



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA



227414

Casa abierta al tiempo

CBS

**MECANISMOS EN LA ACCIÓN RELAJANTE DEL
ÁCIDO 3 α -ANGELOILOXI, 2 α -HIDROXI-13,14 Z DI-
DESHIDROCATÍVICO EN ÍLEON DE COBAYO *IN*
*VITRO***

TESIS

que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas
presenta

Mariana Meckes Fischer

México

Abril, 2002

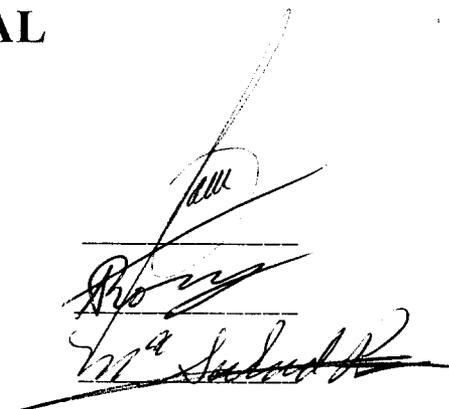
EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN EL
PADRÓN DE POSGRADO DE EXCELENCIA DE CONACYT Y
CUENTA CON EL APOYO DEL MISMO CONSEJO POR
MEDIO DEL CONVENIO PEP-200-93.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco, aprobaron la tesis que presentó el día 26 de abril, 2002:

Mariana Meckes Fischer

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: Dr. Héctor Ponce Monter
Asesor: Dr. Rubén Román Ramos
Asesora: Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez



Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The top signature is the most prominent and appears to be 'Héctor Ponce Monter'. The middle signature is 'Rubén Román Ramos'. The bottom signature is 'Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez'.

Sinodal: Dra. María Guadalupe Campos Lara
Sinodal: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar



Two handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The top signature is 'Dra. María Guadalupe Campos Lara'. The bottom signature is 'Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar'.

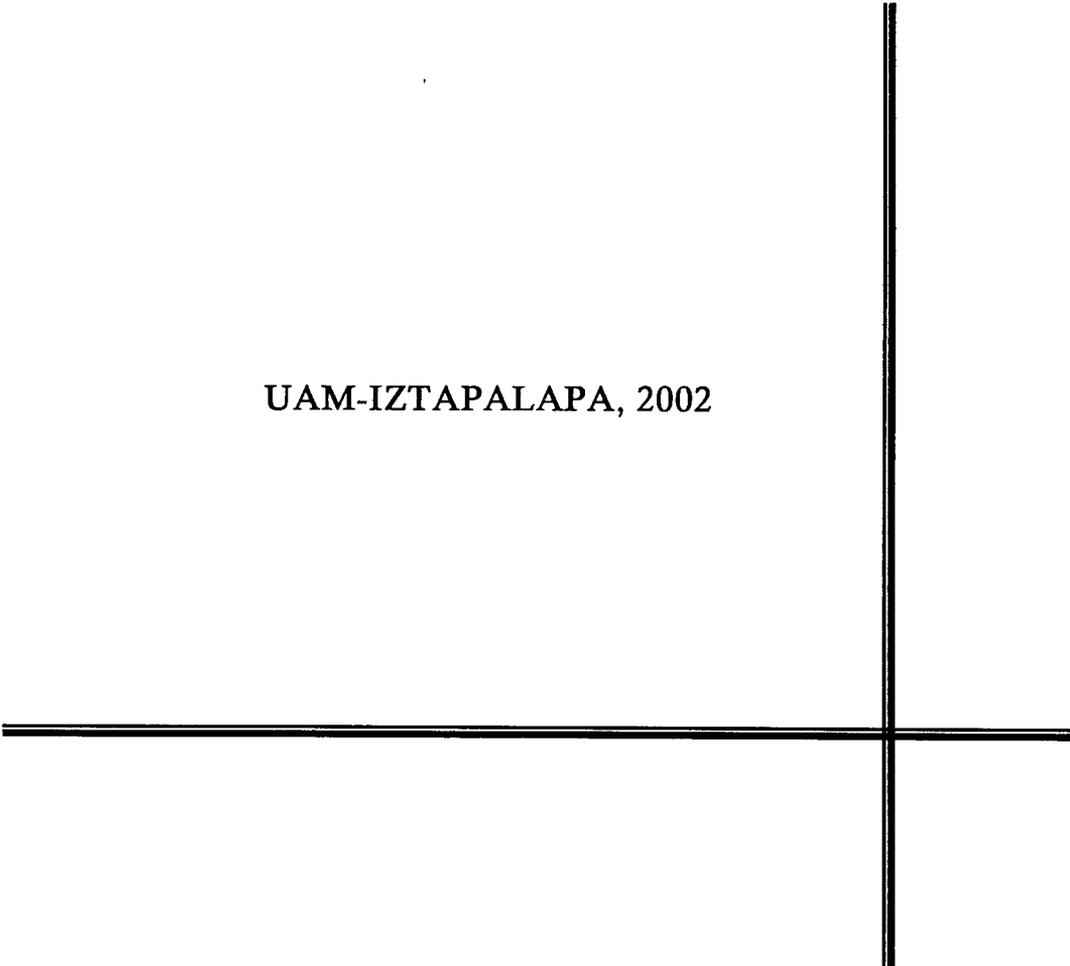


El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó en la UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

El proyecto recibió apoyo económico del Fondo de Fomento para la Investigación de la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (FOFOI, FP0038664) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (0485P-M).

MECANISMOS EN LA ACCIÓN RELAJANTE
DEL ÁCIDO 3 α -ANGELOILOXI, 2 α -HIDROXI-
13,14 Z DI-DESHIDROCATÍVICO EN ÍLEON DE
COBAYO *IN VITRO*

UAM-IZTAPALAPA, 2002



AGRADECIMIENTOS

En primer término debo manifestar mi reconocimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana y al Instituto Mexicano del Seguro Social por haberme brindado la oportunidad de obtener el doctorado y avanzar en el conocimiento de la herbolaria medicinal de México, encuentro con una realidad que se perfila como un fenómeno vigente en la sociedad de mi tiempo.

Siento un profundo agradecimiento por los doctores Héctor Ponce Monter, Rubén Román Ramos y María Salud Pérez Gutiérrez a quienes debo su invaluable asesoría y estímulos; también, por los Doctores María Campos y Francisco Javier Alarcón cuya revisión cuidadosa del manuscrito enriqueció de manera imparable el trabajo. Al Dr. Román Ramos mi gratitud por su amistad y la invitación a emprender este siguiente paso en mi carrera profesional.

A los doctores Fernando Calzada Bermejo y María Adelina Jiménez Arellanes, jóvenes colaboradores que han sido una motivación en este logro de superación académica.

A todos aquellos que me han acompañado con entusiasmo en una larga trayectoria, intentando descifrar las incógnitas que encierra la herbolaria medicinal de este país, manantial inagotable de posibilidades en la búsqueda de alternativas terapéuticas.



A Yanú

INDICE

Página

**RESUMEN
ABSTRACT**

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES	1
EL PAPEL DEL CALCIO EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO	7
El calcio como mediador celular	7
Acoplamiento electromecánico y farmacomecánico	10
Diversidad estructural de los canales de calcio en la membrana plasmática	12
Canales de calcio en los depósitos de almacenamiento intracelular	14
Formación y metabolismo del inositol trifosfato	16
Entrada capacitativa del calcio	17
Sistemas enzimáticos en la regulación de calcio intracelular	20
Agentes inductores de la liberación del Ca ²⁺ almacenado en el retículo sarcoplásmico	21
Papel de la fosforilación de la miosina en la contracción y relajación del músculo liso	21
ANTAGONISTAS DE CALCIO	25
EL MÚSCULO LISO	
Músculo liso fásico y tónico	26
Respuesta contráctil del íleon de cobayo	29
Modelos <i>in vitro</i> con íleon de cobayo	30
ASPECTOS QUIMIOTAXONÓMICOS Y FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO <i>BRICKELLIA</i>	31
Clasificación botánica	31
Constituyentes químicos	31
Propiedades farmacológicas	33
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41

MATERIAL Y MÉTODO

Ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi-13,14Z di-deshidrocatívico	42
Preparaciones <i>in vitro</i> con tiras de fibra longitudinal	42
Efectos del compuesto AAHDD sobre las contracciones tónicas inducidas con K ⁺ (60 mM)	43
Preparaciones con fibra longitudinal de ileon de cobayo	44
Efectos del ácido ciclopiazónico y de la rianodina en el comportamiento del compuesto AAHDD	45
Preparaciones con fibra longitudinal permeabilizada con β -escina	47
Incorporación del ⁴⁵ Ca ²⁺ en preparaciones contraídas con K ⁺	48
Efectos del AAHDD sobre el eflujo de ⁴⁵ Ca ²⁺ en un medio alto en K ⁺	49
Efectos del AAHDD sobre la contracción tónica inducida con Mn ²⁺ en un medio libre de Ca ²⁺ , alto en K ⁺	50
Expresión de los resultados y análisis estadístico	51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectos del compuesto AAHDD, verapamilo y papaverina como bloqueadores de las contracciones fásica y tónica	53
EFFECTOS DEL COMPUESTOS AAHDD SOBRE LA MOVILIZACIÓN DEL CALCIO EN LOS DEPÓSITOS INTRACELULARES	
Efecto del ácido ciclopiazónico y rianodina en la actividad inhibitoria del AAHDD sobre la contracción inducida con Ca ²⁺	61
Efecto del compuesto AAHDD sobre el eflujo de ⁴⁵ Ca ²⁺	65
Efecto del AAHDD sobre la liberación del Ca ²⁺ inducida con cafeína en preparaciones con tejido permeabilizado	67
EFFECTO DEL COMPUESTO AAHDD SOBRE EL INFLUJO DEL Ca ²⁺ A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	
Efectos del compuesto AAHDD sobre la contracción inducida con Mn ²⁺ en un medio libre de Ca ²⁺ , alto en K ⁺	71
Incorporación intracelular del Mn ²⁺	75
Incorporación del ⁴⁵ Ca ²⁺	77

CONCLUSIONES	83
--------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
----------------------------	----

FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1	Vías de entrada de Ca^{2+} a la célula	9
Fig. 2	Entrada capacitativa de Ca^{2+}	18
Fig. 3	Contracción vía la fosforilación de la cadena ligera de la miosina	24
Fig. 4	Compuestos aislados de <i>Brickellia paniculata</i> , relajantes de la musculatura lisa intestinal del cobayo in vitro	36
Fig. 5	Preparación de la fibra longitudinal del músculo liso intestinal del cobayo	44
Fig. 6	Registro característico de la respuesta tónica inducida con K^+	54
Fig. 7	Efecto inhibitorio del AAHDD sobre la contracción fásica inducida con K^+	56
Fig. 8	Efecto del AAHDD sobre el eflujo de $^{45}Ca^{2+}$	66
Fig. 9	Efecto del AAHDD en tejidos permeabilizados con β -escina	69
Fig. 10	Efecto del AAHDD sobre la contracción inducida con Mn^{2+}	72
Fig. 11	Efecto del verapamilo sobre la contracción inducida con Mn^{2+}	74
Fig. 12	Incorporación del Mn^{2+} en tejidos tratados con AAHDD	73
Fig. 13	Incorporación del Mn^{2+} en tejidos tratados con verapamilo	75
Fig. 14	Efecto del AAHDD sobre la incorporación de $^{45}Ca^{2+}$	76
Tab. 1	Plantas medicinales utilizadas para tratar problemas gastrointestinales y cuya actividad relajante se asocia con un efecto antagonista sobre el Ca^{2+}	6
Tab. 2	Contracción inducida con K^+ (60 mM) en tiras de fibra longitudinal	55
Tab. 3	AAHDD en tejidos tratados con ácido ciclopiazónico y rianodina	63

PUBLICACIONES

Meckes M., Román R., Pérez S., Calzada F., Ponce H.A
Effects of a diterpene isolated from Brickellia paniculata on intracellular Ca^{2+} deposit of guinea-pig ileal longitudinal muscle.
Planta Med. 2002 (aceptado).

Meckes M., Román R., Pérez S., Calzada F., Ponce H.A
Effects of 3 α -angeloyloxy, 2 α -hydroxy, 13, 14Z di-dehydrocativic acid from Brickellia paniculata on calcium influx in longitudinal ileal muscle of guinea-pig ileum.
Life Sciences 2002 (en preparación).

ABREVIATURAS

ADPR	adenosina-difosfato-ribosa
ACh	acetilcolina
AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
$[Ca^{2+}]_i$	concentración del calcio en el citosol (Ca^{2+} libre)
Ca,Mg-ATPasa	bomba de calcio
CaM	calmodulina
CaMK	proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina
CE ₅₀	concentración que produce la mitad del efecto máximo
CI ₅₀	concentración que inhibe el efecto en un 50%
CLC	calcio-libera calcio
DAG	1,2-diacilglicerol
EDTA	ácido etilen diamina-bis-(β-aminoetil éter)N,N,N',N' tetracétido
EGTA	ácido etilen glico-bis-(β-aminoetil éter)N,N,N',N' tetracétido
GTP	guanosina trifosfato
ILC	inositol trifosfato-libera calcio
InsP ₂	(d-mio-) inositol bifosfato
InsP ₃	(d-mio-) inositol 1,4,5-trifosfato
InsP ₃ R	receptor de inositol trifosfato
InsP ₄	(d-mio-) inositol tetrakisfosfato
Kda	kilodalton
MLCK	cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
NDA	nicotinamida-adenín-dinucleótido
PLC	fosfolipasa C
RMN	resonancia magnética nuclear
RyR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplásmico
SERCA	Ca,Mg-ATPasa del retículo sarco (endo) plásmico
μCi	micro Curie

RESUMEN

El conocimiento sobre las propiedades biológicas que encierran más de 4000 especies vegetales, identificadas por los mexicanos como el recurso herbolario medicinal del país, ha sido uno de los temas de interés recurrente para un sector del medio científico nacional y, el enfoque metodológico que se ha aplicado en cada período al estudio de las plantas medicinales de México obedece fundamentalmente al desarrollo tecnológico alcanzado en su momento.

La flora medicinal de México es una de las más variadas del mundo; aunada a esta característica, la herbolaria medicinal mexicana se sustenta en un valioso conocimiento empírico sobre las propiedades curativas que encierra este recurso natural, saber que ha sido heredado por generaciones. Actualmente, las plantas medicinales son una alternativa terapéutica para la resolución de los problemas de salud de un alto porcentaje de mexicanos, la corroboración experimental de sus propiedades medicinales atribuidas sólo puede aportar beneficios para el medio clínico y contribuir al mejor entendimiento de una expresión cultural médica profundamente arraigada entre sus pobladores. Las plantas constituyen también una reserva natural que aún no ha sido suficientemente explorada como fuente de obtención de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica. Las potencialidades terapéuticas, sus alcances en la clínica y el interés que podrían generar en la

industria farmacéutica son aspectos que se podrán abordar cuando la planta o sus productos derivados hayan sido evaluados en el humano. Los estudios experimentales que se realizan en las diferentes instituciones del país, hablan de un avance sustancial en el conocimiento sobre los aspectos químicos y farmacológicos de algunas especies; sin embargo, la corroboración de los efectos en estudios clínicos y la demostración de la eficacia y seguridad del producto vegetal, son parámetros fundamentales para establecer las potencialidades reales del recurso y constituye la meta y proyección de los estudios para algunos grupos dedicados a la investigación de las plantas medicinales del país.

El estudio sobre el mecanismo de acción del diterpeno tipo labdano 3α -angeliloxi, 2α -hidroxi-13,14Zdi-deshidrocatívico (AAHDD) aislado de las hojas de *Brickellia paniculata*, representa una etapa en la cadena de ensayos biológicos a los cuales se ha sometido la especie. La elucidación del mecanismo involucrado en su actividad relajante sobre la musculatura lisa intestinal aporta conocimiento sobre las propiedades que se le atribuyen a la planta como remedio para tratar los cólicos, el dolor abdominal y las diarreas acuosas. Con estos propósitos se diseñaron diferentes modelos biológicos experimentales en los que se utilizaron preparaciones *in vitro* con fibra longitudinal de íleon de cobayo.

Los estudios realizados demostraron que las propiedades relajantes que posee AAHDD involucra un efecto de bloqueo sobre la movilización del calcio en la célula. En el tejido muscular del íleon, el compuesto inhibió la contracción tónica inducida con 60 mM de K^+ ($CI_{50}=15.52 \pm 1.93 \mu M$), potencia que resultó ser dos veces menor a la que se determinó con papaverina en el mismo modelo ($CI_{50}=6.70 \pm 1.31 \mu M$). El componente fásico de la respuesta contráctil también fue bloqueado y la relación CI_{50} fásica/ CI_{50} tónica tuvo un valor de 7.11; esta relación fue menor (3.56) en los estudios realizados con papaverina y, notablemente mayor (181.25) en el caso de verapamilo que es un antagonista específico de calcio. En una solución libre de Ca^{2+} y con una concentración alta en K^+ (60 mM), el AAHDD inhibió las contracciones inducidas con 2 mM de Ca^{2+} ; en estas preparaciones, la adición de 10 μM de ácido ciclopiazónico o de 30 μM de rianodina no modificó el efecto antagonista del AAHDD sobre la respuesta contráctil inducida con el calcio.

En los tejidos incubados con ^{45}Ca y lavados luego con una solución K^+ (60 mM) que contenía AAHDD, la medición del eflujo del ^{45}Ca fue similar a la determinada en el grupo de tejidos control sin el diterpeno. Este antecedente y, dado que el efecto relajante del AAHDD no se modificó con la adición del ácido ciclopiazónico ni con rianodina, dos agentes que han sido descritos como moduladores de la captura y liberación del Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico respectivamente, los resultados obtenidos en estos ensayos permiten sugerir que el efecto inhibitor que ejerce AAHDD sobre la respuesta

permiten sugerir que el efecto inhibitor que ejerce AAHDD sobre la respuesta contráctil no involucra la movilización del calcio a nivel de los depósitos de almacenamiento del calcio intracelular, hipótesis que se corrobora con las observaciones realizadas en tejidos permeabilizados con β -escina, en los cuales el AAHDD no modificó la respuesta contráctil inducida con 10 mM de cafeína, un alcaloide que estimula la liberación del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico.

En la siguiente serie de estudios se valoró el comportamiento del AAHDD sobre las contracciones inducidas con Mn^{2+} en preparaciones con tejidos incubados en un medio alto en K^+ (60 mM) y libre de calcio. Los resultados mostraron que, a las 3 hrs siguientes a la aplicación de 5 mM de Mn^{2+} , 80 μM de AAHDD y 0.16 μM de verapamilo suprimen totalmente la respuesta contráctil tónica inducida con el Mn^{2+} . Estos resultados vienen a apoyar la conclusión derivada de este estudio respecto a que el compuesto es un antagonista que bloquea las contracciones tónicas inducidas con Mn^{2+} , inhibiendo el influjo del calcio a través de canales de calcio dependientes del voltaje, efecto que se correlacionó con un decremento en el influjo de ^{45}Ca y también con la disminución de la concentración del Mn^{2+} en el tejido.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten asumir que el diterpeno en cuestión actúa como un bloqueador de la biodisponibilidad del calcio en la célula cuyo sitio de acción es la membrana plasmática impidiendo

el influjo del catión al interior de la célula. El uso popular que tiene *Brickellia paniculata* en la medicina tradicional mexicana puede apoyarse en los datos experimentales encontrados en este estudio; sin embargo, para definir las potencialidades que tiene esta planta como un antiespasmódico es necesario demostrar estas propiedades en el humano.

ABSTRACT

It has been of great interest for the medical scientific national sector, knowing about the biological properties that are within more than 4000 plants, identified by Mexicans as the medicinal herbal resource of the country. The methodological approach that has been applied in each period in the study of Mexican plants, responds mainly to the technological development reached at this moment.

The Mexican medicinal flora is one of the largest in the world. Together with this feature, medicinal herbology is backed up by a valuable empirical knowledge which is based upon the healing properties of this natural resource, a knowledge that has been inherited by generations. Today, medicinal plants are, for a high percentage of Mexicans, a therapeutic alternative to resolve health problems. The experimental corroboration of the attributed biological properties benefits the clinical area and contributes to a better understanding of a strongly established medical cultural expression among its inhabitants. Plants also are part of the natural resource that has not been explored enough to obtain new molecules with biological activities. The therapeutic potential and the interest they can generate in the pharmaceutical industry are aspects that could be taken in consideration once the plants or its products are evaluated in human beings. The experimental studies carried on in different

institutions around the country show a great advance in what is known about the chemical and pharmacological aspects, however, the corroboration of the effects in clinical studies and the demonstration of the effectiveness and safety of the plants are critical parameters for establishing their real potential, and this is the main objective of the studies carried out by some of the groups dedicated to the research of medicinal plants in the country.

The study of the mechanism of action of a diterpene isolated from *Brickellia paniculata* leaves, represents a stage in the chain of biological assays to which this species is being submitted. The elucidation of the involved mechanism in its relaxing activity on the intestinal smooth muscle contributes to the understanding of the attributed properties given to this plant as a remedy to treat colics, abdominal pain and watery diarrhea. For this purpose, different biological experimental models were designed using *in vitro* preparations with longitudinal fibers of guinea pig ileum.

The studies showed that the relaxing properties of the labdane diterpene 3 α -angeloyloxy,2 α -hydroxy-13,14Z di-dehydrocaticvic acid (AAHDD) involves a blocking effect on calcium mobilization in the cell. In ileal tissue, the compound inhibited the tonic contraction induced with 60 mM K⁺ (CI₅₀=15.52 \pm 1.93 μ M), this potence resulted two times less than that determined with papaverine in the same model (CI₅₀=6.70 \pm 1.31 μ M). The phasic component of the contractile response was also blocked and the

relation $CI_{50} \text{ phasic} / CI_{50} \text{ tonic}$ had a 7.11 value; this relation was smaller in the studies in which papaverine was used (3.56), and remarkably larger (181.25) in the verapamil case, which is a specific calcium antagonist. In a free Ca^{2+} high K^+ (60 mM) solution, AAHDD inhibited induced contraction with 2mM Ca^{2+} ; the addition of 10 μ M of cyclopiazonic acid or 30 μ M ryanodine in these preparations did not modify the antagonistic effect produced by AAHDD on the contractile response induced with calcium.

In the tissues incubated with ^{45}Ca and washed with a K^+ (60mM) solution that contained AAHDD, the ^{45}Ca efflux was similar to the one determined in the group of control tissues without the diterpene. Taken into account that the relaxing effect of AAHDD was not modified with the addition of cyclopiazonic acid nor with ryanodine, two agents that have been described as modulators of refilling and releasing of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum, these results allow us to suggest that the inhibitory effect produced by AAHDD upon the contractile response does not involve calcium mobilization at the intracellular calcium storage deposits.

In the following series of studies the behavior of AAHDD on the contractions induced with Mn^{2+} in preparations incubated in a high K^+ (60 mM), Ca^{2+} -free solution was evaluated. The results showed that, as in the case of verapamil, 100 μ M of this compound totally suppress the contractile tonic response induced with 5 mM Mn^{2+} . On the other hand, in permeabilized tissues with β -

escine, AAHDD did not modified the contractile response induced with 10 mM caffeine, an alkaloid that stimulates calcium release from the sarcoplasmic reticulum. These results support the conclusion obtained from this study in the sense that the compound is an antagonist that blocks the tonic contractions induced with Mn^{2+} , inhibiting the calcium influx through voltage-dependent calcium channels, an effect which correlates with a decrease in $^{45}Ca^{2+}$ uptake and also with a decrease in Mn^{2+} concentration in the tissue.

The obtained results in the present study allow us to assume that the evaluated diterpene acts as a blocker of calcium bioavailability in the cell, whose site of action is the plasma membrane avoiding the influx of the cation to the interior of the cell. The popular use that *Brickellia paniculata* has in traditional Mexican medicine finds experimental grounds on the results of the present study. However, to find out the true potential of this plant as an antispasmodic agent, further studies are necessary to establish its usefulness in human beings.

INTRODUCCIÓN

Desde épocas ancestrales, la herbolaria medicinal ha sido para los mexicanos un recurso valioso en el tratamiento de las enfermedades. El país cuenta con una flora medicinal que es extensa y hasta nuestros días se mantiene la tradición del uso de plantas que curan o bien, que alivian los síntomas que acompañan a los padecimientos más comunes que afectan a la población. México se define como una nación pluricultural y como tal, se reconoce además la existencia de un sistema médico no-oficial, la “medicina tradicional”, fenómeno que es singular para cada una de las diferentes etnias en el territorio (Mellado y col., 1994).

La sociedad moderna no encuentra todavía una estrategia que permita abordar de manera satisfactoria los problemas prioritarios de salud y es aún elevado el porcentaje de la población mundial que permanece al margen de los beneficios que ofrece la terapéutica moderna. De acuerdo con los datos que registra la Organización Mundial de la Salud, el 80 % de la población en el mundo recurre a la medicina tradicional para resolver sus problemas prioritarios de salud (Farnsworth y col., 1989). En México, se estima que alrededor del 60% de los habitantes trata sus padecimientos por medio de prácticas médicas populares y, la herbolaria como el recurso prioritario de la medicina tradicional, cumple un papel esencial en el ámbito cultural de la

población. La medicina popular, como una manifestación más de la cultura, se torna un fenómeno complejo en un país que está conformado por alrededor de cuarenta diferentes etnias; de manera similar a otros países en vías de desarrollo, existe a pesar del avance tecnológico y del mejoramiento en las propuestas que ofrece la medicina oficial y en las que la industria farmacéutica no ha sido aún capaz de llegar a los estratos de la sociedad económicamente más deprimidos.

La atención que se presta a las plantas medicinales en las últimas décadas obedece, fundamentalmente, a la necesidad que tiene la industria farmacéutica de encontrar nuevas moléculas prototipo para su aplicación en la clínica y también a las potencialidades que ofrece este recurso para la elaboración de los denominados “fitofármacos”, una nueva categoría de medicamentos que se ha impuesto con fuerte demanda en Europa. Fitofármacos son aquellos productos procesados industrialmente para su distribución en el mercado como tabletas o cápsulas con el vegetal molido, el extracto de la planta, o bien, el complejo de los principios activos. En algunos países europeos diferentes productos herbolarios están registrados dentro de la categoría que corresponde a los productos de libre venta (OTC “over-the-counter”), o bien, como fitofármacos una vez que estos han sido sometidos a las pruebas de control de calidad, a la estandarización de sus principios activos y que se haya demostrado la eficacia y la seguridad del producto vegetal por medio de estudios clínicos (Tyler, 1994; Chatterjee, 1998). Tal es

el caso de tebonin, vasodil o ginkgogink (*Ginkgo biloba*), hipericon (*Hypericum perforatum*), laikan (*Piper methysticum*), o de metamucil (*Psillium plantago*) entre otros, que gozan en la actualidad de gran distribución a nivel mundial (Donald y Brown, 1997; Krieglstein, 2000; Reichling, 1997).

En los países en vías de desarrollo, los padecimientos gastrointestinales son frecuentes; para tratar estos casos, las medicinas tradicionales de diversos países utilizan un número importante de plantas medicinales. Varias de estas especies han sido sometidas a ensayos experimentales y en algunas, se han demostrado propiedades relajantes sobre la musculatura lisa, con un efecto que está mediado por un mecanismo en el que se produce interferencia del calcio a nivel celular (Tabla 1). Los principios activos responsables de las propiedades relajantes corresponden a estructuras químicas diversas, fundamentalmente se han aislado compuestos del tipo flavonoide. Los estudios que se han realizado para definir el sitio de acción de estos compuestos sugieren que los flavonoides actúan a nivel de la unión del complejo Ca^{2+} -calmodulina y, como esta proteína regula la AMPc fosfodiesterasa, la actividad de la enzima es inhibida aumentando de esta manera la concentración del AMPc en el citosol, consecuentemente, aumenta el secuestro de Ca^{2+} en los depósitos de almacenamiento intracelular (Prestwich y Bolton, 1995a).

El interés por encontrar nuevos agentes con acción antagonista sobre el calcio para su aplicación clínica en la terapia de algunos padecimientos cardiovasculares, en especial la hipertensión sanguínea, ha conducido a la realización de programas de rastreo de plantas medicinales utilizadas popularmente para el tratamiento de este tipo de enfermedades. En este caso, la lista de los principios bloqueadores de calcio identificados es mucho más amplia y sobresalen los compuestos alcaloides, en especial del tipo bisbencilisoquinolinas, cumarinas, sesquiterpenos y lignanos (Vuorela y col.,1997). Una revisión en la literatura científica indica que, independientemente de las propiedades antagonistas sobre el calcio que poseen los compuestos activos aislados, la especificidad que ejercen sobre el tejido muscular liso pareciera correlacionarse con el uso que tienen las plantas como relajantes del tejido intestinal y/o cardiovascular.

A la fecha no existen estudios sobre el mecanismo calcio antagonista del efecto relajante sobre la musculatura lisa intestinal que ejercen los diterpenos aislados de aquellas plantas que son utilizadas para tratar problemas gastrointestinales. La presencia de constituyentes del tipo flavonoide y diterpénico es frecuente en las numerosas especies de la familia Compositae empleadas en estos casos. De *Brickellia paniculata* se aislaron como principios activos relajantes de la musculatura lisa, un flavonoide (xantomicol) del cual existen ya reportes sobre sus propiedades antagonistas de calcio (Capasso y col., 1991) y un diterpeno tipo labdano (ácido 3 α -

deshidrocatívico) cuyo mecanismo de acción fue el tema de estudio del presente trabajo. Para ello, fue necesario adaptar metodología *in vitro* ya reportada por otros autores en la literatura (Urakawa y Holland, 1964; Weiss y Goodman, 1969; Goodman y Weiss, 1971; Weiss, 1974; Karaki y Weiss, 1979; Endo y col., 1982; Iino, 1989; Kitazawa y col., 1989; Uyama y col., 1992; 1993; Komori y col., 1995; Nasu y col., 1996), estandarizar los modelos que permiten medir la entrada del calcio al interior de la célula, así como interferir la liberación del calcio desde los depósitos de almacenamiento intracelular. El método del lantano y el manejo de las preparaciones con tejidos permeabilizados son de gran utilidad en los estudios relacionados con los mecanismos involucrados en la acción antagonista del calcio. En el presente estudio sobre *Brickellia paniculata*, el montaje y la estandarización de estos modelos constituyeron una parte importante del trabajo.

Tabla 1

PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS PARA TRATAR PROBLEMAS GASTROINTESTINALES Y CUYA ACTIVIDAD RELAJANTE SE ASOCIA CON UN EFECTO ANTAGONISTA SOBRE EL CALCIO

Especie	Extracto/ fracción	Principios activos		Tejido	Modo de acción
<i>Achillea fragantissima</i>		Lactona sesquiterpénica	13-O-desacetil-1 β -hidroxi afragloucolido	aorta, íleon, útero de rata (<i>Mustafa y col., 1992</i>)	
<i>Angelica archangelica</i>	Extracto de la raíz	Furano-cumarinas	arjangelicina isoimperatorina ostol, fellopterina	células (<i>Härmala y col., 1991</i>)	
<i>Artemisia abrotanum</i>		Flavonoide	7-O- metil eriodictiol	tráquea de cobayo (<i>Bergendorff y Sterner, 1995</i>)	
<i>Artemisia judaica</i>		Flavonoide	cirsimaritina	íleon de cobayo (<i>Abdalla y Abu Zarga, 1987</i>)	
<i>Artemisia monosperma</i>		Flavonoide	7-O-metil eriodictiol	íleon , arteria pulmonar tráquea y útero de rata (<i>Abu Niaaj y col., 1993</i>)	
<i>Baccharis serraefolia</i>	Metanólico de hojas			íleon de cobayo (<i>Tortoriello y Aguilar, 1996</i>)	
<i>Brickellia paniculata</i>		Flavonoide Diterpeno	xantomicrof ác.3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi, 13,14Z di-deshi-drocátívico	íleon de cobayo (<i>Capasso y col., 1991</i>) aorta de rata íleon de cobayo (<i>Meckes y col., 2002b</i>)	influjo del Ca ²⁺
<i>Conyza filaginoides</i>	Cloroformo-metanol (1:1) de hojas y tallos	Flavonoides Terpenoides	glucósido de quercetina pinostrobin, rutina, óxido de β -cariofileno, eritrodíol, 3- β -tridecanoiloxi-28-hidroxiolean-12-eno	íleon de rata (<i>Mata y col., 1996</i>)	
<i>Crinum glaucum</i>	Acuoso de bulbos			duodeno de rata íleon y <i>taenia coli</i> de cobayo (<i>Okpo y Adeyemi, 1998</i>)	
<i>Croton zehntneri</i>	Aceite esencial		estragol anetol	íleon de cobayo (<i>Coelho y col., 1998</i>)	influjo del Ca ²⁺
<i>Croton nepetaefolius</i>	Aceite esencial		metileugenol terpineol	íleon de cobayo (<i>Magalhães y col., 1998</i>)	
<i>Litsea cubeba</i>		Alcaloide aporfinico	laurotetanina	aorta torácica de rata (<i>Chen y col., 1994</i>)	influjo del Ca ²⁺
<i>Psidium guajava</i>		Flavonoide	quercetina β -cariofileno	aorta de rata, íleon de cobayo (<i>Morales y col., 1994</i>) (<i>Morales y Lozoya, 1994</i>) íleon de cobayo (<i>Meckes y col., 1996</i>)	influjo del Ca ²⁺
<i>Pogostemon cablin</i>			alcohol de patchouli	<i>taenia coli</i> de cobayo (<i>Ichikawa y col., 1989</i>)	influjo del Ca ²⁺
<i>Teloxys graveolens</i>		Flavonoides	crisina, pinostrobin	íleon de cobayo (<i>Meckes y col., 1998</i>)	

EL PAPEL DEL Ca^{2+} EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

El calcio como mediador celular

En múltiples funciones de las células excitables, el calcio libre juega un papel relevante, es esencial en los procesos de acoplamiento excitación-contracción y estímulo-secreción, en la activación de las enzimas, la actividad neuronal, etc. Un déficit en la regulación del calcio puede llevar al daño celular, la pérdida de sus funciones e incluso a la muerte de la célula.

En estado de reposo y en un medio de calcio extracelular de 1.0 a 2.5 mM, la concentración del Ca^{2+} libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) del músculo liso intacto es de 80-200 nM. Cuando el músculo se contrae, se ha determinado que esta concentración es aproximadamente de 1 μM (Somlyo y Himpens, 1989). 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 segundo mensajero ha sido adoptado ampliamente 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 de la célula; también como se menciona arriba, el proceso de la muerte celular. La acción del calcio frecuentemente ocurre en interacción con otros sistemas de señales, por ejemplo el de los nucleótidos cíclicos (Rasmussen, 1970).

La contracción del tejido muscular liso es una respuesta al aumento de $[Ca^{2+}]_i$. La célula regula estos niveles modulando el influjo del Ca^{2+} 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 se abren, dependiendo este proceso del voltaje alcanzado en la membrana plasmática (canales de calcio voltaje-dependientes); otros canales de calcio se activan al interactuar el agonista con el receptor (canales de calcio que operan por receptores) (Somlyo y Somlyo, 1968). Un segundo mecanismo participa en la regulación, liberando Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Bolton, 1979; Van Breemen y Saida, 1989; Triggle y col., 1989; Weiss y col., 1981) (Figura 1).

En las células del músculo liso de algunos tejidos, el retículo sarcoplásmico (RS) ocupa 2.0-7.5% del volumen total, la concentración de calcio que libera este organelo es suficiente para producir una respuesta contráctil. Cuando los depósitos intracelulares se encuentran vacíos la respuesta contráctil es muy débil, aún cuando el Ca^{2+} extracelular se mantiene en concentraciones normales. Algunos de los mecanismos involucrados en la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RS se describen más adelante.

El Ca^{2+} se almacena también en la mitocondria, este organelo ocupa el 5% del volumen en la célula del músculo liso. A diferencia del RS y de la membrana plasmática que permiten el incremento de la concentración del

Ca^{2+} libre en el citosol y la consecuente contracción de la fibra muscular, la mitocondria limita este incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ llevando a cabo su almacenamiento.

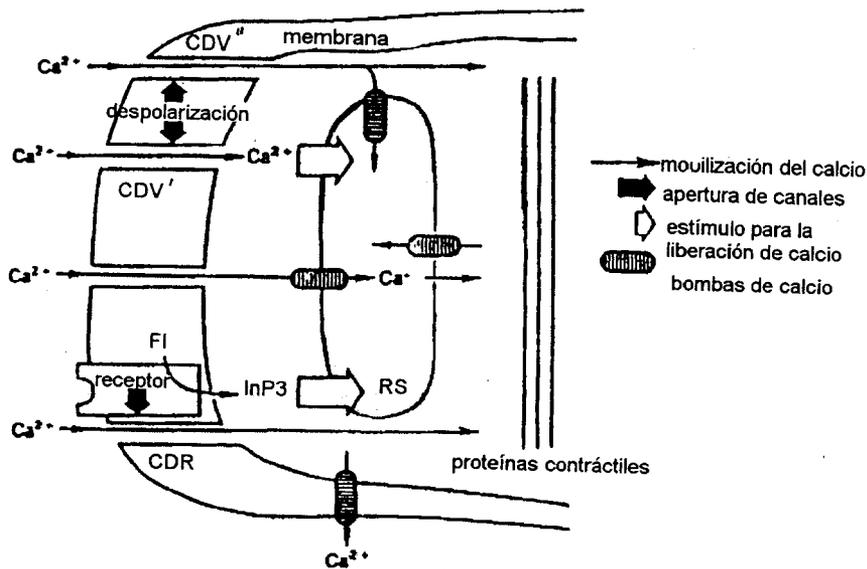


Fig.1 Diferentes vías de entrada de Ca^{2+} a la célula : (CDV'): canales dependientes del voltaje que se inactivan rápidamente, el calcio que entra al citoplasma activa al RS y libera calcio almacenado, (CDV''): canales de calcio voltaje-dependientes del tipo L (de inactivación lenta) a través de los cuales pasa el Ca^{2+} y activa directamente la maquinaria contráctil, el Ca^{2+} también puede acumularse en el RS . Otra ruta de entrada de Ca^{2+} ocurre a través de canales que operan por receptores, el catión actúa directamente sobre la maquinaria contráctil y de manera indirecta, a través de la formación de InsP_3 , libera calcio del RS . En estado de reposo, el calcio puede penetrar a través de canales abiertos en la membrana plasmática y se almacena en el RS , no contribuye al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el citosol. El Ca^{2+} puede activar el proceso de liberación de Ca^{2+} a partir del RS (CLC).

Karaki H, Weiss G, 1988

Algunos trabajos recientes sugieren que la liberación del Ca^{2+} por acción del (d-mio-) inositol 1,4,5 trisfosfato (InsP_3) produce un incremento en la concentración del calcio en la mitocondria, seguido de un aumento en la producción de energía. También se ha sugerido que la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria podría estar relacionada con la muerte de la célula (Miller y Carsten, 1997).

Acoplamiento electromecánico y farmacomecánico

El proceso contráctil en el músculo liso se interpreta fundamentalmente de acuerdo con los dos mecanismos propuestos por Somlyo y Somlyo (1968): electromecánico y farmacomecánico. En condiciones fisiológicas normales, la excitabilidad eléctrica de la musculatura lisa se manifiesta como funciones del voltaje, es decir, potencial de reposo y potencial de acción que es el resultado del movimiento de iones (cargas eléctricas).

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 suele ser 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 celular al ion Ca^{2+} , la concentración de este último se incrementa y la maquinaria contráctil se activa.

Por otro lado, la unión de hormonas y de neurotransmisores con los receptores aumenta la permeabilidad de la membrana a los iones de Ca^{2+} y/o de Na^+ , se produce un cambio en el potencial de membrana y consecuentemente, se abren los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente (Prestwich y Bolton, 1995a; Quast, 1993). Sin embargo, la activación de los canales de Ca^{2+} ligando-dependientes, vía una proteína G, puede también activar a la fosfolipasa C de la membrana plasmática, ésta hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato generando InsP_3 y 1,2-diacilglicerol (DAG) (Best y Bolton, 1986; Prestwich y Bolton, 1995 a, b). El InsP_3 se une luego a su receptor en el RS y libera el calcio almacenado en el depósito intracelular (Berridge e Irvine, 1987; Berridge, 1993). La purificación de los receptores de InsP_3 permitiría luego demostrar la afinidad de la molécula por el InsP_3 y además, la acción reguladora que este último ejerce sobre los canales de Ca^{2+} -dependientes de InsP_3 en el RS (Supattapone y col, 1988; Chadwick y col., 1990). Desde un punto de vista estructural, el receptor de InsP_3 es homólogo a los receptores de rianodina en el músculo (Mignery y col., 1989).

Diversidad estructural de los canales de calcio en la membrana plasmática

Gracias al desarrollo de técnicas modernas como el *patch clamp* que permite hacer registros de la corriente de una célula o incluso de un canal, el conocimiento sobre las corrientes de calcio que se activan con la despolarización de las membranas es un fenómeno que se aborda en la actualidad con mayor precisión. Asimismo, la aplicación de esta técnica ha contribuido de manera importante a la caracterización de los canales de calcio existentes en la célula. Los canales iónicos son poros formados por proteínas transmembranales, existen diferentes tipos: los que operan por voltaje, por receptores, por segundos mensajeros, los capacitativos y probablemente, los relacionados con proteínas G (Miller y Carsten, 1997; Nargeot y Charnet, 1994).

En función de la activación de los canales de calcio se han establecido dos categorías de ellos. Al primer grupo corresponden los canales denominados *canales activados a voltajes bajos* debido a que se activan con voltajes inferiores a -30 mV. Estos canales se inactivan rápidamente por lo que se les conoce también como *canales transitorios* o *canales T* y presentan una permeabilidad al Ca^{2+} similar a la del Ba^{2+} . El segundo grupo de canales se caracteriza porque son activados con despolarizaciones superiores a -30 mV y el proceso de inactivación es lento, se denominan *canales de calcio activados a voltajes altos* y se ha demostrado la existencia de varios tipos, entre ellos, los

canales tipo L o *lentos*. Los canales tipo L muestran por lo regular, mayor permeabilidad al Ba^{2+} que al Ca^{2+} . La mayoría de las células excitables poseen canales del tipo L y T, estos últimos se abren por un tiempo muy breve en la fase inicial del potencial de acción. Aunque la función fisiológica de los canales T es aún desconocida, se presume que está relacionada con la generación de actividades repetitivas de tipo “marcapaso”. En la presinapsis de las neuronas se han detectado *canales del tipo N* y en las células de Purkinje los *canales de calcio de tipo P* que juegan un papel relevante a nivel de la unión neuromuscular en los mamíferos y regulan la liberación de acetilcolina (Nargeot y Charnet, 1994).

Los canales que operan por receptores se caracterizan porque se activan sin la despolarización previa de la membrana. Es difícil distinguirlos, aunque a diferencia de los canales de calcio voltaje-dependientes, los que operan por receptores no son inhibidos por los bloqueadores de calcio orgánicos o inorgánicos. Varios agonistas producen aumento en la concentración del Ca^{2+} intracelular como respuesta a la liberación del calcio almacenado y abren a la vez, los canales de calcio que operan por receptores (Suzuki y col., 1990). Es poco lo que se conoce aún sobre los canales que operan por receptores y también se ha cuestionado la existencia de ellos en la musculatura lisa, se les describe como una estructura modificada de los canales voltaje-dependientes. Por otra parte, se ha reportado la presencia de canales de Ca^{2+} operados por

un receptor purinérgico los cuales no se inhiben con nifedipina (Benham y Tsien, 1987).

Canales de calcio en los depósitos de almacenamiento intracelular

En el músculo liso, el RS constituye la fuente intracelular de almacenamiento de Ca^{2+} más importante. Como se mencionaba anteriormente, la mitocondria no juega realmente un papel preponderante en la regulación de la concentración del calcio libre intracelular, aunque en estados de patología, puede acumular cantidades importantes de calcio (Somlyo e Himpens, 1989). En la membrana del RS existen dos tipos de canales denominados *canales de liberación de calcio* porque cumplen con una función activa en la liberación del ion almacenado. El primero es un canal sensible al InsP_3 , inductor de la liberación de Ca^{2+} , el segundo, se activa cuando aumenta el Ca^{2+} en el citosol (liberación de Ca^{2+} - inducida por Ca^{2+}) (Streb y col., 1983; Somlyo y col., 1985; Hashimoto y col., 1986; Iino, 1989; Berridge, 1993, 1997; Komori y col., 1995; Ohta y col., 1995).

Estudios recientes señalan que el Ca^{2+} se almacena en el RS en compartimentos diferentes. El compartimento $S\alpha$ es sensible a los mecanismos de liberación de Ca^{2+} -inducido por calcio (CLC) y por InsP_3 (ILC), posee receptores de rianodina, cafeína y de InsP_3 . El compartimento $S\beta$ es activo sólo a ILC (Iino, 1988; Yamazawa y col., 1992; Itoh, 1992). Aunque la función que cumplen los receptores de rianodina y la identidad de los

mensajeros son aún desconocidos, se ha propuesto como mensajero a la ADP ribosa cíclica (ADPRc) un producto del metabolismo del β -NAD (Somlyo y Somlyo, 1994). Ha sido reportado que en la fibra longitudinal del músculo liso intestinal la ADPRc aumenta la liberación de Ca^{2+} -inducida por Ca^{2+} (Kuemmerle y Makhlouf, 1995).

Al igual que las células excitables (neuronas y músculos), las células eléctricamente no-excitables (epiteliales, eritrocitos, etc.) utilizan el calcio liberado de los depósitos intracelulares como uno de los mecanismos para generar señales de calcio en el citoplasma. Las células excitables lo logran por medio del mecanismo CLC, en tanto que las células no-excitables lo hacen predominantemente a través del mecanismo ILC (Berridge, 1993).

Observaciones que se han realizado con células de musculatura lisa intestinal indican que el influjo del Ca^{2+} a través de los canales de calcio voltaje-dependientes, aumenta la concentración del catión en el citoplasma, éste a su vez, puede servir de estímulo para iniciar la salida del calcio del RS vía el mecanismo CLC, activando de esta manera las corrientes de K^{+} -dependientes de Ca^{2+} ($I_{\text{K-Ca}}$) (Kitamura y col., 1989; Ohya y col., 1987; Sakai y col., 1988). Por otro lado, la disminución del contenido de calcio en los depósitos de almacenamiento, puede abrir una vía para el re-almacenamiento del Ca^{2+} intracelular y en este caso, la célula toma el calcio del medio extracelular (Ohta y col., 1995; Putney, 1990).

Formación y metabolismo del inositol trifosfato

En el músculo liso, así como en otros tejidos musculares, la unión de los agonistas con receptores específicos en la membrana que pertenecen en su gran mayoría al grupo de receptores acoplados a proteínas G, produce la activación de la fosfolipasa C (PLC). Las proteínas G constituyen heterotrímeros con subunidades $\alpha\beta\gamma$, una gran variedad de estas subunidades ya han sido identificadas. La generación de InsP_3 y de nucleótidos cíclicos son eventos que están mediados por proteínas G, la $G\alpha\beta\gamma$ activa el efecto de la PLC (Miller y Carsten, 1997).

El InsP_3 es un segundo mensajero que libera Ca^{2+} almacenado en el RS (Berridge, 1993; 1997); junto con el DAG, se genera tras la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, constituyente minoritario de los fosfolípidos en la membrana plasmática. En presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , la PLC cataliza la hidrólisis del fosfato unido al glicerol del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

La defosforilación del InsP_3 lleva a la formación de inositol y a la reincorporación del producto al *pool* de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. En el músculo liso intestinal se ha demostrado que por medio de una cinasa dependiente del ATP se puede fosforilar el grupo 3-hidroxilo del InsP_3 con la formación de inositol tetrakisfosfato (InsP_4) (Bielkiewicz y col., 1987). Se ha

propuesto que el InsP_4 abre los canales de calcio estimulando la entrada del catión desde el exterior para llenar los depósitos de almacenamiento intracelular (Irvine, 1992); sin embargo, es aún incierto el papel que juega en la homeostasis del Ca^{2+} . Con el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la vía metabólica se ve favorecida hacia la producción del InsP_4 , este último se inactiva formando InsP_3 y finalmente inositol.

La formación del InsP_3 , la liberación del Ca^{2+} de los depósitos de almacenamiento intracelular y la consecuente contracción del músculo liso son eventos que se desencadenan por la unión de un agonista con los receptores específicos en la membrana plasmática. Sin embargo, aunque la liberación del calcio intracelular, vía este mecanismo, es una concepción muy difundida, hay controversias respecto a que la liberación de Ca^{2+} por acción de las prostaglandinas siga el mismo patrón (Molnar y Hertelendy, 1990). La heparina por otra parte, compite por los sitios de unión del InsP_3 en el RS e inhibe la salida del Ca^{2+} almacenado en el organelo (Kobayashi y col., 1989).

Entrada capacitativa del calcio

Recientemente se ha dado atención al mecanismo conocido como *entrada capacitativa del calcio*. Cuando en 1983 se describió el papel importante que jugaba InsP_3 en la movilización del calcio, quedaba la sospecha de que este mensajero actuaba como la señal de salida del calcio intracelular.

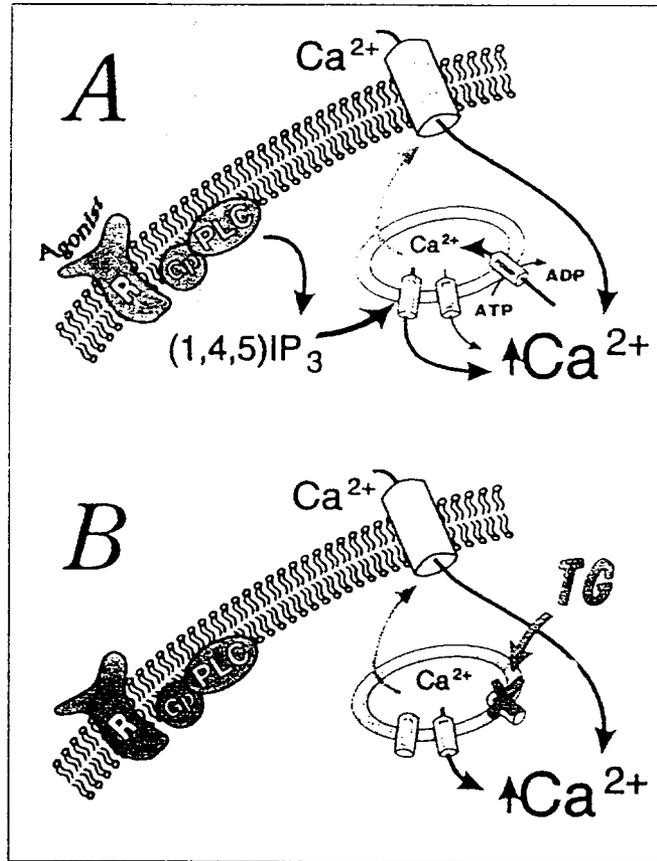


Fig.2 Entrada capacitativa de calcio .A) La activación del receptor (R) sirve de estímulo para activar la fosfolipasa C (PLC), generalmente el evento ocurre a través de un intermediario, las proteínas G. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato da por resultado la formación de $InsP_3$ éste activa a su vez canales que tienen receptores al $InsP_3$ y producen la salida de Ca^{2+} de los depósitos de almacenamiento intracelular. La salida del Ca^{2+} sirve de señal a un canal de entrada de calcio desde el medio extracelular. B) Los agentes SERCA como la tapsigargina (TG) inhiben la Ca^{2+},Mg^{2+} -ATPasa, el Ca^{2+} almacenado sale de los depósitos por canales abiertos y estimula la entrada del Ca^{2+} desde el medio extracelular.

Putney JW Jr, 1997

Más adelante se plantearía el modelo de la *entrada capacitativa de calcio* por medio del cual se establece que la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, activa la entrada del ion por un mecanismo que es independiente del InsP_3 o de la ocupación de los receptores (Putney, 1986; Takemura y col., 1989; Putney y Bird, 1993). La taspargina y el ácido ciclopiazónico que son inhibidores específicos de la Ca^{2+} -ATPasa del RS, producen depleción de los depósitos intracelulares y activan la entrada de calcio desde el medio exterior (Thastrup y col., 1994) (Figura 2).

Los estudios en torno a este tema se centran con interés en la naturaleza de la señal que establece el vínculo entre la depleción de los depósitos de calcio y los canales de calcio en la membrana plasmática. Para algunos investigadores, existe un acoplamiento estructural entre las proteínas de ambos sitios; para otros, el RS libera un mensajero que difunde hacia la membrana y activa los canales de calcio. En este último caso, se han propuesto una serie de mensajeros moduladores de la entrada capacitativa del calcio, a la fecha, no se ha demostrado claramente esta hipótesis (Putney, 1997).

En el músculo liso la tirosina cinasa es muy activa; a esta enzima se la ha vinculado con la contracción muscular mediada por receptores (Di Salvo y col., 1997). Por otra parte, se ha demostrado que la genisteína, que es un inhibidor de la tirosina cinasa, inhibe las contracciones mediadas por la entrada capacitativa de Ca^{2+} en tejidos cuyos depósitos de almacenamiento de

Ca^{2+} se han depletado (Ohta y col., 2000), lo que sustentaría la hipótesis de que la entrada capacitativa de Ca^{2+} es un proceso modulado por la tirosina cinasa; sin embargo, aún quedan dudas al respecto ya que se ha sugerido también, que la acción de genisteína ocurre a nivel de los canales de calcio dependientes del voltaje y no sobre la tirosina cinasa (Ohta y col., 2000).

Sistemas enzimáticos que participan en la regulación de la concentración del calcio intracelular

En la membrana plasmática del músculo liso, la bomba de Ca^{2+} forma parte del grupo de las Ca^{2+} -ATPasas. Es una proteína que en el músculo liso se caracteriza por tener un sitio de unión al Ca^{2+} , uno al ATP, un residuo aspartilo que es sitio para la fosforilación y un sitio de unión a la calmodulina. En presencia de Ca^{2+} , la Ca,Mg-ATPasa de la membrana plasmática interactúa con la calmodulina. Para que se lleve a cabo la función de la Ca,Mg-ATPasa se necesita un medio lipídico, se ha demostrado que el fosfatidil inosítido incrementa la afinidad de la bomba por el Ca^{2+} (Missiaen y col., 1989).

Agentes inductores de la salida del calcio almacenado en los depósitos intracelulares

La cafeína ejerce una acción directa y específica sobre el retículo sarcoplásmico (Karakı y col., 1987; 1988; Prestwich y Bolton, 1995b; Dessy y Godfraind, 1996). La metilxantina aumenta la sensibilidad del mecanismo CLC y como resultado de la liberación del calcio intracelular induce contracciones en el músculo liso, (Iino, 1989; Komori y col., 1995). Además del efecto contráctil, la cafeína resulta un poderoso relajante de la musculatura lisa en las preparaciones con tejidos pre-contraídos (Karakı y col., 1984). En preparaciones con aorta, se ha demostrado que el alcaloide relaja las contracciones inducidas con noradrenalina y con carbacol, también produce incremento del AMPc, inhibe los canales de calcio voltaje-dependientes (Hughes y col., 1990), produce hiperpolarización de la membrana (Van der Bent y Bény, 1991) e inhibe la actividad de la fosfodiesterasa y del InsP_3 (Toescu y col., 1992). El efecto relajante de la cafeína en el músculo liso se ha vinculado con la inhibición del metabolismo del AMPc.

Papel de la fosforilación de la miosina en la contracción y relajación del músculo liso

La calmodulina es una proteína que fija calcio en cuatro centros de unión de alta afinidad. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el citosol es mayor a $1\mu\text{M}$, la unión del catión a la calmodulina produce cambios conformacionales en la proteína lo

que permite al complejo Ca^{2+} -calmodulina interactuar con las enzimas que regula, entre ellas la proteína cinasa-dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (Ca-CaM) a la que activa (Dabrowska y col., 1977). La activación de la proteína cinasa arriba mencionada da como resultado la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y el incremento de la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa de la miosina activada por la actina (Adelstein y Eisenberg, 1980; Stull, 1980; Kamm y Stull, 1985; Hartshorne, 1987). La miosina como la proteína mayoritaria en los filamentos gruesos del músculo liso, está formada por dos cadenas pesadas, cada una con dos cadenas livianas de 20 000 y 17 000 daltones, respectivamente. Este antecedente ha conducido a una serie de estudios sobre el papel que juega la fosforilación de la miosina por acción de la cinasa de la cadena ligera de miosina-dependiente de Ca^{2+} -calmodulina en la regulación de la contracción del músculo liso (Frearson y col., 1976; Sobieszek, 1977; Kamm y Stull, 1985).

La relajación del músculo liso está mediada por AMPc. Este último, puede inhibir la interacción de la actina con la miosina vía un efecto sobre la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MCLK), reduciendo la sensibilidad al Ca^{2+} (Adelstein y Hathaway, 1979). Estudios recientes indican que la acción del AMPc depende en gran medida de la formación del complejo Ca-CaM. Cambios muy sutiles en la actividad de la Ca-CaM pueden afectar la capacidad del AMPc para inhibir la interacción de la miosina con la actina (Meisheri y Rüegg, 1983).

En las células del músculo liso, la contracción es el efecto resultante de la interacción de la Mg^{2+} -ATP de la miosina en los filamentos gruesos con la Mg^{2+} -ATP de la actina en los filamentos delgados. La fuerza de la contracción dependerá de la concentración del Ca^{2+} en el medio. Aunque se ha propuesto la existencia de otras vías alternas, la ruta prioritaria para la regulación de la contracción y relajación del músculo liso por el Ca^{2+} depende de los procesos de fosforilación/desfosforilación de la miosina (Figura 3). Según este modelo, la relajación del músculo liso se correlaciona con un descenso en la concentración del Ca^{2+} en el citosol, inactivación del MLCK y consecuentemente, la desfosforilación de la miosina por fosfatasas de la cadena ligera (Haeberle y col., 1985; Hoar y col., 1985; Rüegg y col., 1984). La actomiosina Mg^{2+} -ATPasa se desactiva y el músculo se relaja (Driska, 1987; Driska y col., 1989; Gong y col., 1992). Sin embargo, el modelo descrito no explica la capacidad que tiene el músculo liso de sostener la tensión por períodos prolongados, en circunstancias cuando los niveles de la cadena ligera de la miosina fosforilada son bajos (Dillon y col., 1981; Silver y Stull, 1982; 1984). Esto ha llevado a considerar la existencia de otros mecanismos diferentes al de la fosforilación/desfosforilación (Himpens y Somlyo, 1988; Himpens y col., 1988; Kamm y Stull, 1989) y una de las hipótesis plantea que el componente de la respuesta contráctil inicial involucra la activación de la MLCK por el complejo Ca-CaM, pero que la respuesta sostenida obedece a la activación de la proteína cinasa C en la membrana plasmática (Triggle y col., 1989).

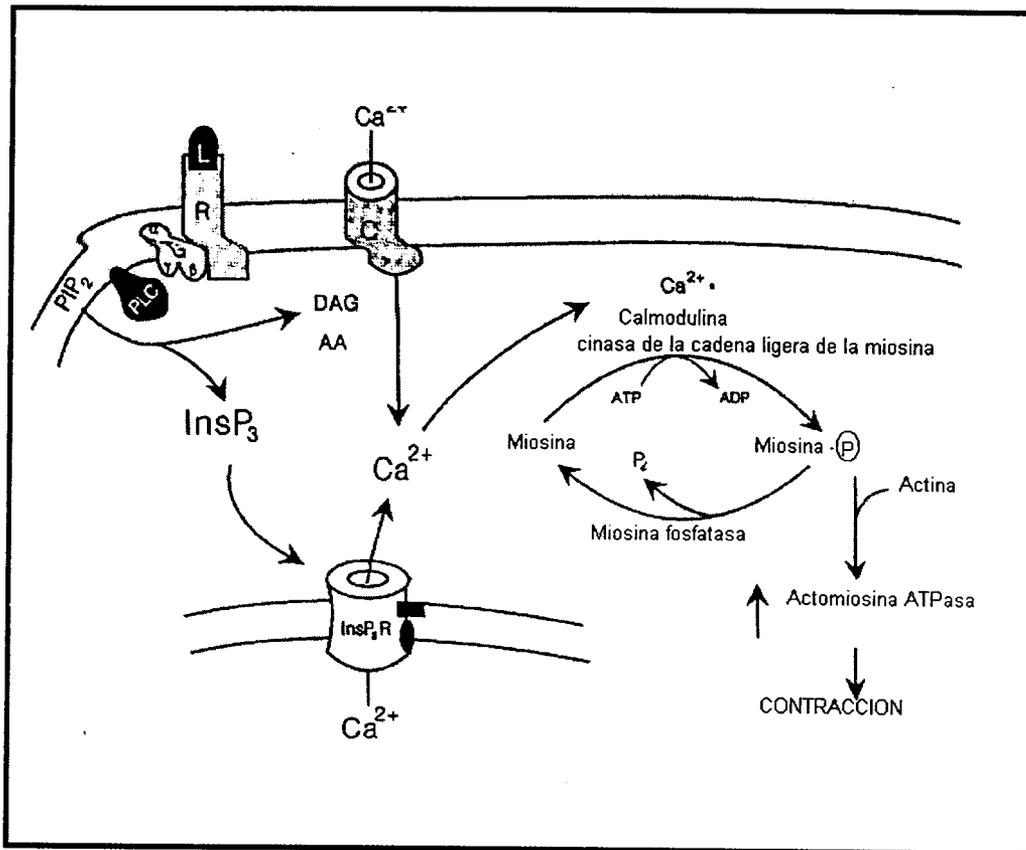


Fig.3 Contracción del músculo liso vía la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. El incremento en la concentración del Ca^{2+} intracelular se produce como resultado de la unión ligando-receptor y la activación del proceso de hidrólisis del fosfatidilinositol trifosfato para formar $InsP_3$ y consecuentemente liberar Ca^{2+} almacenado y/o por influjo del Ca^{2+} extracelular a través de los canales de calcio en la membrana plasmática. Adicionalmente, las proteínas reguladoras asociadas con el receptor para $InsP_3$, las proteínas G asociadas con los receptores de ligandos y la fosfolipasa C participan también en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$.

El Ca^{2+} se une a la calmodulina (Ca^{2+} -CaM) y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (miosina -P) va a depender de la activación que ejerce este complejo sobre la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Ca^{2+} -CaM-MLCK). La miosina-P interactúa con la actina para inducir la contracción, a su vez, la miosina-fosfatasa revierte el proceso de fosforilación.

Word y Kamm, 1997

ANTAGONISTAS DE CALCIO

Los estudios realizados por Fleckenstein y Godfraind en la década de los 70s abrieron un espacio al estudio de fármacos que tienen la propiedad de alterar la función del calcio en el proceso de la excitación-contracción (Fleckenstein, 1971; Godfraind y Kaba, 1972). En la actualidad, los agentes antagonistas de calcio tienen importante aplicación terapéutica en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como angina pectoris, infarto del miocardio, aterosclerosis e hipertensión. Los fármacos que han sido aprobados para su aplicación clínica se clasifican dentro del grupo de las dihidropiridinas, benzotiazepinas y fenilalquilaminas; son agentes que ejercen su acción por diversos mecanismos. Nifedipina, diltiazem y verapamilo bloquean los canales de calcio voltaje dependientes; prenilamina y fendilina son antagonistas no-selectivos que bloquean también los canales de calcio que operan por receptores, interfieren las actividades de la bomba Na^+ , Ca^{2+} , de la calmodulina, etc. Los antagonistas de calcio relajan la musculatura lisa vascular, disminuyen la resistencia periférica y la presión sanguínea. En la actualidad, la lista de antagonistas de calcio se ha incrementado e incluye compuestos que actúan a nivel de la membrana plasmática y también al interior de la célula. Los principales sitios de acción son los canales de Ca^{2+} -dependientes del voltaje, los canales de calcio que operan por receptores, la Ca^{2+} -ATPasa del citoplasma, la Ca^{2+} -ATPasa del RS, los canales en la membrana del RS que controlan la salida del Ca^{2+} y la bomba Na^+ , Ca^{2+} .

El primer antagonista de calcio descrito fue la papaverina, conocido relajante de la musculatura lisa intestinal. La necesidad de contar con agentes más específicos, ha llevado al estudio de plantas medicinales buscando moléculas prototipo. Ya se han realizado algunos programas de rastreo sobre la actividad antagonista de calcio de extractos de plantas (Ichikawa y col., 1989; Ko y col., 1991; 1993; Wagner, 1993; Rauwald y col., 1994; Vuorela y col., 1997) y se ha demostrado actividad antagonista de calcio en alcaloides, cumarinas, furanocumarinas, furanocromonas, estilbenos, lignanos, naftoquinonas, fenilpropanos, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos (Vuorela y col., 1997).

EL MÚSCULO LISO

Músculo lisode tipo fásico y tónico

Con base en la capacidad que tienen los músculos lisos de generar una respuesta contráctil, estos se han clasificado en músculos de tipo fásico o tónico. La estimulación con concentraciones altas de K^+ o con agonistas, producen en los músculos del tracto gastrointestinal, de algunos esfínteres o del músculo liso del miometrio, un aumento en la amplitud de la respuesta contráctil sin modificar el tono. A estos tejidos Golenhofen (1976; 1981) los clasificó como músculos liso tipo “fásico” los que, en contraste con los del

tipo “tónico” como es el caso de la musculatura lisa vascular y de las vías aéreas, responden lentamente al estímulo y los tiempos de contracción y de relajación son más prolongados, los tejidos se caracterizan por mantener la tensión por períodos muy largos y tienen membranas celulares que no responden con un potencial de acción ante el estímulo eléctrico, pero son altamente sensibles a la activación vía los receptores en la membrana. Algunos músculos lisos generan un patrón intermedio, contracciones fásicas que se superponen a la contracción tónica; el íleon, *taenia caecum* y venas presentan este comportamiento mixto (Ozaki y Karaki, 1993).

El comportamiento de estos tejidos se explicó en un principio tomando en consideración las diferencias que existían en las propiedades eléctricas de la membrana plasmática; más adelante se ha demostrado que no hay siempre una correlación estrecha entre la concentración del calcio en el citosol y el tiempo que perdura la fuerza de contracción del músculo lo que ha llevado a plantear que si bien, el calcio es el regulador fisiológico más importante de la contracción, la sensibilidad al calcio del aparato regulatorio contráctil difiere según se trate de músculo liso tipo fásico o tónico.

El nivel enzimático es otro factor que se contempla en la clasificación de los músculos fásico y tónicos. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción del músculo liso se han asociado con el proceso de fosforilación de la miosina (Ozaki y Karaki, 1993). El sistema Ca^{2+} /calmodulina/cinasa de la cadena ligera de

miosina, es por tanto, el mecanismo primario en la regulación de la contracción muscular (Hartshorne, 1987; Kamm y Stull, 1985). Sin embargo, cuando se despolariza con K^+ la aorta de la rata que es un músculo del tipo tónico, se observa que al inicio se produce una respuesta contráctil inmediata con el consecuente incremento de $[Ca^{2+}]_i$, posteriormente la tensión muscular sigue incrementando, sin embargo, la $[Ca^{2+}]_i$ comienza gradualment a bajar un 70% del nivel máximo. Este fenómeno se ha explicado con base en el mecanismo denominado *de cerrojo*, por medio del cual, se mantiene la fuerza de contracción en ausencia de miosina fosforilada (Dillon y col., 1981). Cuando el estímulo es resultado de la unión de un agonista con el receptor se ha observado que la amplitud de la contracción para una $[Ca^{2+}]_i$ determinada y la miosina fosforilada son mayores que cuando se estimula el tejido con K^+ . Estas observaciones sugieren que la sensibilidad de la miosina fosforilada al Ca^{2+} se incrementa con la interacción de ciertos agonistas con sus receptores como es el caso de la norepinefrina y las prostaglandinas en la aorta de rata (Sato y col, 1988), de la fenilefrina y derivados del tromboxano en la arteria pulmonar del conejo (Himpens y col., 1990), de carbacol en la tráquea del perro y de pilocarpina en el íleon de cobayo (Takayanagi y Ohtsuki, 1990).

En el músculo liso de tipo fásico, el K^+ en concentraciones altas incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ de manera sostenida, sin embargo, la fuerza de la contracción cae abruptamente cuando la concentración del K^+ resulta demasiado elevada. En este caso, se observa que la relajación y el proceso de desfosforilación de la

miosina (aumento de la actividad de las fosfatasa) son significativamente mayores que la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$.

Respuesta contráctil del íleon de cobayo

El íleon de cobayo ha sido descrito por algunos autores como un músculo liso tipo mixto (Ozaki y Karaki, 1993) y como músculo fásico por otros (Somlyo y Himpens, 1989). En este tejido, el tiempo de fosforilación de la cadena ligera de la miosina es extremadamente rápido y vuelve a los niveles basales en 30 segundos, en tanto que la fuerza de contracción permanece elevada (Himpens, 1988; Himpens y col., 1988;1989). El músculo se caracteriza además, porque cuando se incubaba en un medio despolarizante sin calcio, se produce una disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} del aparato regulador de la contracción.

El tejido despolarizado con K^+ aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ a través del influjo de calcio desde el medio extracelular; sin embargo, los estudios realizados con células en cultivo permiten asumir que la despolarización puede liberar calcio intracelular almacenado (Kobayashi y col., 1986). Por otra parte, se ha reportado que la disminución del Na^+ en el medio exterior activa la fosfolipasa C con el consecuente incremento del $InsP_3$, segundo mensajero que induce la salida de Ca^{2+} almacenado en el RS (Smith y col., 1989).

Modelos in vitro con íleon de cobayo

El íleon de cobayo ha sido el tejido más frecuentemente utilizado para el estudio de los antagonistas de calcio que actúan sobre el músculo liso intestinal. Comparado con el tejido intestinal del cobayo, en el de la rata, la respuesta contráctil inducida con acetilcolina (ACh) resulta poco sensible al verapamilo, nifedipina y dazodipina (Bates y col.,1982). El íleon de cobayo aislado tiene poca actividad contráctil espontánea y por lo regular presenta una línea basal estable, esto favorece la evaluación de los efectos que ejercen las sustancias sobre las contracciones inducidas. En preparaciones intactas, la membrana representa una barrera difícil de franquear cuando se desea evaluar los efectos de los compuestos sobre los depósitos de almacenamiento de calcio. Las preparaciones con tejido permeabilizado o “desnudo” (skinned) permiten evaluar la acción directa de los productos sobre la maquinaria contráctil. En el caso de tejidos permeabilizados con β -escina, una saponina aislada de las especies *Aesculus*, estos quedan desprovistos de la membrana funcional del plasma, pero mantienen intactos el RS y los filamentos contráctiles, también se preserva el sistema de transducción de señales acoplados a los receptores (Kobayashi y col., 1989; Kitazawa y Somlyo, 1990). De esta manera, los tejidos permeabilizados con β -escina responden al estímulo inducido con carbacol, cafeína e InsP_3 y son preparaciones que se utilizan con frecuencia para realizar estudios sobre la movilización del calcio intracelular.

ASPECTOS QUIMIOTAXONÓMICOS Y FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *BRICKELLIA*

227414

Clasificación botánica

El género *Brickellia* es originario del Nuevo Mundo, incluye alrededor de 100 especies que se propagan en forma silvestre desde los límites del sur de Canadá hasta Sudamérica. México concentra un gran número de sus especies, algunas poseen propiedades curativas y son reportadas para tratar problemas gastrointestinales (Aguilar y col., 1994).

Brickellia paniculata (Mill.) B.L. Rob. pertenece a la familia Asteraceae (Compositae), tribu Eupatorie y sub-tribu Alomiinae, sección Bulbostydis, sub-sección Coleosanthus. La planta se propaga de manera extensa en los estados de Chiapas, Oaxaca y Jalisco. La información en los bancos de datos del Herbario IMSSM reporta *ch'ail pox* y *prodigiosa* como nombres que dan a esta planta los tzetzales y tzotziles de los Altos de Chiapas (ejemplar de herbario n° 3800).

Constituyentes químicos

Los estudios químicos que se han realizado sobre un número amplio de las especies *Brickellia* permiten concluir que las partes aéreas de estas plantas poseen un contenido importante de flavonoides, especialmente de agliconas 6-

metoxiladas y glicósidos (Mues y col.,1979; Timmerman y col., 1979; Ulubelen y col.,1980; Li y col., 1986); se caracterizan además por la presencia de sulfatos 6-metoxiflavonoles (Mues y col.,1979; Roberts y col.,1980; Timmerman y col.,1981). Asimismo, la serie de diterpenos (Bohlmann y Zdero, 1976; Bohlmann y col., 1978; 1981; 1982) que se han identificado en las hojas, junto con los derivados de nerolidol aislados de la raíz (Bohlmann y Zdero, 1976; Bohlmann y col.,1978) son otros de los grupos importantes de constituyentes químicos en estas plantas.

Hispidulina, cirsimaritina, cirsiolol, pectolinarigenina, eupafolina, eupatina, artemetina y spinacetina son flavonoles comunes en el género; entre los glicósidos cabría mencionar la presencia de patuletina, patuletina 3-galactósido, eupalitina galactósido y eupatolitina 3-galactósido. Eupatolitina 3-sulfato, veronicafolina-3 sulfato, patuletina 3-sulfato. De las partes aéreas de *B. paniculata* se aisló 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona o xantomicro (Meckes y col., 1997; 2002a).

De las partes aéreas de *B. argyrolepsis* se aislaron diterpenos tipo labdano: derivados angelatos y tiglatos (Bohlmann y col.,1978), uno de ellos, el ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi,13,14Zdi-deshidrocatívico (C₂₅H₃₈O₅) fue obtenido de la especie *B. eupatoriedes* (Bohlmann y col.,1982) y más recientemente de *B. paniculata* (Meckes y col.,2002a). Los estudios químicos realizados con *B. paniculata* colectada en el estado de Oaxaca condujeron al aislamiento del

ácido 3 α -angeloiloxi,2 α -hidroxicatívico (C₂₅H₄₀O₅) (Gómez y col.,1983; Calderón y Viguera, 1990).

Propiedades farmacológicas

La planta es reportada para tratar dolor de estómago, cólicos y diarreas (Herbario IMSSM). Los antecedentes sobre los efectos biológicos de las especies del género *Brickellia* son escasos. Existen reportes sobre el efecto antiespasmódico *in vitro* que presenta el extracto metanólico de *B. paniculata* en íleon de cobayo estimulado eléctricamente (Tortoriello y col., 1995), respecto a la inhibición que produce el extracto de *B. glandulosa* sobre la contracción espontánea en el yeyuno de conejo (Jayme y col., 1993) y estudios realizados sobre el comportamiento que tiene el extracto acuoso de *B. veronicaefolia* en el tracto gastrointestinal del cobayo, rata y ratón (Pérez y col., 1996).

El contenido de los flavonoides lleva a establecer inmediatamente una correlación entre los efectos relajantes de la musculatura lisa intestinal detectados en las pruebas biológicas *in vitro* y el uso medicinal que tienen estas plantas en el tratamiento de los padecimientos gastrointestinales. Hay reportes acerca de la acción relajante que ejercen los flavonoides sobre la musculatura lisa, también sobre los mecanismos que explicarían dicha actividad (Abdalla y Abu Zarga, 1987; Abdalla y col.,1988;1989;1994;

Capasso y col.,1991; Morales y col., 1994; Tortoriello y col., 1996; Bergendorff y Sterner, 1995; Mustafa y col., 1992; Beretz y col., 1986; Hammad y Abdalla, 1997). Una situación diferente ocurre con los diterpenos y en este sentido hay campo interesante por explorar.

Brickellia paniculata es una hierba que se propaga de manera silvestre en varios estados de la República mexicana. En las prácticas médicas populares de los mayas del sureste del país, las hojas y los tallos se utilizan con propósitos terapéuticos para tratar el dolor de estómago y la diarrea acuosa, la planta se utiliza también en combinación con otras especies. Ch'ail ox o tuxnuk'cho son los nombre que frecuentemente se dan a la especie en la zona. Los estudios etnobotánicos señalan a la planta como un recurso herbolario importante para los pobladores (Berlin y Berlin, 1996; Berlin y col., 1996). En un rastreo farmacológico en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de las plantas más frecuentemente utilizadas en los Altos de Chiapas para tratar afecciones gastrointestinales y de las vías respiratorias, el extracto metanólico de las hojas y de los tallos de *Brickellia paniculata* presentó actividad moderada contra las cepas estándares de *Staphylococcus aureus* y fué inactivo contra *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Meckes y col., 1995). En preparaciones *in vitro* con íleon de cobayo, el extracto inhibió la contracción inducida por estimulación eléctrica (Tortoriello y col., 1995).

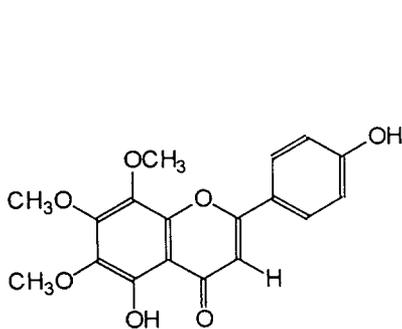
La investigación de *Brickellia paniculata* en una primera fase, trató sobre el estudio fitoquímico de las hojas de la planta. La medición de los efectos inhibitorios del producto vegetal sobre la excitabilidad de la musculatura lisa intestinal *in vitro*, sirvió como prueba biológica monitora. A lo largo del proceso de fraccionamiento químico, el rastreo de la actividad inhibitoria de la respuesta contráctil inducida con potasio (60 mM) condujo al aislamiento y a la purificación de los dos compuestos mayoritarios, responsables del efecto relajante de la musculatura lisa intestinal del cobayo. La caracterización estructural de estos principios activos por medio de procedimientos espectroscópicos y espectrométricos (ultravioleta, infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear) permitió la identificación del compuesto 5,4'-dihidroxi-6,7,8 trimetoxi flavona y del ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi-13,14Z di-deshidrocatívico, este último es diterpeno de tipo labdano (Figura 4). Ambos compuestos se encuentran en diferentes especies del género *Brickellia* y sus estructuras químicas han sido anteriormente descritas en la literatura (Stout y Falk, 1961; Bohlman y col., 1976; 1978, 1981; 1982); sin embargo, hasta el momento no hay reportes referente a los efectos biológicos que posee el diterpeno.

Fig. 4

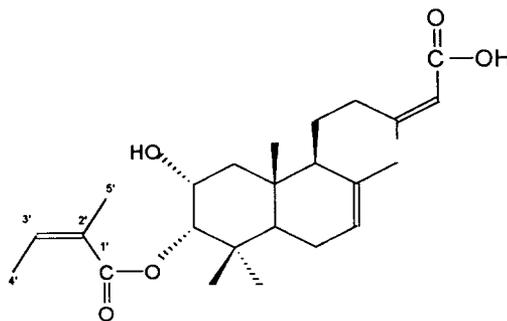
**COMPUESTOS AISLADOS DE *BRICKELLIA PANICULATA*,
RELAJANTES DE LA MUSCULATURA LISA INTESTINAL
DEL COBAYO *IN VITRO***

Xantomicrol (1) $C_{18}H_{16}O_7$; UV(EtOAc); λ_{max} nm = 331, 272; IR: ν_{max} = 3424, 1648, 1596, 1464, 1356, 1280, 1238 cm^{-1} ; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 3.71; 3.77, 3.88 (9H, s, OMe-6,7,8), 6.83 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, J = 9 Hz, H-2', 6'), 7.95 (2H, d, J = 9 Hz, H-3', 5'), 10.3 (1H, sa, OH-4'), 12.6 (1H, s, OH-5).

ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi-13,14Z-deshidrocatívico (2): $C_{25}H_{38}O_5$; $[\alpha]_D^{25}$ = +29.0 (c, -3.6 mg/mL, $CHCl_3$); IR: ν_{max} = 3518, 2968, 1668, 1648, 1446, 1388, 1244, 1164, 1065 cm^{-1} ; 1H -NMR (CD_3OD): δ = 0.84 (3H, s, Me-20), 0.88 (3H, s, Me-19), 1.04 (3H, s, Me-18), 1.78 (3H, s, Me-17), 1.93 (9H, m, Me-16; Me-4', Me-5'), 2.50 (1H, m, H-12), 2.90 (1H, m, H-12), 4.13 (1H, brd, H-2), 5.01 (1H, d, J = 1.65 Hz, H-3), 5.42 (1H, brs, H-7), 5.63 (1H, s, H-14), 6.16 (1H, qq, H-3').



xantomicrol



ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi-
13,14 Z deshidrocatívico

La valoración de la actividad relajante sobre la musculatura lisa intestinal del cobayo *in vitro* indicó, en cierto modo, un comportamiento similar para ambos productos: 1) relajan la musculatura lisa intestinal del cobayo con una potencia cercana; 2) inhiben con igual potencia a los componentes de la respuesta fásica y tónica de la contracción inducida por la despolarización con K^+ (60 mM); 3) presentan un efecto bloqueador de la respuesta contráctil evocada por agentes espasmogénicos como la acetilcolina y la histamina; 4) las propiedades relajantes de la musculatura lisa intestinal se correlacionaron con una acción antagonista sobre el calcio. Sin embargo, un comportamiento distinto se observó en las curvas concentración-respuesta sobre el calcio. A diferencia del flavonoide que actúa como un antagonista de calcio no-específico, el diterpeno, en forma dependiente de la concentración, produjo desplazamiento paralelo hacia la derecha, lo que sugeriría una acción antagonista de tipo competitivo. La potencia antagonista del efecto es mediana si se compara con la reportada en la literatura para otros antagonistas de calcio como son nifedipina, verapamilo y diltiazem ($pA_2 = 9.5, 7.8$ y 7.6 , respectivamente). El valor pA_2 calculado para el ácido 3α -angeloiloxi, 2α -hidroxi-13,14 Z di-deshidrocatívico fue 4.63, cifra cercana a la determinada para la papaverina en el mismo modelo (Godfraind y col., 1986). Los resultados obtenidos en esta fase del estudio permitieron justificar, en cierta medida, el uso popular que tiene la planta para tratar cólicos y dolor abdominal (Meckes y col., 1997; 2002a).

JUSTIFICACIÓN

En México, son numerosas las plantas medicinales que la población reconoce por sus propiedades curativas en el tratamiento de la diarrea, cólicos y dolor de estómago. Varias de estas especies han sido sometidas a estudios experimentales de carácter fitoquímico y farmacológico. El contenido de flavonoides en estas plantas y los efectos relajantes que producen sobre la musculatura lisa intestinal *in vitro*, han explicado en cierta forma, el uso medicinal que tienen las especies como antiespasmódicos (Abdalla y Abu Zarga, 1987; Capasso y col., 1991; Morales y col., 1994; Tortoriello y col., 1996; Bergendorff y Sterner, 1995). En otros casos, además del contenido de flavonoides, se han detectado compuestos terpenoides con efectos biológicos similares (Meckes y col., 1996; Mata y col., 1996; Mezquita y Rivero, 1997).

Los reportes que existen sobre plantas medicinales de México con efectos antiespasmódicos, por lo regular, son estudios en los cuales se presenta la evidencia de un efecto relajante sobre la musculatura lisa intestinal *in vitro*. Aunque se sugiere en ellos un posible mecanismo que media el efecto espasmolítico de los principios activos, la metodología empleada en estos estudios, no permite profundizar en los mecanismos de acción involucrados en la respuesta biológica. El efecto antagonista de calcio de tipo competitivo que presenta un diterpeno tipo labdano aislado de *Brickellia paniculata*,

planta medicinal de los Altos de Chiapas utilizada como antiespasmódico, llevó a plantear el estudio del mecanismo de acción involucrado en la actividad relajante sobre la musculatura lisa intestinal. Conocer con detalle la composición química de *Brickellia paniculata* y el modo de acción de los principios activos aportaría un avance en el conocimiento de las propiedades terapéuticas atribuidas a la planta y la posibilidad de establecer las potencialidades que tiene como antiespasmódico para su uso en la clínica.

HIPÓTESIS

1. El compuesto activo actúa sobre los canales de calcio en la membrana plasmática bloqueando el influjo del calcio extracelular e interrumpiendo la señal para la liberación del ion a partir de los depósitos intracelulares.
2. La inhibición que produce el principio activo sobre la respuesta contráctil fásica inducida por despolarización con K^+ , responde a una acción directa del compuesto sobre los sitios en los depósitos intracelulares, sensibles al Ca^{2+} , a la rianodina y a la cafeína.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la actividad calcio antagonista que presenta el ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi-13,14 Z di-deshidrocatívico está mediada por una acción a nivel de los canales de calcio en la membrana plasmática bloqueando la entrada del Ca²⁺ y/o por una acción a nivel intracelular inhibiendo la liberación del catión a partir de los depósitos intracelulares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Montar preparaciones con fibra longitudinal de íleon de cobayo para la realización de los estudios.
2. Determinar los efectos que tiene el compuesto diterpénico sobre la contracción inducida por despolarización con una solución alta en K⁺ (60 mM), con Ca²⁺ (2 mM) y en presencia de agentes que alteran la homeostasis del calcio a nivel del RS.
3. Estandarizar el modelo "del lantano", para determinar probables efectos del compuesto activo sobre la entrada del calcio extracelular.
4. Estandarizar el modelo para estudiar en preparaciones con tejidos "desnudos", la acción del compuesto activo sobre la movilización del calcio a nivel de los depósitos de almacenamiento intracelular.

MATERIAL Y MÉTODO

Ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi, 13,14Z di-deshidrocatívico (AAHDD)

Para el estudio se dispuso de una cantidad de 6.5 g del ácido 3 α -angeloiloxi, 2 α -hidroxi, 13,14Z di-deshidrocatívico, producto aislado en un estudio anterior a partir del extracto metanólico de las hojas de *Brickellia paniculata* (Meckes y col., 2002a). La estabilidad del compuesto se corroboró por medio de un nuevo espectro RMN-¹H obtenido al inicio del presente trabajo.

Preparaciones con tiras de fibra longitudinal

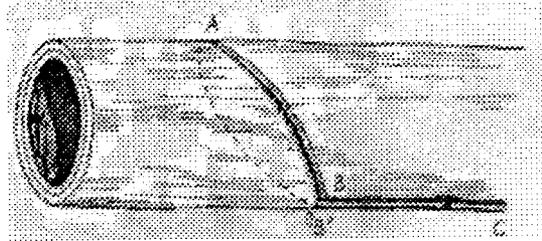
En el estudio se utilizaron cobayos Hartley machos con un peso corporal variable entre 400 y 600 g. Los animales se mantuvieron en ayuno de 16 horas, con libre acceso al agua y se sacrificaron por golpe en la nuca y posterior desangrado. Para el montaje de las preparaciones con tejidos aislados se utilizó íleon en su porción cercana al ángulo íleo-cecal descartando los primeros 10 cm, el resto de intestino se mantuvo en solución Tyrode normal (T₁) a 37 °C y con burbujeo constante de 95% O₂-5% CO₂. La membrana mesentérica se desprendió y para extraer totalmente el contenido de las heces fecales remanentes en el intestino se perfundió la solución a través del lumen. A continuación se cortaron segmentos de 1.5-2.0 cm de

longitud abriendo el tejido con un siguiente corte longitudinal (Figura 5A). En los estudios se utilizó la fibra longitudinal del músculo liso y para la disección se tomó como base la técnica reportada por Rang (1964). El segmento de íleon abierto se bañó en el medio y con ayuda de una pinza curva se ejerció presión tangencialmente para eliminar la serosa y capas del músculo circular, se desprendió luego el paquete transparente de fibras longitudinales (1.0-1.5 mm de ancho por 20 mm de largo aproximadamente) (Figura 5B). Las tiras se suspendieron verticalmente en los baños para órganos aislados y se incubaron las preparaciones en 10 ml de T₁ a 37 °C, manteniendo el burbujeo continuo de 95% O₂-5 %CO₂. El contenido de la solución T₁ expresado en mM fue el siguiente: NaCl, 136; KCl, 2.68; CaCl₂, 1.84; MgCl₂, 0.49; NaH₂PO₄, 0.36; NaHCO₃, 11.10; glucosa, 11.10 y se ajustó la solución a pH 7.4. Uno de los extremos de la tira se fijó a la cámara y el otro extremo se enlazó con un transductor de desplazamiento FTO3 acoplado al polígrafo Grass-7D, previamente calibrado a una sensibilidad de 2 mV/cm y 1 g de tensión. Los tejidos se estabilizaron en la solución durante 50-60 min, cambiando el medio cada 20 min.

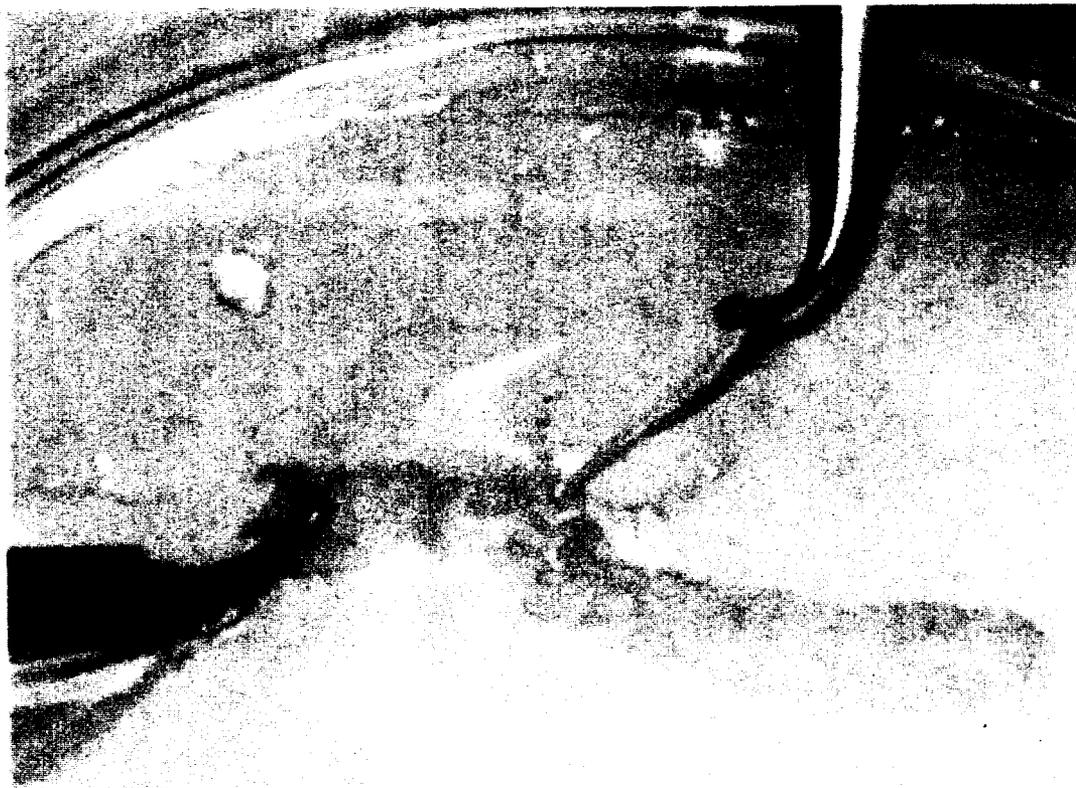
Efectos del compuesto AAHDD sobre las contracciones inducidas con K⁺ (60mM)

Una vez estabilizadas las preparaciones en el medio T₁, se indujo la contracción de los tejidos con una solución Tyrode alta en potasio (T₂) en la que se hizo una sustitución equimolar de Na⁺ por K⁺, (en mM): NaCl, 78.68;

KCl, 60.00; CaCl₂, 1.84; MgCl₂, 0.49; NaH₂PO₄, 0.36; NaHCO₃, 11.10 y glucosa 11.10. Luego de lavar con T₁ se repitió el procedimiento para la



A. Segmento del tejido



B. Músculo liso longitudinal

Figura 5. *Preparación de la fibra longitudinal del músculo liso intestinal de cobayo. La capa del músculo longitudinal se desprende del tejido ejerciendo presión tangencial sobre uno de los extremos del segmento abierto (B-B'-C). El proceso se lleva a cabo manteniendo el tejido sumergido en la solución a 37 °C.*

despolarización de la fibra hasta obtener una respuesta contráctil similar a la anterior. El efecto contráctil producido se registró durante 45-50 min, lapso en el que se obtuvo un valor constante de la contracción tónica ($E_{max}=100\%$). A continuación se aplicaron cada 3 min concentraciones acumulativas del compuesto AAHDD (5-45 μM) hasta inhibir por completo la contracción inducida. La tensión registrada con la adición de AAHDD se expresó como valor porcentual respecto al E_{max} . Asimismo, se determinó la recuperación del músculo después de lavar los tejidos con T_1 . En el estudio se incluyeron observaciones con los agentes antagonistas de calcio verapamilo y papaverina, utilizados como patrones de referencia. Para la determinación de los efectos de AAHDD sobre la respuesta contráctil fásica, el compuesto se adicionó en concentraciones variables (10-80 μM), 15 min antes de cambiar el medio normal por la solución despolarizante alta en K^+ (60 mM).

Efectos del ácido ciclopiazónico y de la rianodina en el comportamiento del AAHDD

Una vez que se estabilizaron las preparaciones en T_1 se sustituyó el medio por una solución Tyrode similar a T_1 pero sin calcio (T_3) y se prolongó la incubación durante 40-60 min cambiando la solución cada 20 min. Los tejidos se despolarizaron con una solución similar al medio T_2 pero sin calcio (T_4). En aquellos casos en los que aún se registraba una señal contráctil, las preparaciones se lavaron y se prolongó el período de incubación de los tejidos

en el medio libre de calcio T_3 o bien, se adicionaron al baño 10 mM de cafeína para que se liberara completamente el calcio almacenado en el RS. La respuesta contráctil se indujo con 2 mM de Ca^{2+} y se repitió la observación hasta reproducir la amplitud máxima de la respuesta contráctil (E_{max}). A continuación, los tejidos depletados del calcio intracelular se incubaron por 10 min en el medio T_4 adicionando luego 10 μ M de ácido ciclopiazónico (ACPZ). Después de incubar las preparaciones con el inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa durante 10 min, se indujo la contracción con 2 mM Ca^{2+} ($E'_{max}=100\%$). La observación se repitió tras aplicar a cada tejido AAHDD (5-80 μ M), 15 min antes de proceder a la despolarización de los mismos con T_4 . La respuesta contráctil del Ca^{2+} para cada concentración del AAHDD se expresó como porcentaje respecto al E'_{max} en el caso de los tejidos tratados con ACPZ y respecto a E_{max} para los valores de la curva control sin ACPZ. Se incluyó en el ensayo la valoración de la actividad del verapamilo en concentraciones 1×10^{-3} - 1×10^{-1} μ M como agente antagonista de los canales de calcio dependientes del voltaje.

En otra serie de estudios, las preparaciones se incubaron en condiciones similares a las descritas en el inciso anterior sustituyendo en este caso el ACPZ por 30 μ M de rianodina, un agente que libera Ca^{2+} del RS y deja abiertos los canales sensibles al mecanismo de liberación de Ca^{2+} -inducido por calcio (CLC) (Figura 1).

Preparaciones con fibra longitudinal permeabilizada con β -escina

Para la serie de estudios en los cuales se utilizó fibra longitudinal permeabilizada, se tomó como base el procedimiento reportado por Seitz y colaboradores (1997), con modificaciones a la técnica tales como la concentración de la saponina aplicada para la permeabilización de los tejidos y el $pCa = -\log [Ca^{2+} \text{ libre}]$ utilizado en la fase contráctil del tejido. Las preparaciones, dispuestas verticalmente en el baño de tejidos aislados y tensadas a 1g se estabilizaron en 10 mL del medio a 32 °C y con burbujeo continuo de 95% O_2 -5% CO_2 . La composición del medio fue la siguiente: (mM) NaCl, 120; KCl, 4; $CaCl_2$, 2.5; $MgCl_2$, 1.1; NaH_2PO_4 , 0.4; $NaHCO_3$, 25; glucosa, 10 y ácido pirúvico, 10; pH=7.4. Posteriormente, los tejidos se incubaron 5 min en una solución relajante libre de Ca^{2+} , alta en K^+ (en mM): KCl, 120; $MgCl_2$, 1.1; $NaHCO_3$, 25; NaH_2PO_4 , 0.4; glucosa, 10, ácido pirúvico, 10 y EGTA, 2 (pH=7.4) y se permeabilizaron con 40 μM de β -escina incubando con la saponina durante 30 min. Con el propósito de cargar el RS con calcio, los tejidos permeabilizados se bañaron luego en una solución contráctil de composición similar a la solución relajante, pero adicionando una cantidad apropiada de $CaCl_2$ calculada la concentración del Ca^{2+} libre a pH 7.4 y 32 °C (Harafuji y Ogawa, 1980; Fabiato y Fabiato, 1975). Después de 10 min de incubación en el medio contráctil, las preparaciones se lavaron con una solución relajante que contenía 0.2 mM de EGTA. La respuesta

contráctil inducida con cafeína se obtuvo en un medio relajante que contenía 20 mM de cafeína y 0.05 mM de EGTA.

Medición de la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en las preparaciones contraídas con K^+

Para establecer un probable efecto del AAHDD sobre el influjo del Ca^{2+} a través de los canales de calcio en la superficie de la membrana celular, se midió la capacidad del tejido tratado con AAHDD para incorporar $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en el interior de la célula. El modelo se basó en el diseño reportado anteriormente en la literatura (Karakı y Weiss, 1979; Goodman y Weiss, 1971). Las tiras de fibra longitudinal (3 x 10 mm) se mantuvieron durante 2 horas a 30 °C en condiciones de burbujeo continuo con 100% O_2 en una solución Tyrode-Tris (T-Tr): NaCl, 123.7; KCl, 2.7; CaCl_2 , 2.5; MgCl_2 , 1; tris (hidroximetil) aminometano, 25; glucosa, 5.5 (mM) a pH=7.4. Los tejidos se transfirieron luego a una solución hipertónica T-Tr (60 mM K^+) + 2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^{45}Ca (act.esp.=18 mCi/mg; Perkin-Elmer), después de incubar por 30 min, se lavaron las preparaciones con una solución que contenía LaCl_3 , 68.7; glucosa, 5.5 y Tris -HCl 25 (mM) a 1 °C y burbujeo de 100% O_2 . El lantano tiene la propiedad de desplazar al Ca^{2+} unido a la membrana inhibiendo de esta manera el influjo transmembranal del calcio (Weiss, 1974; Uyama y col., 1993). Después de 30 min, el tejido se secó haciendo presión entre dos hojas de papel filtro, se digirió con 300 μL de peróxido de hidrógeno a 150 °C y la

radioactividad de la muestra solubilizada en Eco Lume (ICN) se contó en un detector de centelleo líquido. Para determinar los efectos del AAHDD en la incorporación del $^{45}\text{Ca}^{2+}$, una serie de tejidos se trató durante 15 min con concentraciones variables del compuesto (25, 50 y 100 μM) antes de incubarlos en la solución despolarizante con $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Efectos del AAHDD sobre el flujo del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en un medio alto en concentración de K^+

Las preparaciones incubadas en 3 ml del medio T-Tr + ^{45}Ca (6.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) se despolarizaron con K^+ (60 mM) agregando la cantidad apropiada de una solución 2 mM KCl al baño. Después de 30 min, los tejidos se lavaron de manera sucesiva y a intervalos de 5 min con la solución hipertónica, no-radioactiva, con o sin AAHDD (100 μM). Las muestras eluidas, así como las tiras de fibra tratadas, se solubilizaron en Eco Lume (ICN) y la radioactividad de las muestras se contó en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Los resultados obtenidos en la serie de estudios con calcio radioactivo se expresaron como el contenido aparente de ^{45}Ca en el tejido de acuerdo con la fórmula habitualmente reportada en la literatura y en la que se expresa la radioactividad de las muestras en cpm (cuentas por minutos) (Orallo y col., 1991).

$$^{45}\text{Ca}^{+2} \text{ (nmol/kg de peso)} = \frac{\text{cpm en tejido}}{\text{peso (kg)}} \times \frac{\text{nmol Ca/L medio}}{\text{cpm/L medio}}$$

Efecto del AAHDD sobre la contracción tónica inducida por el Mn^{2+} en un medio libre de Ca^{2+} , alto en K^+

Las tiras de fibra longitudinal se estabilizaron en el medio T_1 a 37 °C y con burbujeo continuo de 95% O_2 -5% CO_2 . La respuesta contráctil se indujo con una solución hipertónica de K^+ (60 mM) y se determinó el efecto máximo de la contracción tónica ($E_{\text{max}}=100\%$). Después de lavar los tejidos, las preparaciones se incubaron 60 min en el medio T_3 libre de calcio, cambiando la solución cada 10-15 min. Después de aplicar AAHDD (10-80 μM) e incubar los tejidos con el compuesto durante 10 min, se adicionó al baño la solución hipertónica de K^+ , prolongando la incubación de los tejidos en este medio 10 min más. Finalmente, se adicionó el Mn^{2+} (5 mM) y se registró el aumento gradual del efecto contráctil producido a las 3 y 4 horas de aplicado el manganeso. En el estudio se contempló una serie de tejidos control sin AAHDD y otra de tejidos tratados con verapamilo como el antagonista de los canales de calcio tipo L, utilizados como patrón de referencia.

Para determinar la concentración del Mn^{2+} en el tejido, las preparaciones se lavaron varias veces durante 30 min con un medio Tyrode normal sin Mg^{2+} y sin Ca^{2+} que contenía 5 mM de EDTA para eliminar el manganeso unido a la

membrana celular. Las tiras se secaron a temperatura ambiente, se pesaron y se calcinaron en una mufla a 200 °C por 3 horas. Las muestras se disolvieron en 0.1M HCl y la concentración del Mn^{2+} se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

Expresión de los resultados y análisis estadístico

En los estudios se utilizaron 6-10 preparaciones (tejidos tratados sólo una vez) por cada punto. Los valores se expresaron como promedio \pm desviación estándar y por la prueba de t Student pareada se determinó la significancia de la diferencia entre los valores ($p < 0.05$). La potencia del efecto se expresó como el valor CI_{50} (la concentración de AAHDD que inhibió la respuesta contráctil máxima en un 50%) calculada mediante ajuste no lineal con el programa Sigma Plot. Los valores pCa ($-\log [Ca^{2+}\text{-libre}]$) se determinaron por medio de un programa especialmente diseñado para el cálculo de la concentración total de los sustratos en las soluciones que tienen una concentración específica de iones libres y en el que se incluyó la constante de asociación del complejo Ca-EGTA propuesto por Schwartzbach (Fabiato y Fabiato, 1975; 1978).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diterpeno labdano 3α -angeloiloxi, 2α -hidroxi-13,14Zdi-deshidrocatívico (AAHDD) aislado de las hojas de *Brickellia paniculata* constituye uno de los principios activos, relajantes de la musculatura lisa intestinal *in vitro* (Meckes y col., 2002 a). El contenido del compuesto en las hojas es elevado (1.5%) y en condiciones ambientales de temperatura, luz y de humedad, la molécula es estable.

En el músculo liso intestinal del cobayo *in vitro*, concentraciones altas de K^+ producen una contracción inmediata y transitoria (respuesta fásica) seguida de una respuesta contráctil sostenida (tónica). El bloqueo de la respuesta contráctil con un antagonista de Ca^{2+} cuyo sitio de acción son los canales de calcio dependientes del voltaje, producirá inhibición de la componente tónica de manera significativamente más marcada que la respuesta fásica.

La adición acumulativa del compuesto AAHDD inhibió la contracción tónica máxima inducida con K^+ (60 mM), el efecto antagonista observado mantuvo una relación dependiente de la concentración del diterpeno (Figura 6).

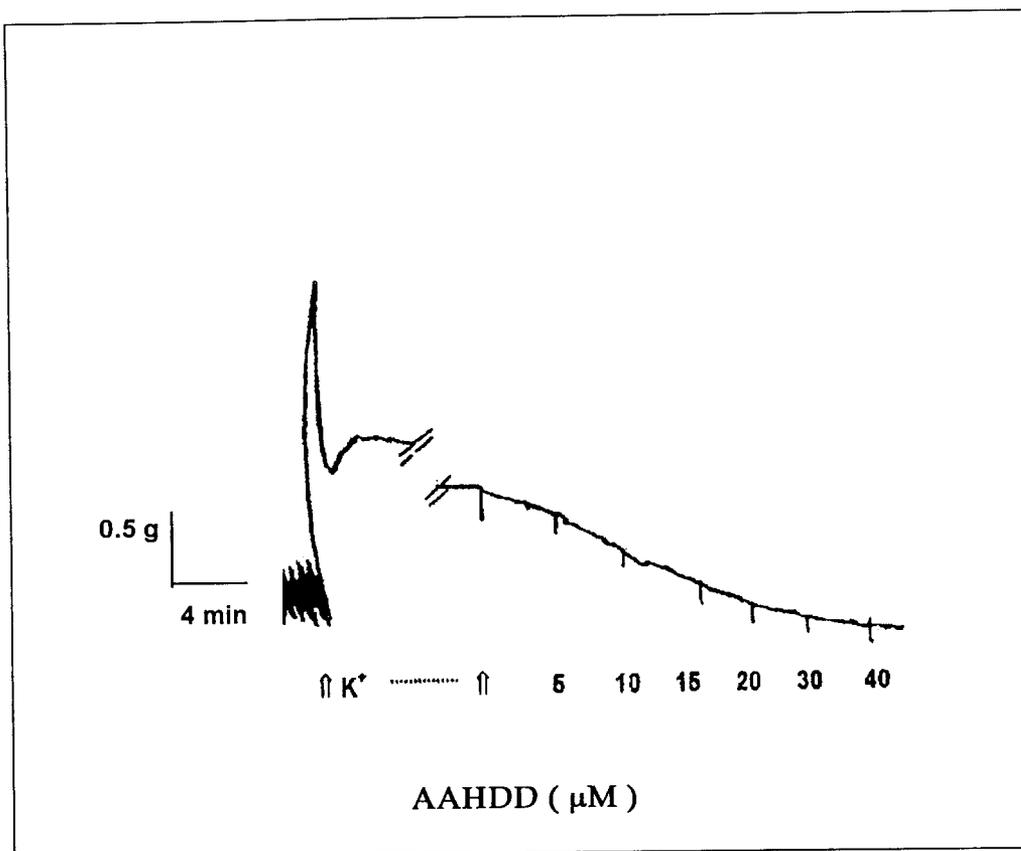


Fig.6 Registro característico de la respuesta tónica que produce la contracción inducida con una solución elevada en K^+ (60 mM). Al inicio se registra una contracción inmediata y rápida (fásica) seguida de una contracción menor en amplitud y sostenida, estable después de 30-40 min (respuesta tónica). La adición de concentraciones acumulativas de AAHDD produce inhibición de la respuesta contráctil tónica.

Con el propósito de establecer un valor comparativo de la potencia que presenta el compuesto AAHDD respecto a otros antagonistas de calcio ya conocidos, en los estudios se incluyó la determinación de los efectos producidos por verapamilo y papaverina. Cabe recordar que verapamilo es un antagonista selectivo de los canales de calcio voltaje-dependientes, papaverina es un relajante de la musculatura lisa que presenta acción antagonista de

calcio inespecífica. Los valores CI_{50} determinados para AAHDD, verapamilo y papaverina fueron $15.52 \pm 1.93 \mu\text{M}$ (n=31), $0.016 \pm 0.005 \mu\text{M}$ (n=18) y $6.70 \pm 1.31 \mu\text{M}$ (n=18), respectivamente (Tabla 2).

CONTRACCIÓN INDUCIDA CON K^+ (60 mM) EN TIRAS DE FIBRA LONGITUDINAL				
Agente bloqueador de la respuesta contráctil	fásica CI_{50} (μM)	tónica CI_{50} (μM)	CI_{50} fásica/ CI_{50} tónica	
AAHDD	110.39 ± 21.42 (6)	15.52 ± 1.93 (31)	7.11	
Verapamilo	2.90 ± 0.68 (6)	0.016 ± 0.005 (18)	181.25	
Papaverina	23.83 ± 8.39 (6)	6.70 ± 1.31 (18)	3.56	

Tabla 2. Potencia del efecto inhibitor que poseen el compuesto AAHDD aislado de *Brickellia paniculata* y los antagonistas de Ca^{2+} verapamilo y papaverina, sobre las respuestas fásica y tónica de la contracción inducida con concentraciones elevadas de K^+ (60 mM) en preparaciones con fibra longitudinal de ileon de cobayo. Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar de (n) tejidos.

Los resultados en estos estudios indican que la potencia del verapamilo como inhibidor de la contracción inducida con K^+ (60 mM) tiene un orden 1×10^3 superior al que presenta AAHDD; diferente de la papaverina que es sólo dos veces más potente que el compuesto en cuestión. Después de lavar las preparaciones, la actividad de los tejidos se recuperó en un 90% en el caso de

las preparaciones tratadas con verapamilo y en 70-80% cuando a los tejidos se les aplicó AAHDD o papaverina.

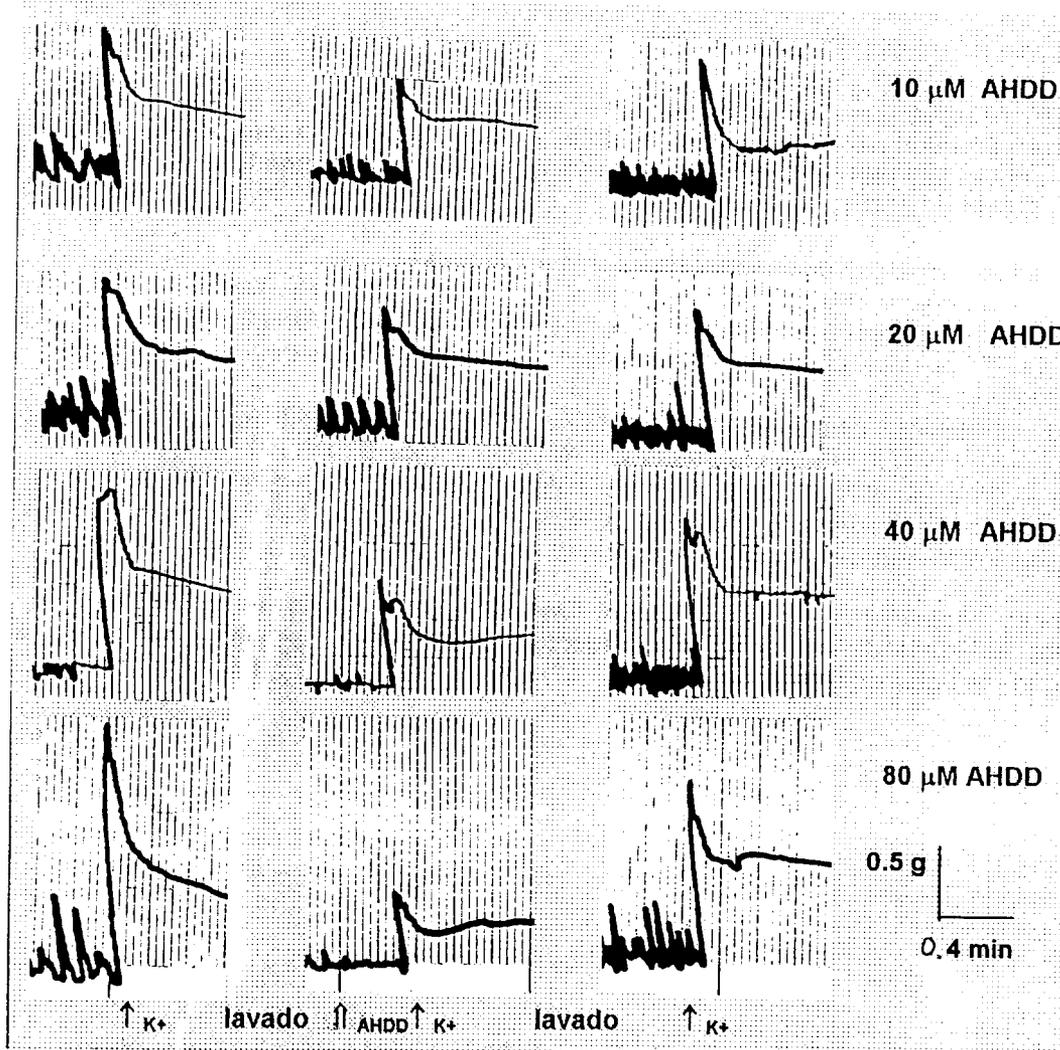


Fig. 7 Inhibición de la contracción fásica en cuatro tejidos tratados con la concentración respectiva del compuesto AAHDD (10-80 μM), después de obtener el registro control de la respuesta contráctil inducida con K^+ (60 mM). La recuperación de los tejidos tratados con el compuesto fue < 100%.

La contracción fásica inducida con una solución isosmótica de K^+ (60 mM), también fue bloqueada por AAHDD en forma concentración-dependiente (Figura 7) y los valores de la potencia del efecto inhibitor sobre la contracción fásica CI_{50} determinados para AAHDD, verapamilo y papaverina fueron $110.39 \pm 21.42 \mu M$, $2.90 \pm 0.68 \mu M$ y $23.83 \pm 8.39 \mu M$ respectivamente (Tabla 2).

En las preparaciones con fibra longitudinal, el efecto inhibitorio que posee el diterpeno AAHDD sobre la respuesta contráctil tónica inducida con KCl (60 mM) tiene una potencia cercana a la que fuera determinada en un estudio anterior utilizando el segmento completo del íleon aislado. Por el contrario, la potencia del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil fásica fue menor en la fibra longitudinal (Meckes y col., 2002a). Aunque existen reportes que señalan que la interferencia que producen ciertos agentes en la movilización del calcio extra e intracelular puede variar de manera importante según la región del tejido intestinal que se registra (Okamoto y col., 1997), no hay antecedentes respecto a diferencias entre el efecto que producen los antagonistas sobre la respuesta contráctil fásica en la fibra longitudinal del íleon respecto al del tejido completo. Sin embargo, entre ambos estudios, la diferencia reside en que la contracción fásica se indujo en las preparaciones con tejido completo con una solución hipertónica de K^+ (60 mM) y en el presente estudio, la fibra longitudinal se contrajo con una solución isosmótica de K^+ (60 mM).

La valoración de los efectos de verapamilo y de papaverina en la fibra longitudinal, incluidos en este estudio como los antagonistas de calcio de referencia, muestra que la potencia del verapamilo como inhibidor de la respuesta contráctil producida con K^+ es cercana a la reportada en preparaciones con *taenia coli* de cobayo (Karakı y col., 1984) y, en el caso de la papaverina, los valores en la literatura (Reiter y Brandt, 1985) correlacionan bien con los datos obtenidos en el presente estudio, antecedentes que indicarían un montaje adecuado de las preparaciones con fibra longitudinal utilizadas.

La contracción tónica se ha vinculado con el aumento en la permeabilidad de la membrana que produce la despolarización con K^+ , el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los canales de calcio dependientes del voltaje y el consecuente incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. A su vez, la respuesta contráctil fásica se ha relacionado con el incremento de la concentración del Ca^{2+} en el citosol, producto de la liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares, particularmente en el RS (Karakı y Weiss, 1984; Kobayashi y col., 1986; Somlyo y Somlyo, 1992; Nasu y col., 1995d; 1996).

En la fibra longitudinal del íleon de cobayo, la potencia del efecto inhibitorio del AAHDD sobre la respuesta fásica fue 7.1 veces menor que la potencia que presenta el compuesto sobre la respuesta tónica. La relación IC_{50} fásica/ IC_{50}

tónica resultó superior a la determinada en este estudio con papaverina (3.56) y notablemente inferior a la que se obtuvo con verapamilo (181.25). Estos resultados se podrían explicar con base en la hipótesis que sostienen algunos investigadores respecto a una relación existente entre la respuesta fásica de la contracción y la liberación de calcio a partir de los depósitos de almacenamiento intracelulares. La papaverina es un antagonista de calcio inespecífico, aún no se ha logrado un consenso respecto al mecanismo de acción de este alcaloide, sin embargo, se asume que es un inhibidor de la fosfodiesterasa de los ácidos nucleótidos y por lo tanto, incrementa el AMPc, el cual a su vez, activa el secuestro de calcio en los depósitos de almacenamiento de calcio intracelular (Prestwich y Bolton, 1995a). Por el contrario, verapamilo es un antagonista de calcio que interfiere de manera específica la entrada del calcio desde el medio exterior bloqueando los canales dependientes del voltaje; por tanto, la inhibición sobre la respuesta fásica no es apreciable. Sin embargo, cabe señalar que ambos componentes de la respuesta contráctil inducida con K^+ en preparaciones con *taenia coli* son inhibidos con nifedipina siendo la relación IC_{50} fásica/ IC_{50} tónica = 6.4, valor cercano al que se determinó en este estudio con AAHDD (Usune y col., 1996). La nifedipina también es un antagonista de calcio cuyo sitio de acción son los canales de calcio tipo L dependientes del voltaje (Mc Donald y col., 1994).

Los mecanismos posibles que conllevan al descenso de la concentración del calcio en el citosol se relacionan con un bloqueo del influjo del calcio desde el medio extracelular, la estimulación del eflujo de calcio, la liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares o bien, la acumulación del ion en los depósitos de almacenamiento. El efecto que presenta el compuesto AAHDD como inhibidor de las contracciones inducidas con K^+ , puede vincularse con cualquiera de las vías mencionadas.

En suma, el diterpeno aislado de *Brickellia paniculata* podría, en principio, actuar sobre la movilización del calcio intracelular. Los estudios realizados con la fibra longitudinal intacta y con fibras tratadas con β -escina para permeabilizar la membrana plasmática, tuvieron como propósito responder a una probable acción del compuesto AAHDD sobre el RS, principal organelo que participa en la movilización del Ca^{2+} almacenado.

EFFECTO DEL COMPUESTO AAHDD SOBRE LA MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+} EN LOS DEPÓSITOS INTRACELULARES (RS)

Tomando en consideración los antecedentes anteriormente señalados, el efecto relajante del compuesto AAHDD se valoró en preparaciones en las cuales se impedía la captura (ácido ciclopiazónico) del calcio o su liberación (rianodina) a partir de los depósitos de almacenamiento intracelular.

Efecto del ácido ciclopiazónico y de la rianodina en la actividad inhibitoria del AAHDD sobre la contracción inducida con Ca^{2+}

El íleon de cobayo en un medio libre de calcio se contrae cuando se expone a los agentes inductores de la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RS. En la serie de estudios realizados, las preparaciones incubadas en una solución libre de Ca^{2+} se trataron con 10 mM de cafeína para liberar calcio de los depósitos intracelulares. Una segunda aplicación del alcaloide no contrajo al músculo, lo que implica en principio un vaciamiento total del depósito. En estas condiciones, la respuesta contráctil inducida con 2 mM de Ca^{2+} (100%) fue bloqueada en forma dependiente de la concentración por el compuesto AAHDD (5-80 μM). Para determinar la participación de la ATPasa de Ca^{2+} en el efecto inhibitorio del compuesto AAHDD los tejidos depletados del calcio intracelular fueron tratados con 10 μM de ácido ciclopiazónico (ACPZ), antes de inducir la contracción con calcio. Los registros indicaron que la adición del ACPZ no modificaba el tono muscular, pero en un 75% de los tejidos se

observó una disminución del $13.19 \pm 5.6\%$ ($n=36$) en la amplitud de la respuesta contráctil inducida con Ca^{2+} . Después de lavar las preparaciones los tejidos recuperaron la tensión basal original.

Para el rango de concentraciones del AAHDD evaluadas, la curva de relajación obtenida con la adición del compuesto AAHDD en presencia de ACPZ, no fue significativamente diferente a la curva control sin ACPZ (Tabla 3). Por el contrario, en la serie de muestras en las que se utilizó verapamilo como antagonista de los canales de calcio, la curva de relajación en presencia de ACPZ se desplazó hacia la izquierda, indicando un incremento en la acción inhibitoria de la respuesta contráctil inducida con Ca^{2+} (no se muestran datos).

Con el propósito de detallar sobre la participación que tiene el calcio almacenado en la actividad relajante del AAHDD, se analizó el comportamiento del compuesto en tejidos preincubados en un medio libre de Ca^{2+} , expuestos a 10 mM de cafeína y 30 μM de rianodina. La rianodina mantiene abiertos los canales de Ca^{2+} en la membrana del RS liberando de esta manera el calcio almacenado en el compartimento que es sensible a la acción del propio calcio y del InsP_3 . En la serie de experimentos en los que se aplicó rianodina, antes de inducir la contracción con Ca^{2+} , no se observaron cambios en el tono muscular, pero la respuesta contráctil con Ca^{2+} se redujo en $21.5 \pm 6.3\%$ en todas las preparaciones. Después de lavar, los tejidos

recuperaron la tensión original. El comportamiento del AAHDD como bloqueador de la respuesta contráctil con Ca^{2+} no se alteró de manera significativa con la presencia de rianodina (Tabla 3).

AAHDD (μM)	% INHIBICIÓN		
	Curva control	con rianodina	con ácido ciclopiazónico
5	7.52 \pm 4.12		7.64 \pm 0.60
10	22.39 \pm 4.52	20.98 \pm 3.41	21.66 \pm 3.38
20	40.57 \pm 6.00	32.65 \pm 7.61	44.03 \pm 4.39
30	51.54 \pm 9.73	54.80 \pm 9.64	
35	60.24 \pm 9.02	63.91 \pm 10.56	
40	67.63 \pm 6.24	72.71 \pm 7.42	59.93 \pm 3.22 *
60	75.00 \pm 5.61	85.14 \pm 1.87 *	81.61 \pm 9.73
80	78.91 \pm 4.41		87.20 \pm 5.10 *

Tabla 3. Efecto del AAHDD (5-80 μM) sobre la contracción inducida por 2 mM de Ca^{2+} en las preparaciones con fibra longitudinal de íleon de cobayo, previamente incubadas en medio libre de calcio y estimuladas con 10 mM de cafeína (curva control). En condiciones similares se realizaron observaciones tratando el tejido con rianodina (30 μM) o con ácido ciclopiazónico (10 μM). Los efectos que producen la rianodina y el ácido ciclopiazónico sobre la contracción inducida por Ca^{2+} fueron tomados en consideración al determinar los valores correspondientes. Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar de n=6-8 tejidos. * $p < 0.05$.

Por otra parte, la extrusión del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ celular puede ser inducida por medio de la despolarización con K^+ en presencia de Ca^{2+} exterior. Los tejidos incubados durante 30 min con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en una solución hipertónica de K^+ (60 mM), al ser lavados con la solución no-radioactiva pierden rápidamente el ^{45}Ca en el transcurso de los primeros 15 min de lavado y después, el proceso ocurre a una velocidad notablemente menor. Los datos obtenidos en esta serie de observaciones indican que el eflujo del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ describe una curva que no se modificó al agregar el compuesto AAHDD a una concentración de 100 μM (Figura 9), cantidad del producto que inhibe en un 100% la respuesta contráctil tónica inducida con K^+ (60 mM).

La serie de observaciones realizadas para determinar la actividad inhibitoria del AAHDD en presencia de agentes que actúan directamente sobre el RS liberando el Ca^{2+} (rianodina) o bien, impidiendo el secuestro del catión (ACPZ), indican que el diterpeno bloquea en forma concentración dependiente las contracciones inducidas con 2 mM de Ca^{2+} en las preparaciones incubadas en un medio libre de calcio, alto en K^+ (60 mM). Comparado este efecto con el de la serie de tejidos tratados previamente con ACPZ que es un inhibidor selectivo de la Ca^{2+} -ATPasa del RS y que impide de esta manera el secuestro del calcio en el organelo (Uyama y col., 1993), se concluye que no hay diferencia significativa entre las dos observaciones realizadas. A su vez, la rianodina, estimula los canales de calcio en el RS que son sensibles al mecanismo CLC y los mantiene abiertos, de tal manera que el

RS no puede volver a almacenar calcio en este compartimento (Hwang y Breemen, 1987). El bloqueo que produce AAHDD sobre la respuesta contráctil inducida con 2 mM de Ca^{2+} en un medio libre de Ca^{2+} , alto en K^+ (60 mM), tampoco fue significativamente diferente al de la serie de tejidos tratados previamente con rianodina. El Ca^{2+} extracelular constituye la principal fuente que provee de calcio al RS cuando éste se encuentra vacío, circunstancia que puede servir como señal para que se produzca el influjo de calcio desde el medio extracelular. Los resultados en estos estudios permiten asumir por tanto, que la acción de AAHDD tampoco está relacionada con el mecanismo Ca-induce la salida de calcio.

Finalmente, las mediciones del eflujo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en las preparaciones no se modificaron con la adición de 100 μM AAHDD indicando que la bomba de extrusión de Ca^{2+} es también insensible a la acción del diterpeno (Figura 8).

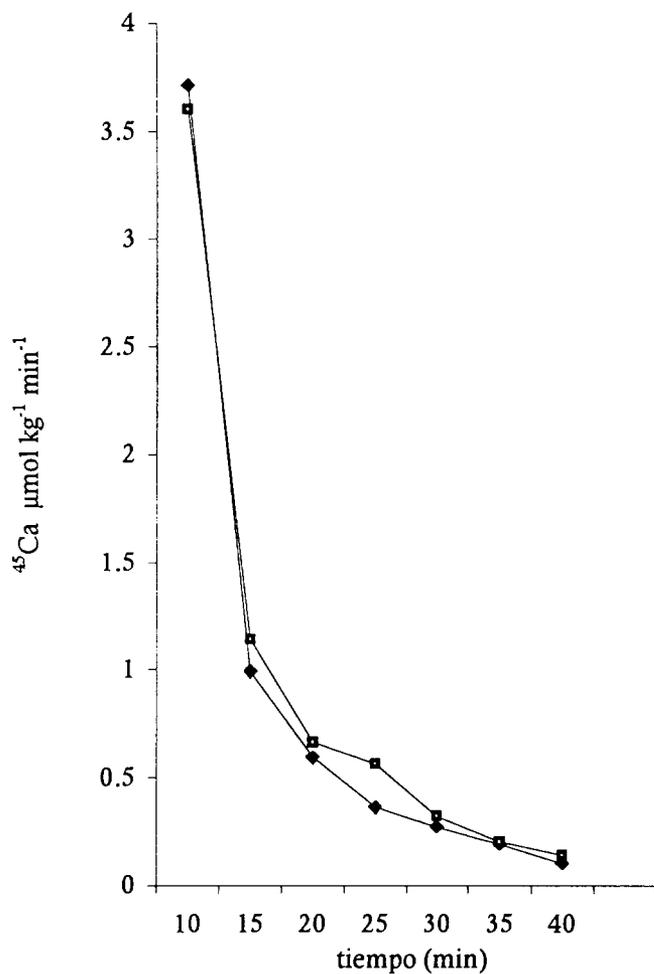


Fig.8 Efecto que produce AAHDD (100 μM) sobre el eflujo de ^{45}Ca en el músculo liso longitudinal del íleon de cobayo. Las curvas muestran la radioactividad de las muestras después de lavar los tejidos con una solución hipertónica de K^+ (60 mM) (♦) o con la solución + 100 μM AAHDD (◻), después de incubar los tejidos a 37 °C y 100% O_2 por 30 min en un medio alto en K^+ + 6.5 $\mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Cada punto en la curva representa el promedio ($n=5$) y se expresan en unidades [$\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$].

Efecto del AAHDD sobre la liberación de Ca^{2+} inducida con cafeína en preparaciones con tejido permeabilizado

Ha sido ampliamente documentado que la perforación de la membrana plasmática por medio de agentes químicos tales como la β -escina, es un proceso que no afecta las funciones del retículo sarcoplásmico ni la de los filamentos contráctiles. La β -escina actúa sobre la membrana plasmática dejándola permeable a los compuestos que tienen un peso molecular alrededor de 17000. Además de las características señaladas respecto a la integridad que conservan el RS y la maquinaria contráctil, el saponósido no afecta al receptor de la proteína G e $InsP_3$ y deja intacto el sistema de transducción de señales acoplados a los receptores (Kobayashi y col., 1989; Uyama y col., 1992; Komori y col., 1995). También se ha demostrado que las tiras permeabilizadas despolarizan con KCl y responden al estímulo con los agonistas (Kobayashi y col., 1989).

La técnica utilizada para permeabilizar la fibra muscular debe contemplar un medio en el baño que impida la contracción de la fibra muscular cuando el sarcolema se encuentra muy permeable a los solutos, a la vez que se preserve intacto el retículo sarcoplásmico. Debido a que la célula muscular posee un contenido elevado en K^+ , la solución base debe tener una concentración alta en K^+ . El EGTA se adiciona para mantener un $pCa (-\log_{10} [Ca^{2+}]) > 7$ que corresponde a la concentración del Ca^{2+} en la célula en estado de relajación.

En la Figura 9 se muestran los registros originales de la tensión desarrollada en dos preparaciones tratadas con β -escina. Luego de permeabilizar los tejidos en la solución relajante libre de Ca^{2+} , el llenado de los depósitos intracelulares con calcio y la contracción máxima se registraron a un pCa 4.88 (13 μM). Como se observa en la figura, el lavado subsecuente de las preparaciones con una solución relajante que contenía 0.2 mM de EGTA redujo bruscamente la tensión hasta alcanzar el valor inicial, antes de inducir la contracción. Posteriormente, la adición de 20 mM de cafeína activó la liberación del calcio almacenado, consecuentemente se registró una respuesta contráctil transitoria, misma que no se modificó al adicionar previamente el compuesto AAHDD en concentraciones de 10-20 μM . En una siguiente observación y una vez lavado los tejidos, AAHDD se adicionó antes de cargar con Ca^{2+} los depósitos, en este caso se observó un ligero decremento de la respuesta contráctil inicial y la respuesta contráctil inducida con cafeína fue notablemente menor.

La permeabilización de la membrana plasmática en los tejidos tratados con β -escina es un procedimiento que facilita el registro de los efectos que ejercen los agentes biológicos sobre el RS. En estas preparaciones se ha demostrado que cuando la concentración de Ca^{2+} en el medio está aumentada, el RS almacena más Ca^{2+} ; sin embargo, si la concentración es elevada (1×10^{-4} M), se activa el mecanismo CLC y produce eflujo del Ca^{2+} almacenado. El Mg^{2+} y la procaína inhiben este mecanismo, la cafeína por el contrario, aumenta la sensibilidad del

sistema CLC, por lo tanto, es menor la concentración del Ca^{2+} que se requiere para activarlo (Karaki y Weiss, 1984).

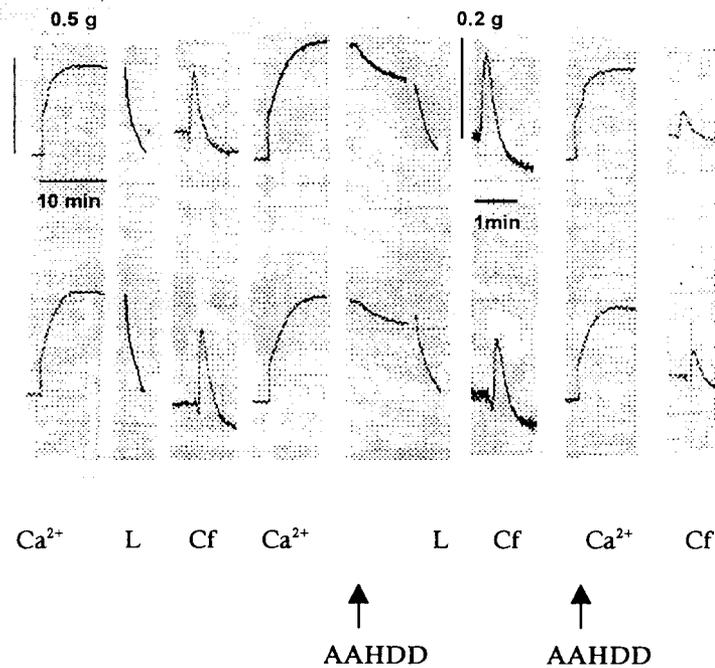


Fig.9. Las fibras permeabilizadas ($60 \mu\text{M}$ de β -escina en un medio relajante) se estabilizaron en un medio sin Ca^{2+} y se incubaron durante 10 min en un medio contráctil (pCa^{2+} 4.88), luego se lavaron con una solución relajante que contenía 0.2 mM EGTA (L) y se indujo la liberación del Ca^{2+} intracelular almacenado, aplicando 20 mM de cafeína en una solución con 0.05 mM EGTA. Después de lavar los tejidos y una vez estabilizadas las preparaciones, se trataron nuevamente con la solución contráctil y se adicionaron $20 \mu\text{M}$ del compuesto AAHDD, 10 min más tarde se liberó Ca^{2+} intracelular con cafeína. La secuencia se repitió, pero con la incubación previa del compuesto AAHDD, 15 min antes de contraer la fibra con Ca^{2+} y con cafeína ($n=8$ tejidos).

Las observaciones realizadas con tejido longitudinal permeabilizado con β -escina permiten afirmar que la adición del compuesto AAHDD en concentraciones de 20-100 μ M, después de cargar con calcio al RS, no modifica de manera significativa la respuesta contráctil inducida con cafeína. Estos resultados confirmarían, en principio, la hipótesis arriba mencionada respecto a que el diterpeno no interfiere con la movilización del calcio a nivel de los depósitos de almacenamiento intracelular. Por el contrario, si AAHDD se aplica antes de cargar con calcio los depósitos, la liberación del Ca^{2+} intracelular por acción de la cafeína es significativamente menor a la respuesta control sin el diterpeno.

EFECTO DEL COMPUESTO AAHDD SOBRE EL INFLUJO DEL Ca^{2+} A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Efectos del compuesto AAHDD sobre la contracción inducida por Mn^{2+} en un medio libre de Ca^{2+} y alto en K^+ (60 mM)

Los resultados en las observaciones realizadas en el presente estudio muestran que la adición de Mn^{2+} en el baño (5 mM) produjo contracciones progresivas de la fibra longitudinal del íleon de cobayo previamente incubada en un medio libre de Ca^{2+} y despolarizada con K^+ (60 mM). El efecto contráctil comenzó a manifestarse aproximadamente 60 min después de aplicar el Mn^{2+} y a las 3 horas alcanzó un valor igual a $163.89 \pm 17.70\%$ (n=8) respecto a la respuesta contráctil original inducida con el K^+ (100%), resultados que son similares a los reportados por Nasu y colaboradores (1994). Una hora después, el incremento de las contracciones fue aún significativo y alcanzó niveles 90.74% por arriba del control. Concentraciones variables entre 10-80 μM del compuesto AAHDD inhibieron la contracción tónica inducida con el Mn^{2+} , el efecto fue concentración-dependiente y se inhibió totalmente a una concentración de 100 μM de AAHDD (Figura 10). Acorde con la técnica descrita en la literatura (Nasu y Sasaki, 1998), la disminución de la respuesta contráctil producida por AAHDD se acompañó de un decremento en la concentración de Mn^{2+} acumulada en el tejido (ver adelante).

En la serie de estudios en los que se utilizó verapamilo como referencia de un antagonista de los canales de calcio tipo L, se observó un comportamiento similar al descrito para AAHDD; el verapamilo inhibió la respuesta contráctil inducida con Mn^{2+} en forma concentración-dependiente, bloqueando totalmente la respuesta a una concentración de $0.16 \mu M$; sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con el compuesto AAHDD, los registros a las 4 horas presentaron, en este caso, un desplazamiento mayor respecto al de las 3 horas (Figura 11).

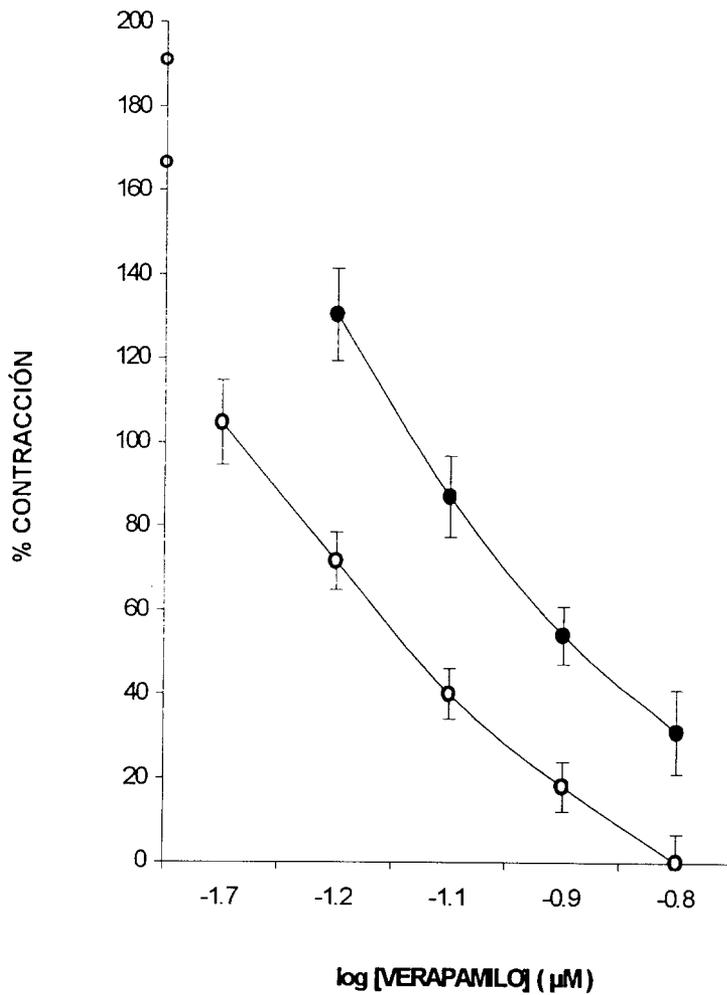


Fig.11. Efecto inhibitor de la respuesta contráctil que presenta verapamilo en las preparaciones con tiras de fibra longitudinal de ileon de cobayo, incubadas en un medio libre de Ca^{2+} , alto en K^+ (60 mM) y contraídas con 5 mM de Mn^{2+} . Curvas concentración-respuesta a las 3 hrs (o) y a las 4 hrs (●) después de la aplicación del Mn^{2+} . La contracción está expresada respecto al máximo de la respuesta contráctil tónica inducida con 60 mM K^+ en un medio que contiene 1.87 mM de Ca^{2+} (100%). Los puntos en las curvas corresponden al promedio \pm desviación estándar de $n= 6-8$ tejidos

Después de 4 horas de registro, las preparaciones se lavaron con una solución Tris-Tyrode libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} que contenía 5 mM de EDTA. La concentración del manganeso determinada en los tejidos controles que no fueron tratados con el compuesto AAHDD fue de 5.673 mM kg^{-1} de peso seco (100%). La adición de 20, 40 y $60 \text{ }\mu\text{M}$ del compuesto AAHDD disminuyó la incorporación intracelular del Mn^{2+} en forma concentración-dependiente a 75.76, 57.52 y 31.76%, respectivamente. A la concentración de $10 \text{ }\mu\text{M}$ del compuesto se observó un incremento del 26% respecto al control (Figura 12).

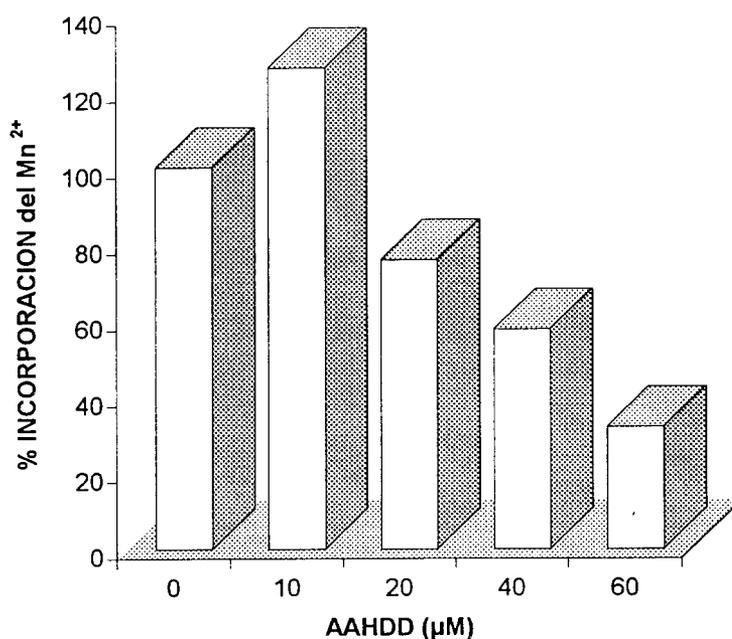


Fig.12. Concentraciones de Mn^{2+} [mM kg^{-1}] determinadas por absorción atómica en el pool de los tejidos ($n= 6-8$) contraídos con 5 mM de Mn^{2+} (control) y tratados previamente con 10, 20, 40 y $60 \text{ }\mu\text{M}$ del compuesto AAHDD, los resultados en la figura están expresados como valor porcentual respecto a la concentración del Mn^{2+} en los tejidos control. Las desviaciones en las barras son 15-20% del promedio.

Un comportamiento similar se observó con verapamilo. La Figura 13 muestra que, a una concentración de 0.08 μM del antagonista de calcio, el contenido de Mn^{2+} en el tejido se reduce presentando un valor igual a 55% del control; a una concentración de verapamilo de 0.16 μM , este valor fue de 35%. El verapamilo, utilizado como antagonista de los canales dependientes del voltaje, mostró en el mismo modelo un patrón de comportamiento similar, aunque el incremento de las contracciones inducidas con Mn^{2+} fue más pronunciado a las 4 horas de registro.

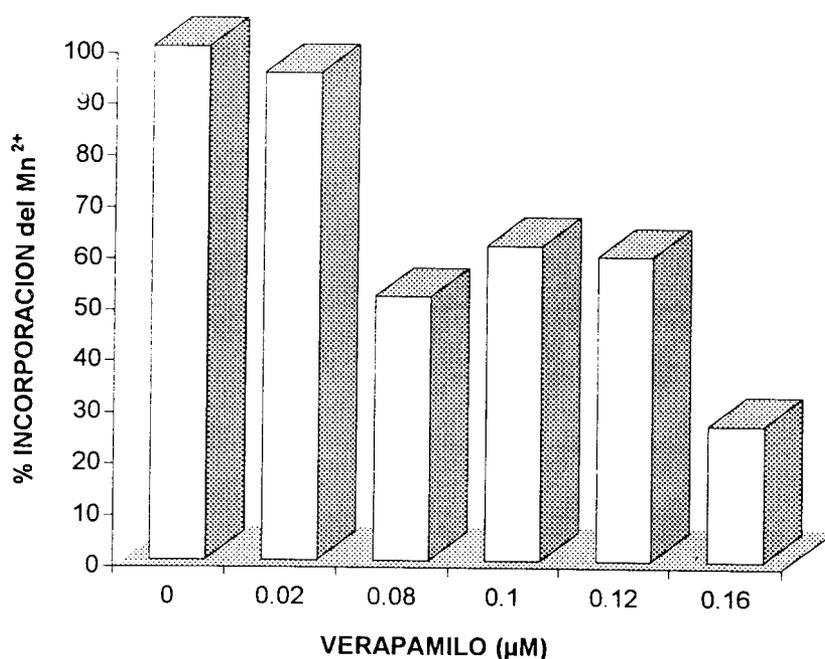


Fig.13. Concentraciones de Mn^{2+} [mM kg^{-1}] determinadas por absorción atómica en el pool de los tejidos ($n= 6-8$) contraídos con 5 mM de Mn^{2+} (control) y tratados previamente con verapamilo (0.02-0.16 μM) del compuesto AAHDD, los resultados se expresan como valor porcentual respecto a la concentración del Mn^{2+} en los tejidos control. Las desviaciones en las barras son 10-15% del promedio.

El lantano (La^{3+}) tiene gran afinidad por los sitios de unión del Ca^{2+} en la membrana plasmática. En el tejido, el La^{3+} ocupa sólo el espacio extracelular, y en su estado iónico no penetra al interior de la célula por lo que se ha utilizado este elemento para hacer un estimado del contenido de calcio intracelular. La incorporación del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en la serie de tejidos incubados durante 30 min en un medio alto en K^+ (60 mM) + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y lavados luego con la solución de lantano fue de $0.836 \pm 0.085 \text{ nmol g}^{-1}$ (n=12). La adición previa de 100 μM del compuesto AAHDD redujo la toma del ^{45}Ca en un 57.05% ($0.359 \pm 0.05 \text{ nmol g}^{-1}$; n=16). De igual manera, la adición de 1 μM de verapamilo redujo en un 48.68% ($0.429 \pm 0.109 \text{ nmol g}^{-1}$; n=5) la incorporación del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en los tejidos (Figura 14).

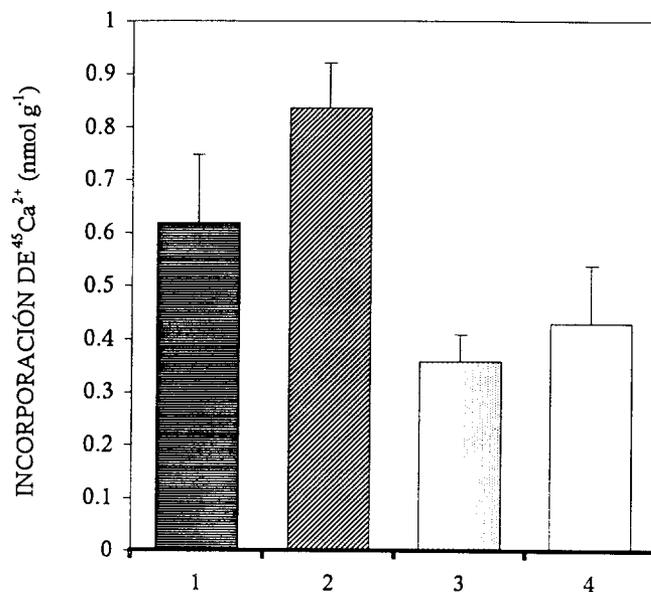


Fig. 14. Toma del calcio radioactivo en los tejidos incubados en un medio Tyrode-Tris+1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^{45}Ca (1). La adición de K^+ (60mM) a la solución produce un incremento en la incorporación del ^{45}Ca (2), mismo que disminuye cuando los tejidos se incuban previamente con 100 μM de AAHDD (3) o con 1 μM de verapamilo (4).

El análisis de los resultados hasta aquí, parecen confirmar un efecto del compuesto interfiriendo la entrada del calcio a nivel de la membrana plasmática y la serie de estudios en los que se registra el comportamiento del compuesto sobre la contracción inducida con Mn^{2+} ayudan a la definición de una probable acción del AAHDD bloqueando este sitio.

Si bien, el Mn^{2+} inhibe las contracciones que inducen los agonistas en el músculo liso interfiriendo el influjo del Ca^{2+} ; estudios posteriores realizados

permiten asumir que en determinadas condiciones, el Mn^{2+} actúa como un agente contráctil (Sutter y col., 1988; Lategan y Brading, 1988; Nasu y col., 1994). Los efectos que produce el Mn^{2+} sobre la contractilidad del tejido muscular liso ha sido un tema abordado de manera extensa por Nasu y colaboradores (1995a-d;1998). Estos autores reportan que en las preparaciones con fibra longitudinal de íleon de cobayo, la aplicación de 5 mM Mn^{2+} inhibe totalmente la contracción tónica inducida con soluciones altas en K^+ (>35 mM) en un lapso de 1 min; posteriormente, se produce un incremento progresivo del tono, alcanzando a las 3 horas siguientes, valores que son superiores a los de la respuesta tónica original inducida con el K^+ . El efecto no se presenta cuando los tejidos se incuban en una solución normal. Estos antecedentes podrían indicar que concentraciones milimolares de Mn^{2+} pueden producir contracciones cuando la membrana del tejido se encuentra en un estado de despolarización con un potencial de membrana alrededor de -37 mV (Nasu y col., 1994).

El incremento progresivo de la tensión se observa también cuando el Mn^{2+} se adiciona a las preparaciones incubadas en un medio libre de Ca^{2+} y alto en K^+ , antecedente que ha llevado a concluir que la respuesta contráctil no se debe al influjo del Ca^{2+} desde el medio extracelular (Nasu, 1995; Nasu y col., 1995). Asimismo, se ha confirmado que, si bien el Mn^{2+} induce un efecto contráctil tardío, la captura del $^{45}Ca^{2+}$ en estos tejidos es igual a la que presenta el grupo control (Nasu y col., 1994).

Por otra parte, la rianodina y el ácido ciclopiazónico no modifican la respuesta contráctil del músculo en un medio libre de Ca^{2+} lo que indicaría que el Mn^{2+} no libera Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Nasu y col., 1995c). También se ha demostrado que la concentración del Mn^{2+} se encuentra incrementada en los tejidos tratados con el ion, efecto que al igual que la tensión producida, es antagonizado por algunos agentes bloqueadores de los canales de calcio del tipo L como diltiazem, galopamilol, verapamilol, nifedipina, lo que lleva a proponer que el Mn^{2+} penetra al citoplasma a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes en la membrana de la célula en un estado de despolarización (Nasu y col., 1995b). Antagonistas de los canales de calcio del tipo T, entre ellos amiloride y el ion Ni^{2+} , no modifican la respuesta contráctil producida por el Mn^{2+} (Nasu y col. 1995 b).

Finalmente, se ha reportado que el Mn^{2+} ejerce una acción directa sobre las proteínas contráctiles, efecto que se inhibe con trifluoroperazina, un antagonista de la calmodulina (Savineau y col., 1988). Cabe señalar que Hoar y Kerrick (1988) plantean al respecto un mecanismo diferente en el que Mn^{2+} podría inducir contracciones sin que se lleve a cabo un proceso de fosforilación de la cadena ligera de la miosina; es decir, sin involucrar al sistema Ca^{2+} -calmodulina.

Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que la aplicación de 5 mM de Mn^{2+} a las fibras incubadas en un medio libre de Ca^{2+} , alto en K^+ (60

mM), produce contracciones tónicas con una amplitud de la contracción, a las 3 horas después de aplicar el Mn^{2+} , 70% por arriba de la respuesta original inducida con K^+ (60 mM) en un medio normal con 1.87 mM de Ca^{2+} , resultados que son similares a los reportados por Nasu y colaboradores (1994). A su vez, el compuesto AAHDD reduce esta respuesta contráctil, efecto que se acompaña de una disminución de la concentración de Mn^{2+} determinada en el tejido de acuerdo con la técnica descrita en la literatura (Nasu y Sasaki, 1998). De esta manera, pareciera que AAHDD actúa bloqueando la entrada del Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los canales de calcio en la membrana y no por una acción directa del diterpeno sobre las proteínas de la maquinaria contráctil, hipótesis que podría sustentarse además, ya que la incorporación de $^{45}Ca^{2+}$ disminuye en los tejidos tratados con AAHDD. El verapamilo, utilizado como antagonista de los canales dependientes del voltaje mostró en el mismo modelo un patrón de comportamiento similar, aunque el incremento de las contracciones inducidas con Mn^{2+} fué más pronunciada a las 4 horas de registro.

El análisis de los resultados en este estudio permiten concluir que el diterpeno aislado de *Brickellia paniculata* relaja la musculatura lisa intestinal del cobayo en las preparaciones *in vitro* por un mecanismo antagonista sobre el calcio, interfiriendo la entrada del Ca^{2+} extracelular.

Brickellia paniculata es utilizada para tratar cólicos, dolores abdominales y la diarrea acuosa. Los estudios químico-farmacológicos realizados demuestran que el flavonol xantomicrol, así como el diterpeno aquí evaluado, son los principios relajantes y se encuentran como los constituyentes prioritarios en las hojas. El antagonismo de calcio que media el efecto relajante de los compuestos, presenta mayor selectividad en el tejido muscular liso del intestino, el diterpeno es un antagonista de calcio de tipo competitivo en íleon de cobayo, mientras que en la aorta de la rata su efecto es menos potente y de tipo no-competitivo (datos no incluidos en el presente estudio). La diarrea constituye uno de los problemas de salud severos entre las comunidades del sureste del país (Berlin y Berlin, 1996). Los chamulas de los Altos de Chiapas acostumbran utilizar *Brickellia paniculata* en combinación con *Baccharis serraefolia*, esta última es una de las especies más importantes entre los mayas para tratar diarreas y de la que también se han demostrado propiedades espasmolíticas y antagonistas sobre el calcio (Tortoriello y Aguilar, 1996). El calcio regula el equilibrio entre la absorción y secreción de líquido a través de la mucosa intestinal; una baja concentración de calcio intracelular favorece la absorción en tanto que su incremento promueve la secreción (Berridge, 1984). De esta manera, la modulación del flujo de calcio en el epitelio de la mucosa puede jugar un papel importante en la acción de los agentes antidiarreicos, efecto que podría explicar también el uso popular que tiene *Brickellia paniculata* en el tratamiento de las diarreas acuosas.

CONCLUSIONES

1. El diterpeno tipo labdano aislado de las hojas de *Brickellia paniculata* ácido 3 α -angeloiloxi,2 α -hidroxi-13,14Z di-dehidrocatívico, relaja la fibra longitudinal del íleon de cobayo *in vitro* por un mecanismo antagonista de calcio.
2. El sitio de acción del compuesto AAHDD es la membrana plasmática sobre la que el diterpeno ejerce un efecto de bloqueo interfiriendo la entrada del Ca²⁺ desde el medio extracelular.
3. El efecto relajante evaluado en la fibra longitudinal del íleon de cobayo no está mediado por una acción del compuesto a nivel de la movilización del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico, de la maquinaria contráctil ni de la bomba de calcio en la membrana plasmática.
4. El antagonismo de calcio que media el efecto relajante sobre la musculatura lisa intestinal del diterpeno sustenta el uso popular que tiene la especie medicinal *Brickellia paniculata* para tratar cólicos, dolor abdominal y diarreas acuosas.
5. *Brickellia paniculata* constituye un candidato potencial para su evaluación clínica como antiespasmódico.
6. La potencia del efecto relajante del diterpeno es cercana a la de papaverina, aunque el mecanismo de acción de ambos antiespasmódicos es diferente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla S, Abu Zarga M. Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica* on isolated guinea-pig ileum. *Planta Med.* 1987; 53: 322-324.
- Abdalla S, Abu Zarga M, Afifi F, Al-Khalil S, Sabri S. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa* on isolated guinea-pig smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* 1988; 19: 559-563.
- Abdalla S, Abu Zarga M, Afifi F, Al-Khalil S, Mahasneh A, Sabri S. Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 1989; 41: 138-141.
- Abdalla S, Abu Zarga M, Afifi F, Al-Khalil S, Mahashne A, Sabri S. Effects of the flavone luteolin, isolated from *Colchicum richii* on guinea-pig isolated smooth muscle and heart and on blood pressure and blood flow. *Phytother. Res.* 1994; 8: 265-270.
- Abu Niaaj L, Abu-Zarga M, Sabri S, Abdalla S. Isolation and biological effects of 7-O-methyleriodictyol, a flavanone isolated from *Artemisia monosperma*, on isolated smooth muscles. *Planta Med.* 1993; 59: 42-45.
- Adelstein RS, Hathaway DR. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5'' monophosphate in regulation smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am. J. Cardiol.* 1979; 44: 783-787.
- Adelstein RS, Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin -ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.* 1980; 49: 921-956.
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jáquez P, López ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS, México, 1994.
- Bates RFL, Buckely GA, Eglen RM, McArdle CA, Wilkinson SJ. Calcium

- antagonists: differential effects on guinea-pig and rat intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1982; 777: 567P.
- Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated Ca^{2+} permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; 328: 275-278.
- Berlin B, Berlin E. Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico. *The Gastrointestinal Diseases*. Princeton University Press, USA., 1996 pp.126, 451.
- Berlin B, Berlin E, Lozoya X, Meckes M, Tortoriello J, Villarreal ML. The scientific basis 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, NY. 1996. pp. 43-68.
- Beretz A, Anton R, Cazenave J. The effect of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986; 213: 281-296.
- Bergendorff O, Sterner O. Spasmolytic flavonols from *Artemisia abrotanum*. *Planta Med.* 1995; 61: 370-371.
- Berridge MJ, Dawson RMC, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF. Change in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositide. *Biochem. J.* 1983; 212: 473-482.
- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 159-193.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-325.
- Berridge MJ. Inositol phosphates and calcium signalling. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. Vol. 26. Raven Press, N.Y., 1997.
- Best L, Bolton TB. Depolarization of guinea-pig visceral smooth muscle causes hydrolysis of inositol phospholipids. *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* 1986, 333: 78-82.
- Bielkiewicz-Vollrath B, Carpenter JR, Schulz R, Cook DA. Early production

- of 1,4,5-inositol triphosphate and 1,3,4,5-inositol tetrakisphosphate by histamine and carbachol in ileal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 1987; 31: 513-522.
- Bohlmann F, Zdero C. Naturally occurring terpene derivatives. Constituents of the genus *Brickellia*. *Chem. Ber.* 1976; 109: 1436-1445.
- Bohlmann F, Suwita A, Mabry T. New labdane derivatives and further constituents of *Brickellia* species. *Phytochemistry* 1978; 17: 763-765.
- Bohlmann F, Kramp W, Grenz M, Robinson H, King R. Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 1981; 20: 1907-1913.
- Bohlmann F, Bapuji M, Jakupovic J, King R, Robinson H. Unusual diterpenes from *Brickellia eupatorioides*. *Phytochemistry* 1982; 21: 181-186.
- Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 606-718.
- Calderón JS, Viguera C. Nuevos diterpenos tipo labdano de *Brickellia paniculata*. XVII Simposium Internacional de Química de Productos Naturales. Monterrey, México, 1990. (Resumen).
- Capasso A, Pinto A, Sorrentino R, Capasso F. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea-pig isolated ileum. *J. Ethnopharmacol.* 1991; 34: 279-281.
- Coelho de Souza AN, Criddle DN, Leal-Cardoso JH. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. *Phytother. Res.* 1998; 12: 189-194.
- Chadwick CC, Saito A, Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 2132-2136.
- Chatterjee SS. Active constituents and standardization of CNS-active medicinal plant extracts. In: *Neurophyto-pharmaceuticals*. (Eds) Lozoya X, Gómez E, Brunner M. Simposio IMSS Farmasa/Schwabe. México, 1998, pp 19-21.

- Chen WY, Ko FN, Wu YC, Lu ST, Teng CM. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46: 380-382.
- Dabrowska R, Goch A, Galazkiewicz B, Osiska H. The influence of caldesmon on ATPase activity of the skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 842: 70-75.
- Dessy C, Godfraind T. The effect of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119: 142-148.
- Di Salvo J, Nelson SR, Kaplan N. Protein tyrosine phosphorylation in smooth muscle: a potential coupling mechanism between receptor activation and intracellular calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 214: 285-301.
- Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP, Murphy RA. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 1981; 211: 495-497.
- Driska SP. High myosin light chain phosphatase activity in arterial smooth muscle: can it explain the latch phenomenon ? *Prog. Clin. Res.* 1987; 245: 387-398.
- Driska SP, Atein PG, Porter R. Myosin diphosphorylation during rapid relaxation of hog carotid artery smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1989; 256 : C315-321.
- Donald J, Brown ND. Aplicación clínica de tres fitofármacos: *Ginkgo biloba*, *Piper methysticum* y *Serenoa repens*. En: *Fitofármacos*. (Eds) Lozoya X, Gómez E. 1 Simposio IMSS-Farmasa Schwabe, México 1997, págs. 71-99.
- Endo M, Yagi S, Iino M. Tension-pCa relation and sarcoplasmic reticulum responses in chemically skinned smooth muscle fibers. *Fed. Proc.* 1982; 41: 2245-2250.
- Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of

- calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.* 1975; 249: 469-495.
- Fabiato A, Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1978; 307: 491-522.
- Farnsworth , Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal Plants in Therapy. *Bull. Sanit. Panam.* 1989; 107: 314-329.
- Fleckenstein A. Specific inhibitors and promoters of calcium action in excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the production or prevention of myocardial lesions. In: *Calcium and the Heart.* (Eds) Harris P, Opie L. Academic Press, London, 1971, pp. 135-188.
- Frearson N, Focant BWW, Perry SV. Phosphorylation of a light chain component of myosin from smooth muscle. *FEBS Lett.* 1976; 63: 27-32.
- Godfraind T, Kaba A. The role of calcium in the action of drugs on vascular smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1972; Suppl. 196: 35-49.
- Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Am. Soc. Pharmacol. Exper. Ther.* 1986; 38: 324-420.
- Golenhofen K. Theory of P and T systems for calcium activation in smooth muscle. In: *Physiology of Smooth Muscle.* (Eds) Bulbring E, Shuba MF. Raven Press. N.Y. 1976, pp 197-202.
- Golenhofen K. Differentiation of calcium activation processes in smooth muscle using selective antagonists. In: *Smooth Muscle. An Assessment of Current Knowledge.* (Eds) Brading AF, Jones AW, Tomita T. Arnold, London 1981, pp 157-170.
- Gómez F, Quijano L, Calderón JS, Ríos T. 3α -angeloiloxi- 2α -hidroxicativic acid, a new diterpene from *Brickellia paniculata*. *Phytochemistry* 1983; 22: 1292-1293.

- Gong MC, Fuglsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AP. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21492-21498.
- Goodman F, Weiss G. Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 1971; 220: 759-766.
- Haeberle JR, Hathaway DR, De Paoli Roach AA. Dephosphorylation of myosin by the catalytic subunit of a type-2 phosphatase produces relaxation of chemically skinned uterine smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1985; 250: 9965-9968.
- Hammad H, Abdalla SS. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen. Pharmac.* 1997; 28: 767-771.
- Harafuji H, Ogawa Y. Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetracetic acid with calcium around neutral pH. *J. Biochem. (Tokyo)* 1980; 87: 1305-1312.
- Härmälä P, Vuorela H, Törnquist K, Kaltia S, Galambosi B, Hiltunen R. Isolation and testing of the calcium blocking activity of furanocoumarins from *Angelica archangelica*. *Planta Med.* 1991; Suppl 2: A58.
- Hartshorne DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* (Ed) LR Johnson. Raven Press N.Y., 1987; pp: 423-482.
- Hashimoto T, Hirata M, Itoh T, Kanmura Y, Kuriyama H. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *J. Physiol.* 1986; 370: 605-618.
- Himpens B, Somlyo AP. Free calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea pig smooth muscle. *J. Physiol.* 1988; 395: 507-530.
- Himpens B, Matthijs G, Somlyo AV, Butler TM, Somlyo AP. Cytoplasmic

- free calcium, myosin light chain phosphorylation and force in phasic and tonic smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 1988; 92: 713-729.
- Himpens B, Matthijs G, Somlyo AP. Desensitization to cytoplasmic Ca^{2+} and Ca^{2+} sensitivities of guinea-pig ileum and rabbit pulmonary artery smooth muscle. *J. Physiol. (London)* 1989; 413: 489-503.
- Himpens B, Kitazawa T, Somlyo AP. Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Arch.* 1990, 416: 351-359.
- Hoar PE, Pato MD, Kerrick WGL. Myosin light chain phosphatase: effect on the activation and relaxation of gizzard smooth muscle skinned fiber. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 8760-8764.
- Hoar PE, Kerrick WGL. Mn^{2+} activates skinned smooth muscle cells in the absence of myosin light phosphorylation. *Pflügers Arch.* 1988; 412: 225-230.
- Hughes AD, Hering S, Bolton TB. The action of caffeine on inward barium current through voltage-dependent calcium channels in single rabbit ear artery cells. *Pflügers Arch.* 1990; 416: 462-466.
- Hwang KS, Van Breemen C. Ryanodine modulation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux and tension in rabbit aortic smooth muscle. *Pflügers Arch.* 1987; 408: 343-350.
- Ichikawa K, Kinoshita T, Sankawa U. The screening of chinese crude drugs for Ca^{2+} antagonist activity: identification of active principles from aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume*. *Chem. Pharm. Bull.* 1989; 37: 345-348.
- Iino M, Kobayashi T, Endo M. Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 152: 417-422.
- Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea-pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* 1989; 94: 363-383.
- Irvine RF. Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: Toward a proliferation or a simplification ? *FASEB J.* 1992; 6: 3085-3091.

- Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J. Physiol. (London)* 1992; 451: 307-328.
- Jayme AV, Clavijo A, Romero A, James G, Juárez C. *Brickellia glandulosa*: efecto sobre la contracción espontánea del yeyuno de conejo. VII Congreso Internacional de Medicina Tradicional y Folklórica. 1993, Yucatán, México.
- Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1985; 25: 593-620.
- Kamm KE, Stull JT. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol.* 1989; 51: 299-313.
- Karaki H, Weiss G. Alterations in high and low affinity binding ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum and low temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979; 211: 86-92.
- Karaki H, Weiss G. Calcium channels in smooth muscle. *Gastroent.* 1984; 87: 960-970.
- Karaki H, Nakagawa H, Urakawa N. Comparative effects of verapamil and sodium nitroprusside on contraction and ^{45}Ca uptake in the smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta and guinea-pig taenia coli. *Brit. J. Pharmac.* 1984; 81: 393-400.
- Karaki H, Ahn HY, Urakawa N. Caffeine-induced contraction in vascular smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1987; 285: 60-71.
- Karaki H, Weiss G. Calcium release in smooth muscle. *Life Science* 1988; 42: 111-122.
- Kitamura K, Sakai S, Kajioka S, Kuriyama H. Activation of the Ca dependent K channel by Ca released from the sarcoplasmic reticulum of mammalian smooth muscles. *Biomed. Biochim. Acta* 1989; 48: S364- S369.

- Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AP, Somlyo AV. Receptor-coupled permeabilized smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 5339-5342.
- Kitazawa T, Somlyo AV. Desensitization and muscarinic re-sensitization of force and myosin light chain phosphorylation to cytoplasmic Ca^{2+} in smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 172: 1291-1297.
- Ko FN, Lin CN, Liou SS, Huang TF, Teng CM. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by norathyriol isolated from Gentianaceae. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 192: 133-139.
- Ko FN, Wu YC, Lu ST, Teng CM. Ca^{2+} -channel blockade in rat thoracic aorta by crychine isolated from *Cryptocarya chinensis* Hemsl. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993; 45: 707-710.
- Kobayashi S, Kanaide H, Nakamura M. Complete overlap of caffeine and K^+ -depolarization-sensitive intracellular calcium storage site in cultured rat arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 15709-15713.
- Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV, Somlyo AP. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 17997-18004.
- Komori S, Itagaki M, Unno T, Ohashi H. Caffeine and carbachol act on common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. *Europ. J. Pharmacol.* 1995; 277: 173-180.
- Kriegelstein J. Bases farmacológicas para el uso del extracto de ginkgo biloba en la enfermedad de Alzheimer. En: *El Manejo de los Fitofármacos en el Nuevo Milenio*. (Eds) Lozoya X, Gómez E. 4 Simposio IMSS-Farmasa Schwabe, México 2000, págs. 115-120.
- Kuemmerle JF, Makhlof GM. Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 25488-25494.
- Lategan TW, Brading AF. Contractile effects of manganese in *taenia coli* of guinea pig cecum. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: G489-G494.

- Li R, Fang N, Mabry T. Flavonoids from *Brickellia scoparia*. J. Nat. Prod. 1986; 49: 732-733.
- Magalhães P, Criddle DN, Tavares RA, Melo EM, Mota TL, Leal-Cardoso JH. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. Phytother. Res. 1998; 12: 172-177.
- Mata R, Rojas A, Acevedo L, Estrada S, Calzada F, Rojas I, Bye R, Linares E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza flaginoides*. Planta Med. 1996; 63: 31-37.
- McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer D. Regulation and modulation of calcium channel in cardiac, skeletal and smooth muscle cells. Physiol. Rev. 1994; 74: 365-507.
- Meckes M, Villarreal ML, Tortoriello J, Berlin B, Berlin E. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of southern Mexico. Phytother. Res. 1995; 9: 244-250.
- Meckes M, Calzada F, Tortoriello J, Gonzáles JL, Martínez M. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. Phytother. Res. 1996;10: 600-603.
- Meckes M, Calzada F, Paz D, Rodríguez J. Efecto de los compuestos activos aislados de *Brickellia paniculata* sobre la musculatura lisa intestinal del cobayo *in vitro*. Memorias. VI Reunión Nacional de Investigación Médica. IMSS, 1997. (Resumen).
- Meckes M, Paz D, Acosta J, Mata R. Effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids from *Teloxys graveolens* leaves on isolated guinea-pig ileum. Phytomed. 1998; 5: 459-463.
- Meckes M, Calzada F, Paz D, Rodríguez J, Ponce-Monter H. Inhibitory effect of xanthomicrol and 3 α -angeloyloxy,2 α -hydroxy-13,14Z-di-dehydrocativic acid from *Brickellia paniculata* on the contractility of guinea-pig ileum. Planta Med. 2002(a) (en prensa).
- Meckes M, Román R, Pérez S, Calzada F, Ponce H. Effects of 3 α -angeloyloxy,2 α -hydroxy-13,14Z-di-dehydrocativic acid isolated from

- Brickellia paniculata* on Ca^{2+} influx in longitudinal ileal muscle of guinea-pig. Life Sciences 2002 (b) (en preparación).
- Meisheri KD, Rüegg JC. Dependence of cyclic-AMP induced relaxation on Ca^{2+} and calmodulin in skinned smooth muscle of guinea-pig taenia coli. Pflügers Arch. 1983; 399: 315-320.
- Mellado M, Sánchez A, Femia P, Erosa E, Bonilla DM, Domínguez M. La medicina tradicional de los pueblos indígenas de México. En: La Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, 1994.
- Mezquita M, Rivero B. Compuestos bioactivos de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). Tesis Facultad de Química, UNAM, 1997.
- Mignery GA, Sudhof TC, Takei K, De Camilli P. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. Nature 1989; 342: 192-195.
- Miller J D, Carsten ME. Calcium Homeostasis in Smooth Muscles. In: Cellular Aspects of Smooth Muscle Function. (Eds) Kao CY, Carsten ME. Cambridge University Press, 1997, p. 48-97.
- Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vrolix M, De Schmedt H, Casteels R. Phospholipids-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. Biochem. J. 1989; 263: 687-694.
- Molnar M, Hertelendy F. Regulation of intracellular free calcium in human myometrial cells by prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$: comparison with oxytocin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990; 71: 1243-1250.
- Morales M, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with spasmolytic properties of *Psidium guajava*. Arch. Med. Res. 1994; 25: 17-21.
- Morales M, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin on aortic smooth muscle. Planta Med. 1994; 60: 313-317.
- Mues R, Timmermann N, Ohno N, Mabry TJ. 6-methoxyflavonoids from *Brickellia californica*. Phytochemistry 1979; 18:1379-1383.
- Mustafa EH, Abu Zarga M, Abdalla S. Effects of cirsiol, a flavone isolated

- from *Achillea fragantissima*, on rat isolated ileum. Gen. Pharmacol. 1992; 23: 555-560.
- Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques du gene a la fonction. Médecine/Sciences 1994; 10: 1293-1308.
- Nasu T, Murase H, Shibata H. Manganese ions induce tonic contraction after relaxation in a high-K⁺ medium in ileal longitudinal smooth muscle of guinea-pig. J. Pharm. Pharmacol. 1994; 46: 735-739.
- Nasu T. Actions of manganese ions in contraction of smooth muscle. Gen. Pharmacol. 1995 (a) 26: 945-953.
- Nasu T, Murase H, Shibata H. Manganese ions penetrate via L-type Ca²⁺ channels and induce contraction in high-K⁺ medium in ileal longitudinal smooth muscle of guinea-pig. Gen. Pharmac. 1995 (b); 26: 381-386.
- Nasu T, Arakaki H, Shibata H. Effects of nifedipine, ryanodine and cyclopiazonic acid on tension development by Mn²⁺ in Ca²⁺-free, high-K⁺ medium in ileal longitudinal muscle. Gen. Pharmac. 1995 (c); 26: 1255-1260.
- Nasu T, Oosako H. Dantrolene blocks the tonic contractions to carbachol and histamine with smaller effects oh the phasic due to release of intracellular Ca²⁺ in ileal longitudinal muscle. Gen. Pharmac. 1995 (d); 26: 1591-1596.
- Nasu T, Oosako H, Shibata H. Dantrolene blocks the tonic contraction and calcium influx evoked by K⁺ in ileal longitudinal smooth muscle. Gen.Pharmac. 1996; 27: 513-517.
- Nasu T, Sasaki M. Contractile action of Mn²⁺ via Ca²⁺ channels activated by Bay K 8644 in guinea-pig taenia coli. J. Pharm. Pharmacol. 1998; 50: 437-442.
- Ohta T, Kawai K, Ito S, Nakazato Y. Ca²⁺ entry activated by emptying of intracellular Ca²⁺ stores in ileal smooth muscle of the rat. Br. J. Pharmacol. 1995; 114: 1165-1170.
- Ohta T, Yasuda W, Hasegawa A, Ito S, Nakazato Y. Effects of inhibitors for

- tyrosine kinase and non-selective cation channel on capacitative Ca^{2+} entry in rat ileal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 387:211-220.
- Ohya Y, Kitamura K, Kuriyama H. Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cell. *Am. J. Physiol.* 1987; 252: C401-C410.
- Okamoto H, Inoue K, Kamisaki T, Takahashi K, Sato M. Regional differences in calcium sensitivity in the guinea-pig intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997; 49: 981-984.
- Okpo SO, Adeyemi OO. Effects of *Crinum glaucum* aqueous extract on intestinal smooth muscle activity. *Phytother. Res.* 1998; 12: 413-416.
- Orallo F, Gil-Longo J, Bardan B, Calleja J. Comparison of the effects of hydralazine and nifedipine on contractions and ^{45}Ca influx in rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991; 3: 356-359.
- Ozaki H, Karaki H. Different Ca^{2+} -sensitivity in phasic and tonic types of smooth muscles. *Biol. Signals* 1993; 2: 253-262.
- Pérez RM. Effect of an aqueous extract of *Brickellia veronicaefolia* on the gastrointestinal tract of guinea-pig, rat and mice. *Phytother. Res.* 1996; 10: 677-679.
- Prestwich S.A, Bolton T.B. G-protein involvement in muscarinic receptor-stimulation of inositol phosphates in longitudinal smooth muscle from the small intestine of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 1995 (a); 114: 119-126.
- Prestwich S.A , Bolton T.B. Inhibition of muscarinic receptor-induced inositol phospholipid hydrolysis of caffeine, β -adrenoreceptors and protein kinase C in intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1995 (b); 114: 602-611.
- Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 1986; 7: 1-12.
- Putney JW Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990; 11: 611-624.

- Putney JW Jr, Bird GSJ. The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 1993; 75: 199-201.
- Putney JW Jr. *Capacitative Calcium Entry*. 1997, ISBN 0.57059-43.
- Quast U. Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 1993; 14: 332-337.
- Rang HP. Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1964; 22: 356-365.
- Rasmussen H. Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 1970; 170: 404-412.
- Rauwald HW, Brehm O, Odenthal KP. Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Pseudanum ostruthium*. *Phytother. Res.* 1994; 8: 135-140.
- Reichling J. La producción de medicamentos herbolarios, fitofármacos modernos. *Fitofármacos*. (Eds) Lozoya X, Gómez E. 1 Simposio IMSS-Farmasa Schwabe, México 1997, págs. 3-18.
- Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on trachea and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneim. Forsch. Drug. Res.* 1985; 35: 408-414.
- Roberts MF, Timmermann BN, Mabry TJ. 6-Methoxyflavonols from *Brickellia veronicaefolia* (Compositae). *Phytochemistry* 1980; 19:127-129.
- Rüegg JC, Pfitzer G, Zimmer M, Hofmann F. The calmodulin fraction responsible for contraction in an intestinal smooth muscle. *FEBS Letts.* 1984; 170: 383-386.
- Sakai T, Terada K, Kitamura K, Kuriyama H. Ryanodine inhibits the Ca-dependant K current after depletion of Ca stored in smooth muscle cells of the rabbit ileal longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 1089-1100.
- Sato K, Ozaki H, Karaki H. Changes in cytosolic calcium level in vascular

- smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 246: 294-300.
- Savineau JP, Mironneau J, Mironneau C. Contractile properties of chemically skinned fibers from pregnant rat myometrium: Existence of an internal Ca store. *Pflügers Arch.* 1988; 411: 296-303.
- Seitz U, Ameri A, Pelzer H, Gleitz J, Peters T. Relaxation of evoked contractile activity of isolated guinea-pig ileum by (\pm)-kavain. *Planta Med.* 1997; 63: 303-306.
- Silver PJ, Stull JT. Regulation of myosin light chain and phosphorylase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 6145-6150.
- Silver PJ, Stull JT. Phosphorylation of myosin light chain and phosphorylase in tracheal smooth muscle in response to KCl and carbachol. *Mol. Pharmacol.* 1984; 25: 267-274.
- Smith JB, Dwyer SD, Smith L. Decreasing extracellular Na⁺ concentration triggers inositol polyphosphate production and Ca²⁺ mobilization. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 831-837.
- Sobieszek A. Ca-linked phosphorylation of a light chain vertebrate smooth-muscle myosin. *Eur. J. Biochem.* 1977; 733: 477-483.
- Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1968; 156: 129-145.
- Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 85: 5231-5235.
- Somlyo AP, Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 1989; 3: 2266-2276.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling: the role of G-proteins in Ca²⁺-release and modulation of Ca²⁺-sensitivity. *Jpn. J. Pharmacol.* 1992; 58: (suppl 2), 54P-59P.

- Somlyo AP, Somlyo A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236.
- Somlyo AP. How many messengers to send calcium? Focus on IP₃ receptor blockade fails to prevent intracellular Ca²⁺ release by ET-1 and α-thrombin. *Am. Physiol. Soc.* 1998; 274: C1453-C1455.
- Stout G, Falk-Stout V. The structure and synthesis of xanthomicrol. *Tetrahedron*, 1961; 14: 296-303.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca²⁺ from a non-mitochondrial intracellular store of pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5 trisphosphate. *Nature (Lond)* 1983; 306: 67-69.
- Stull JT. Phosphorylation of contractile proteins in relation to muscle function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1980; 13: 39-93.
- Sutter MC, Hay PBY, Lim SL. Manganese can inhibit or potentiate contractile responses in mesenteric portal vein. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 1988; 66: 737-744.
- Supattapone S, Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. Solubilization, purification and characterization of an inositol triphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 1530-1534.
- Suzuki E, Tsujimoto G, Tamura K, Hashimoto K. Two pharmacologically distinct α₁-adrenoreceptor subtypes in the contraction of rabbit aorta. *Mol. Pharmacol.* 1990; 38: 725-736.
- Takayanagi I, Ohtsuki H. Greater contraction is induced by pilocarpinethan carbachol at the same level of cytosolic Ca²⁺ concentration in isolated longitudinal muscle of guinea-pig ileum. *Jpn. J. Pharmacol.* 1990; 53: 525-528.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter, thapsigargin, in partoid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 12266-12271.
- Thastrup O, Dawson AP, Scharff O. Thapsigargin, a novel molecular probe

- for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and Actions* 1994; 43: 187-193.
- Timmermann BN, Mues R., Mabry TJ, Powell M. 6 Methoxyflavonoids from *Brickellia laciniata* (Compositae). *Phytochemistry* 1979; 18: 1855-1858.
- Timmermann BN, Graham S, Mabry TJ. Sulfated and 6-methoxyflavonoids from *Brickellia baccharidea*. *Phytochemistry* 1981; 20: 1762.
- Toescu EC, O'Neill, Petersen OH, Eisner DA. Caffeine inhibits the agonist-evoked cytosolic Ca²⁺ signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol triphosphate production. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 23467-23470.
- Tortoriello J, Meckes-Fischer M, Villarreal ML, Berlin B, Berlin E. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the highland of Chiapas. *Phytomed.* 1995; 2: 57-66.
- Tortoriello J, Aguilar-Santamaría L. Evaluation of the calcium-antagonist antidiarrheic and central nervous system activities of *Baccharis serraefolia*. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 53: 157-161.
- Triggle DJ, Zheng W, Hawrhorn M, Kwon YW, Wei XY, Joslyn A, Ferrante J, Triggle AM. Calcium channels in smooth muscle. Properties and regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1989; 215-229.
- Tyler V.E. *Herb of Choice. The Therapeutic use of Phytomedicinal.* Pharmaceutical Products Press. Haworth Press, Inc. N.Y. 1994. pp. 17-21.
- Ulubelen A, Timmermann BN, Mabry TJ. Flavonoids from *Brickellia chlorolepsis* and *B. dentata*. *Phytochemistry* 1980; 19: 905-908.
- Urakawa N, Holland W. ⁴⁵Ca uptake and tissue calcium on K-induced phasic and tonic contraction. *Am. J. Physiol.* 1964; 207: 873-876.
- Usune S, Katsuragi T, Furukawa T. Discrimination by nimodipine, but not by nifedipine, between phasic and tonic contractions of guinea-pig taenia coli induced by K⁺ depolarization. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1996; 73: 1600-1604.

- Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. Effects of cyclopiazonic acid, a novel Ca^{2+} inhibitor on contractile responses in skinned ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106: 208-214.
- Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 565-572.
- Van der Bent V, Bény JL. Mechanisms controlling caffeine-induced relaxation of coronary artery of the pig. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 103:1877-1882.
- Van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smooth muscle. *Ann.Rev. Physiol.* 1989; 51: 315-329.
- Vuorela H, Vuorela P, Tornquist K, Alaranta S. Calcium channel blocking activity: Screening methods for plant derived compounds. *Phytomed.* 1997; 4: 167-181.
- Wagner H. Leading structures of plant origin for drug development. *J. Ethnopharmacol.* 1993; 38: 105-112.
- Weiss G, Goodman F. Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and Ca^{45} movements in intestinal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1969; 169: 46-55.
- Weiss GB. Cellular pharmacology of lanthanum. *Annu. Rev. Pharmacol.* 1974; 14: 343-354.
- Weiss GB, Hatano K, Stall JI. Contrast between actions of two calcium channel inhibition and hydralazine on tension and on uptake and mobilization of ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle. *Blood Vessels* 1981; 18: 230.
- Word RA, Kamm KE. Regulation of Smooth Muscle Contraction by Myosin phosphorylation. In: *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function.* (Eds) Kao CY, Carsten ME. Cambridge University Press, 1997, p.210.
- Yamazawa T, Iino M, Endo M. Presence of functional different compartments of the Ca^{2+} store in single intestinal smooth muscle. *FEBS Letts.* 1992; 301: 181-184.

Mariana Meckes

De: Dr. A. Nahrstedt <nahrste@uni-muenster.de>
Para: test test <meck7707@prodigy.net.mx>
Enviado: Domingo, 03 de Febrero de 2002 08:40 a.m.
Asunto: Planta Medica (acc)

Dear Dr. Meckes:

Thank you for re-submitting your improved manuscript 30 10 01.
This is to inform you that your manuscript was now accepted for publication
in Planta Medica in the Full Paper format.
Proofs will reach you in 12-16 weeks time from Thieme Publisher.
Yours sincerely, A. Nahrstedt (Editor)

Prof. Dr. Adolf Nahrstedt
Pharmaceutical Biology and Phytochemistry
University of Muenster, Germany
fax: +251 833 8341
email: nahrste@uni-muenster.de

Effects of a Labdane Diterpene Isolated from *Brickellia paniculata* on Intracellular Ca^{2+} Deposit of Guinea-Pig Ileal Longitudinal Muscle

Mariana Meckes^{1*}, Rubén Román-Ramos², Salud Pérez³, Fernando Calzada¹ and Héctor Ponce-Monter⁴

¹ U.I.M Farmacología de Productos Naturales. Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, cp.06725, México DF

² Laboratorio de Farmacología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México DF

³ Laboratorio de Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México DF.

⁴ U.I.M Farmacología. Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, cp.06725, México DF.

Abstract: The labdane diterpene 3 α -angeloyloxy-2 α -hydroxy-13,14Z-dehydrocativic acid (AAHDD) isolated from *Brickellia paniculata* leaves, produces relaxation of the guinea-pig ileum *in vitro* by Ca^{2+} antagonistic effect. In the longitudinal ileal muscle the compound inhibited the tonic contractions induced with 60 mM K^+ (IC_{50} =15.52 \pm 1.93 μM) with half a potency than that of papaverine (IC_{50} =6.70 \pm 1.31 μM). Phasic response to high K^+ was also blocked by AAHDD, being the ratio IC_{50} phasic / IC_{50} tonic=7.11. In Ca^{2+} -free, high K^+ (60 mM) solution, AAHDD inhibited the contractions induced with 2mM Ca^{2+} and pretreatment of the tissues with 10 μM cyclopiazonic acid or 30 μM ryanodine failed to influence the blockade of AAHDD on Ca^{2+} induced contractions. In muscles loaded with ^{45}Ca , after washing the preparations with AAHDD in high K^+ (60 mM) solution, determined ^{45}Ca efflux was similar to that of the control without the diterpene. As the relaxant effect of AAHDD was not influenced by cyclopiazonic acid and by ryanodine - two agents which have been described as modulators of Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release from intracellular stores- the obtained results suggest that tension inhibitory effects produced by AAHDD does not involve the mobilization of Ca^{2+} at intracellular deposit.

Key words: *Brickellia paniculata* (Asteraceae), medicinal plant, relaxant effect, Ca^{2+} -antagonist, labdane diterpene, longitudinal guinea-pig ileum.

Introduction

Brickellia paniculata (Asteraceae) is a medicinal plant commonly used in Southeastern Mexico to treat colics, abdominal pains and watery diarrhoea (1,2). In a previous study, from the methanolic extract were isolated a flavonoid (xanthomicrol) and a labdane diterpene, this latter compound was structurally characterized as 3 α -angeloyloxy-2 α -hydroxy-13,14Z-dehydrocativic acid [AAHDD] (3). The structures have already been

reported and, their identity was confirmed by comparison with published physical and spectroscopic data (4-6). Both compounds relaxed the segments of isolated guinea-pig ileum stimulated with high K^+ and the effect was correlated with an interference of Ca^{2+} mobilization in the cell. Furthermore, a competitive calcium-antagonistic activity was described for AAHDD, although the precise mechanism underlying this effect was not demonstrated. It is well documented that in the guinea pig ileum, K^+ depolarization induces the opening of the voltage-dependent calcium channels increasing the influx of Ca^{2+} into the cell; as a response to the rise of free- Ca^{2+} in the cytosol, the muscle contracts. Calcium entry is the primary but not the sole mechanism of increasing $[Ca^{2+}]_i$, since the release of the cation from intracellular deposit can also occur. Phasic response to K^+ has been attributed to a rise in cytosolic free- Ca^{2+} which is released from intracellular store. On the other hand, the tonic component has been associated with the opening of the voltage-dependent calcium channels causing Ca^{2+} influx to increase (7-9).

As it has been observed, the compound AAHDD inhibited with the same potency the K^+ evoked phasic and tonic components of the contractile response. This work was undertaken to gain further information about a possible blocking action of AAHDD at intracellular Ca^{2+} stores.

Materials and Methods

Stability of the pure compound *3 α -angeloyloxy-2 α -hydroxy-13,14Z-dehydrocativic acid* [AAHDD] was corroborated by RMN spectra.

Tissue preparation and tension recording

Male, Hartley guinea pigs weighing 400-550g were stunned and bled. Biological experiments were carried out according to the guidelines of the local animal ethics (National Social Security Department); after stunning, the animals were exsanguinated from carotid arteries. Strips (3mm in wide x 10 mm in length) from the longitudinal layer of distal ileum were isolated (10) and suspended in 10 mL organ baths in normal Tyrode solution of the following composition (in mM): NaCl 136.8; KCl 2.68; $CaCl_2$ 1.84; $MgCl_2$ 0.49; NaH_2PO_4 0.36; $NaHCO_3$ 11.10 and glucose 11.10 (pH 7.4). Ca^{2+} -free solution was prepared by removing $CaCl_2$ and high K^+ (60 mM) solutions were made either by substituting 60 mM NaCl in the normal solution with equimolar K^+ (isosmotic) or by adding appropriate concentration of KCl to the normal solution (hyperosmotic). The composition of modified Tyrode's buffer used to determine ^{45}Ca efflux was (mM): NaCl 123.7, KCl 2.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.0, tris(hydroxymethyl)aminomethane 25 and glucose 5.5 (pH 7.4). The tissues were continuously bubbled with O_2 (5% CO_2) or 100% O_2 when modified Tyrodes's buffer was used, and incubation temperature was maintained at 37°C.

Usually, six organ baths were used in parallel. The preparations were maintained at a resting tension of 1g, and changes in tension were recorded isometrically with a Grass force-displacement transducer (FTO3C) connected to the Grass-7D polygraph.

Contractile responses

The preparation was stimulated with the isosmotic high K^+ (60 mM) solution. Once the contraction reached a steady maximal response ($E_{max}=100\%$), every 3min AAHDD was added cumulatively into the bath. Drugs, solubilized in dimethyl sulphoxide (DMSO) were applied to the bathing media at a volumen $< 0.1\%$ of the vehicle, at this concentration DMSO had no effect on the contractility of the tissues.

To check if cyclopiazonic acid (CPA) and ryanodine, two agents known for modulate functions of sarcoplasmic reticulum (SR), modified the blocking effect of AAHDD against Ca^{2+} , the preparations were stabilized in normal Tyrode for 45 min; afterwards, they were repeatedly washed with a Tyrode Ca^{2+} -free solution for 50-60 min. In order to deplete entirely the accumulated Ca^{2+} in the storage site, the tissues were exposed to caffeine (10 mM). In the absence or presence of SR modulators (10 μ M CPZ or 30 μ M ryanodine), contractile responses were elicited in high K^+ (60 mM; hyperosmotic) with a single dose of 2 mM Ca^{2+} . AAHDD, tested for its ability to modify Ca^{2+} evoked contractions, was applied to the organ bath, 15 min prior to the subsequently contraction induced with Ca^{2+} .

^{45}Ca efflux

The rate of Ca^{2+} efflux from the tissues was followed by means of the radioactive tracer. The preparations were equilibrated for at least 90 min in 3 ml organ bath with modified Tyrode's buffer and bubbled with 100% O_2 . Afterwards, the strips were incubated for 30 min in K^+ (60 mM) hypertonic solution containing 6.5 μ Ci/ml $^{45}Ca^{2+}$ (Amersham , specific activity 35 mCi mg^{-1}).The preparations were successively washed at intervals of 5 min with nonradioactive, hypertonic (60 mM K^+) modified Tyrode's solution (controls) or with nonradioactive, hypertonic (60 mM K^+) +100 μ M AAHDD solution. The effluents and the strips were treated with Eco Lume solubilizer (ICN) and radioactivity of the samples was counted with a Beckman liquid scintillation spectrophotometer.

Data analysis

The results are expressed as mean \pm S.D and Student's t-test was used for statistical evaluation, a difference with $p<0.05$ was considered to be significant. The tissue maximal contraction was determined as the response elicited with 60 mM K^+ or 2mM Ca^{2+} and inhibition of the response was expressed as percentage of this maximal effect. Data in concentration-response curves were adjusted by the Sigma Plot non-linear curve fitting program to obtain IC_{50} values.

Results

Effects of AAHDD on high K^+ -induced contraction

Stimulation by high K^+ induced a biphasic contractile response with an initial rapid, high transitory increase in tension (phasic component) followed by a slow sustained contractile response (tonic component). In the present study, tonic contraction induced with isosmotic K^+ -depolarizing Tyrode reached a steady level of tension after 40-50 min. Applied at 3 min intervals, cumulative concentrations of AAHDD (5-45 μ M) produced a concentration-dependent inhibition of this sustained tonic contractile response. The potency of the inhibitory effect (IC_{50}) was 15.52 ± 1.93 μ M (n=30), two fold lower than the potency obtained with papaverine (6.70 ± 1.31 μ M, n=12) the well known antispasmodic agent described as a non-specific calcium antagonist which was included in this assay as a reference. As it is shown in Table 1, blocking effect of AAHDD on the phasic response to high K^+ was less potent, although the ratio of IC_{50} for phasic contraction to IC_{50} for the tonic contraction (7.11) was not as markedly high as with verapamil (181.25), a specific voltage-dependent calcium channel antagonist. After washing the preparations, recovery of the tissues treated with AAHDD was 85-95%.

Effects of AAHDD on $^{45}Ca^{2+}$ efflux in high K^+ media

A release of cellular $^{45}Ca^{2+}$ can be induced by K^+ depolarization in the presence of external Ca^{2+} . Incubated tissues for 30 min in $^{45}Ca^{2+}$, high K^+ (60 mM) hypertonic solution and then washed with non-radioactive solution, lost ^{45}Ca rapidly during the first 15 min of washing and thereafter, at a progressively slower rate. The data indicating the manner in which ^{45}Ca flowed out of the muscle describes a curved line which was not modified by adding 100 μ M AAHDD to the eluent. Fig. 1 shows the fractional outflow of $^{45}Ca^{2+}$, desaturation curves were plotted from a summation of the $^{45}Ca^{2+}$ present in each sample and the amount of ^{45}Ca remaining in the tissues at the end of the washout period.

Effects of AAHDD on the response to Ca^{2+} application in treated tissues with CPA and ryanodine.

After the tissues had been incubated in Ca^{2+} -free medium for 40-50 min and Ca^{2+} was totally removed from the intracellular stores with 10 mM caffeine, SR seems almost depleted from Ca^{2+} . Further, contraction evoked with 2 mM Ca^{2+} in high K^+ (60 mM; hyperosmotic) was inhibited with AAHDD (5-80 μ M) to obtain the control curve. Pretreating of the preparations with 10 μ M CPA did not change the muscle tone but Ca^{2+} -evoked contractile response diminished by 13.19 ± 5.6 % in 75.26% of the strips (n=24). The maximum contractile response obtained in this case (E'_{max}) was taken as 100%. After washout, the recovery of the

tissues was almost 100%. Inhibitory responses produced by AAHDD on Ca^{2+} -induced contractions in the presence of CPA were expressed as percentage of E'_{max} and the relaxant curve showed to be not significantly different from the control (Table 2).

In the SR membrane, ryanodine opens Ca^{2+} -permeable channels sensitive to Ca^{2+} , making the SR leaky to Ca^{2+} (Iino 1988). In the assayed longitudinal tissues with 30 μM ryanodine, it was observed that the muscle tone remained unchanged but Ca^{2+} -evoked contractile response significantly reduced by $22.91 \pm 7.00\%$ ($n=32$) in all the tissues. Inhibitory effect of AAHDD (5-80 μM) was not significantly different from the control without ryanodine (Table 2).

Discussion

High concentrations of K^+ (30-140 mM) produce a sustained tonic smooth muscle contraction, a response of the tissue which has been proposed to occur due to membrane depolarization resulting in sustained opening of the voltage-dependent Ca^{2+} channels and Ca^{2+} influx (12). Increase of calcium concentration in the cytosol triggers Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. In our study, the labdane diterpene AAHDD isolated from *Brickellia paniculata* leaves, concentration-dependently inhibited the phasic and the tonic contractile responses evoked by 60 mM K^+ . The obtained results could imply that AAHDD inhibited Ca^{2+} influx by a blockade at the voltage-dependent Ca^{2+} channels. Tonic contraction is more markedly inhibited than the phasic contraction by voltage-dependent Ca^{2+} channel antagonists; nevertheless, it is well known that nifedipine abolishes phasic response induced with K^+ in guinea-pig taenia coli preparations with a ratio IC_{50} phasic/ IC_{50} tonic contraction equal to 6.4; obtained ratio in this assay was 7.11, two-fold higher than that obtained with papaverine. In the longitudinal muscle of guinea-pig taenia coli, verapamil and papaverine have been reported with ratios half the values obtained in the present study with ileal longitudinal preparations (12). Smooth muscle regional variations in the sensitivity to the inhibitors has been already described and could be an explanation for this difference (13). Moreover, obtained ratio shows a difference with previously determined IC_{50} phasic/ IC_{50} tonic=1.49 for the complete ileal segments.

Further, it was studied the effect of intracellular Ca^{2+} stores modulators on the capacity of AAHDD to inhibit evoked contractions. In guinea-pig ileum, a calcium-free medium eliminates Ca^{+2} entry, may deplete the Ca^{2+} stores and, with caffeine unloads the SR. Under these conditions, it was shown that AAHDD dose dependently blocked the contractions induced by a single concentration of 2 mM Ca^{2+} in Ca^{2+} -free, high K^+ (60 mM) solution. Comparing the effect of AAHDD with that obtained in tissues pretreated with CPA, a selective Ca^{2+} -ATPase inhibitor of SR that prevents Ca^{2+} sequestration (14), it was shown that contraction induced with Ca^{2+} in the presence of CPA was not significantly different from the control without CPA. On the other hand, ryanodine induces Ca^{2+} release from the SR, it stimulates calcium channels at the organelle locking the "calcium-induced calcium release channels" (CICR) in an open state (15). Thus, intracellular store

in this situation lost its capacity to hold calcium inside (16). In all the preparations pretreated with ryanodine it was observed that the contractile responses evoked by 2 mM Ca^{2+} were decreased in tension if compared with the controls without ryanodine, although AAHDD blockade was similar to the effect in the preparations without ryanodine pretreatment. Extracellular Ca^{2+} has been described as the major source for refilling the stores following Ca^{2+} release by an agonist, and the state of emptiness of the intracellular deposits may be the signal for the Ca^{2+} entrance at the cell membrane (17). Attenuated contractile responses by Ca^{2+} in tissues treated with CPA or ryanodine occurred presumably because in this situation SR is unable to refill the deposit with Ca^{2+} or, it loss the capacity to buffer Ca^{2+} -influx.

Since the stimulated ^{45}Ca efflux was unaffected by AAHDD, it may be assumed that Ca extrusion pump is insensitive to the diterpene. The results obtained with the here designed assay permit to assume that AAHDD blocking pathway is not related with a process of releasing or refilling Ca^{2+} from the intracellular deposit.

Acknowledgements

This study was supported by a Grant-in-Aid for Research (FP0038664) from the Medical Research Council of the Mexican Institute of Social Security and the National Council of Science and Technology, Mexico (0485P-M).

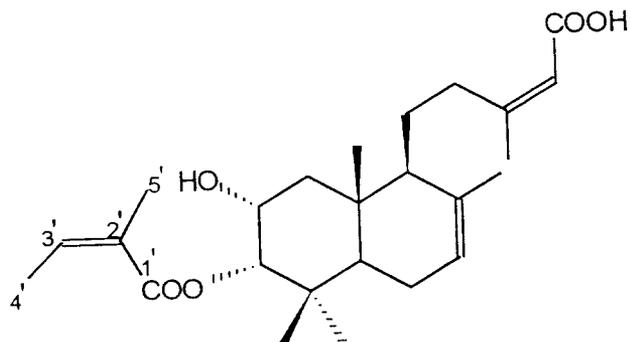
References

- [1] Berlin EA, Berlin B. Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico. The Gastrointestinal Diseases. Princeton Academic Press. USA. 1995: 126, 451
- [2] Berlin B, Berlin EA, Meckes M, Lozoya X, Villarreal ML, Tortoriello J. The Scientific Basis of Gastrointestinal Herbal Medicine among the Highland Maya of Chiapas, Mexico. In: Naked Science Anthropological Inquiry into Boundaries, Power and Knowledge. Nader L, editor. Routledge. USA. 1996: 43-68
- [3] Meckes M, Calzada F, Paz D, Rodríguez J. Effects of active compounds isolated from *Brickellia paniculata* on isolated smooth muscle. 38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Iowa, U.S.A. 1997:
- [4] Stout G. and Falk-Stout, V. The structure and synthesis of xanthomicrol. Tetrahedron 1961; 14: 296-303.
- [5] Bohlmann F, Bapuji M, Jakupovic J, King R, Robinson H. Unusual diterpenes from *Brickellia eupatorioides*. Phytochemistry 1982; 21: 181-186

- [6] Bohlmann F, Zdero Ch. Naturally occurring terpene derivatives. Constituents of the genus *Brickellia*. Chem Ber 1976; 109: 1436-1445
- [7] Nasu T, Oosako H, Shibata H. Dantrolene blocks the tonic contraction and calcium influx evoked by K^+ in ileal longitudinal smooth muscle. Gen Pharmacol 1996; 27: 513-517
- [8] Dessy Ch, Godfried T. The effect of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle. Br J Pharmacol 1996; 119; 142-148
- [9] Urakawa, N. and Holland, W.C. ^{45}Ca uptake and tissue calcium on K-induced phasic and tonic contraction; Am. J. Physiol. 1964; 207: 873-876
- [10] Honda K, Takano Y, Kamiya H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea-pig ileal longitudinal muscle. Gen Pharmacol 1996; 27: 957-961
- [11] Himpens B, Somlyo AP. Free-calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle. J Physiol 1988; 395: 507-530
- [12] Usune S, Katsuragi T, Furukawa T. Discrimination by nimodipine, but not by nifedipine, between phasic and tonic contractions of guinea-pig taenia coli induced by K^+ depolarization. Can J Physiol Pharmacol 1996; 73: 1600-1604
- [13] Okamoto H, Inoue K, Kamisaki T, Takahashi K, Sato M. Regional differences in calcium sensitivity in the guinea-pig intestine. J Pharm Pharmacol 1997; 49: 981-984
- [14] Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe MB. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum increases excitability in ileal smooth muscle. Brit J Pharmacol 1993; 110: 565-572
- [15] Hwang KS, Van Breemen C. Ryanodine modulation of $^{45}Ca^{2+}$ efflux and tension in rabbit aortic smooth muscle. Pflüg Arch -Eur J Physiol 1987; 408: 343-350
- [16] Iino M, Kobayashi T, Endo M. Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. Biochem Biophys Res Comm 1988; 152: 417-422
- [17] Putney JW Jr, Bird GSJ. The signal for capacitative calcium entry. Cell 1993; 75: 199-201

Mariana Meckes

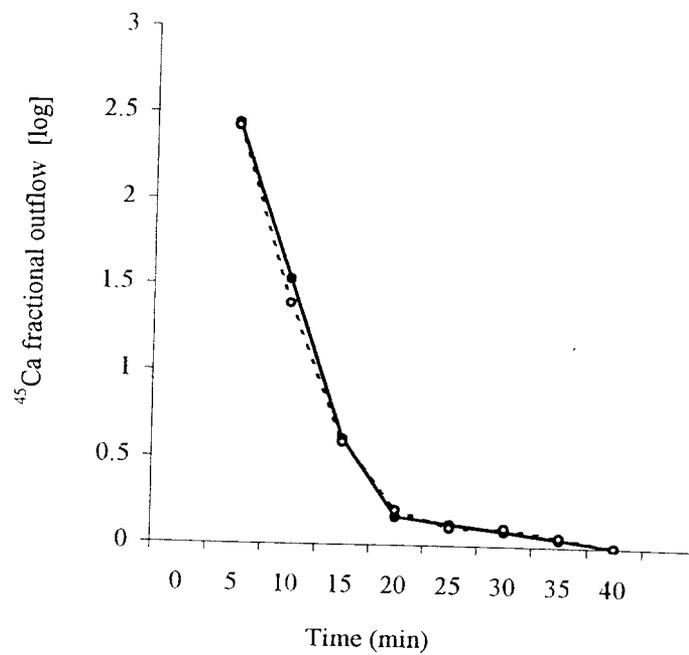
Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
Av. Cuauhtémoc, 330, Col Doctores cp. 06725, México D.F
fax: 57-61-0952
meck7707@prodigy.net.mx



3α-angeloyloxy-2α-hydroxy-13,14Z-dehydrocativic acid (AAHDD)

Antagonist	IC ₅₀ (μM)		A/B
	phasic (A)	tonic (B)	
AAHDD	110.39 ± 21.42	15.52 ± 1.93	7.11
Verapamil	2.90 ± 0.68	0.016 ± 0.005	181.25
Papaverine	23.83 ± 8.39	6.70 ± 1.31	3.56

AAHDD (μM)	% INHIBITION ($\bar{x} \pm \text{S.D}$)		
	control	Ryanodine	CPA
5	7.52 \pm 4.12		7.64 \pm 0.60
10	22.39 \pm 4.52	20.98 \pm 3.41	21.66 \pm 3.38
20	40.57 \pm 6.00	32.65 \pm 7.61	44.03 \pm 4.39
30	51.54 \pm 9.73	54.80 \pm 9.64	
35	60.24 \pm 9.02	63.91 \pm 10.56	
40	67.63 \pm 6.24	72.71 \pm 7.42	59.93 \pm 3.22 *
60	75.00 \pm 5.61	85.14 \pm 1.87 *	81.61 \pm 9.73
80	78.91 \pm 4.41		87.20 \pm 5.10 *



LEGENDS

Table 1. Inhibitory effect of AAHDD, verapamil and papaverine on induced contractions with 60 mM K^+ . All the values were calculated as % respect the maximum phasic and tonic responses with K^+ ($E_{max}=100\%$) and the concentration of the blocking agents giving half the maximal response (IC_{50}) was calculated from the fitted non-linear curve ($n=10$).

Table 2. Effect of ryanodine and CPA acid on the blockade with AAHDD of 2 mM Ca^{2+} -induced contraction. AAHDD (5-80 μM) was added to the tissues depleted from calcium and depolarized with K^+ (60 mM), 10 min before inducing the contractile response with 2 mM Ca^{2+} . Values are expressed as percentages of the maximum effect without AAHDD (E_{max}). By following the same procedure, a second series of longitudinal strips were treated with 10 μM cyclopiazonic acid or 30 μM ryanodine for 20 min, before stimulating with 2 mM Ca^{2+} (E'_{max}). Contractile responses in the presence of AAHDD (5-80 μM) were expressed as percentages of E''_{max} . Each point is the mean \pm SD of 6-8 strips; * $p<0.05$, with respect to the control.

Figure 1. The desaturation curves were obtained after washing the tissues with the hypertonic medium containing K^+ (60 mM) (\bullet) or the medium+100 μM AAHDD (\circ), following the incubation of the tissues at 37°C and 100% O_2 for 30 min in a high K^+ solution + 6.5 $\mu Ci/mL$ $^{45}Ca^{2+}$. Decrease of ^{45}Ca is plotted in relative units on a logarithmic scale as a function of time. Each point in the curves represents the mean of 5 experiments.