecto antiespasmódico con los extractos etanólicos de *L. glutinosa* y *L. monopetala*; sin embargo no hay datos relacionados con los efectos de la especie *L. glaucescens*.

De las partes aéreas de *Teloxys graveolens* se han aislado un grupo de sesquiterpenoides y de flavonoides, entre estos últimos crisina y pinostrobinina (Mata y col., 1987). Como se mencionó anteriormente, las propiedades espasmolíticas de crisina y pinostrobinina han sido vinculadas con los procesos de regulación del calcio intracelular (Capasso y col., 1991; Meckes y col., 1998).

Tanto el extracto crudo como los flavonoides aislados de la planta, produjeron desplazamiento hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta al Ca^{2+} , con decremento de la respuesta máxima de contracción del tejido. En esta serie de experimentos, la fuente de Ca^{2+} fue exclusivamente

extracelular; sin embargo el efecto observado no se puede atribuir de manera concluyente a la interferencia del influjo del Ca^{2+} al interior de la célula ya que podría existir la posibilidad de que estas sustancias actuaran también a niveles intracelulares y se concluyó que los flavonoides aislados de *Teloxys graveolens*, pinostrobina y crisina, inhiben la respuesta contráctil del tejido despolarizado con K^+ de acuerdo al comportamiento que tienen en las curvas concentración-respuesta de calcio, actúan como antagonistas no-competitivos del calcio. La comparación entre la potencia que muestran ambos compuestos, indica que pinostrobina reproduce el efecto a concentraciones cercanas a la tercera parte de las requeridas con crisina.

Para un grupo de las plantas estudiadas no se encontraron antecedentes en la literatura que permitan sustentar los efectos biológicos encontrados, entre ellas, las especies *Archibaccharis androgyna*, *Bocconia gracilis*, *Brickellia paniculata*, *Brugmansia candida* y *Smallanthus maculatus*. Cabe destacar que, con excepción del género *Brickellia*, el resto se caracteriza por la presencia en sus especies de compuestos nitrogenados: alcaloides tipo indólico (*Brugmansia*) e isoquinolínicos (*Bocconia*).

CONCLUSIONES

1. Un porcentaje elevado de los extractos de las plantas medicinales (69%) seleccionadas por sus propiedades antiespasmódicas reportadas en estudios previos, producen relajación de la musculatura lisa intestinal del cobayo, probablemente a través de mecanismos mediados por la acción del calcio. El rastreo de estas plantas, utilizadas en la medicina popular mexicana como "antidiarreicos" y para tratar síntomas relacionados con efectos espasmogénicos (cólicos, vómito, dolor de estómago, "empacho", etc.) puede servir como una fuente potencial para la búsqueda de compuestos antagonistas del calcio.

2. De las 13 plantas estudiadas, los extractos metanólicos de *Brickellia paniculata*, *Ruta graveolens*, *Bocconia gracilis* y *Salvia cinnabarina*, presentaron la mayor actividad relajante de la musculatura lisa intestinal en el íleon aislado de cobayo. Los extractos produjeron inhibición de la contracción tónica inducida con potasio (60 mM), siendo los valores de la concentración inhibitoria del 50 % (CI₅₀) igual a 11.82 ± 1.06 , 12.84 ± 2.46 , 13.16 ± 1.38 y 17.17 ± 3.35 µg/ml respectivamente.

3. Se reportan por primera vez las propiedades relajantes sobre la musculatura lisa intestinal que presentan especies de los géneros *Brickellia*, *Smilax* y *Archibaccharis*. Son plantas utilizadas en México, y en especial en las medicinas tradicionales de las etnias mayas de Chiapas, para tratar dolor abdominal y

diarreas inespecíficas. *Smilax* y *Archibaccharis* presentaron un efecto inhibitor de la contracción inducida con K^+ (60 mM), con menor potencia que el de los extractos arriba mencionados, siendo los valores CI_{50} de 50.19 ± 2.98 y 53.03 ± 5.80 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

4. Por la potencia que muestra el extracto metanólico de *Brickellia paniculata*, esta especie resulta interesante para someterla a estudios futuros, encaminados al fraccionamiento químico biodirigido, al aislamiento del o de los principios activos responsables de la acción antagonista del calcio y a la valoración farmacológica del efecto.

5. El efecto relajante observado con el extracto íntegro de *Teloxys graveolens* fue moderado en comparación al de *Brickellia paniculata* (CI_{50} 29.71 ± 1.97 $\mu\text{g/ml}$). Esta especie constituye una de las plantas medicinales indígenas de México y su uso para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales ha sido persistente desde épocas precolombinas. Los resultados encontrados en el presente estudio permiten sustentar en cierta medida el difundido uso de esta planta para combatir el dolor de estómago y para detener la diarrea.

6. Se demuestra que la acción bloqueadora del calcio que presenta el extracto metanólico de *Teloxys graveolens* se debe en parte a la presencia de los flavonoides crisina y pinostrobin. Estos compuestos actúan como agentes

antagonistas sobre el calcio aunque su efecto es de carácter no-competitivo.

Pinostrobina actúa con una potencia tres veces superior a la de crisina.

PROYECCIONES FUTURAS DEL TRABAJO

El ileon de cobayo aislado ha sido ampliamente utilizado en el estudio de bloqueadores de calcio en musculatura lisa intestinal; sin embargo los productos estudiados podrían actuar de manera más específica en otros tejidos; entre ellos, los del sistema cardiovascular. Como siguiente fase, se encuentran en proceso los estudios sobre los efectos de algunas de las plantas seleccionadas en aorta de rata y los mecanismos de acción involucrados en la actividad relajante.

.

BIBLIOGRAFIA

Abdalla S., M. Abu-Zarga. (1987). Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from Artemisia judaica, on isolated guinea-pig ileum. Planta Med. 322: 324.

Abdalla S., M. Abu-Zarga, F. Afifi, S. Al-Khalil, A. Mahasneh., S. Sabri. (1989). Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. J. Pharm. Pharmacol. 41: 138-141.

Arunlakshana O., P. Schild. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. Br. J. Pharmacol. 14: 48-58.

Berlin B. (1990). La Herbolaria Médica Tzeltal-Tzotzil en los Altos de Chiapas Volumen I. Serie Nuestros Pueblos (Gbn. Edo de Chiapas, Consejo Estatal de Fomento a la Investigación y Difusión de la Cultura DIF-Chiapas/ Ins.Chiapaneco de Cultura. Chiapas, México.

Berlin B., E. Berlin, M. Meckes, X. Lozoya, M.L. Villarreal, J. Tortoriello. (1996). The Scientific Bases of Gastrointestinal Herbal Medicine Among the Highland Maya of Chiapas, Mexico In: Naked Science Anthropological Inquiry into Boundaries, Power and Knowledge. (Ed) Laura Nader. Routledge, pp.43-68

Berlin E., B. Berlin. (1996). Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico. The Gastrointestinal Diseases. Princeton Academic Press, USA.

Berridge M.J., R.M.C. Dawson, C.P. Downes, J.P. Heslop, R.F. Irvine (1983). Changes in the leaves of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. Biochem. J. 212: 473-482

Bhakuni D.S., M.L. Dhar, M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehrotra. (1969). Screening of Indian plants for biological activity. Part II Indian J. Exp. Biol. 7: 250-262.

Bolton T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and substances on smooth muscle. Physiol. Rev. 59: 606-718.

Broekaert A., T. Godfraind (1979). A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and papaverine on the noradrenaline and calcium-evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. Eur. J. Pharm. 53: 281-288.

Browner C.H. (1985). Plants used for reproductive health in Oaxaca, Mexico. Econ Bot. 39 482-504.

Capasso A., A. Pinto, R. Sorretino., F. Capasso. (1991). Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea-pig isolated ileum. J. Ethnopharmacol. 34: 279-281.

*Chen W.Y., F.N. Ko, Y.C. Wu, S.T. Lu, Ch.M. Teng. (1994). Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. J. Pharm. Pharmacol. 46: 380-382.*

Chen W., Y. Dong, Ch. Wang, G. Ting. (1979). Pharmacological studies of sodium transhinone II-A sulphonate. Acta Pharm. Sin 14:277.

Darias V., L. Bravo, R. Rabanal, M.C. Sánchez, R.M. González, A.M. Hernández-Pérez. (1989) New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. J. Ethnopharmacol. 25:77-92.

Dhar A.L., M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehrotra, C. Ray. (1968) Screening of Indian plants for biological activity. Part. I. Indian J. Exp. Biol. 6: 232-247.

Esquivel B., N.S. Martínez, J. Cárdenas, T.P. Ramamoorthy, L. Rodríguez. (1989). The primarane-type diterpenoids of *Salvia microphylla* var. *neurepia*. Planta Med. 55:62-63

Gao Y; Y. Song; Y. Yang; W. Liu., J. Tang. (1979). Pharmacology of tanshionone. Acta Pharm. Sin. 14:75

Harmala P., H. Vuorela, K. Tomquist, R. Hiltunen. (1991). Choice of solvent in the extraction of *Angelica archangelica* roots with reference to calcium blocking activity. Planta Med. 58: 176-183.

Haynes R.C. (1990) Agents affecting calcification. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman and Gilman's, 8^{ed}. Ed. Pergamon Press, pag. 1496

Ichikawa K., T. Kinoshita, S. Nishibe, U. Sankawa. (1986). The Ca²⁺ antagonist activity of lignans. Chem. Pharm. Bull. 34. 3514-3517.

Ichikawa K., T. Kinoshita, U. Sankawa. (1989). The screening of chinese crude drugs for Ca²⁺ antagonist activity: Identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume*. Chem. Pharm. Bull. 37 (2). 345-348.

Iino M. (1989). Calcium-induced calcium release mechanism in guinea-pig taenia caeci. Gen. Physiol 94:363-366.

IMSS-ETNODATA Fuente de Información Etnobotánica del Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Kachur E., D.W.Morgan, T.S.Gaginella (1986). Effect of dextromethorphan on guinea pig ileal contractility in vitro: Comparison with levomethorphan, loperamide and codeine. J. Pharm. Exp. Ther. 239 (3): 661-667.

Ko F.N., Y. Ch. Wu, S. T. Lu , Ch. M. Zeng. (1993). Ca²⁺ channel blockade in rat thoracic aorta by crychine isolated from *Cryptocarya chinensis* Hemsl J. Pharm. Pharmacol. 45: 707-710.

Kozawa T., K. Sakai, M. Uchida, T. Okuyama , S. Shibata. (1981). Calcium antagonistic action of a coumarin isolated from "Qian-Hu", a chinese traditional medicine. J. Pharm. Pharmacol. 33: 317-320.

Lei X.L , G.C.Y.Chiou (1986). Studies on cardiovascular actions of *Salvia miltiorrhiza*. Amer. J. Chin Med. 14: 26-32.

Mansour S., Al-Said, M. Tariq, M.A. Al-Yahya, S. Rafatullah, O.T. Ginnawi, A.M. Ageel. (1990). Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. J. Ethnopharm. 28. 305-312

Martín M.L., M.T. Díaz, M.G. Montero, P. Prieto, L. San Román, D. Cortés. (1993). Antispasmodic activity of benzylisoquinoline alkaloids analogous to papaverine. Planta Med 59: 63-67.

Mascolo N., G. Autore, F. Capasso, A. Menghini, M.P. Fasulo. (1987) Biological screening of italian medicinal plants for anti-inflammatory activity Phytother Res. 1(1) : 28-31

Mata R., A. Navarrete, L. Alvarez, R. Pereda-Miranda, G. Delgado, A. Romo de Vivar. (1987). Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochem.* 26 (1): 191-193.

Meckes M., M.L. Villarreal, J. Tortoriello, B. Berlin, E. Berlin. (1995). A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of southern Mexico . *Phytother. Res.* 9 (4): 244-250.

Meckes M., P. Paz, J. Acosta, R. Mata. (1998). The effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids isolated from *Teloxys graveolens* leaves on isolated guinea-pig ileum. *Phytomed.* 5(6), 459-463.

Morales M.A., J. Tortoriello, M. Meckes, D. Paz y X. Lozoya. (1994). Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava*. *Arch. Med. Res.* 25 (1): 17-21.

Murad F. (1990). Drugs used for the treatment of angina. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman and Gilman's. 8^aed. Ed. Pergamom Press pp.774

NAPRALERT SYSTEM (Natural Products Alert) Base de datos computarizados sobre plantas medicinales del Colegio de Farmacia en la Universidad de Illinois, Chicago, EEUU.

Putney J.W.Jr. (1990) .Capacitative calcium entry revisited. *Cell.Calcium*.7.1

Rauwald H.W., O.Brehm. (1991). Screening of some medicinal plants for their possible calcium-antagonistic activity. *Planta Med.* 57 (A 59) Suppl. Issue 2.

Rauwald H.W. , O. Brehm. (1994). Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of Olea europea and Peucedanum ostruthium. Phytother. Res. 8: 135-140.

Saavedra H., C. Paeile. (1990). Fármacos coadyuvantes de analgesia y otros. En: El Dolor. Aspectos Básicos. Paeile C. y Saavedra H. Ed. Técnicas Mediterráneo, Chile, pp. 147-148.

Samueli F., A. Bonabello, A. Grassi. (1984). Antagonistic activity of verapamil and diltiazem against different intestinal smooth muscle stimuli. Arzneim. Forsch Drug Res. 34 (2): 181-184.

Spedding M., C. Berg. (1985). Antagonism of Ca^{2+} induced contraction of K^+ depolarized smooth muscle by local anesthetics. Eur. J. Pharmacol. 108: 143-150

Taddei G.D., E Taddei, P. Mantovani, E. Bianchi. (1988). Spasmolytic activity of peppermint, sage and rosemary essences and their major constituents. Fitoterapia 59: 463-468.

Tortoriello J., M. Meckes, M.L. Villarreal, B. Berlin, E. Berlin. (1995). Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the highland of Chiapas. Phytomedicine 2: 1-10.

Velázquez C. Tesis de Maestría en Química Farmacéutica, Fac. Química, UNAM, 2000.

Weniger B , M. Rouzier, R. Daguilh, D. Henrys, J.H. Henrys, R. Anton. (1986). Popular medicine of the Central Plateau of Haiti. J. Ethnopharmacol. 17: 13-30

West W.L. (1982). Calmodulin-regulated enzymes: Modification by drugs and disease. Fed. Proc. 41: 2251-2252.

Yano, S., H. Horiuchi, S. Horie, N. Aimi, S.I. Sakai, K. Watanabe (1991). Ca²⁺ channel blocking effects of hirsutine, an indole alkaloid from Uncaria genus in the rat aorta. Planta Med. 57: 403-405.

APENDICE

(I) Preparación Solución Tyrode (pH 7.4)

Soluciones acuosas de:

KCl	2.0 g / 100 ml
MgCl ₂	1.0 g / 100 ml
NaH ₂ PO ₄	0.5 g / 100 ml

A 8 g de NaCl, 2 g de glucosa y 1 g de NaHCO₃ se incorporan 10 ml de cada una de las soluciones anteriores. Antes de aforar completamente a 1 litro de solución, se agregan 0.27g de CaCl₂.H₂O, evitando la precipitación del catión.

(II) Solución Tyrode despolarizante con K+ (60 mM)

Soluciones acuosas de:

KCl	2.0 g / 100 ml
MgCl ₂	1.0 g / 100 ml
NaH ₂ PO ₄	0.5 g / 100 ml

A 3.55 g de NaCl, 4.45 g de KCl, 2 g de glucosa y 1 g de NaHCO₃ se le adicionan 10 ml de cada una de las soluciones arriba mencionadas. Antes

de aforar completamente a 1 litro con agua bidestilada, se agregan 0.27g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, evitando la precipitación de la solución.

(III) Solución Tyrode libre de Ca^{2+}

La composición es similar a la solución Tyrode (I), omitiendo la adición de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

(IV) Solución Tyrode despolarizante con K^+ (60 mM) libre de Ca^{2+}

La composición es similar a la solución Tyrode despolarizante con K^+ (II), omitiendo la adición de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Reactivos

Atropina (sulfato)	(Sigma)	PM 676 48
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Mallinckrodt)	PM 147.02
Crisina	(Mata, 1987)	PM 254.20
Pinostrobina	(Mata, 1987)	PM 270.29

DMSO dimetilsulfóxido (Merck)

Sales para la preparación de los medios (Merck)

***Efecto de la tensión inicial del tejido sobre la contractilidad
inducida con K^+ (60mM).***

Tensión inicial del tejido (g)	Respuesta contráctil (%)*
0.10	44.64 ± 4.30
0.25	59.29 ± 3.60
0.50	76.80 ± 2.77
1.00	92.24 ± 2.02
1.50	96.15 ± 1.34
2.00	89.30 ± 0.02

* Los valores se calcularon como porcentaje respecto a la respuesta máxima alcanzada por cada uno de los tejidos. Los datos se presentan en la tabla como el promedio ± error estandar de la media de 20 tejidos