

25
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS CAURENOS AISLADOS DE
Montanoa sp. SOBRE EL UTERO DE RATA in vitro

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PATRICIA CAMPOS BEDOLLA

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	i
-------------------	---

I. INTRODUCCION

1. Aspectos botánicos	1
a. Consideraciones botánicas	1
b. Descripción botánica	11
2. Aspectos etnobotánicos	13
3. Estudios fitoquímicos	15
4. Naturaleza de los compuestos	22
5. Estudios farmacológicos	24
6. Mecanismo de excitación-contracción del músculo liso	39
7. Inervación uterina	44
8. Aspectos histológicos del aparato reproductor femenino de la rata	46
9. Cambios morfológicos inducidos por la acción de los estrógenos en útero de la rata	49
10. Mecanismo de acción de los estrógenos en el útero de la rata	52

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
--	----

III. OBJETIVOS	56
--------------------------	----

IV. MATERIAL Y METODO	
1. Ensayos farmacológicos	57
2. Compuestos utilizados	59
3. Técnicas histológicas	60
4. Análisis estadístico	62
V. RESULTADOS	
64	
VI. DISCUSION	
80	
VII. CONCLUSIONES	
86	
VIII. BIBLIOGRAFIA	
87	

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto, *in vitro*, de los caurenos ácido cauradienoico, caurenoico, grandiflorico, 16 alfa-OH caurenoico y su ester metílico aislados de *Montanoa ssp.* sobre el útero de rata tratada con estrógeno en contracciones inducidas por los agonistas acetilcolina, oxitocina y serotonina. Se observó que los caurenos estudiados inhiben indistintamente la respuesta contráctil inducida por estos agonistas en el útero de rata. Lo cual sugiere que estos compuestos podrían participar en el proceso de entrada de Ca^{2+} o en la inhibición de la hidrólisis de los fosfoinosítidos, ya que la contracción uterina está íntimamente relacionada con el ingreso de Ca^{2+} extracelular.

El estudio histológico muestra el efecto del ácido cauradienoico (40.0 ug/ml) en el útero de rata tratada con estrógeno. Se reporta que este caureno induce descamación del epitelio de revestimiento y laxitud del tejido conjuntivo que rodea a las glándulas.

El objeto de este trabajo es el de contribuir en el esclarecimiento de los posibles mecanismos de acción de los caurenos en el músculo liso uterino de rata.

INTRODUCCION

ASPECTOS BOTANICOS

CONSIDERACIONES BOTANICAS

El cihuapahtli, un nombre náhuatl asignado a plantas del género *Montanoa* que han sido utilizadas, desde épocas precolombinas, para el tratamiento de disfunciones en el aparato reproductor de la mujer.

El género *Montanoa*, perteneciente a la familia Compositae, tribu Helianthae, está representado por 25 especies y 8 subespecies (Font, 1981).

En 1790, Cervantes describe por primera vez el género *Montanoa*, dedicado al médico Luis Montaña y consideró una especie, *M. tomentosa*.

Von Humboldt, Bonpland y Kunth (1820) habfan descrito este género como *Eriocoma*, con una sólo especie *E. floribunda*.

En 1836, De Candolle modificó el nombre *Montanoa* por *Montagnaea*, para aproximar más la pronunciación hispánica del apellido Montaña, y describió 8 especies de este género. Posteriormente, Robinson y Greenman (1899) realizaron una revisión del género.

En la obra de Standley *Arboles y arbustos de México* (1920-1926), se asigna 31 especies diferentes al género *Montanoa*.

En su tesis doctoral, Font (1981) describió la distribución

del género *Montanoa* en México y Centroamérica, así como su ubicación taxonómica. Reporta en la República Mexicana 21 especies de las 25 descritas para este género (Cuadro 1).

Se distribuye principalmente en zonas perturbadas, bosque de pino, bosque de pino-encino y selva baja caducifolia, desde 230-2100 msnm. Existen reportes de las especies de *Montanoa* para el Distrito Federal y los estados de Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Font, 1981).

ESPECIES DESCRITAS PARA EL GENERO *Montanoa*

- M. tomentosa* (Cerv.)
M. frutescens (Mairet ex D. C.)
M. guatemalensis (Robins. ex Groenland)
M. mollissima (Brongniart ex Groenland)
M. andersonii (Mc Vough)
M. standleyi (V. A. Funk)
M. liebannii (Schultz Bip in Klatt, S.F. Blake)
M. echinacea (S. F. Blake)
M. revealli (H. Robinson)
M. ovulifolia (Delessert ex D. C.)
M. badilloi (V. A. Funk)
M. ungulata (Badillo)
M. quadrangularis (Schultz Bip in C. Koch)
M. josei (V. A. Funk)
M. leucantha (Log., S. F. Blake)
M. karwinskii (D. C.)
M. atriplicifolia (Pers., Schultz Bip in Seemann)
M. pteropoda (S. F. Blake)
M. hibiscifolia (Benth in Oerst.)
M. hexagona (Robins. y Greenm.)
M. laskowskii (Mc Vaugh)
M. grandiflora (Alaman ex D. C.)
M. speciosa (D. C.)
M. imbricata (V. A. Funk)
M. bipinnatifida (Kunt C. Koch)

DESCRIPCION BOTANICA
(Tomada de Font, 1981)

Montanoa es un género arbustivo, muy ramificado, con una altura de 1.0-3.0 m. El tallo es café, cilíndrico, estriado y tomentoso.

Las hojas son opuestas, con peciolo de 1.5-4.0 cm de largo y 2.0-8.0 cm de ancho; las inferiores de cordado a ovado-trianguulares y las superiores ovado-oblongo-lanceoladas. El ápice es de agudo a acuminado, el margen de aserrado a irregularmente dentado y sin lóbulos o hasta 3-5 lóbulos; el haz de moderado a densamente pubescente y el envés espaciado o densamente pubescente con pelos de 2 mm de largo (Fig. 1).

Tiene cabezuelas pequeñas de 0.3-0.8 cm en flor y 0.5-1.2 cm de diámetro en fruto; en inflorescencias cimosas, dispuestas en corimbos compuestos, ramificados en forma opuesta y alterna.

Es un género monoico, con 0-6 rayos florales, sus corolas son de color crema a blanco, con lóbulos ovadas a obovadas, de 3.0-5.0 mm de largo y 2.0-4.0 mm de ancho y el ápice de truncado a redondeado. Los discos florales son de 8-9; las corolas de amarillo pálido a obscuro, espaciadamente pubescente, unido a su base, 5 lóbulos agudos pubescentes. Los estambres con filamentos de 1.2-3.5 mm de largo y 0.2 mm de ancho, con anteras no salientes de la corola; las tecas de color amarillo a café y los estilos amarillos de 5.5 mm de largo. Del total de aquenios por cabeza sólo madura uno, y es de color café negrusco, con una longitud de 2.5-3.5 mm y 1-1.5 de diámetro.

ASPECTOS ETNOBOTANICOS DEL ZOAPATLE

A lo largo de muchos siglos, los diferentes grupos étnicos de México han utilizado diversas especies vegetales, de una u otra forma como agentes reguladores de la fertilidad humana. Tal es el caso de las plantas del género *Montanoa*, que han sido descritas en las diferentes fuentes históricas, desde hace más de 400 años, como plantas utilizadas para inducir la menstruación y el aborto o estimular las contracciones uterinas durante el parto (De la Cruz, 1552).

Diversas denominaciones comunes se le han asignado a algunas especies de este género, como es el zihuatpatl, zoapatl, cihoapatli y zoapatle. Conforme a la nomenclatura náhuatl, cihuapahtli (cihua (tl), mujer y pahtli, medicina), significa medicina de la mujer (Derbez, Pardo y Del Pozo 1945; Lozoya y Lozoya, 1982). Sin embargo, el término zoapatle es el más utilizado en la actualidad.

La primera descripción del uso del zoapatle la realiza De la Cruz (1552) en su libro sobre plantas medicinales indígenas, traducido al latín por Juan Badiano en 1552, *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. En el cual recomienda el uso del zoapatle "...cuando una mujer tiene dificultad para eliminar el feto o para facilitar el parto".

En los libros *La Historia general de las cosas de la Nueva España*, escrito por Fray Bernardino de Sahagún en 1570, describe el uso empírico de la planta donde se establece que "...son

útiles estas, sus hojas no se muelen, enteras se hierven (lo que) sale de sus hojas bien cocidas, le es útil a las mujercitas que ya sientes su vientre, que están a punto de parir..." y describe también "...cuando ya la preñada sentía los dolores del parto, luego le daban un baño y después del baño dábanle a beber la raíz de una yerba molida que se llama cihuapactli, que tiene la virtud de impeler o empujar afuera la criatura...". (López-Austin, 1971).

En *Historia natural de la Nueva España*, escrito por Hernández (1576), describe plantas denominadas como cihuapatli con propiedades medicinales en la mujer.

Ximénez (1615) describe la morfología, distribución del "cihuapahtli heminiótico", descrito anteriormente por Hernández (1576).

Posteriormente, Cervantes (1880) realiza la descripción botánica del zoapatle, así como sus propiedades y modo de empleo, en *Ensayo a la materia médica vegetal de México*.

ESTUDIOS FITOQUIMICOS

El interés por conocer y aislar los compuestos secundarios del zoapatle ha motivado un número considerable de investigaciones fitoquímicas para el género *Montanoa* (Cuadro 2).

García-Peña (1888), Rfo de la Loza (1893) y Quiróz (1894), que realizando los primeros análisis de los componentes de la planta, reportaron la presencia de un alcaloide no identificado.

En un estudio efectuado por Altamirano (1895) se reportó la obtención de dos sustancias, una ácida de color negro y otra neutra de color amarilla, definiendo ésta última como un producto con probables efectos biológicos.

En 1925 Fernández de Castro en su trabajo *Contribución al estudio del cihuaphtli* llevó a cabo un análisis de la planta del que obtuvo dos alcaloides, uno soluble en agua y otro líquido soluble en éter.

No fue sino hasta 1970 que Caballero y Walls encontraron dos compuestos nuevos, el ácido monoginoico y una lactona sesquiterpénica, a la que se le dio el nombre de zoapatlina. Asimismo, aislaron otros compuestos descritos para otras plantas: el ácido cauradienoico (Brieskorn and Pohlmann, 1969), el monoginol (Kapadi and Dev, 1964), el ácido caurenoico (Cannon *et al.*, 1966) y los ácidos palmítico y estereárico. Comprobaron también, en tiras de útero de rata *in vitro*, que los extractos obtenidos (etanólico, bencénico y hexánico), así como el ácido monoginoico no mostraron actividad oxitócica.

Geissman y Griffin (1971) del extracto clorofórmico de las hojas y flores secas de la especie *Montanoa tomentosa* aislaron una lactona sesquiterpénica, a la que denominaron tomentosina.

En 1972, se iniciaron diversos estudios en el Instituto Mexicano del Seguro Social con el propósito de identificar y aislar los compuestos activos del zoapatle. Así, se describió un nuevo método de extracción de compuestos de la planta, patentado y cedido posteriormente a la compañía farmacéutica, Ortho-Pharmaceutical. Este grupo de investigadores obtuvo dos diterpenoides, compuestos biológicamente activos, denominados zoapatanol y montanol (Mateos, 1976). Investigaciones posteriores han determinado la estructura molecular y procedimientos para la síntesis química de estos compuestos (Levine *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1980; Chen and Rowand, 1980; Kane and Doyle, 1981; Cotter, 1981; Kanojia *et al.*, 1982).

Levine *et al.* (1979) publicaron la fórmula estructural del zoapatanol y montanol. Al zoapatanol lo describieron como el causante de las respuestas biológicas. Sin embargo, se encontró que éste es un compuesto altamente inestable lo que sugiere que el zoapatanol no es el único compuesto responsable de las actividades biológicas (Marcelle *et al.*, 1985).

Werner *et al.* (1980) realizaron la extracción de tres compuestos germacradienólidos de la especie *M. hibiscifolia*, miembros de una clase trans, trans-germacra-1(10), 4-dien-cis-6, 12 olides.

Quijano *et al.* (1982) aislaron otros dos compuestos de *M. tomentosa*, a los que denominaron zoapatanólidos A y B, compuestos isómeros que se incluyen en el grupo de las lactonas sesquiterpénicas de tipo heliangólido. Otros hallazgos han sido los zoapatanólidos C y D, sesquiterpenos del tipo guaianólido (Quijano *et al.*, 1984).

Quijano *et al.* (1979) aislaron un nuevo compuesto, una lactona sesquiterpénica obtenida de *Montanoa frutescens*, al que denominaron montafrusina. Así como el ácido cauradienoico y su 15 alfa-isovalerato.

En 1983, Wani *et al.* reportaron la síntesis y la evaluación biológica de análogos del zoapatanol. Utilizando el extracto acuoso y orgánico de *M. tomentosa*.

Continuando con la caracterización de los compuestos aislados de *Montanoa tomentosa*, Guzmán *et al.* (1984) aislaron, a partir de hojas y flores, un conjunto de tres sustancias, denominado "triada", constituida por zoapatanol, montanol y otra similar y relacionada con el montanol. De esta triada se obtuvo un nuevo compuesto definido como zoapatanólido E. De esta misma especie, Oshima *et al.* (1986a) aislaron dos flavonoides que denominaron nicotilorin e isoquercitrin.

Enríquez *et al.* (1983), determinaron la presencia del ácido grandiflorénico (o cauradienoico) por cromatografía de líquidos de alta exactitud. Y farmacológicamente, destacan que este compuesto fue responsable, en parte, de la actividad biológica

observada en el extracto crudo. Posteriormente, Seaman *et al.* (1984a) obtienen un compuesto semejante al zoapatanol y lo nombran como tomexantina.

Nuevamente, Quijano *et al.* (1985a) aislaron dos diterpenoides que denominaron tomentol y tomenxantol. Posteriormente, otro reporte del mismo grupo establecen los precursores de los derivados diterpenoides oxepano correspondientes, los denominados pre-tomentanol, pre-zoapatanol y pre-tomexantol (Quijano *et al.*, 1985b).

En un estudio fitoquímico de la especie *M. hibiscifolia*, colectada en la región de Soconusco, Chiapas, se obtuvo ácido cauranoico y caurenoico. La composición química de esta especie mostró diferencias al compararse con la misma especie colectada en Costa Rica, C. A. (Magaña, 1986).

Oshima *et al.* (1986b) describieron un nuevo compuesto aislado de *Montanoa leucantha* ssp. *leucantha*, una lactona sesquiterpénica denominada leucantanolido, la cual fue evaluada como un uteroevacuante en cobayos preñados, a una dosis de 20 mg/kg administrada intraperitonealmente.

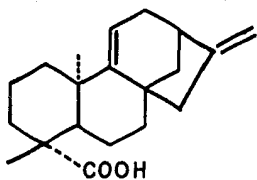
Con el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa, se desarrolló un análisis cualitativo y cuantitativo de los constituyentes diterpenoides, activos biológicamente, de extractos metanólicos y de agua caliente de algunas especies de *Montanoa* (Dong *et al.* 1989). En este trabajo, se propone la posibilidad de usar este método en investigaciones taxonómicas del género *Montanoa*. La

cromatografía manifiesta la presencia de compuestos como el zoapatanol, ácido caurenico, ácido monoginoico, ácido grandiflorico, ester metílico del ácido caurenico y tomenxantina (Dong *op cit.*, 1989).

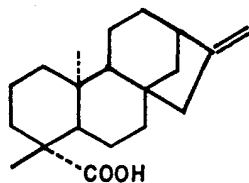
Algunos de los caurenos aislados, como el ácido cauradienoico aislado de *M. tomentosa*, han demostrado tener actividad uterotónicas en tiras uterinas de cobayo, en experimentos de bioensayo *in vitro* (Lozoya *et al.*, 1983; Enríquez *et al.*, 1984). Sin embargo, otros compuestos y extractos acuosos de de otras especies no han sido evaluados aún en sistemas biológicos.

COMPUESTOS AISLADOS DE *Montanoa ssp.*

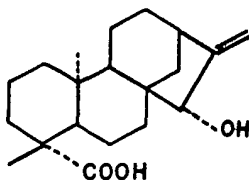
COMPUESTO	ESPECIE	REFERENCIA
Acido cauradienoico	<i>M. tomentosa</i>	Brieskorn 1969
Monoginol	<i>M. tomentosa</i>	Kapadi 1964
Acido caurenoico	<i>M. tomentosa</i>	Cannon 1966
Acido monoginoico	<i>M. tomentosa</i>	Caballero <i>et al.</i> 1970
Zoapatlina	<i>M. tomentosa</i>	Caballero <i>et al.</i> 1970
Tomentosina	<i>M. tomentosa</i>	Geissman <i>et al.</i> 1971
Zoapatanol	<i>M. tomentosa</i>	Levine <i>et al.</i> 1979
Montanol	<i>M. tomentosa</i>	Levine <i>et al.</i> 1979
Montafrusina	<i>M. frutescens</i>	Quijano <i>et al.</i> 1979
15-alfa isovalerato	<i>M. frutescens</i>	Quijano <i>et al.</i> 1979
ácido caurenoico		
Zoapatanolido A	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1982
Zoapatanolido B	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1982
Zoapatanolido C	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1984
Zoapatanolido D	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1984
Nicotiflorin	<i>M. tomentosa</i>	Oshima <i>et al.</i> 1986a
Isoquercitrin	<i>M. tomentosa</i>	Oshima <i>et al.</i> 1986b
Leucantanólide	<i>M. leucantha</i>	Oshima <i>et al.</i> 1986b
Tomentol	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1985a
Tomexantol	<i>M. tomentosa</i>	Quijano <i>et al.</i> 1985a



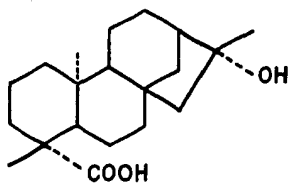
ACIDO CAURADIENOICO



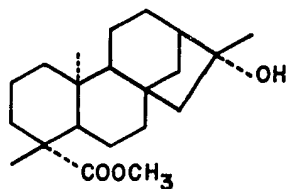
ACIDO CAURENOICO



ACIDO GRANDIFLORICO



ACIDO 16 α -OH CAURENOICO



ESTER METILICO
DEL
ACIDO 16 α -OH CAURENOICO

FIG. 2. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS
ESTUDIADOS Y AISLADOS DE
Montanoa ssp.

NATURALEZA DE LOS COMPUESTOS

En las plantas superiores existen productos naturales, que han sido clasificados como metabolitos primarios o secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos químicos que están íntimamente relacionados en el metabolismo celular y desarrollo fisiológico (aminoácidos, lípidos, monosacáridos, etc.) (Balandrin *et al.*, 1985; Gros *et al.*, 1985). A los metabolitos secundarios no se les ha adjudicado una función aparente en los procesos metabólicos de la planta, tales como fotosíntesis, respiración, etc., (Dirzo, 1985). Sin embargo, a partir de metabolitos primarios algunas de estas sustancias son sintetizadas activamente por la planta. Se ha sugerido que son consecuencia de presiones ecológicas y fisiológicas que incluyen, por ejemplo, la protección contra radiaciones ultravioleta o la desecación, la de ser productos de detoxificación (Dirzo, 1985; West *et al.*, 1979); así como, mediadores de las interacciones ecológicas con otros organismos, que en algunos casos actúan, inequívocamente, como mecanismos de defensa para reducir de alguna manera la herbivoría o la acción de los patógenos (Dirzo, 1985). Además de actuar como agentes protectores, también pueden funcionar como atrayentes, alelopáticos y, en menos casos, como hormonas vegetales (West *et al.*, 1979; Rosenthal and Jansen, 1979) y no exclusivamente como mecanismo de defensa.

De los diversos metabolitos secundarios de las plantas, los terpenoides comprenden algunas de las vitaminas, aceites esenciales, pigmentos vegetales y productos de la degradación de

la glucosa y ácidos grasos. En este grupo se incluyen a los diterpenoides tetracíclicos que caracterizan algunos de los productos naturales aislados del género *Montanoa*. Estos compuestos están constituidos de cuatro unidades de cinco átomos de carbono, denominándose cada una isopreno (2-metil-1,3-butadieno) o isopendieno.

Los diterpenos están constituidos por los compuestos formados por la unión virtual de cuatro unidades isoprenoides, es decir esqueletos carbonados de 20 átomos de carbono. En los que se incluyen hidrocarburos, alcoholes, óxidos, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, y se considera que derivan del pirofosfato geranylgeranyl (Loomis and Croteau, 1980). La clasificación de los diterpenoides se basa en el número de ciclos que presenta el esqueleto carbonado definiéndose las siguientes clases: alicíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos, macrocíclicos y misceláneos. Estas clases se han subdividido de acuerdo con el tipo de esqueleto carbonado que presentan. En los tetracíclicos se subdividen en tres grupos principales que son: filocladeno-caureno, giberelinas y grayanotoxinas. De éstos, los del grupo filocladeno-caureno, son los más distribuidos y por lo tanto los más conocidos.

ESTUDIOS FARMACOLOGICOS

Las primeras investigaciones sobre las propiedades farmacológicas del zoapatle son reportadas por Alfaro (1866) en la *Gaceta Médica*, donde describe su uso potencial para facilitar el parto e inducir la menstruación.

En 1888 se fundó el Instituto Médico Nacional cuyo objetivo principal era el estudio de la flora mexicana y sus posibles aplicaciones industriales y medicinales. En sus publicaciones, *El Estudio* (1889-1893) y los Anales del Instituto, destacan los trabajos farmacológicos del zoapatle realizados por Rodríguez en 1869, quien administró extracto hidroalcohólico del zoapatle a sus pacientes, observando fuertes contracciones uterinas (Béjar, 1985).

Cota en 1883 realizó un ensayo experimental con perras preñadas a las que les administró 1-2 g de la sustancia neutra obtenida por Altamirano (1895) y describió al zoapatle como un oxitócico.

En 1887 Reza describió los efectos tóxicos de la ingestión de las decocciones del zoapatle en mujeres embarazadas. Encontró que ejercía una acción directa sobre el músculo liso uterino grávido, ya que provocaba su tetanización.

Toussaint (1893) detectó el efecto del extracto acuoso del zoapatle en la fibra cardíaca y estableció que inducía inhibición en la contractilidad muscular.

Mediante la recopilación de evidencias clínicas, Ramírez (1894) determinó que el zoapatle es una planta oxicítica y útil para el parto. No obstante, a principios del siglo se prohibió la venta del zoapatle en los mercados de México, debido a su uso indiscriminado (Noriega, 1902).

Otro trabajo posterior que describe el efecto del zoapatle fue la tesis realizada por Rodríguez-Román (1929) con el *Estudio fisiológico del cihuapatli*.

García-Colón (1929) realizó el estudio *Contribución a la farmacología de los oxicíticos con especial referencia al zoapatle*, en éste se reporta la presencia un elemento biológicamente activo, Eriocomina A, especificando su actividad "oxicítica" en mujeres embarazadas.

Del mismo modo, los trabajos de Terrés (1921) *Estudio sobre la aplicación terapéutica de la Eriocomina en Ginecología*, el de Villafuerte (1929) *Contribución al estudio de los oxicíticos* y el de Valencia y Rodríguez-Ibarra (1931), determinaron el efecto oxicítico y uteroconstrictor de la planta.

De Lille y Ramírez (1933) efectuaron un análisis del efecto de la decocción de la especie *Montanoa myriocephala* sobre el útero de cobayo *in vitro*, el cual indujo motilidad uterina de cobayos normales y grávidos.

Los resultados obtenidos hasta ese momento, en el estudio del zoapatle generaron un interés general que dio como resultado el surgimiento de diversos estudios fisiológicos posteriores.

Derbez, Pardo y Del Pozo (1945) estudiaron las acciones del zoapatle sobre la actividad motora del útero *in situ* en ratas grávidas e ingrávidas; así como, las respuestas uterinas a estímulos nerviosos y hormonales. Como resultado obtuvieron una respuesta inhibitoria en el útero ingrávido y excitatoria en el útero grávido. Se planteó que estas respuestas podrían deberse a la liberación de adrenalina de las glándulas suprarrenales. De acuerdo con sus observaciones sugirieron la acción directa del zoapatle sobre el músculo uterino e indirecta en las suprarrenales.

El trabajo realizado por Hidalgo-Chávez (1947) destaca el uso de diferentes tipos de extractos y fracciones aislados del zoapatle, administrado por vía endovenosa, a conejas grávidas e ingrávidas y gatas ingrávidas, *in vivo*. En éste se observaron efectos sobre la contractilidad y actividad rítmica del útero, comparada con los diversos extractos ensayados. Concluye que la respuesta inducida por los extractos se debían probablemente a la liberación de adrenalina.

Los trabajos de investigación, para evaluar los efectos de los diferentes extractos del zoapatle, han adolecido de imprecisiones metodológicas, lo que ha impedido conocer su efecto real sobre el músculo uterino. Dichas imprecisiones se deben a que no se ha considerado diversas condiciones tanto de la planta, como del sistema en que se está experimentando.

Es importante considerar las características intrínsecas de la planta, como es la especie, su edad, el lugar y época

estacional de colecta; así como, la parte de la planta a partir de la cual se hizo la extracción; por ejemplo, flores, raíces, tallos u hojas. De acuerdo con esto, Damian (1990) reportó que la concentración de los compuestos aislados de *Montanoa tomentosa* no es constante en diferentes períodos estacionales. Otros factores que pueden influir son los factores abióticos (Estrada *et al.*, 1983; Ponce-Monter *et al.*, 1983), la presencia de electrolitos Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Bolton, 1979), el pH del producto, la concentración y la variable de la dilución.

Asimismo, debe tomarse en cuenta el estado hormonal en que se encuentran los animales utilizados en la experimentación. Esta condición se modificada en los mamíferos, de manera importante, en las diferentes fases del ciclo estral.

El efecto uterotónico de la decocción del zoapatle fue comprobado por Sentés y Amayo (1964) sobre útero humano grávido (32-42 semanas), con producto muerto. Durante esas investigaciones no se observaron cambios en la presión sanguínea, ni en la frecuencia respiratoria y cardiaca del paciente. Empero, no describieron la expulsión de los productos muertos.

En 1976, Mateos *et al.* realizaron una descripción del efecto de los productos orgánicos semipurificados del zoapatle, en mujeres embarazadas con muerte fetal y en mujeres en diferentes días del ciclo menstrual.

En 1977, Gallegos y Cortés-Gallegos obtuvieron una patente en la cual describieron los efectos del extracto acuoso del

zoapatle en mujeres con diferentes niveles hormonales. Inicialmente, administraron oralmente un concentrado de té con 15 y 30 g de hojas secas de *Montanoa tomentosa*, a mujeres de ciclo menstrual normal, en la fase lutea. En este trabajo se descubrió una reducción rápida y transitoria en los niveles de progesterona circulante, como efecto luteolítico, y este cambio se relacionó con la temperatura corporal basal. Asimismo, determinaron una disminución en la duración del ciclo menstrual. Además se probó el efecto uterotónico del extracto acuoso en diferentes especies de animales *in vitro*. De la misma manera, los autores evaluaron el efecto tóxico del extracto sobre la función cardiovascular, gastrointestinal, renal y respiratoria, adicionalmente probaron el efecto uterotónico del extracto acuoso en diferentes especies de animales *in vitro*, y concluyeron que esta decocción no tuvo efecto sobre el útero de rata y ni sobre el de mono *Rhesus*.

Calderón *et al.* (1977) realizaron un trabajo sobre el efecto de la decocción de *M. tomentosa* sobre la actividad uterina de conejas, *in vitro*. Concluyeron que la decocción del zoapatle, administrada en dosis de 0.5 ml, 1.0 ml y 1.5 ml, ejerce un efecto oxitócico menor al producido por la oxitocina. Sin embargo, en este trabajo no se menciona el origen de la planta, no se explica la forma de preparación del té, ni el volumen de las cámaras de órganos aislados. Tampoco se consideró la presencia del ion potasio presente en la decocción. No obstante, realizaron la importante observación, hasta ese momento, de comparar su efecto con el de la oxitocina.

Von R. Neidlein y Stumpf (1977a) realizaron algunos estudios sobre la biotransformación y farmacocinética del ácido grandiflorénico, obtenido de la planta del género *Espeletia*. Describieron la formación de seis metabolitos obtenidos por incubación del ácido grandiflorénico (20 mg/kg) por la acción de la enzimas microsomales hepáticas de rata *in vitro* (Von R. Neidlein and Stumpf, 1977b) y su biodegradación por la flora intestinal y excreción renal (Von R. Neidlein and Stumpf, 1977c).

Para corroborar los efectos anticonceptivos del zoapatle, Landgren *et al.* (1979) administraron oralmente la decocción equivalente a 124 g de hojas secas (1 g/ml), a mujeres en embarazo temprano (6-7 semanas), con muerte fetal intrauterina. Estos autores concluyeron que la decocción del zoapatle tiene efecto uterotónico significativo con dilatación cervical, cólicos de tipo menstrual y sangrado en algunas pacientes. Indicaron también que las dosis administradas, 1.1 y 1.4 g/kg de hojas secas, fueron toleradas por las pacientes sin producir efectos gastrointestinales. De esta manera, ellos no detectaron propiedades luteolíticas, como lo había reportado anteriormente Gallegos y Cortés-Gallegos (1977). Sin embargo, estas diferencias podrían ser atribuidas a diferentes condiciones biológicas y ecológicas de la planta (Ponce-Monter *et al.*, 1983), o al estado reproductivo del animal (Hahn *et al.*, 1981).

Siguiendo la trayectoria de las investigaciones farmacológicas y químicas sobre los constituyentes del zoapatle, han surgido básicamente dos grupos de trabajo, el de los

investigadores de Ortho Pharmaceutical y el de los investigadores mexicanos. Estos grupos de investigación han aportado elementos que han permitido ampliar la información sobre la planta.

Destaca el trabajo publicado por Hahn *et al.* (1981), dentro de los investigadores del grupo de Ortho Pharmaceutical. Estos autores evaluaron diferentes productos aislados del zoapatle, extracto crudo, extracto semipurificado, montanol y zoapatanol, para observar los efectos de antifertilidad y antiimplantatorio en cobayo, rata, ratón y hamster. Sus resultados obtenidos demuestran sólo un efecto interceptivo en el cobayo en el día 22 de la preñez. La administración intraperitoneal y oral del extracto crudo, extracto semipurificado y el zoapatanol, a diferentes dosis, produjo la interrupción del embarazo y la disminución en el número de implantes. Reportan al montanol como un compuesto menos activo, comparado con el zoapatanol administrado a la misma dosis. Mientras que, la actividad antiimplantatoria del montanol, por la vía intraperitoneal fue prácticamente nula. Los compuestos zoapatanol y montanol no resultaron ser más eficaces respecto que los extractos.

En 1981, Smith *et al.* compararon la actividad del zoapatanol con el de las prostaglandinas, tomando como base las semejanzas que existen en los efectos antifértiles y en la estructura molecular química. En este experimento encontraron que el zoapatanol (100 nM) contraía el fleo de cobayo como la arteria coronaria del gato pero, en contraste, era incapaz de inducir un efecto sobre el útero de conejo y rata. Esto sugirió que el

efecto de antifertilidad del zoapatanol podría deberse a su interacción con receptores del músculo liso vascular, aun no identificados.

Dentro de los trabajos realizados por el grupo de investigadores mexicanos, sobresalen los dirigidos por Gallegos y Lozoya del Instituto Mexicano del Seguro Social; así como, los investigadores del Instituto de Investigaciones Agrícolas de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y de los investigadores del Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De esta colaboración interdisciplinaria se han producido diversos trabajos de investigación sobre el zoapatle, que analizaron los aspectos históricos, botánicos, químicos, farmacológicos, fisiológicos y toxicológicos.

En estos trabajos, Estrada *et al.* (1983) evaluaron la actividad uterotónica de algunas especies del género *Montanoa*, recolectadas en diversas zonas de la República Mexicana. Comparándolas con especies cultivadas en un campo experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo. Para ello, utilizaron el modelo *in vitro* en útero aislado de cobayo. Los resultados destacan la actividad de *M. frutescens* como la especie con mayor actividad uterotónica y a *M. mollissima* como la especie menos activa, mientras que *M. tomentosa* tuvo una potencia uterotónica intermedia. Ellos establecen que diversas variables pueden influir en los resultados de este sistema *in vitro*, como es la edad de la planta y la parte estructural utilizada y las

condiciones climáticas o biológicas.

Lozoya *et al.* (1983) comprobaron la acción uterotónica de la decocción, el extracto hexánico y el ácido cauradienoico sobre la contractilidad uterina de cobayo, perro y rata, *in vitro*, a dosis de 20 ug/ml 40 ug/ml y 20 ug/ml, respectivamente. Es importante destacar que estos compuestos incrementaron el tono y frecuencia de las contracciones; sin embargo, en úteros aislados de rata no se observaron efectos oxitócicos.

Para disminuir el contenido de iones (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) del extracto acuso del zoapatle se administró el extracto dializado en tejidos uterinos de diversas especies de mamíferos (Ponce-Monter *et al.*, (1983).

Los pruebas toxicológicas aplicadas a rata y perro, demuestran que la decocción de hojas de zoapatle carece de toxicidad (Southam *et al.*, 1983). Esto confirma los resultados obtenidos por Gallegos y Cortés-Gallegos *et al.* (1977), en mujeres y por Landgren *et al.*, (1979), en rata y mono *Rhesus*.

Diversos trabajos han surgido para destacar la actividad de los extractos acuosos de *M. tomentosa* y *M. frutescens*. Entre estos, el estudio de Estrada *et al.* (1983) y Ponce-Monter *et al.* (1983) quienes destacan a *M. frutescens* como la especie que induce mayor contractilidad uterina (Ponce-Monter *et al.*, 1983).

Otro trabajo es el realizado por Pedrón *et al.* (1985) quienes comprobaron la inhibición de los sitios de implantación en la rata, utilizando los extractos acuosos de *M. frutescens*

y *M. tomentosa*. Estos resultados destacan que el extracto acuoso de *M. frutescens*, a una concentración de 50 mg equivalentes de hojas secas, produce la inhibición total de los sitios de implantación, al cuarto día de preñez. Mientras que, al utilizar extracto acuoso de *M. tomentosa* los implantes presentan características morfológicas anormales. Lo que apoya lo descrito por Levine *et al.* (1981) que demostraron que el extracto acuoso de *M. tomentosa* no tuvo efecto antiimplantatorio, al ser administrado oralmente del día 1 al 6 de la gestación a dosis menores de 100 mg/kg.

Para comprobar nuevamente la actividad de *M. frutescens* y *M. tomentosa*, González-Angulo *et al.* (1985) administraron intrauterinamente extracto acuoso (1 g de hojas secas/ml) a ratas. Estos resultados demostraron que el extracto acuoso de *M. frutescens* causa alteraciones en las estructuras morfológicas uterinas. No observándose este fenómeno con el extracto acuoso de *M. tomentosa*. Esto podría ser una base para explicar el efecto antiimplantatorio producido por el extracto acuoso de *M. frutescens*, en la rata. Esto también fue comprobado por Méndez (1989) quien compara el efecto de la decocción de *M. tomentosa* y *M. frutescens* sobre la implantación, organogénesis y período perinatal *in vivo* en rata.

Wens *et al.* (1985) estudiaron el efecto de los extractos acuosos de *M. tomentosa* y *M. frutescens* (1 mg de hojas secas/ml) sobre espermatozoides de conejo y humano. Determinaron que el extracto acuoso de *M. frutescens* producía un efecto inhibitorio sobre la motilidad y viabilidad de espermatozoides humanos, lo

que no sucedió con el extracto acuoso de *M. tomentosa*.

Del mismo modo, Valencia *et al.* (1986), encontraron que el ácido caurenoico y dos de sus derivados aislados de *M. frutescens* (ácido 15-hidroxi-dihidrocaurenoico y 15-ceto-dihidrocaurenoico), tienen efectos inmovilizantes y poca capacidad para disminuir el número en los espermatozoides humanos.

Otro reporte que destaca los efectos producidos por el extracto acuoso de *M. tomentosa* fue el realizado por Ponce-Monter *et al.* (1985). En éste, se observa que la actividad espontánea de las tiras uterinas de rata son inhibidas en presencia del extracto acuoso, produciendo un efecto contrario en las tiras uterinas del cobayo. No obstante, Estrada *et al.* (1983) encontraron que el extracto acuoso de *M. frutescens* incrementa la contractilidad uterina en la rata. Ellos demostraron que los efectos producidos, no están mediados por los sistemas histaminérgicos presentes.

Con el objeto de esclarecer los posibles mecanismo de acción de los extractos acuosos del zoapatle, Perusquía *et al.* (1985) estudiaron en tiras uterinas de rata el efecto de los extractos de *M. tomentosa* y *M. frutescens* (20 mg/ml). Los resultados de este trabajo demuestran que estos extractos son capaces de modificar la tensión muscular. En el útero de rata esta acción está mediada por la estimulación de receptores adrenérgicos y/o colinérgicos, producido, probablemente, por sustancias presentes en los extractos con propiedades adrenérgicas o colinérgicas.

Se han realizado diferentes trabajos para conocer los cambios en los niveles de progesterona circulante producido por los extractos acuosos del zoapatle. Según Gallegos y Cortés-Gallegos *et al.* (1977), se observa disminución en los niveles de progesterona plasmática al administrar el extracto acuoso a mujeres durante el ciclo menstrual. Y el mismo efecto cuando se administró a mujeres embarazadas (Landgren *et al.*, 1979). Sin embargo, en el sistema seleccionado por Pedrón *et al.* (1988), en conejos preñados se les administró extracto acuoso (5.0 mg/día) no se observaron modificaciones en los niveles de progesterona plasmática.

Con la continua inquietud de seguir explorando los mecanismos de acción de los compuestos aislados del zoapatle Béjar *et al.* (1984a) establecieron que el ácido cauradienoico, como compuesto más abundante en el extracto acuoso del zoapatle (0.19 mg/ml), tiene una actividad antagonista al calcio, lo que produce un efecto inhibitorio en la actividad contráctil del útero de rata.

Enríquez *et al.* (1984) estudiaron en un modelo *in vitro* el efecto del ácido y de su ester metílico sobre la contractilidad del útero aislado de cobayo, rata y humano. Mostraron que el ácido cauradienoico produce inhibición en la actividad espontánea en los tres modelos empleados y que el ester metílico induce un aumento en la motilidad espontánea de los mismos tejidos ensayados. Este hallazgo confirmó la posible la función crítica que desempeña el grupo carboxilo sobre las propiedades farmacológicas de estos caurenos. Sin embargo, Ponce-Monter *et*

al. (1988) probaron que el ácido 16a-OH caurenoico y su ester metílico, aislado de *M. hibiscifolia*, sobre las tiras uterinas de rata y cobayo, manifiestan una inhibición en la actividad contráctil espontánea y la inducida por oxitocina y K^+ .

Béjar *et al.* (1984b), publicaron otro trabajo donde destacan el efecto del extracto acuoso de *M. tomentosa* (20 ul/ml) y el ácido grandiflorénico (12 ug/ml) en diferentes etapas del ciclo estral. Confirman que la motilidad uterina *in vitro* está determinada por los niveles de hormonas esteroideas, como se comentó anteriormente. Las respuestas en las contracciones espontáneas inducidas por ambos compuestos son similares. Por lo que consideran al ácido grandiflorénico un componente importante del extracto acuoso.

Dentro del grupo de investigadores de Ortho-Pharmaceutical, Hahn *et al.* (1984), comprobaron el efecto antifertilidad y vasoconstrictor del músculo liso uterino de un compuesto sintético análogo del zoapatanol, el ORF 13811. Esto concuerda con lo reportado por Smith *et al.* (1981), al demostrar el efecto vasoconstrictor del zoapatanol en arteria coronaria de gato. Asimismo, demostraron las propiedades uterotónicas de este compuesto

Según los trabajos realizados por Yamamoto *et al.* (1983) se ha comprobado que los caurenos diterpenos pueden inhibir la producción de glucosa en los túbulos renales de la rata. Otros efectos producidos por los caurenos en la rata es la

fosforilación oxidativa de la mitocondria aislada del higado (Bracht *et al.*, 1985) y efectos esteroideogénicos en células adrenales aisladas, inducidos por el caurenol (Moriwaki *et al.*, 1986).

Se ha propuesto que la polaridad de los compuestos influyan en la actividad uterotónica de los tejidos ensayados. El primer tipo de actividad fue caracterizada por un incremento de las contracciones, en magnitud y frecuencia, el segundo tipo inhibe las contracciones espontáneas (Waller *et al.*, 1987).

Otros compuestos ensayados farmacológicamente han sido los ácidos angeloigrandiflorico, monoginoico y caurenico. En bioensayos realizados en cobayo *in vitro*, se mostró que el ácido angeloigrandiflorico, a dosis mayores (100 mg/kg), induce contracción. Mientras que los ácido caurenico y monoginoico (4.0 y 4.6 mg/ml), en fueron inactivos (Lu *et al.*, 1987).

Béjar (1988) reporta que el ácido grandiflorénico no tiene actividad estrogénica sobre el útero de rata ovariectomizadas, a diferentes dosis.

En otro trabajo (Campos-Lara *et al.*, 1990), se determinó el efecto antagónico de los derivados del ácido caurenico en úteros de rata y cobayo estrogenizados. El ácido 15-ceto-hidrocaurenico y el 15-hidroxi-hidrocaurenico incrementaron la actividad espontánea uterina de cobayo a 10-60 uM y 15-100 uM, respectivamente, mientras que, en el útero aislado de rata el 15-hidroxi-hidrocaurenico (15-100 uM) inhibe su actividad espontánea y el ácido 15-ceto-hidrocaurenico (25-160 uM) la

incrementa. Este incremento de la contractilidad uterina en ambos modelos no es modificado a través de los receptores muscarínicos y liberación de prostaglandinas.

Otra propiedad reportada para el ácido caurenoico, obtenido de *Mikania laevigata*, es el de ser un compuesto antimicrobiano y fungicida, sobre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis* y en hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra* y *Aspergillus parasiticus*, a una concentración de 250 ug/ml, (Davino *et al.*, 1989).

MECANISMO DE EXCITACION-CONTRACCION

En el mecanismo de excitación-contracción del músculo liso, la participación del calcio es indispensable para activar a las proteínas contráctiles de las fibras musculares (Somlyo and Somlyo, 1968; Bolton, 1979; Kanmura, 1988). Esta activación es producida por los cambios en la concentración de calcio intracelular del músculo liso (Kamm and Stull, 1989; Kanmura, 1988). En la actualidad, se reconocen tres fuentes primarias para inducir el incremento intracelular de Ca^{2+} , una es el calcio libre extracelular y otra es el calcio ligado a la membrana y, finalmente, el calcio almacenado intracelularmente (Mironneau, 1973; Hodgson and Daniel, 1973; Ruzicky *et al.*, 1987).

Se ha reportado que en el músculo liso uterino el retículo sarcoplásmico es un organelo fundamental en la regulación de calcio citoplásmico (Carsten, 1969; Somlyo, 1985), y que la mitocondria no contribuye significativamente en ello (Somlyo and Himpens, 1989).

El ingreso de Ca^{2+} al músculo liso es inducido por el acoplamiento electromecánico y farmacomecánico (Bolton, 1979). El primero está mediado por cambios en el potencial de membrana que ocasionan la entrada de Ca^{2+} por los canales sensibles al voltaje, mientras que el acoplamiento farmacomecánico está mediado por la entrada de Ca^{2+} a través de canales operados por el receptor y por la acción de segundos mensajeros, generados por la activación del receptor, los cuales inducen la liberación de calcio de almacenes intracelulares (Bolton, 1979; Ruzicky, 1987;

Un método para el manejo del acoplamiento farmacomecánico incluye el uso de agonistas colinérgicos, serotoninérgico, oxitócicos, prostaglandínicos, entre otros; mientras que, un método para manipular el acoplamiento electromecánico consiste en la utilización de una solución despolarizante de K^+ (40 mM). Es importante mencionar que cuando se inducen contracciones del músculo liso uterino, independientemente del método utilizado, la actividad contráctil de este tejido depende de la concentración de Ca^{2+} extracelular (Bolton, 1979).

Bolton (1979) señaló que las contracciones del músculo liso, inducidas por agonistas, son consecuencia del incremento del calcio intracelular a través de las vías de entrada de calcio sensibles al receptor y que la contracción inducida por el método químico (K^+ 40 mM), es producto del incremento de calcio intracelular por las vías de entrada de calcio sensibles al voltaje.

Al activarse el receptor por el agonista, la proteína G, que es un oligómero formado de tres subunidades (alfa, beta y gama), se disocia y libera a su subunidad catalítica (alfa), la cual activa a la fosfolipasa C, la cual inicia la hidrólisis de los fosfoinosítidos (Berridge, 1987) (Fig. 3). Se ha propuesto que este mecanismo induzca la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico e incrementa rápidamente la concentración de Ca^{2+} citoplásmico y principia el acoplamiento farmacomecánico (Abdel-Latif, 1986; Hughes and Putney, 1988; Van Breemen and

Somlyo *et al.* (1985) aportan suficientes evidencias para considerar que la vía de fosfatidilinositol, específicamente el inositol trifosfato (Ins 1,4,5 P3), actúa como un transmisor que induce la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico del músculo liso. Observaciones similares reportan al Ins 1,4,5 P3 como un segundo mensajero que participa en la liberación de Ca^{2+} de fuentes no mitocondriales (Carsten and Miller, 1985; Abdel-Latif, 1986; Berridge, 1987; Kanmura *et al.*, 1988; Van Breemen and Saida, 1989) (Fig. 3).

Este aumento Ca^{2+} intracelular, por la vía de la hidrólisis de los fosfoinosítidos, produce que la calmodulina se una a los iones de Ca^{2+} , formando el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Una molécula de miosin-cinasa de cadena ligera es activada por una molécula de Ca^{2+} -calmodulina (Kamm and Stull, 1985). Al interactuar el complejo Ca^{2+} -calmodulina con la miosin-cinasa de cadena ligera, fosforila las dos cadenas ligeras de miosina. Una vez fosforilada la miosina forma puentes de entrecruzamiento con la actina y se produce el deslizamiento de los filamentos de la actina y la miosina. Cuando los niveles de calcio disminuyen, la calmodulina se disocia de la miosin-cinasa de cadena ligera, y se produce la relajación (Carsten, 1987; Somlyo, 1990). Cuando el músculo liso miométrial está en reposo la concentración de calcio es de 10^{-7} M. Mientras que en la contracción existe un aumento en la concentración de calcio intracelular a 10^{-5} M (Irvine, 1986; Carsten, 1987).

En esta dinámica de regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular del músculo liso, intervienen dos sistemas de membranas, la membrana plasmática, la cual esta bajo el control del potencial de membrana y los agonistas, y el retículo sarcoplásmico, el cual está regulado por los segundos mensajeros (Van Breemen and Saida, 1989).

La disminución de calcio intracelular través de la membrana plasmática puede realizarse por una $\text{ATPasa-Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$, por un intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ o a través de la toma de Ca^{2+} por organelos intracelulares (Cauvin *et al.*, 1983; Mironneau, 1984; Bolton, 1986; Nicholls, 1986; Carsten, 1987; Van Breemen and Saida, 1989). Se ha propuesto que el mecanismo del intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ en el músculo liso uterino es un mecanismo importante en el movimiento de Ca^{2+} (Carsten, 1987).

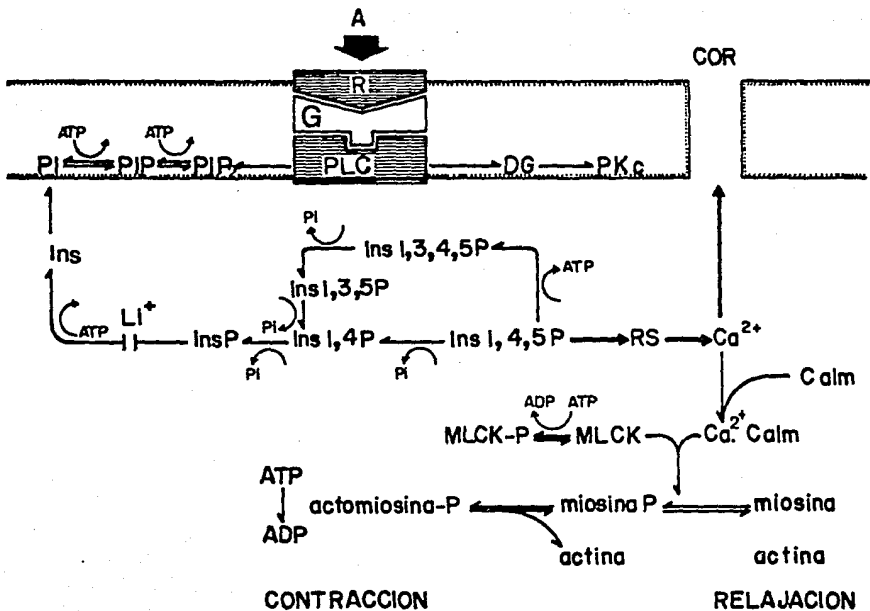


FIG. 3 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO FOSFATIDIL INOSITOL

A:agonista, R:receptor, G:proteína G. PLC:fosfolipasa C, DG:diacilglicerol; ATP:adenosín trifosfato, PKC: Proteín-cinasa C, Pi:fosfato, PI:fosfatidil inositol, PIP:fosfatidil inositol 4-fosfato, PIP₂:fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, Ins 1,4,5,P:inositol 1,4,5 trifosfato, Ins 1,3,4,5P:inositol tetrakisfosfato, Ins 1,4,P: inositol 1,4 fosfato, InsP:inositol 1-fosfato, Ins:inositol, RS:retículo sarcoplásmico, Calm:calmodulina, MLCK:miosina-cinasa cadena ligera, COR:canales operados por el receptor.

INERVACION UTERINA

Mediante técnicas histoquímicas y electrofisiológicas se ha determinado que el músculo liso uterino de rata presenta una inervación dual simpática y parasimpática. Asimismo, contiene plexos nerviosos en vasos sanguíneos y glándulas (Adham and Schenk, 1969).

En el músculo liso del aparato reproductor de la hembra, la inervación simpática está constituida por fibras adrenérgicas que tienen como neurotransmisor a la noradrenalina, dicho neurotransmisor estimula receptores alfa y beta adrenérgicos que se encuentran en este tejido. Por su parte, la inervación parasimpática está conformada por fibras colinérgicas que tienen como neurotransmisor a la acetilcolina, la cual estimula a los receptores muscarínicos de este tejido (Campbell, 1970; Sato *et al.*, 1989).

La inervación dual del músculo liso uterino puede haber diferir considerablemente entre especies de animales (Moadwood, 1973). También se ha demostrado que las hormonas ováricas regulan la cantidad de noradrenalina presente en las terminaciones de los nervios adrenérgicos (Adham and Schenk, 1969; Marshall, 1970).

El útero de rata presenta una inervación adrenérgica abundante, asociada con vasos sanguíneos y haces del músculo liso. La capa circular interna del músculo uterino está más inervada que la capa longitudinal externa; la intensidad de la inervación disminuye hacia la parte ovárica del cuerno uterino

De manera clásica, se ha propuesto que el nervio hipogástrico es la ruta parasimpática principal que se dirige hacia la zona pélvica; el nervio pélvico constituye la ruta parasimpática que va hacia las vías urogenitales (Campbell, 1970).

Recientemente, Sato *et al.* (1989) confirmaron que el nervio hipogástrico y pélvico son las vías de inervación motora del útero, cérvix y vejiga en la rata. Además de la inervación adrenérgica y colinérgica de la actividad del músculo liso uterino está influida en forma directa por otros neurotransmisores, tales como la serotonina, la histamina, la oxitocina, la angiotensina y las prostaglandinas, sustancias que alcanzan la membrana celular a través de la vía sistémica.

ASPECTOS HISTOLOGICOS DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO DE LA RATA

En los mamíferos, el aparato reproductor femenino está constituido por los ovarios, oviductos, útero y vagina (Beck and Boots, 1974). El útero y oviducto derivan embriológicamente de los conductos de Muller. El oviducto se denomina algunas veces tubo uterino o trompa de Falopio (Snell, 1941; Bloom and Fawcett, 1987). En los oviductos se realiza la fertilización y el transporte de los gametos del macho y de la hembra (Snell, 1941).

En el oviducto se distinguen varios segmentos, a los cuales se asignan diferentes términos descriptivos. La parte cercana al ovario llamada ámpula, comprende aproximadamente las $2/3$ partes de la longitud del oviducto. Su diámetro es amplio, forma prolongaciones largas y delgadas hacia la luz y su porción anterior es semejante a un embudo abierto; el se denomina infundíbulo. El ámpula continúa con el istmo (Snell, 1941), y comprende aproximadamente $1/3$ de la longitud del oviducto en relación con el ámpula. Su luz es más estrecha, pero su pared es más gruesa. El istmo se continúa con el área de transición entre el oviducto y el útero llamada unión uterotubal.

El útero tiene funciones importantes en la reproducción, ya que es el lugar donde se recibe al embrión procedente de la trompa, se produce la implantación y establece las relaciones vasculares para el mantenimiento del embrión a lo largo de su

desarrollo (Bloom and Fawcett, 1987; Dellmann and Brown, 1976).

Las porciones uterinas de los conductos de Muller pueden presentar varios grados de fusión, dependiendo de la especie (Snell, 1941; Dellmann and Brown, 1976). En la rata, estos conductos se fusionan solamente en sus extremos inferiores y se abren en un solo orificio al exterior, quedando su mayor superficie como dos tubos separados que forman los cuernos uterinos (Snell, 1941).

Desde el punto de vista histológico la pared del útero está dividida en tres regiones: endometrio, miometrio y perimetrio (Dellmann and Brown, 1976; Banks, 1986; Vaquero, 1982).

El endometrio participa en la implantación del embrión y la formación de la placenta (Bloom and Fawcett, 1987). El endometrio incluye el epitelio, las glándulas tubulares simples y el tejido conjuntivo subyacente (Vaquero, 1982; Banks, 1986). El epitelio es columnar simple y secretor (Bloom and Fawcett, 1987). Mientras que, las glándulas tubulares están revestidas por epitelio cúbico simple (Dellmann and Brown, 1976). Los productos de secreción del epitelio glandular incluyen lípidos, glucógeno y proteínas.

El tejido conjuntivo laxo está muy vascularizado, con muchos fibroblastos. Se hallan presentes abundantes macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que penetran desde los vasos sanguíneos.

La siguiente región uterina, el miometrio, está formado de

una capa de músculo liso circular interna más gruesa y los haces están arreglados alrededor del eje longitudinal . En la capa externa los haces están arreglados de manera paralela al eje longitudinal del útero (Dellmann and Brown, 1976; Banks, 1986).

El tejido conjuntivo situado entre los haces musculares está formado por fibras colágenas, fibroblastos, células indiferenciadas del tejido conjuntivo, macrófagos y células cebadas (Bloom and Fawcett, 1987; Finn and Porter, 1975).

El perimetrio o túnica serosa, se compone de tejido conjuntivo laxo, recubierto de mesotelio peritoneal. En esta capa se encuentran presentes numerosos vasos linfáticos y sanguíneos y fibras nerviosas (Dellman and Brown, 1976).

El útero está vascularizado, principalmente, por las arterias uterinas y, de modo accesorio, por las arterias ováricas y por las arterias del ligamento redondo. Estas arterias penetran en la capa muscular y se resuelven en un plexo, del cual se emiten ramas externas para los estratos musculares más externos y para el perimetrio (Vaquero, 1982).

La zona de transición es el cuello uterino o cérvix, que es de epitelio plano poliestratificado aglandular no queratinizado y sirve como válvula para cerrar el lumen uterino y separarlo de la vagina. El cuello uterino se continúa con la vagina, la cual se abre hacia la vulva (Snell, 1941) y misma que se comunica al exterior.

CAMBIOS MORFOLOGICOS INDUCIDOS POR LA ACCION DE LOS ESTROGENOS

Existen diversos cambios morfológicos y fisiológicos del útero de los mamíferos a lo largo de su ciclo estral, éstos se encuentran regulados, principalmente, por las hormonas sexuales, los estrógenos y la progesterona.

Se ha utilizado al útero de rata como modelo para describir los procesos celulares y bioquímicos relacionados con el mecanismo de acción de los estrógenos, inducidos durante el ciclo estral o mediante su administración.

Los estrógenos en el útero de rata inducen una serie de procesos complejos que comprenden los incrementos en la permeabilidad vascular, en la imbibición de agua, de eosinófilos, de células cebadas, en el metabolismo de la glucosa, en la síntesis de proteínas, en la producción de actomiosina (Lan and Katzenellenbogen, 1976; Campbell *et al.*, 1980), y en la estimulación de la síntesis de RNA (Wilson, 1963; Gorski and Nelson, 1965) y DNA.

Entre los trabajos histológicos, destaca el de Grunert *et al.* (1986) el cual establece que la administración por vía endovenosa (0.01-1 000 ug/kg) en ratas ovariectomizadas, produce una reducción en la altura del epitelio celular 6 horas después de la administración de esta hormona e induce también hipertrofia celular miometrial, después de 24 horas. Determinaron que el dietilestilbestrol es más débil que el 17-

beta estradiol para inducir edema uterino, incremento de eosinófilos y su redistribución en el miometrio, 6 h después de la administración. Esto concuerda con el trabajo de Hisaw (1959), quien compara la efectividad de seis estrógenos, administrados subcutáneamente, sobre el edema y crecimiento uterino de rata, a diferentes dosis.

Sin embargo, Campbell *et al.* (1980) reportan que el dietilstilbestrol es más efectivo para promover el crecimiento del útero de rata ovariectomizada que el 17-beta estradiol con una dosis de 1 ug/ml y administrados por vía subcutánea.

En el trabajo de Ross y Klebanoff (1967), realizado con microscopio electrónico, determinaron cambios en la concentración y distribución del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi en las células del músculo liso y fibroblastos del útero de rata, seguido de una administración subcutánea de 17-beta estradiol (0.06 a 60 ug), en diferentes fases del ciclo estral. Estos autores proponen que los cambios están asociados con la síntesis y secreción de proteínas.

Del mismo modo, Bo *et al.* (1968) describen un incremento gradual en el número de ribosomas en la lámina externa de la membrana nuclear y retículo endoplásmico rugoso, en células del músculo liso del útero de rata, entre 6 y 96 horas después de la administración subcutánea de dipropionato de estradiol (10 ug/100 ul). También informan de un incremento en el número de las mitocondrias (entre 24 y 48 h después de administración del estrógeno) y ribosomas (6-12 h después), establecieron que estos

cambios ocurren por un incremento en la actividad metabólica de la células del músculo liso.

MECANISMO DE ACCION DE LOS ESTROGENOS EN EL UTERO DE RATA

Recientemente, se ha propuesto que las diferentes respuestas inducidas por los estrógenos sobre el útero de rata pueden agruparse en dos tipos de mecanismos independientes (Tchernitchin, 1979; Tchernitchin, 1983). Así, las respuestas que se manifiestan durante las cuatro primeras horas después de la administración de estrógenos, se han denominado tempranas e incluyen el incremento de eosinófilos, edema, incremento de permeabilidad vascular uterina, liberación de histamina y protección antiinmune del blastocisto contra su rechazo (Tchernitchin, 1974; Tchernitchin, 1979; Lan and Katzenellbogen, 1976), tales sucesos se han caracterizado como efectos no genómicos de los estrógenos en el útero de rata. Estas respuestas, probablemente son mediadas por receptores a estrógenos, localizados en la membrana de los leucocitos eosinófilos uterinos, los cuales migran de la sangre al epitelio luminal uterino, donde sufren autólisis masiva y liberan su contenido. Participan también los receptores a estrógenos situados en la superficie de los vasos sanguíneos, dichos receptores, al ser activados por los estrógenos modifican la permeabilidad vascular (Tchernitchin, 1974; Tchernitchin, 1983; Lee, 1982).

El otro tipo de mecanismo de acción de los estrógenos sobre el útero de rata, es el que desencadena los procesos que tienen una latencia de más de 24 h y contemplan el aumento de la

síntesis de proteínas, de DNA y de RNA. A este se le ha denominado acción genómica de los estrógenos sobre el útero de rata y corresponde al mecanismo clásico de acción de los estrógenos que se inicia con la activación del sistema receptor a estrógenos citosólico-nuclear (Tchernitchin *et al.*, 1974).

Kirkland *et al.* (1977) y Gardner *et al.* (1978) sugieren que las respuestas no genómicas inducidas por los estrógenos en el útero de rata representan la preparación de este tejido para las respuestas genómicas que son el verdadero crecimiento del órgano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El valor terapéutico de las plantas medicinales, manifiesto en la medicina tradicional mexicana, ha tenido un reconocimiento indiscutible por muchos siglos. En nuestro país, existe un gran número de plantas medicinales que cumplen una función importante en el manejo del primer nivel de atención a la salud. Sin embargo, muchas especies de plantas no han sido aun estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y de su actividad biológica.

Con base en los extensos estudios etnobotánicos, los estudios etnofarmacológicos tratan de evidenciar las propiedades biológicas de las decocciones y de los productos aislados de las plantas medicinales mediante la utilización de los métodos farmacológicos convencionales. A través de estos métodos se ha estudiado al zoapatle (*Montanoa sp.*), planta ampliamente utilizada en los tratamientos relacionados con algunos procesos de la reproducción en la mujer.

Se han realizado un gran número de estudios, utilizando preparaciones *in vivo* e *in vitro*, a fin de conocer el efecto de las decocciones y compuestos aislados del zoapatle sobre la actividad uterina de diferentes especies animales, tales como rata, cobayo e inclusive del útero humano.

Sin embargo, estos estudios han mostrado resultados controversiales ya que los compuestos analizados presentan tanto efectos excitatorios como inhibitorios. Así, por ejemplo en estudios *in vitro*, en el útero de cobayo se ha observado que

generalmente los compuestos aislados de *Montanoa* producen un incremento en la actividad uterina; mientras que, frecuentemente, en el útero aislado de rata se ha observado un efecto inhibitor en la actividad uterina inducida por diferentes estímulos. Por otro lado, aún son muy escasos los estudios histológicos que muestran el efecto de las decocciones y compuestos aislados del zoapatle sobre el tejido uterino.

Por tal motivo, en este trabajo se ensaya el efecto de los caurenos, aislados del género *Montanoa*, sobre la actividad contráctil del músculo liso uterino, aislado de rata tratada con estrógeno, inducida por los agonistas acetilcolina, oxitocina y serotonina. Este ensayo se realiza con el objeto de conocer si los caurenos son capaces de modificar las vías de entrada de Ca^{2+} inducidas por el acoplamiento farmacomecánico en este tejido. Se pretende además, investigar, a nivel histológico, si el ácido cauradienoico induce cambios morfológicos en el útero aislado de rata tratada con estrógeno.

Con este estudio, se pretende contribuir al conocimiento de algunos aspectos de la actividad biológicas de los caurenos, aislados de *Montanoa frutescens*, *M. tomentosa* y *M. hibiscifolia*, en útero aislado de rata estrogenizada al emplear técnicas farmacológicas e histológicas. Específicamente, los objetivos de esta investigación son:

1. Estudiar el efecto de los ácidos cauradienoico, caurenoico, grandiflorico, 16 alfa-OH caurenoico y el ester metílico, del ácido 16 alfa-OH caurenoico aislados de la planta *Montanoa ssp.* sobre la contracción inducida por agonistas uterotónicos en el útero de ratas tratadas con estrógeno 3 benzoato-17 beta estradiol ($3BE_2$), *in vitro*.

2. Observar las características morfológicas del útero aislado de ratas tratadas con estrógeno ($3BE_2$) sometidos a diferentes tratamientos: solución Ringer Krebs bicarbonato, acetilcolina ($10^{-4}M$) y acetilcolina-ácido cauradienoico (40 ug/ml).

ENSAYOS FARMACOLOGICOS

Los experimentos se realizaron en tiras de músculo uterino obtenidas de ratas vírgenes de la cepa Sprague-Dawley de 200-250 g de peso, aproximadamente. Los organismos estuvieron en condiciones controladas, agua y alimento *ad libitum* y un ciclo de luz-obscuridad de 12-12 horas.

Con el objeto de estandarizar el estado hormonal de los individuos, a cada uno se le administró subcutáneamente una dosis de 20 ug/kg de 3-benzoato-17 beta estradiol (3 BE₂) de los laboratorios Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), en un volumen de 200 ul de aceite de maíz, 24 horas antes del sacrificio.

Los animales se sacrificaron por desnucamiento e inmediatamente se extrajeron cuidadosamente los cuernos uterinos, quitándoles el tejido conjuntivo y grasa. Posteriormente, se colocaron en una caja de Petri que contenía solución Ringer-Krebs bicarbonato, con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ 20; NaCl 120; KCl 4.6; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.0 y glucosa 11.5. Las sales utilizadas fueron grado reactivo (marca Merck). La solución se ajustó a un pH 7.4 con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en 95% de O₂.

De la parte central de cada cuerno uterino se obtuvieron dos segmentos, de 1 cm de longitud aproximadamente. Los tejidos se colocaron en cámaras de órganos aislados, con un volumen de 10

ml, las cuales contenían solución Ringer-Krebs bicarbonato, a una temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y burbujeo constante de 5% de CO_2 en 95% de O_2 .

La actividad uterina se registró isométricamente con un transductor de tensión (FTO3 Grass) conectado a un polígrafo modelo Grass 7B. Los segmentos uterinos se ajustaron a 1 g de tensión (9.8 mN) y se estabilizaron durante una hora antes de exponerlos a las drogas, renovando la solución Ringer-Krebs bicarbonato cada 10 minutos.

COMPUESTOS UTILIZADOS

Los agonistas utilizados en el presente estudio fueron cloruro de acetilcolina (AChCl), creatinin sulfato de serotonina (5HT) de los laboratorios Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); así como, la oxitocina sintética (OT) de los laboratorios Sandoz (México).

Estos compuestos uteroconstrictores se adicionaron directamente a la cámara de órganos aislados, en un volumen que no excedió los 20 ul. Las concentraciones utilizadas en cada agonista fueron acetilcolina 10^{-4} M y 10^{-5} M, oxitocina 5 mUI/ml, y serotonina 10^{-5} M.

La respuesta inducida por acetilcolina (10^{-4} M) en todos los experimentos verificó la viabilidad del tejido.

Los caurenos fueron aislados y purificados según lo reportado por Lozoya *et al.* (1983), Valencia *et al.* (1986) y Ponce-Monter *et al.* (1988), de diferentes especies de *Montanoa*.

El ácido caurenoico se aisló de *M. frutescens*, el ácido grandiflórico y ácido cauradienoico de *M. tomentosa*, mientras el ácido 16 alfa-OH-caurenoico y el ester metílico 16 alfa-OH-caurenoico se obtuvieron de *M. hibiscifolia*.

Los caurenos utilizados se disolvieron en etanol puro (marca Merck) y se adicionaron directamente a las preparaciones estudiadas quedando una concentración final del disolvente de 0.1%. Con el uso de bioensayos se comprobó que la concentración de etanol utilizada no modificó la respuesta del tejido.

TECNICAS HISTOLOGICAS

Para las observaciones histológicas se utilizaron 3 ratas de la cepa Sprague-Dawley de 200-250 g de peso aproximadamente, las cuales estuvieron en las condiciones antes mencionadas. A este grupo de animales se le administró subcutáneamente una dosis de 20 ug/kg de 3-benzoato-17 beta estradiol de los laboratorios Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), en un volúmen de 200 ul de aceite de maíz, 24 horas antes del sacrificio.

Los animales se sacrificaron por desnucamiento e inmediatamente, se extrajeron los cuernos uterinos de la cavidad abdominal, quitándoles el tejido conjuntivo y grasa. De cada cuerno uterino se obtuvieron dos segmentos, de 1 cm de longitud por 0.3 cm de ancho, aproximadamente. Y de estos segmentos se obtuvieron los fragmentos de paltina (Estrada *et al.*, 1982).

Los fragmentos obtenidos fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1, considerado como control, fue extraído y fijado inmediatamente en formol al 10%.

En los siguientes tratamientos el tejido uterino fue colocado en cámaras de órganos aislados, con un volúmen de 10 ml, los cuales contenfan solución Ringer-Krebs bicarbonato, a una temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a un pH de 7.4 y burbujeo constante de 5% de CO_2 en 95% de O_2 , durante un periodo de cinco horas.

En el tratamiento 2, se mantuvo una porción uterina exclusivamente con solución Ringer Krebs bicarbonato, durante el

periodo estipulado.

En el tratamiento 3, se indujo una contracción uterina con el agonista ACh 10^{-4} M, durante el mismo tiempo,

Finalmente, en el tratamiento 4, el tejido uterino fue incubado con el ácido cauradienoico (40 ug/ml) durante 10 minutos y posteriormente se indujo una contracción con acetilcolina (ACh 10^{-4} M).

Al finalizar cada uno de los tratamientos, el tejido uterino se procesó de la siguiente manera: se fijó cada porción en formol al 10% por un tiempo de 48 h, después se lavó el fragmento de platina en agua corriente, por un periodo de 2 h, para eliminar el fijador. Posteriormente, se deshidrató en alcoholes graduales 50%, 60%, 70%, 80%, 96% y 100% durante 30 minutos en cada uno. Se aclaró en xilol, xilol-parafina y se procedió a incluir en parafina a 56 °C con tres cambios de 30 minutos cada uno. Los cortes se hicieron en un microtomo de parafina con un grosor de 6 μ m en dirección transversal.

Las técnicas de tinción aplicadas fueron las de Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Gallego y azul de alciano.

Al finalizar las técnicas de tinción se montaron, limpiaron y etiquetaron las preparaciones obtenidas. Se procedió a observar en un fotomicroscopio Zeiss III, en un sistema de iluminación de campo claro. Se tomaron fotografías con una película Fuji 100 ASA.

ANALISIS ESTADISTICO

El incremento en la actividad contráctil, inducida por los diferentes agonistas, se analizó cuantitativamente al obtener el área bajo la curva (cm^2) de los registros en un período de 6 minutos. La medicina del área bajo la curva se hizo con un planímetro digital con trazador ajustable, Tamaya modelo polar 2.

La respuesta inducida por acetilcolina (10^{-4} M) se consideró como el 100% en todos los experimentos y con ésta se comparó las respuestas inducidas por los agonistas (ACh, OT y 5HT). Obteniendo un valor relativo porcentual.

En el cuadro 3, se define el modelo experimental utilizado en este trabajo, cada valor observado representa el número de úteros utilizados en cada tratamiento. Para el análisis estadístico se consideró como dato los promedios de las fracciones utilizadas por útero en cada tratamiento. Fue definido de esta manera para considerar la independencia de las repeticiones. Asimismo, en este trabajo, no se identificaron fuentes de variación entre las unidades experimentales. Por tal motivo, se utilizó un Diseño Experimental completamente al azar sin covariable.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico BMDP (Biomedical Package), específicamente el programa 7D. Este módulo de proceso estadístico se caracteriza por presentar histogramas y estadísticos básicos para cada tratamiento. Incluye también pruebas de comparación múltiple

(análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey). El análisis de varianza de una vía contempla dos procedimientos de prueba. El primero supone que las varianzas son homogéneas y utiliza la prueba de Levene. El segundo, supone que no existe homogeneidad de varianzas, por lo que utiliza la prueba de Welch y/o Brown-Forsythe (Dixon *et al.*, 1990). El nivel de significancia se fijó en valores de $p < 0.05$ unimarginal. Los datos en el texto y figuras constituyen los valores porcentuales de inhibición promedio de la fracciones del útero +/- el error estándar de la media de los tratamientos.

C U A D R O 3

	20.0	ACIDO CAURADIENOICO	17.0	8.0
	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	6	9	-	-
OT (5 mUI/ml)	6	9	-	-
5HT (5 ⁻⁵ M)	3	3	3	3

	20.0	ACIDO CAURENOICO	17.0	8.0
	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	3	-	-	2
OT (5 mUI/ml)	3	-	-	-
5HT (5 ⁻⁵ M)	2	3	-	-

	20.0	ACIDO CAURENOICO	17.0	8.0
	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	3	*	*	2
OT (5 mUI/ml)	3	*	*	*
5HT (5 ⁻⁵ M)	2	3	*	*

	20.0	ACIDO GRANDIFLORICO	41.66	53.75
	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	3	*	*	*
OT (5 mUI/ml)	2	*	*	*

	20.0	ACIDO 16 ALFA-OH CAURENOICO	5.0
	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	*	2	2
5HT (10 ⁻⁵ M)	2	2	2

	20.0	ESTER METILICO DEL ACIDO 16 ALFA-OH CAURENOICO	5.0
	ug/ml	ug/ml	ug/ml
ACh (10 ⁻⁴ M)	*	*	*
5HT (10 ⁻⁵ M)	2	*	*

Cada valor representa el número de úteros utilizados en cada tratamiento. El * establece que no se pudo determinar el efecto. Y - no se realizaron experimentos con esos tratamientos.

RESULTADOS

Los caurenos estudiados, cuya estructura química se muestra en la figura 2, inhibieron la actividad contráctil inducida por 10^{-5} M de acetilcolina, 5 mUI/ml de oxitocina y 10^{-5} M de serotonina en el útero aislado de rata tratada con estrógeno.

En la figura 4 se muestra un trazo típico del protocolo experimental utilizado en este trabajo. Se puede observar que la respuesta del tejido a 10^{-4} M de acetilcolina es repetitiva y de semejante magnitud. En el trazo superior se define la acción de 5 mUI/ml de OT y posteriormente el efecto de este agonista en presencia de 20 ug/ml del ácido caurenoico. En el trazo inferior se observa el efecto del ácido cauradienoico (20 ug/ml) sobre la actividad contráctil uterina inducida por 10^{-5} M de acetilcolina. Nótese que en ambos casos, la respuesta a los agonistas empleados es reducida por la presencia de los ácidos antes mencionados.

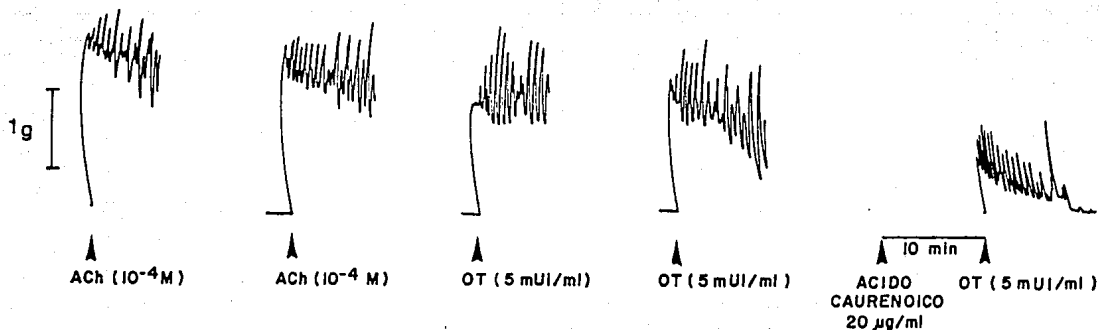
El cuadro 4 muestra el porcentaje de inhibición inducido por los ácidos cauradienoico y caurenoico (20 ug/ml) sobre la actividad uterina producida por 10^{-5} M acetilcolina, 5 mUI/ml de oxitocina y 10^{-5} M de serotonina sobre segmentos uterinos aislados *in vitro* de ratas tratadas con estrógeno. La contracción inducida por 10^{-5} M de acetilcolina fue inhibida por el ácido cauradienoico en un 52.81% (+/- 14.18) y en un 79.75% (+/- 6.16) por el ácido caurenoico. Así también, en la contracción inducida por 5 mUI/ml de oxitocina inhibieron en un 67.67% (+/- 5.26) y 72.21% (+/- 15.41), respectivamente. Y en la contracción inducida por 10^{-5} M de serotonina inhibieron en un

68.63% (+/- 31.37) y 100%, comparativamente (Fig. 5 y 6). La comparación de los datos, obtenidos en estos tratamientos, a través del análisis de varianza de una vía y de acuerdo a la prueba de Levene, muestran que no existen diferencias significativa.

El ácido cauradienoico (17.0 ug/ml) inhibió las contracciones inducidas por 10^{-5} M de acetilcolina, 5 mUI/ml de oxitocina y 10^{-5} M de serotonina en un 27.37% (+/- 10.73), 36.56% (+/- 7.71) y 59.73% (+/- 40.27), respectivamente. A través de una prueba de análisis de varianza, de acuerdo a la prueba de Levene, no existen diferencias significativas entre tratamientos.

A una concentración de 20 ug/ml el ácido grandiflorico inhibió la contracción inducida por 5 mUI/ml de oxitocina en un 13.94% (+/- 0.855). Cuando se realizó el estudio comparativo entre el efecto del ácido grandiflorico, cauradienoico y caurenoico (20 ug/ml) sobre la contracción inducida por 5 mUI/ml de oxitocina se observó que existen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre estos tratamientos, de acuerdo con la prueba de Levene (Fig. 7).

La figura 8 muestra un trazo característico de los efectos del ester metílico y el ácido 16 alfa-OH caurenoico sobre la actividad uterina inducida por 10^{-5} M de serotonina sobre útero aislado de rata tratada con estrógeno. Se observa la notable diferencia en el efecto inhibitorio inducido por el ester metílico en contraste con el menor efecto del ácido 16 alfa-OH caurenoico.



8

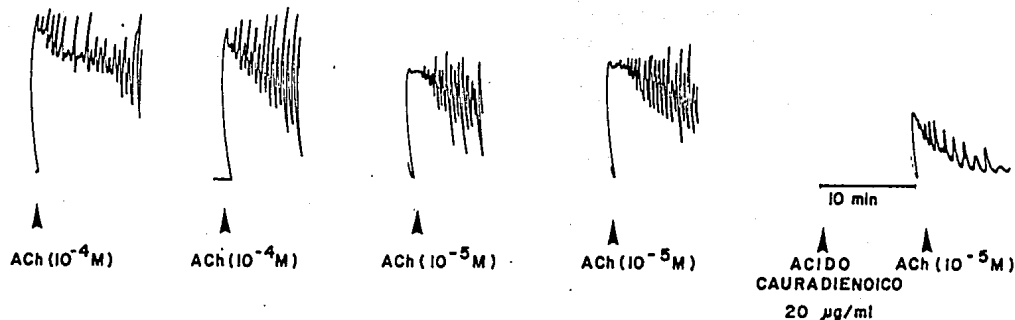


Fig. 4 Efecto de los ácidos caurenoico y cauradienoico (20 µg/ml) en contracciones inducidas por la oxitocina (OT) y la acetilcolina (ACh) en útero de rata in vitro

PORCENTAJE DE INHIBICION INDUCIDO POR LOS ACIDOS CAURADIENOICO Y CAURENOICO (20 ug/ml) SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL PRODUCIDA POR AGONISTAS EN UTERO DE RATA ESTROGENIZADA.

	A C I D O CAURADIENOICO	A C I D O CAURENOICO
ACh (10 ⁻⁵ M)	52.82 +/-14.18 (6)	79.75 +/- 6.16 (3)
OT (5 mUI/ml)	67.67 +/- 5.26 (6)	72.21 +/- 15.42 (3)
5-HT (10 ⁻⁵ M)	68.63 +/-31.37 (3)	100.00 +/- 00.00 (2)

Los valores representan el valor promedio +/- el error estandar de la media. Entre paréntesis se muestra el número de úteros utilizados en cada experimento.

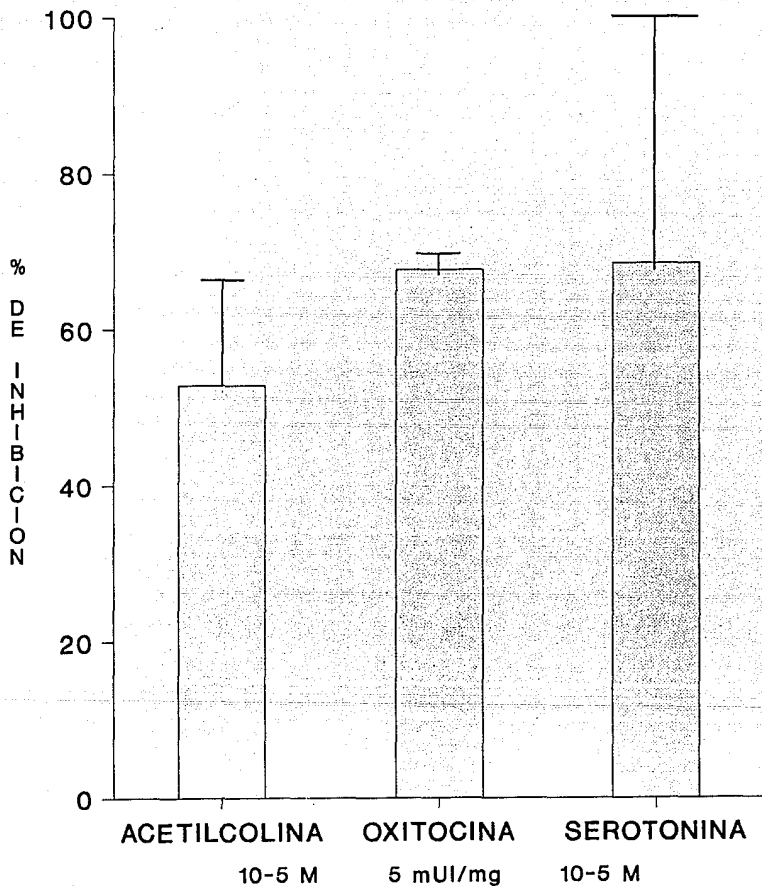


FIG. 5. PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICION INDUCIDO POR EL ACIDO CAURADIENICO (20 ug/ml) EN CONTRACCIONES PRODUCIDAS POR AGONISTAS ACETILCOLINA, OXITOCINA Y SEROTONINA.
 Con valores de n=6, 6 y 3 respectivamente.

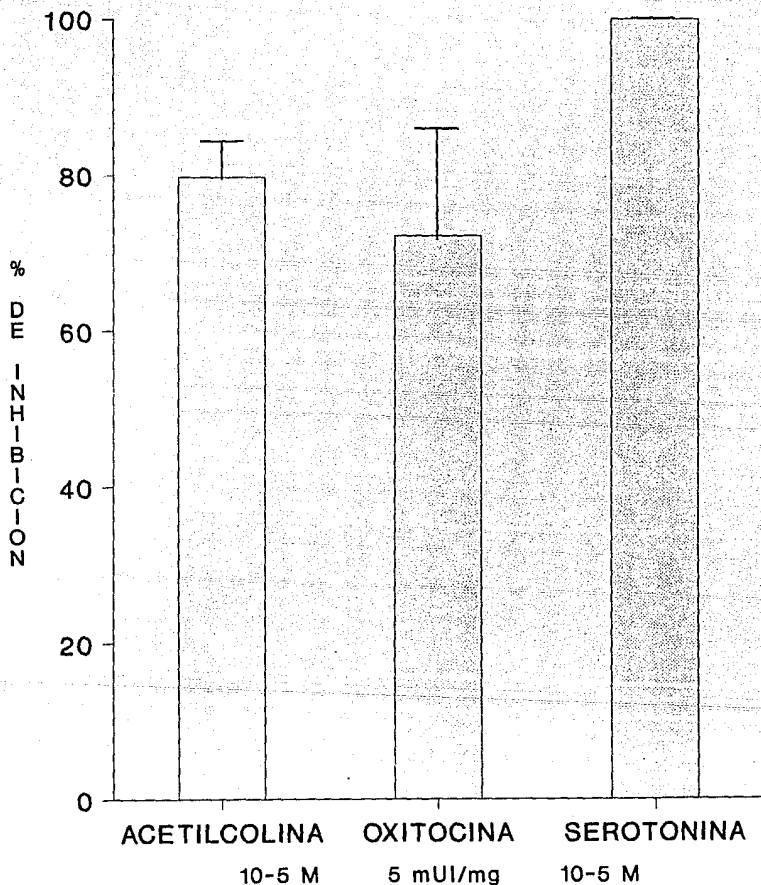


FIG. 6. PORCENTAJE PROMEDIO DE INHIBICION INDUCIDO POR EL ACIDO CAURENOICO (20 ug/ml) EN CONTRACCIONES PRODUCIDAS POR AGONISTAS ACETILCOLINA, OXITOCINA Y SEROTONINA.
 Con valores de n=3, 3 y 2 respectivamente.

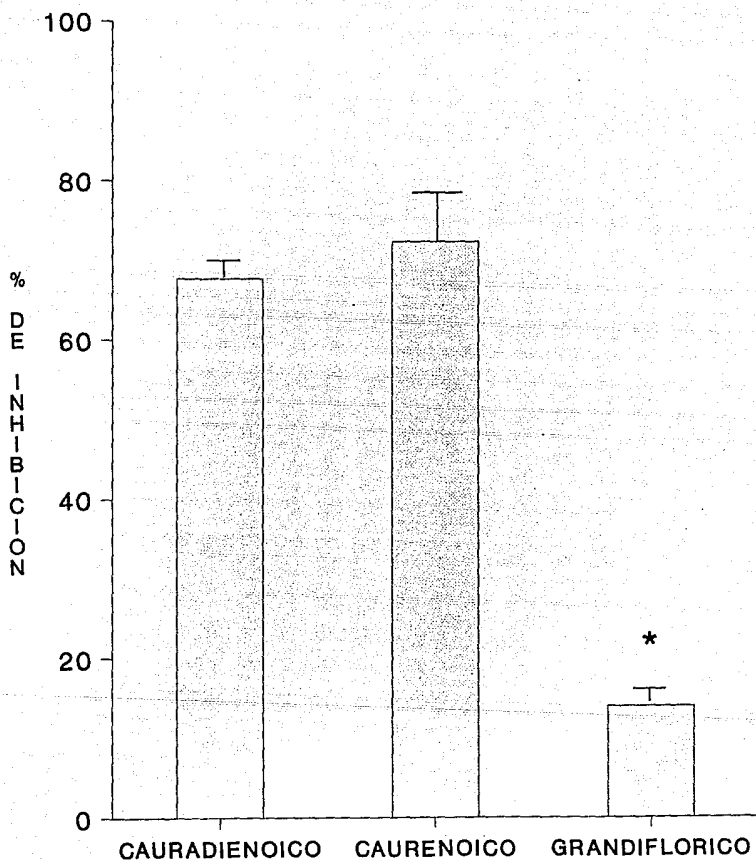
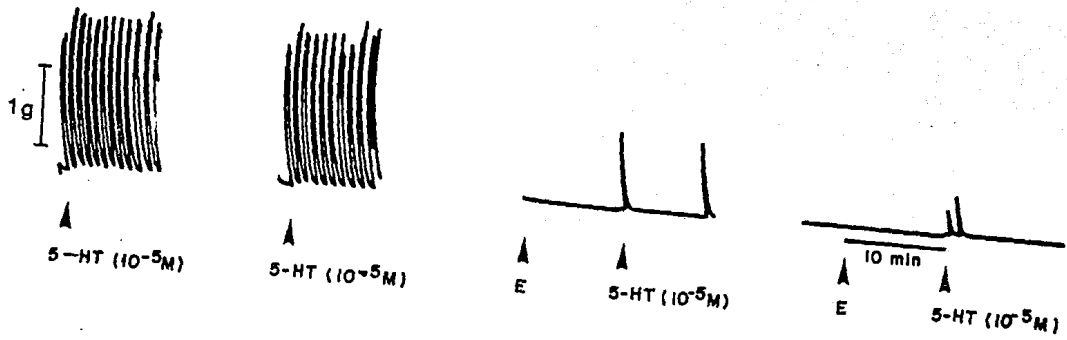
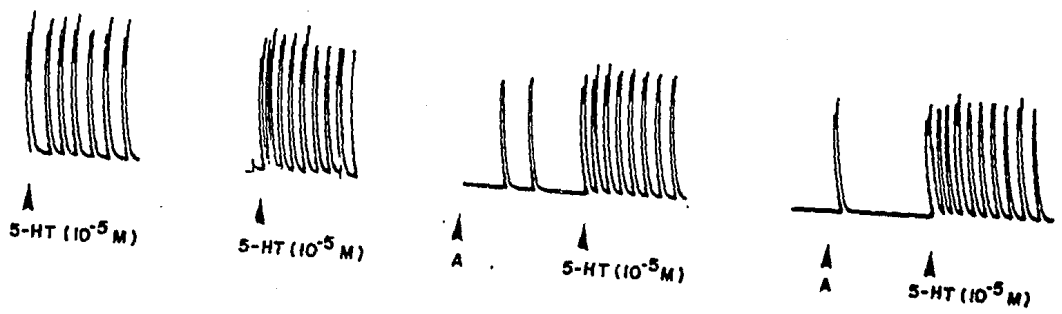


Fig. 7. Porcentaje de inhibición inducido por caurens (20 ug/ml) en contracción uterina producida por oxitocina 5 mUI/ml
 * $p < 0.01$.



E = ESTER METILICO DEL ACIDO
16 alfa-HIDROXI-CAURENICO



A = ACIDO 16 alfa-HIDROXI-CAURENICO

Fig. 8 Efecto del ácido 16 alfa-hidroxi-caurenolico y su ester metilico en la respuesta contráctil inducida serotonina (5-HT) en útero de rata in vitro

En el cuadro 5 se muestra el porcentaje de inhibición inducido por el ester metílico 16 alfa-OH caurenico (90.25% +/- 9.75) y el ácido 16 alfa-OH caurenico (15.70% +/- 1.14), a la concentración de 20 ug/ml, sobre la actividad producida por serotonina (10^{-5} M). Entre estos tratamientos, considerando la prueba de Levene del análisis de varianza, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 9).

El ester metílico 16 alfa-OH caurenico (5.0 ug/ml) inhibió la actividad uterina producida por 10^{-5} M de acetilcolina y 10^{-5} M de serotonina en un 96.77% (+/- 3.23) y 95.04% (+/- 4.95) (Fig. 10). Al realizar el análisis de varianza no existen diferencias significativas entre tratamientos.

En todos los tejidos tratados con los caurenos y después de haberse renovado varias veces la solución Ringer-Krebs bicarbonato, se observó una completa recuperación cuando se somete a la acción de los agonistas utilizados.

C U A D R O 5

PORCENTAJE DE INHIBICION INDUCIDO POR EL ACIDO Y EL ESTER METILICO 16 alfa-HIDROXI-CAURENOICO (20 ug/ml) SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL PRODUCIDA POR SEROTONINA EN UTERO DE RATA ESTROGENIZADA.

	A C I D O	ESTER	METILICO
5-HT (10^{-5} M)	15.70 +/- 1.13 (2)	90.25	+/- 9.74 (2)

Los valores representan el valor promedio +/- el error estandar de la media. Entre paréntesis se muestra el número de úteros utilizados en cada experimento.

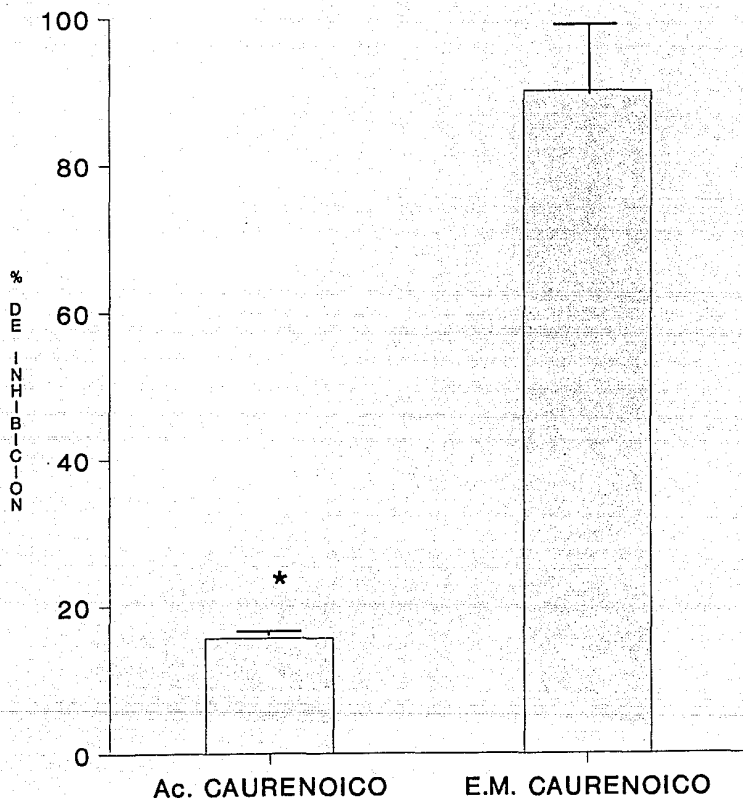


FIG. 9. PORCENTAJE DE INHIBICION INDUCIDO POR EL ACIDO CAURENOICO Y SU ESTER METILICO EN CONTRACCIONES UTERINAS PRODUCIDAS POR 10-5 M DE SEROTONINA.

* $p < 0.05$. $n=2$.

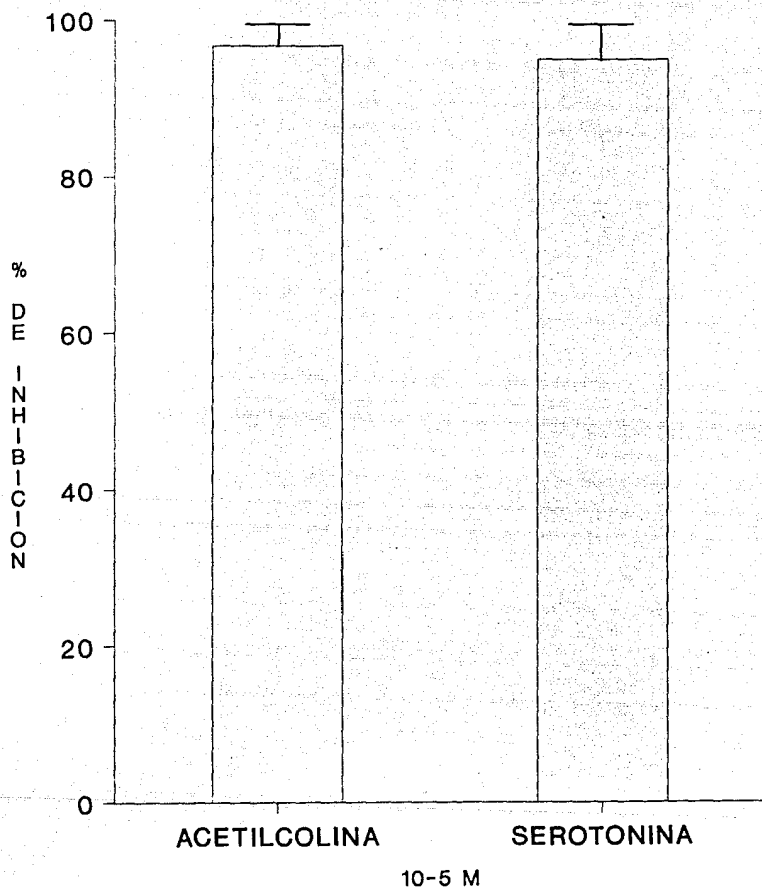


FIG. 10. PORCENTAJE DE INHIBICION INDUCIDO POR EL ESTER METILICO DEL ACIDO 16ALFA-OH CAURENOICO (5.0 ug/ml), EN CONTRACCIONES PRODUCIDAS POR ACETILCOLINA Y SEROTONINA. n=2.

CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS

En los cortes de los úteros observados se distinguieron tres capas: a) una mucosa o endometrio constituida por epitelio y tejido conjuntivo, en el cual quedan incluidas glándulas exócrinas; b) tejido muscular liso o miometrio, organizado en una capa circular interna y una longitudinal externa y por último, c) una serosa o perimetrio formada de escaso tejido conjuntivo y mesotelio (Lámina 1 y 2).

En los úteros sometidos a los diferentes tratamientos se diferenciaron algunas características morfológicas:

En la lámina 1, se puede observar que el tratamiento 1 muestra la superficie endometrial en forma de pliegues de diverso tamaño formando una luz estrecha y estrellada de forma irregular (Fig. a). En el tratamiento 2, esta mucosa presenta un menor número de pliegues y estos disminuyeron en el tratamiento 3 (Fig. b y c), lo que produce que la luz sea menos irregular. En tanto, el tratamiento 4 muestra los pliegues más laxos y la luz de mayor amplitud (Fig. d).

En la lámina 3, se pueden observar las modificaciones del epitelio inducidas por los diferentes tratamientos. En el tratamiento 1, el epitelio es cilíndrico simple, los núcleos son esféricos, localizados en el extremo basal de la célula, su citoplasma es de constitución homogénea y ligeramente acidófila (Fig. i). En los tratamientos 2, 3 y 4 se observó un aumento evidente en la altura del epitelio (Fig. j, k y l) y la

modificación de la posición de los núcleos a distintas alturas, los cuales pueden tener diversas formas, unos más elongados que otros. El borde apical del epitelio fue positivo a la técnica de azul de alciano, lo que indicó la presencia de mucopolisacáridos. La constitución del citoplasma varió en unas células y fue más hialino, homogéneo y granuloso en otras. Así también, en el tratamiento 4 se observaron en el epitelio modificaciones más evidentes. Este presentó en su superficie mayor irregularidad y una notable disminución en algunas zonas, debido a las descamaciones epiteliales (Lámina 4).

En la lámina 5, se muestra el epitelio de las glándulas exócrinas. El tratamiento 1, muestra características similares a las del epitelio de revestimiento, el cual es columnar simple, los núcleos celulares son basales, esféricos o ligeramente irregulares y muestran un nucléolo evidente, el citoplasma es homogéneo (Fig. o). Así mismo, en el tratamiento 2 no se observaron modificaciones en las glándulas (Fig. p). En los tratamientos 3 y 4, se advirtió que las glándulas tuvieron una luz más amplia y su epitelio fue más bajo. Es de hacer notar que en el tratamiento 4 el número de glándulas que muestra el útero es claramente mayor. El tejido conjuntivo que rodea a las glándulas se observa con mayor laxitud en los tratamientos 3 y 4 (Lámina 6).

El tejido conjuntivo mostró características similares en los cuatro tratamientos; sin embargo, es ligeramente más laxo en el tratamiento 4 (Fig. t y u). Este tejido presentó abundantes células correspondientes a fibroblastos y macrófagos, este último

tipo celular con frecuencia se observó en la base del epitelio, tanto de las glándulas como del de revestimiento; también se diferenciaron linfocitos y eosinófilos. Los vasos sanguíneos observados son de pequeño calibre y se encuentran en forma abundante,

En la lámina 7, se evidencia de manera notable la presencia de eosinófilos, especialmente en la región endometrial y miometrial, así como en el tejido conjuntivo que rodea a las células musculares. La presencia de estas células es una característica de la condición estrogénica del útero. La capa muscular o miometrio mostró aspectos morfológicos similares en los primeros tres tratamientos, en tanto que en el tratamiento 4 su grosor fue ligeramente menor, tanto en la capa circular como en la longitudinal (Fig. y).

En todos los casos, la serosa está constituida por delgado tejido conjuntivo en el cual se localizan vasos de pequeño y mediano calibre y no se observó modificaciones evidentes en los distintos tratamientos.

L á m i n a 1

Vista panorámica de úteros de rata tratados con estrógeno

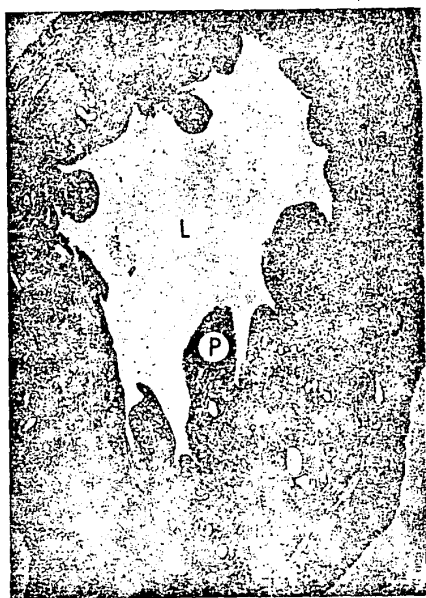
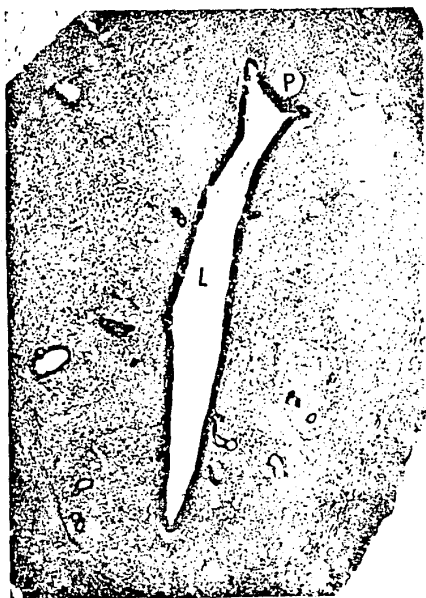
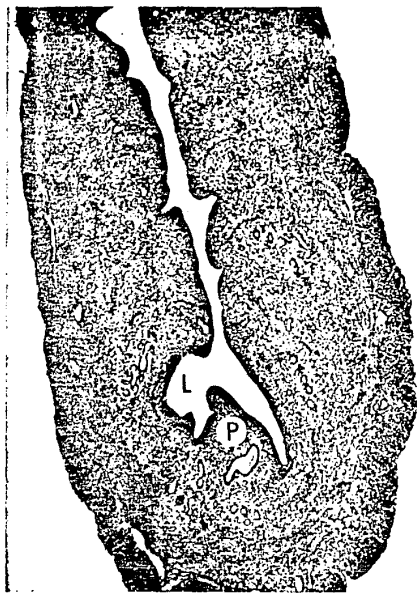
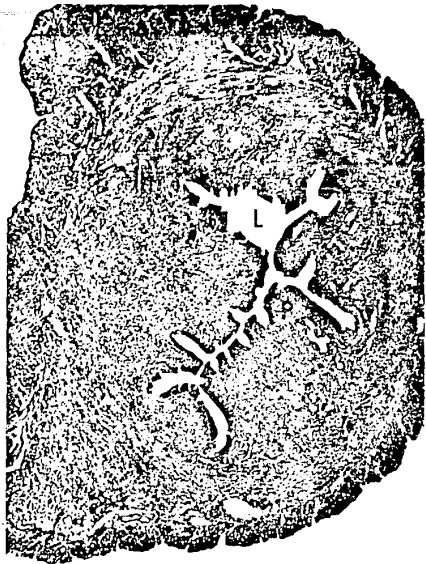
Fig. a. Tratamiento 1. H-E. 32X.

Fig. b. Tratamiento 2. H-E. 32X.

Fig. c. Tratamiento 3. H-E. 32X.

Fig. d. Tratamiento 4. Azul alciano. 32X.

Es evidente las modificaciones que existen en la luz del útero (L) y los pliegues de la mucosa (P).



L á m i n a 2

Capas que forman la pared uterina

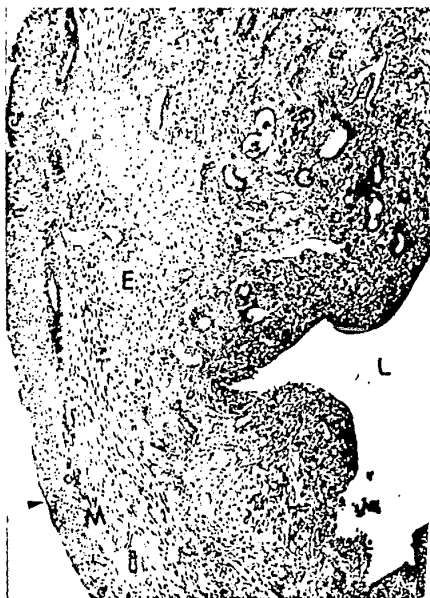
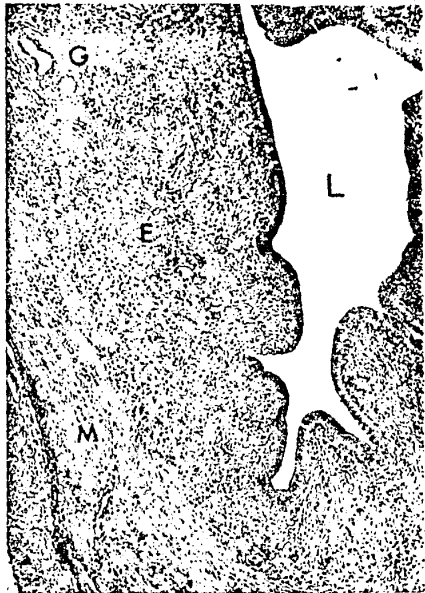
Fig. e. Tratamiento 1. H-E. 78X.

Fig. f. Tratamiento 2. Tricrómica de Gallego. 78X.

Fig. g. Tratamiento 3. Azul de alciano. 78X.

Fig. h. Tratamiento 4. Tricrómica de Gallego. 78X.

Se observan las capas uterinas: endometrio (E),
miometrio (M) y perimetrio (A). Así también, se muestra
las glándulas (G) y la luz del útero (L).



L á m i n a 3

Epitelio de revestimiento

- Fig. i. Tratamiento 1. Tricrómica de Gallego. 500X.
Fig. j. Tratamiento 2. Azul alciano. 500X.
Fig. k. Tratamiento 3. Azul alciano. 500X.
Fig. l. Tratamiento 4. Tricrómica de Gallego. 500X.

Se evidencia las modificaciones en la altura del epitelio (E), la secreción del polo apical (▲) y la descamación celular (D). Se muestra también, la luz del útero (L) y tejido conjuntivo (T).

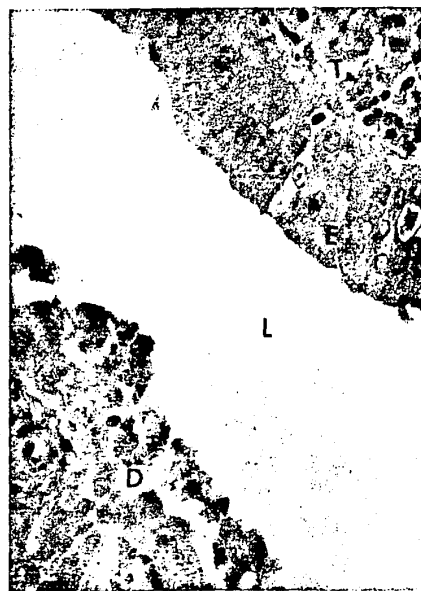
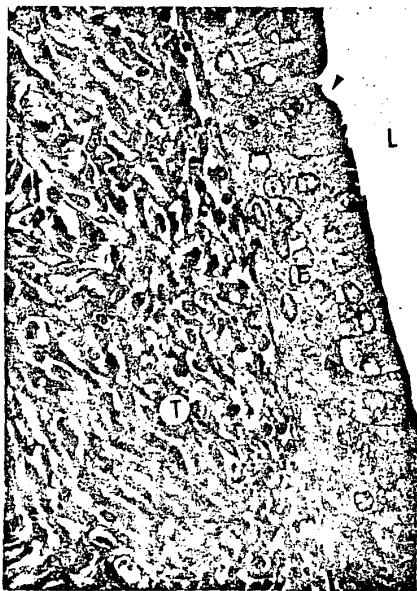
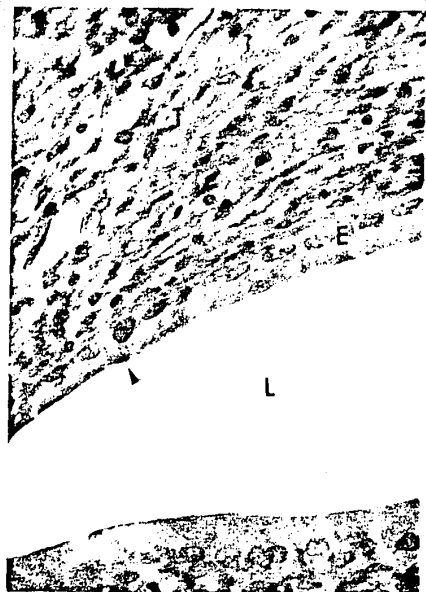


Lámina 4

Tratamiento 4, irregularidad en el epitelio

Fig. m. Azul de alciano. 78X.

Fig. n. Tricrómica de Gallego. 200X.

Se muestran alteraciones en la superficie uterina sometida a este tratamiento, en ella es evidente su reducción en amplias zonas (A), así como descamaciones celulares (D).

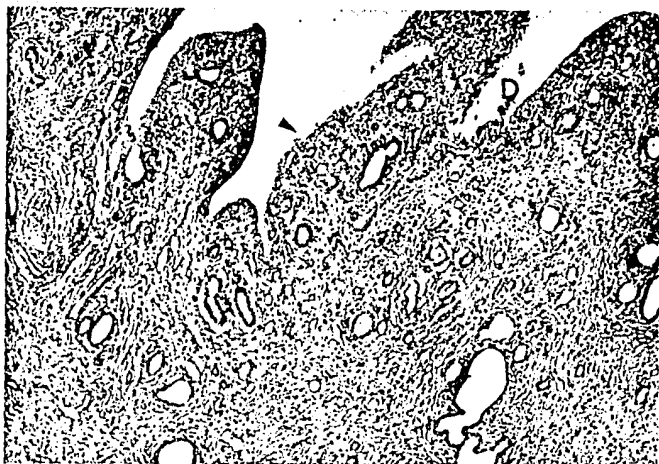
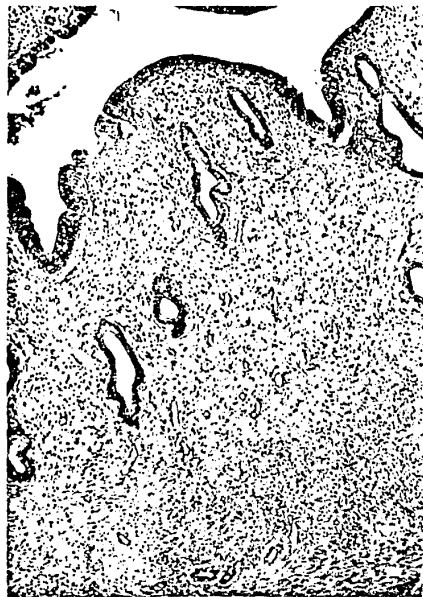


Lámina 5

Glándulas uterinas

- | | | | | |
|---------|-------------|----|------------------------|------|
| Fig. o. | Tratamiento | 1. | H-E. | 78X. |
| Fig. p. | Tratamiento | 2. | H-E. | 78X. |
| Fig. q. | Tratamiento | 3. | H-E. | 78X. |
| Fig. r. | Tratamiento | 4. | Tricrómica de Gallego. | 78X. |

En el tratamiento 3 y 4 se observa un mayor desarrollo de las glándulas (G) y una luz uterina (L) más laxa.



L á m i n a 6

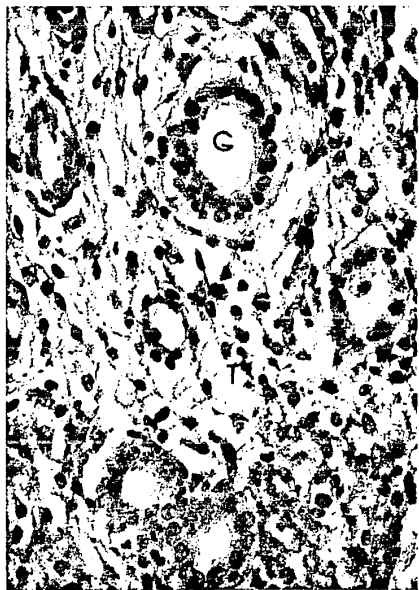
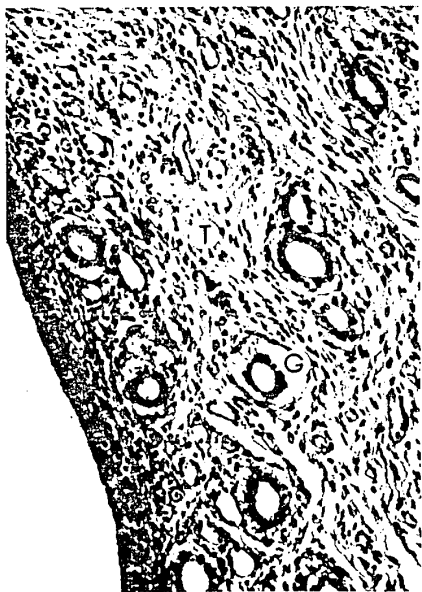
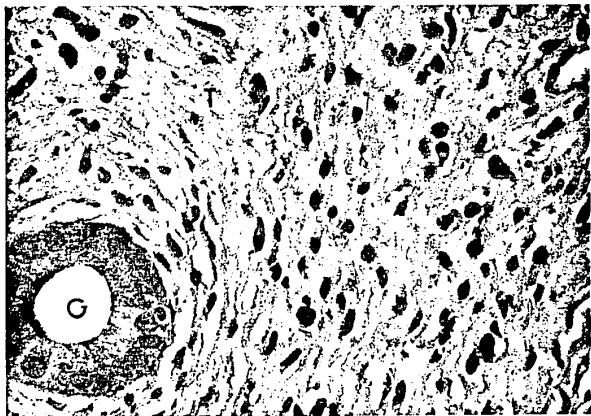
Glándulas uterinas

Fig. s. Tratamiento 3. H-E. 500X.

Fig. t. Tratamiento 4. H-E. 200X.

Fig. u. Tratamiento 4. Azul de alciano. 500X.

En el tratamiento 4, se observa la laxitud del tejido conjuntivo (T) que rodea a las glándulas exócrinas (G).

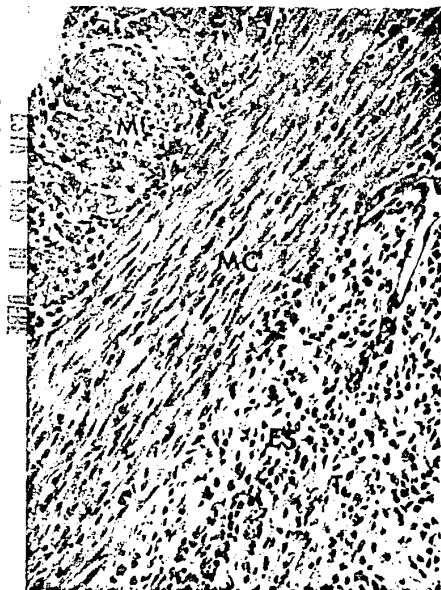
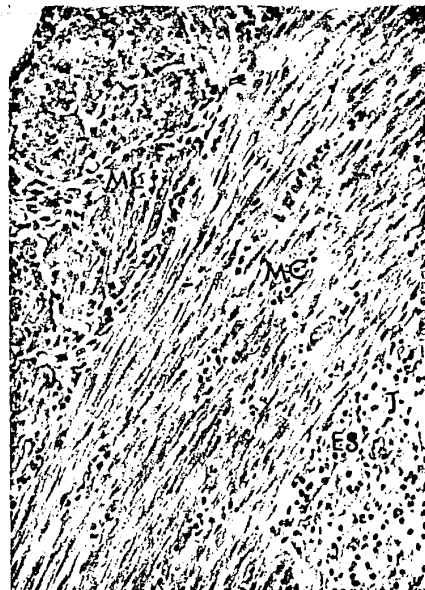


L á m i n a 7

Músculo liso uterino de rata estrogenizada

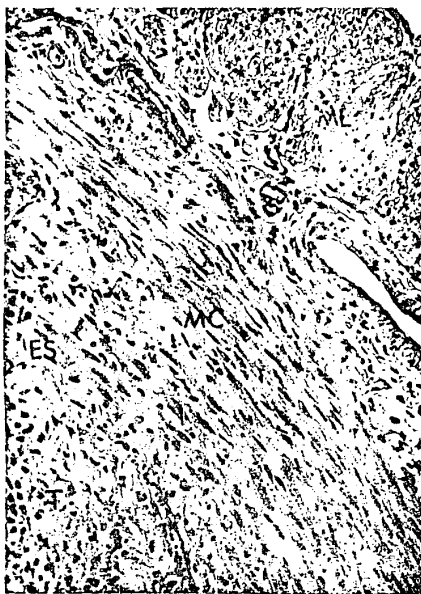
- Fig. v. Tratamiento 1. H-E. 200X.
Fig. w. Tratamiento 2. H-E. 200X.
Fig. x. Tratamiento 3. H-E. 200X.
Fig. y. Tratamiento 4. H-E. 200X.

Se evidencia la presencia de eosinófilos (ES) en el el tejido conjuntivo (T), la capa muscular circular (MC) y en la capa muscular longitudinal (ML) debido a su condición estrogénica.



ALB. DE LA KOLLEGE

ESIN TISS. NO DEBE



DISCUSION

En este trabajo se muestra que los caurenos aislados de *Montanoa frutescens*, *M. tomentosa* y *M. hibiscifolia* producen un efecto inhibitorio sobre la actividad uterina inducida por los agonistas acetilcolina, oxitocina y serotonina (ACh, OT y 5-HT) en segmentos de úteros aislados de ratas tratadas con estrógenos. En trabajos anteriores, se ha mostrado que el efecto de los extractos acuosos aislados de *M. tomentosa* depende de la especie animal utilizada y de su estado endócrino (Béjar *et al.*, 1984b). Del mismo modo, se reporta además la inhibición de la actividad contráctil espontánea producida por los caurenos (Lozoya *et al.*, 1983; Béjar *et al.*, 1984a; Béjar *et al.*, 1984b; Enríquez *et al.*, 1984; Ponce-Monter *et al.*, 1988; Campos-Lara *et al.*, 1990). Tales observaciones realizadas en útero de rata son congruentes con los resultados mostrados.

El efecto inhibitorio de los caurenos sobre la actividad contráctil inducida por agonistas, puede estar relacionado con varios procesos. Se ha propuesto que estos agonistas producen un incremento en la actividad uterina mediante la activación de receptores específicos, localizados en la membrana plasmática de las células miométriales y que cada uno de estos agonistas activa vías de entrada de Ca^{2+} operadas por el receptor (Ichida *et al.*, 1983; Mironneau *et al.*, 1984). Sin embargo, de acuerdo con los resultados de esta investigación (cuadro 4 y cuadro 5), es factible proponer que el efecto inhibitorio de los caurenos es inespecífico para las tres estrategias de contracción inducida

por los agonistas (acetilcolina, serotonina y oxitocina). Y que los caurenos puedan interferir en el proceso de entrada de Ca^{2+} al interior de la célula miometrial y que es poco probable que interfieran en la formación del complejo agonista-receptor.

El mecanismo de acción de los agonistas utilizados en el proceso de excitación-contracción del músculo liso uterino involucra la hidrólisis del fosfatidil inositol. Por lo que el efecto inhibitorio de los caurenos puede ser producido, probablemente, por alguna interacción con este conjunto de eventos, en los cuales se postula que el IP_3 actúa como un segundo mensajero (Carsten and Miller 1985; Abdel-Latif 1986; Berridge 1987; Kanmura *et al.* 1988; Van Breeme and Saida 1989).

Otra posibilidad, es que los caurenos induzcan la liberación de noradrenalina de la varicosidades nerviosas noradrenérgicas y que este neurotransmisor liberado actúe sobre los receptores beta adrenérgicos postsinápticos y se produzca la inhibición a la actividad contráctil. No obstante, la posibilidad de que este proceso ocurra es menor, ya que se ha demostrado que el efecto inhibitorio de los extractos de *M. tomentosa* y *M. frutescens*, no es bloqueado por la presencia del propanolol, un antagonista beta adrenérgico (Perusquía *et al.*, 1985).

Otra explicación que se ha propuesto, en relación al efecto inhibitorio de los caurenos en el útero de rata tratada con estrógenos, es que probablemente interfieran en las vías de entrada de calcio operadas por el receptor y actúen como bloqueadores en la incorporación de calcio a las células

Los resultados obtenidos con el ácido 16 alfa-OH caurenoico comprueban que la modificación del grupo carboxilo a ester metílico influye en la actividad inhibitoria de estos derivados. Este notable incremento en la inhibición producida por el ester puede ser explicado por la disminución de la polaridad de este compuesto y tenga más posibilidades de interaccionar con los elementos membranales (Enríquez *et al.*, 1984; Ponce-Monter *et al.*, 1988).

Existe muy poca literatura referente a los estudios morfológicos hechos en útero de rata sometido al efecto de los caurenos, al respecto, encontramos solamente la mención de Gonzalez-Angulo *et al.* (1985), quienes afirman que el extracto acuoso de *M. frutescens* produce alteraciones epiteliales y vasculares del tejido uterino, de manera más generalizada que los producidos por *M. tomentosa*. Con el análisis de nuestros resultados, podemos afirmar que el efecto observado en úteros sometido al ácido cauradienoico, obtenido de *M. tomentosa*, muestra alteraciones evidentes en el epitelio de revestimiento. Este epitelio presenta una superficie es muy irregular, encontrándose zonas en las que es más alta, otras en las que existe abundante descamación y otras de enorme adelgazamiento. Consideramos que estos cambios morfológicos del epitelio uterino, inducidos por el caureno, están relacionados, probablemente, con el efecto de inhibición de la fertilidad, observado con otros caurenos (Hahn *et al.*, 1984). Esta inhibición puede ser provocada por una alteración en el proceso de implantación, como

lo afirman Pedrón *et al.* (1985) y Méndez (1989).

El análisis de la morfología del útero de rata control (tratamiento 1) coincide con las características para la fase de estro mencionado por diversos autores (Fuxe and Nilsson, 1963; Galand *et al.*, 1971; Greep, 1973; Andrew and Hickman, 1974).

En nuestras observaciones resulta evidente la abundante presencia de eosinófilos ante el estímulo de estrógeno. Esta característica es mencionada por Ross y Klebanoff (1966) quienes; sin embargo, afirman que su significado fisiológico no es claro y proponen que estas células intervienen en procesos antígeno-anticuerpo. Asimismo, los eosinófilos presentan lisosomas que pueden actuar en los cambios histológicos del útero durante las fases posteriores al estro. La distribución intrauterina de eosinófilos es dependiente de la fase del ciclo estral.

Otras modificaciones que pueden estar relacionadas con el fenómeno estrogénico son la amplitud de la luz uterina y la estimulación del epitelio superficial y glandular descrito por Solomon *et al.* (1976). Estas características dependen basicamente del estado hormonal de los individuos. Asimismo, la actividad secretora del polo apical de las células epiteliales se incrementa en esta fase estrogénica, lo que confirma lo descrito por Fuxe y Nilsson (1963).

La notable laxitud del tejido conjuntivo inducida por el tratamiento 4, puede ser explicada, probablemente, como un efecto de infiltración tisular en las células del músculo liso uterino y

vascular. La causa de esto puede estar vinculada con el adelgazamiento de los vasos sanguíneos de la mucosa uterina, a lo cual también hacen referencia González-Angulo *et al.* (1985). Otra explicación posible es que el ácido cauradienoico (40 ug/ml) produzca efectos tóxicos en el epitelio de revestimiento y tejido conjuntivo. Empero, en un estudio realizado por Southam (1983) se establece que el extracto acuoso de *M. tomentosa* no produce efectos tóxicos en diferentes modelos experimentales.

Es importante destacar que el incremento glandular presente en el tratamiento 4, puede no estar asociado al efecto de los caurenos sino más bien se debe a que en la región en donde se realizó el corte tenga mayor número de glándulas. De hecho, en porciones más cercanas al ovario existe un mayor número de glándulas.

En un experimento realizado por Yamamoto *et al.* (1983), utilizando un caureno aislado de *Stevia rebaudiana*, el esteviol, se mostró que éste inhibe la gluconeogenesis en túbulos renales de rata, produciendo una hipoglucemia. Esto podría apoyar la propuesta de que los caurenos producen a nivel del epitelio uterino un fenómeno similar, manifestándose en su alteración.

En los tratamientos 2 y 3 solo se mostraron cambios evidentes en la forma de la luz. Esto puede estar relacionado con el nivel uterino de donde se obtuvo el corte o por el mismo estado de tensión al que fue sometido. De la misma manera, no se observaron modificaciones morfológicas en las capas circular y longitudinal del músculo liso uterino.

Es importante destacar que, generalmente, en los trabajos farmacológicos, para el análisis estadístico se utiliza como dato las fracciones totales del tejido a examinar; sin considerar el número de individuos utilizados. En este trabajo, con el objeto de tener realmente repeticiones independientes, se consideró como n el número de úteros utilizados en cada tratamiento. Lo que redujo, en algunas ocasiones, el tamaño de la muestra; por lo que en ciertos casos, no pudo determinarse el efecto producido en cada tratamiento. Asimismo, esto produce que la distribución de los datos sea mayor y el intervalo de confianza se incremente. Por tal motivo se sugiere para investigaciones posteriores considerar como n al tejido aislado de cada individuo.

Finalmente, aunque nuestros resultados indican que el efecto inhibitorio de los caurenos en útero de rata estrogenizada pueden desempeñar un papel funcional en los mecanismos reproductivos de los animales y en la fisiología uterina, se desconoce la función de estos compuestos, por lo que son necesarios estudios adicionales tanto farmacológicos como histológicos que permitan elucidar el mecanismo de acción y su relación con las respuestas del útero en diferentes especies animales y en diferentes estados endócrinos. Asimismo, es indispensable conocer con precisión diversos aspectos botánicos, ecológicos, farmacológicos e histológicos para valorar las propiedades de las plantas empleadas popularmente en el tratamiento de algunos padecimientos y destacar su valor terapéutico.

CONCLUSIONES

Los caurenos estudiados inhibieron inespecíficamente las respuesta contráctil inducidas por los agonistas acetilcolina, oxitocina y serotonina

La esterificación metílica del grupo carboxilo de la posición 19 del ácido 16 alfa-OH caurenoico incrementa en forma significativa el efecto inhibitorio del ácido.

El ácido cauradienoico (40 ug/ml) induce descamación del epitelio de revestimiento y laxitud del tejido conjuntivo en el útero aislado de rata estrogenizada.

El ácido cauradienoico no modificó la estructura de las capas circular y longitudinal del músculo liso uterino.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Latif A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38 (3): 227-272. 1986.
- Adham N. and Schenk E. A. Autonomic innervation of the rat vagina, cervix, and uterus and its cyclic variation. *Am. J. Obst. Gynec.* 104:508-516. 1969.
- Alfaro R. Del cihoapatli o zoapatle. *Gac. Med. Mex.* 3: 47-48. 1866.
- Altamirano F. Estudio sobre el zihoapactli (o sinhuapaste). *An. Inst. Méd. Nac. Méx.* 1: 108-111. 1895.
- Andrew W. and Hickman C. P. Histology of the vertebrates a comparative text. The C. V. Mosby Co. 439 p. 1974.
- Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele S. E., Bollinger Wm. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 228: 1154-1160. 1985.
- Banks W. J. Histología Veterinaria aplicada. Manual Moderno. 1986. 730 pp.
- Beck L. R. and Boots L. R. The oviduct and its functions. Edit by A. D. Johnson Fawley Academic Press. New York. 1-51 p. 1974.
- Béjar O. E., Lozoya X., Enríquez R. y Escobar L. Efecto comparativo de los productos del zoapatle (*Montanoa tomentosa*) y del verapamil sobre la contractilidad uterina de la rata *in vitro*. *Arch. Invest. Med. (México).* 15: 223-235. 1984a.
- Béjar O. E., Enríquez R. y Lozoya X. The *in vitro* effect of grandiflorenic acid and zoapatle aqueous crude extract upon spontaneous contractility of the rat during oestrus cycle. *J. Ethnopharmacology.* 11: 87-97. 1984b.
- Béjar Ocampo E. El efecto de la decocción de *Montanoa tomentosa ssp. tomentosa* (zoapatle) y de sus constituyente activo el ácido grandiflórico sobre la contractilidad uterina. Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM, Iztapalapa. 1985.
- Béjar Ocampo E. Preliminary investigation of the estrogenic potential of grandiflorenic acid from *Montanoa tomentosa*. *J. Ethnopharmacology.* 23: 329-331. 1988.
- Berridge M. J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-193. 1987.

- Bloom W. D. and Fawcett D. W. A textbook of histology. W. B. Saunders Co. London. 1987. 1033 pp.
- Bo W. J., Odor D. L., Rothrock M. The fine structure of uterine smooth muscle of the rat uterus at various time intervals following a single injection of estrogen. *Am. J. Anat.* 123: 369-384. 1968.
- Bolton T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59 (3): 606-718. 1979.
- Bolton T. B. Calcium metabolism in vascular smooth muscle. *British Med. Bull.* 42 (4): 441-429. 1986.
- Bracht *et al.* Effect of *Stevia rebaudiana* natural product on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 34: 873-882. 1985.
- Brieskorn C. H. and Pohlman. Kauradien-9 (11)-16-saure (19). *Chem Ber.* 102: 2621-2628. 1969.
- Caballero Y. and Walls F. Productos naturales del zoapatle. *Bol. Inst. Quím. Univ. Nacl. Autón. México.* 22: 79-102. 1970.
- Calderón J. F., Ocampo C. L. y Ferrer J. A. Registros miográficos de los efectos del extracto de *Montanoa tomentosa* (zoapatle) sobre la actividad uterina de conejas Nueva Zelanda. *Rev. Vet. Mex.* 8: 77-80. 1977.
- Campbell, G. Autonomic nervous supply to effector tissues. in: Smooth muscle. ed. Bulbring E., Brading A. F., Jones A. W. and Tomita T. London. Edward Arnold. 1970. 675 pp.
- Campbell P. S., Newman G. A., Loveless G. C., Wilson H. J. and Eley M. H. Differential uterine responsivity to diethylstilbestrol: apparent bases for contrasting estrogenic potency. *Biology of Reproduction* . 23: 78-87. 1980.
- Campos-Lara G., Ponce-Monter H., Pedrón N., Valencia A., Gallegos A., Ríos T., Calderón J., Gómez F., Quijano L. and Fuentes V. Zoapatle XVI. Effect of two derivatives of kaurenolic acid isolated from *Montanoa frutescens* on rat and guinea pig uterus. *Int. J. Crude Drug Res.* 28(1):61-65. 1990.
- Cannon J. R., Chow P. W., Jefferies P. R. and Meeham G. V. Isolation of (-)-kaura-16-en-19-oic acid and 15 beta-hydroxy-(-)-1-kaura-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude*. *Aust. J. Chem.* 19: 861. 1966.
- Carsten M. E. Role of calcium binding by sarcoplasmic reticulum in the contraction and relaxation of uterine smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 53: 414-426. 1969.

- Carsten M. E. and Miller J. D. Ca^{2+} release by inositol triphosphate from Ca^{2+} -transporting microsomes derived from uterine sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130: 1027-1031. 1985.
- Carsten M. E. and Miller J. D. A new look at uterine muscle contraction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157 (5): 1303-1315. 1987.
- Cauvin C., Loutzenhiser R. and Van Breemen C. Mechanism of calcium antagonist-induced vasodilation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 373-396. 1983.
- Cervantes V. (1790). Ensayo a la materia médica vegetal de México. *El Estudio. Tip. Srfa. de Fomento. México.* 49-50 p. 1880.
- Cota F. (1883). Algo sobre el zihuatpatl. Nueva recopilación de Monografías Mexicanas. *An. Inst. Méd. Nac. Mex.* 2: 23-28. 1897.
- Cotter M. L. CNMR Spectral studies of zoapatanol and montanol novel diterpenos of *Montanoa tomentosa* (zoapatle) and their chemical derivates. *Organic Magnetic Resonance.* 17(1): 14-17. 1981.
- Chen R. and Rowand D. A. Total synthesis of (+/-) zoapatanol. *J. Amer. Chem. Soc.* 102: 6609-6611. 1980.
- Davino S. C., Giesbrecht A. M. and Roque N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbono 15. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22: 1127-1129. 1989.
- De Condolle, A. P. 1836. *Prodromus Systematic Naturalist Regni Vegetabilis.* Vol 5. Treuttel and Wuertz. France.
- De la Cruz M. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis Aztec.* Manuscript 1552. Traducido por Juan Badiano. Ed. IMSS. México. 1964.
- De Lille J. y Ramírez E. Acción de *Montanoa myriocephala* sobre el músculo uterino. *An. Inst. Biol.* 4 (2): 95-102. 1933.
- Dellman H. D. and Brown E. M. *Histología Veterinaria.* Ed. Acribia. España. 529 pp. 1976.
- Demian B. L. Zoapatle (*Montanoa tomentosa*): estudio sobre la metodología de extracción fitoquímica y ensayo farmacológico. Tesis Mestría en biología experimental. UAM, Ixtapalapa. 42 pp. 1991.
- Derbez J., Pardo E. y Del Pozo E. C. El cichuapahtli, activador de la motilidad uterina. *Bol. Inst. Est. Méd. Biol.* 3: 127-139. 1945.

- Dirzo R. Metabolitos secundarios en las plantas. Atributos panglossianos o de valor adaptativo? *Ciencia*. 36 (3): 137-145. 1985.
- Dixon W. J., Brown M. B., Engelman L. and Jennrich R. I. BMDP Statical Software. University of California Press. USA. 1990.
- Dong X., Hamburger M. O., Cordell G. A. and Fong H. H. S. HPLC Analysis of *Montanoa* species for pharmacological active constituents. *Planta Medica*. 55: 185-187. 1989.
- England P. J. Intracellular calcium receptor mechanisms. *Br. Med. Bull.* 42 (4): 375-383. 1986.
- Enríquez R. G., Escobar L. I., Romero M. L. Chávez M. A. and Lozoya X. Determination of grandifloreonic acid in organic and aqueous extracts of *Montanoa tomentosa* (zoapatle) by reverse phase HPLC. *J. Chromatography*. 258: 297-301. 1983.
- Enríquez R. G., Bejar O. E. y Lozoya X. Importancia del ácido cauradienoico y su ester metílico en el efecto producido por *Montanoa tomentosa* sobre la contractilidad uterina *in vitro*. *Arch. Inv. Med. (Mex)*. 15 (3): 236-238. 1984.
- Estrada E., Peralta E. y Rivas P. Manual de técnicas histológicas. Ed AGT. Editor S. A. México. 140 p.
- Estrada V. A., Enríquez R. G., Lozoya X., Béjar E., Girón H., Ponce-Monter H. and Gallegos A. J. The zoapatle II. Botanical and ecological determinants. *Contraception*. 27 (3): 239-253. 1983.
- Fernández de Castro J. Contribución al estudio del cihuapatli. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM. 78 pp. 1925.
- Finn C. A. and Porter D. G. The uterus. Publishing Sciences Group, Inc. USA. 1975.
- Font V. Distribution of genus *Montanoa* in Mexico and Central America. Tesis de Doctorado. University of Texas, Austin. 351 pp. 1981.
- Fuxe K. and Nilsson O. The mouse uterine surface epithelium during the estrous cycle. *Anat. Rec.* 145: 541-548. 1963.
- Galand P., Leroy F and Chrétien J. Effect of estradiol on cell proliferation and histological change in the uterus and vagina mice. *J. Endocr.* 49:243-252. 1971.
- Gallegos A. J. y Cortés-Gallegos V. Composition and methods for fertility control. 1977. U.S. Pat. 4006227 (filed Nov.1974).

- García-Colón G. Contribución a la farmacología de los ocitócicos con especial referencia al zoapatle. *J. Am. Pharm. Assoc.* 18 (9): 876-880. 1929.
- García-Peña P. (1888). Estudio sobre el zoapatle. Tesis para el Examen Profesional de Farmacia. Escuela Nacional de Medicina y Farmacia. en: *An. Inst. Med. Nac. Mex.* 2: 71-78. 1897.
- Gardner R. M., Kirkland J. L., Ireland J. S. and Stancel G. M. Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. *Endocrinology*. 103 (4): 1164-1172. 1978.
- Geissman T. A. and Griffin T. S. Sesquiterpene lactones, tomentosin from *Montanoa tomentosa* Cerv. *Rev. Latinoam. Quim.* 2: 81-83. 1971.
- González-Angulo. A., Ruíz de Chávez I., Estrada A. V., Pedrón N., and Gallegos A. J. Ultrastructural changes in endometrium of rats. *Zoapatle VIII. Contraception*. 31 (5): 509-521. 1985.
- Gorski J. and Nelson N. J. Ribonucleic acid synthesis in the rat uterus and its early response to estrogen. *Arch. Biochem. Biophys.* 110: 284. 1965.
- Greep R. O. Female reproductive system. In: *Handbook of Physiology*. section 7. *Am. Physiol. Soc.* Wash. 247-243 p. 1973.
- Gros G. E., Pomilio A. B., Seldes A. M. y Burton G. Introducción al estudio de los Productos Naturales. Monografía 30. Serie de Química. OEA. 146 pp. 1985.
- Grunert G., Porcia M. and Tchernitchin A. N. Differential potency of oestradiol-17 beta and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. *J. Endocr.* 110: 103-114. 1986.
- Guzmán A., Gallegos A. J., García de la Mora G. y Fores-Moreno J. M. Separación de la triada de zoapatanol y montanol obtenida de *Montanoa tomentosa*. *Arch. Invest. Med.* 16: 209-216. 1984.
- Hahn D. W., Ericsson E. W., Lai M. T. and Probst A. Antifertility activity of *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *Contraception*. 23 (2): 133-141. 1981.
- Hahn D. W., Ericsson E. W., Lai M. T. and Probst A. Antifertility activity and general pharmacological properties of ORF 13811: a synthetic analog of zoapatanol. *Contraception*. 30 (1): 39-53. 1984.
- Hernández F. (1576). *Historia Natural de la Nueva España*. UNAM. Tomo II. p 293-298. 1960.

- Hidalgo-Chávez C. Acciones farmacológicas de diversos extractos de cihuapahtli. *Bol. Inst. Est. Méd. Biol. Mex.* 5(1):11-27. 1947.
- Hirasawa K. and Nishizuka Y. Phosphatidylinositol turnover in receptor mechanism and signal transduction. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 147-170. 1985
- Hisaw F. L. Comparative effectiveness of estrogens on fluid imbibition and growth of the rat's uterus. *Endocrinology* 64: 276-289. 1959.
- Hodgson B. J. and Daniel E. E. Studies concerning the source of calcium for contraction of rat myometrium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51:914-932. 1973.
- Hughes A. R. and Putney J. W. Metabolism and functions of inositol phosphates. *Biofactors.* 1 (2): 117-121. 1988.
- Humboldt Von F.H. Bonpland A. J. and Kunth C. S. *Nova Genera et Species.* 4. 1820.
- Ichida S., Tokunaga H., Oda Y., Fujita N., Hirata A., y Hata T. Increase of serotonin receptors in rats uterus induced estradiol. *J. Biol. Chem.* 25(22):13438-13443. 1983.
- Irvine R. F. Calcium transients: mobilization of intracellular Ca^{2+} . *Br. Med. Bull.* 42 (4): 369-374.
- Kamm K. E. and Stull J. I. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 25:593-620. 1985.
- Kamm K. E. and Stull J. I. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *J. Physiol.* 51:299-313. 1989.
- Kane V. V. and Doyle D. L. Total synthesis of (+/-) zoapatanol. *Tetrahedron Letters.* 22 (32): 3031-3034. 1981.
- Kanmura Y., Missiaen L. and R. Casteels. Properties of intracellular calcium stores in pregnant rat myometrium. *Br. J. Pharmacol.* 95: 284-290. 1988.
- Kanojia R. M., Wachter M. P., Levine S. D., Adams R. E., Chen R., Chin E., Cotter M. L., Hirsh A. F., Huettemann R., Kane V. V., Ostrowski P., Shaw C. J., Mateos J. L., Noriega L., Guzmán A., Mijarez A. and Tovar L. Isolation and structural elucidation of zoapatanol and montanol, novel oxepane diterpenoides from the Mexican plan zoapatle (*Montanoa tomentosa*). *J. Org. Chem.* 47: 1310-1319. 1982.
- Kapadi H. H. and Dev S. Diterpenes of *Erythroxylum mogynom* (+/-) monogynol. *Tetrahedron Letters.* 38: 2751-2757. 1964.

- Kirkland J. L., Gardner R. M., Ireland J. S. y Stancel G. M. The effect of hypophysectomy on the uterine response to estradiol. *Endocrinology* . 101 (2): 403. 1977.
- Lan N. C. and Katzenellenbogen B. S. Temporal relationship between hormone receptor binding and biological responses in the uterus: studies with short-and long-acting derivatives of estriol. *Endocrinology* . 1976.
- Landgren B. M., Aedo A. R., Hagenfeldt K. and Diczfalusky E. Clinical effects of orally administered extracts of *Montanoa tomentosa* in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135 (4): 480-484. 1979.
- Lee S. H. Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. *Histochemistry*. 74: 443-452. 1982.
- Levine S. D., Adam R. E., Chen R., Cotter M. L., Hirsh A. F., Kane V. V., Kanojia R. M., Shaw C., Wadnter M. P., Chin E., Huettemann R., Ostrawski P., Mateos J. L., Noriega L., Guzmán A., Mijararez A. and Tovar L. Zoapatanol and montanol novel oxepane diterpenoids from the Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*). *Am. Chem. Soc.* 101. 3404. 1979.
- Levine S. D. *et al.* The mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*) in reproductive medicine. *J. Rep. Med.* 26: 524-528. 1981.
- Loomis D. W. and Croteau R. Biochemistry of terpenoids. Ed. PK. Stumpf and E. E. Conn. *THE Biochemistry of plants*. Vol. 4. Academic Press. USA. p 363-418. 1980.
- López-Austin A. De las plantas medicinales y de otras cosas medicinales. *In: Estudios de cultura náhuatl IX*. León-Portilla y López-Austin A. UNAM. México. 1971.
- Lozoya X. y Lozoya M. Flora medicinal mexicana. I parte. en: *Plantas Indígenas. IMSS*. México. 1982: 193-223.
- Lozoya X., Enríquez R. G., Bejar E., Estrada A. V., Girón H. and Gallegos A. J. The zoapatle V. The effect of kauradienoic acid upon uterine contractility. *Contraception*. 27 (3): 267-279. 1983.
- Lu Z., Xue H., Tu Z., Konno Ch., Waller D. P., Soejarto D. D., Cordell G. A. and H. H. S. Fong. Studies on zoapatle VII. Angelolygrandifloric acid, a spontaneous uterine contraction inhibitor (SUCI) from *Montanoa tomentosa ssp. tomentosa* J. *Nat. Prod.* 50 (5): 995-997. 1987.
- Magaña M. W. Estudio químico de *Montanoa hibiscifolia*. Tesis para obtener el título de Químico. Universidad de Chiapas. 1986.

- Marcelle G. B., Bunyapraphatsara N., Cordell G. A., Fong H. H. S., Nicolaou K. C. and Zipkin R. E. Studies of zoapatle I. The extraction of zoapatle (*Montanoa tomentosa*) and the identification of 21-normantanol as the initial decomposition product of zoapatanol. *J. Nat. Prod.* 48 (5): 739-745. 1985.
- Marshall J. M. Comparative aspects of the pharmacology of smooth muscle. *Fed. Proc.* 26:1104. 1970.
- Mateos J. L., Noriega R., Huetteman R. and Kanojia R. M. Purification of uteroevacuant extracts from plant substances. *U.S. Pat.* 3996132. 1974.
- Méndez I. M. Efecto de *Montanoa tomentosa* y *Montanoa frutescens* sobre la gestación en rata. Tesis licenciatura. Químico-farmacéutico industrial. IPN. 45 pp. 1989.
- Mironneau J. Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J. Physiol.* 223:127-141. 1973.
- Mironneau C., Mironneau J. and J.P. Savineau. Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a Ca^{2+} -free solution. *Br. J. Pharmacol.* 82: 735-743. 1984.
- Moadwood A. H. The symphathetic nervous system and the uterus. in: Jasimovich, J. B. Uterine contraction-side effects of steroidal contraceptive. John Wiley and Sons. 1973. 65-82 pp.
- Moriwaki K., Gumi M., Itoh Y., Iida S., Tsugawa M., Tarvri S., Fuji K., Node M. and Kajimoto T. Steroidogenic effect of ENT-kaur-16-en-15 beta-ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. *Life Sciences.* 38: 453-458. 1986.
- Neidlein V. R. and Stumpf V. Biotransformation and pharmacokinetics of grandiflorenic acid [kauradien-9(11), 16 oic acid-18]. *Azneim-Forsch/Drug Res.* 21 (21): 999-1004. Nr. 6. 1977a.
- Neidlein V. R. und Stumpf V. Biotransformation and pharmacokinetics of grandiflorenic acid [kauradien-9(11), 16 oic acid-18]. *Azneim-Forsch/Drug Res.* 21 (21):1162-1166. Nr. 6. 1977b.
- Neidlein V. R. und Stumpf V. Biotransformation and pharmacokinetics of grandiflorenic acid [kauradien-9(11), 16 oic acid-18]. *Azneim-Forsch/Drug Res.* 21 (21):1384-1390. Nr. 6. 1977c.
- Nicholls, D. G. Intracellular calcium homeostasis. *Brit. Med. Bull.* 42 (4): 353-358. 1986.

- Nicolau K. C., Clareman D. A. and Barnette W. E. Total synthesis of +/- zoapatanol. *J. Amer. Chem. Soc.* 102 (21): 6611-6612. 1980.
- Noriega J. M. Curso de Historia de Drogas. Ed. Oficina Tipográfica de Srfa. de Fomento. México. 428 pp. 1902.
- Oshima Y., Cordell G., Fong H. Studies on zoapatle III. Flavonoides glycosides from *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*. *J. Natl. Prod.* 49 (3): 313-317. 1986a.
- Oshima Y., Wong S., Konno C., Cordell G., Waller D., Soejarto D. and Fong H. Studies on zopatlé II. Leucanthanolide, a novel sesquiterpene lactone from *Montanoa leucantha* ssp. *leucantha*. *J. Nat. Prod.* 49 (3): 552-553. 1986b.
- Pedróñ N., Estrada A. V., Ponce-Monter H., Valencia, A., Guzmán A. and Gallegos A. J. Antiimplantation effect in the rat of zoapatle aqueous crude extract (ZACE) from *Montanoa tomentosa* y *Montanoa frutescens*. *Contraception*. 31 (5): 499-507. 1985.
- Pedróñ N., Wens M. A. García-Pineda J., Estrada A. V., Ponce-Monter H. and Gallegos A. J. The effect of oral administration of zoapatle upon progesterone plasma levels in pregnant rabbits. *Contraception*. 38 (3): 373-380. 1988.
- Perusquía M. Sánchez E. Ponce-Monter H., Estrada A. V., Pedróñ N., Valencia A., Guzmán A., Gallegos A. J. Effects elicited by *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens* on rat uterine strips. *Contraception*. 31 (5): 543-551. 1985.
- Ponce-Monter H., Girón H., Lozoya X., Enríquez R. G., Béjar O. E., Estrada A. V. and Gallegos A. J. The zoapatle III. Biological and uterotonic properties of aqueous plant extract. *Contraception*. 27 (3): 254-265. 1983.
- Ponce-Monter H., Estrada A. V., Pedróñ N., Valencia A. and Gallegos A. J. The *in vitro* effect of zoapatle aqueous crude extract (ZACE) and histamine upon rat and guinea pig uterine strips. *Contraception*. 31 (5): 533-541. 1985.
- Ponce-Monter H., Campos-Lara G., Pedróñ N., De la Torre L., Villanueva T., Gallegos A., Romo de Vivar A., Aspetia E. and Pérez A. The zoapatle XV. Activity of 16 alfa-hidroxy-ent-kauran-19-oic and isolated from *Montanoa hibiscifolia*, and its methyl ester on rat and guinea pig uterus. *J. Ethnopharmacology*. 24: 127-134. 1988.
- Quijano L., Calderón J. S., Gómez F. and Ríos T. C. Montafrusin, a new germacrolide from *Montanoa frutescens*. *Phytochemistry*. 18: 843-845. 1979.

- Quijano L., Calderón, J. S. Gómez G. F. y Ríos T. C. Zoapatanolides A and B, two new heliangolides from *Montanoa tomentosa*. *Phytochemistry*. 21 (8): 2041-2044. 1982.
- Quijano L., Gómez G. F., Calderón J. S., López P. J. y Ríos T. C. Zoapatanolides C and D, two guaianolides from *Montanoa tomentosa*. *Phytochemistry*. 23 (1): 125-127. 1984.
- Quijano L., Calderón J. S., Gómez-Garibay F., Rosario M. V. and Ríos T. C. Oxepane diterpenoides and sesquiterpene lactones from "zoapatle" (*Montanoa tomentosa*), a mexican plant with oxytotic activity. *Phytochemistry*. 24 (10): 2337-2340. 1985a.
- Quijano L., Calderón J. S., Gómez-Garibay F., Rosario V. and Ríos T. Acyclic precursors of the uterotonic oxepane diterpenoids of zoapatle (*Montanoa tomentosa*). *Phytochemistry*. 24 (11): 2741-2743. 1985b.
- Quiroz R. Artículo de la Revista Farmacéutica. feb. 1894. citado por Ramírez J. p 144. 1894.
- Ramírez J. El zoapatli. Datos para la Materia Medica Mexicana. Parte I. México. p 137-151. 1894.
- Rasmussen Reynolds W. F., Enríquez R., G., Escobar L. I. y Lozoya X. Total assignment of ^1H and ^{13}C spectra of kauradien-9-(11), 16-oic acid with the aid of heteronuclear, correlated 2D spectra optimized for geminal and vicinal ^{13}C - ^1H coupling constants: or what to do when INADEQUATE is impossible. *Can. J. Chem.* 62: 2421-2425. 1984.
- Reza A. (1887). Acción fisiológica comparada del cuernecillo del centeno y el cihuapatli. *An. Inst. Méd. Nac. Méx.* 2: 43-60. 1897.
- Río de la Loza F. Informes de los trabajos ejecutados en la sección 2a. del Instituto Médico Nacional. *An. Inst. Méd. Nac.* 1: 181-183. 1893.
- Robinson B. and Greenman J. (1899). Revision of the genera *Montanoa*, *Perimeryum* and *Zaluzania*. *Proc. Am. Acad. Arts.* 34:507-521.
- Rodríguez-Ibarra B. Contribución al estudio del zoapatle. Tesis. Fac de Medicina, UNAM. México. 50 pp. 1931.
- Rodríguez-Román A. Contribución al estudio fisiológico del cihuapajtlí. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM. México. 44 pp. 1929.
- Rosenthal G. A. and Jansen D. H. eds. *Hervibores. Their interaction with secondary plant metabolites.* Academic Press. New York. 1979

- Ross R. and Klebanoff S. J. Fine structural changes in uterine smooth muscle and fibroblasts in response to estrogen. *J. Cell Biology* . 32: 155-167. 1967.
- Ross R. and Klebanoff S. J. 1966. The eosinophilic leucocyte. Fine structure studies change in the uterus during the estrous cycle. *J. Exptl. Med.* 124: 654. 1966.
- Ruzycky A. L., Crankshaw D. J. and Triggler D. J. Ca^{2+} channel ligand activities in uterine smooth muscle: influence of hormonal status. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 2085-2092. 1987.
- Sahagún B. 1570. Historia general de las cosas de la Nueva España. Ed. Porrúa. México. 1093 pp. 1977.
- Salamo M. M., Errerías M. R. and Sainatti A. R. Effects of indomethacin on the action of stevioside on mean arterial pressure and on renal function in rats. *IRCS. Med. Sci.* 13: 1230-1231. 1985.
- Sato S., Hayashi R. H. and Garfield R. E. Mechanical responses of the rat uterus, cervix, and bladder to stimulation of hypogastric and pelvic nerves *in vivo*. *Biology of Reproduction.* 40:209-219. 1989.
- Seaman F. C., Malcom A. J. and Fisher N. H. Tomexathin and oxepane diterpene from *Montanoa tomentosa*. *Phytochemistry.* 23 (2): 464-465. 1984a.
- Seaman F. C., Malcom A. J. and Fisher N. H. Germacra-12-6 beta olides from *Montanoa revealii* and *M. mollissima*. *Phytochemistry.* 23 (5): 1063-1066. 1984b.
- Sentfés L. G. y Amayo R. Symposium sobre avances en el estudio de la contractilidad uterina. IV. Efecto del cihuapatle sobre el útero humano grávido. *Gac. Méd. Méx.* 94: 343. 1964.
- Smith B. J., Smith E. F., Lefler A. M. and Nicolaou K. C. Spasmogenic effects of the anti-fertility agent, zoapatanol. *Life Sciences.* 28: 2743-2746. 1981.
- Snell, G. D. Biology of laboratory mouse. edit. Jackson Roscoe B. Memorial Lab. Dover Pub. Inc. New York. 1941.
- Somlyo A. V. and Somlyo A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159: 129-145. 1968.
- Somlyo A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Cir. Res.* 57: 497-507. 1985a.

- Somlyo A. V., Bond M., Somlyo A. P. and Scarpa A. Inositol triphosphate -induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5231-5235. 1985b.
- Somlyo A.P. and B. Himpens. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 3: 2266-2276. 1989.
- Somlyo A. P. and Somlyo A. V. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation and contraction in smooth muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 857-874. 1990.
- Solomon J., Cocchia M. A. and DiMartino R. Effect of Delta-9-tetrahydrocannabinol on uterine and vaginal cytology of ovariectomized rats. *Science.* 195(4):875-877. 1977.
- Southern L., Pedrón N., Ponce-Monter H., Girón H., Estrada A. V., Lozoya X., Enríquez R. G., Béjar O. E. and Gallegos A. J. The zoapatle IV. Toxicological and clinical studies. *Contraception.* 27 (3): 255-265. 1983.
- Standley P. C. The trees and shrubs of México. Smithsonian Institute. National Herbarium. USA. 1926.
- Tchernitchin A. Effect of superfusion with human male serum, bovine serum albumin or non radioactive estrogens on the retention of tritiated estradiol 17 beta abd estriol by the rat uterus. *J. Steroid Biochem.* 5:481-484. 1974.
- Tchernitchin A. The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to estrogens in the uterus. *J. Steroid Biochem.* 5: 481-484. 1979.
- Tchernitchin A. Eosinophil mediated non-genomic parameters of estrogen stimulation a separate group of responses mediated by and independent mechanism. *J. Steroid Biochem.* 19 (1): 95-100. 1983.
- Terrés R. Estudio sobre la aplicación terapéutico de la *Eriocomina* en Ginecología. Tesis Facultad de Medicina. UNAM. 54 pp. 1921.
- Toussaint M. (1893). Informe de los trabajos ejecutados en el Instituto Médico Nacional. *An. Inst. Med. Nac.* II. 1894. 90.
- Van Breemen C. and Saida K. Cellular mechanism regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 315-329. 1989.
- Valencia A., Wens A. Ponce-Monter H., Pedrón N. Gallegos A. J., Quijano L., Calderón J., Gómez F. and Rfos T. Zoapatle XII. *In vitro* effect of kaurenoic acid isolated from *Montanoa frutescens* and two derivates upon human spermatozoa. *J. Ethnopharmacology.* 18:89-94. 1986.
- Valencia R. J. Contribución al tratamiento médico de la

- fibromiomas uterina. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM. México. 50 pp. 1931.
- Vaquero C. J. Fundamentos de Histología. Interamericana. México. 431 pp. 1982.
- Villafuerte E. Contribución al estudio de los ocitócicos. Tesis. Facultad de Medicina, UNAM. México. 1929.
- Waller D. P., Martin A., Oshima Y. and Fong H. H. S. Studies on zopate V. Correlation between *in vitro* uterine *in vivo* pregnancy interruption effect in guinea pig. **Contraception**. 35 (2): 147-153. 1987.
- Wani M. C., Vishnuvajjala B. R., Swain W. E., Rector D. H., Cook C. E., Petrow V., Reel J. R., Allen K. M. and Levine S. G. Synthesis and biological activity of zoapatanol analogues. **J. Med. Chem.** 26: 426-430. 1983.
- Wilson J. D. The nature of the RNA response to estradiol administration by the uterus of the rat. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 50: 93. 1963.
- Wens A., Valencia A., Pedrón N., Ponce-Monter H., Guzmán A. and Gallegos A. J. *In vitro* effect of *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens* upon human sperm and red cells. **Contraception**. 31 (5): 523-532. 1985.
- Werner H. and Serengolam V. Govindan and Blount J. F. Trans, trans-germacra-1 (10), 4-dien-cis-6, 12 olides from *Montanoa hibiscifolia*. **J. Org. Chem.** 45: 1113-1116. 1980.
- West C. A., Dudley M. W. and Dueber M. T. Regulation of terpenoid biosynthesis in higher plants. in: Topic in the biochemistry of natural products. Vol 13. Swain T. and Waller G. R. edit. Plenum Press. N. Y. p 163-198. 1979.
- Ximénez F. 1615. Quatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España. Ed. Of. Tip. Sría. de Fomento. México. p 165. 1888.
- Yamamoto N. S., Bracht A. M., Ishii E. L., Kimmelmeier F. S., Alvarez M. and Brach A. Effect of steviol and its structural analogues uptake in rat renal tubules. **Experientia**. 41:55-57. 1983.