

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA Y  
ANALISIS QUIMICO APLICADO. FACULTAD DE FARMACIA  
Y

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA  
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

## ESTUDIO DEL EFECTO RELAJANTE DE LA FIBRA LISA, EN ILEO AISLADO DE RATA, INDUCIDO POR DERIVADOS TERPENICOS

H. López G<sup>a</sup> de la Serrana; R. Garcia-Villanova y E. Puche

*Palabras clave:* Terpenos, Fibra lisa, Acetil-colina, Calcio.

*Key words:* Terpenes, Smooth muscle, Acetylcholine, Calcium.

### RESUMEN

Presentamos el estudio de la actividad relajante de la fibra lisa por parte de algunos derivados terpénicos: Terpinenol-4, alfa-Pineno, Borneol y Canfeno, sobre la contracción del ileo aislado de rata inducida con dosis crecientes de Acetil-colina y  $\text{CaCl}_2$  en un medio libre de calcio y previa despolarización del ileo con potasio.

Los resultados obtenidos indican que el Terpinenol-4 a  $10^{-8}\text{M}$  y el alfa-Pineno a  $10^{-5}\text{M}$  poseen actividad relajante del ileo "in vitro" a través de un mecanismo de acción no mediado por receptores muscarínicos (antagonismo no competitivo frente a la Acetil-colina, dosis-dependiente) y muy probablemente relacionado con un antagonismo frente al Calcio, Terpinenol-4 a  $10^{-5}\text{M}$  y alfa-Pineno  $10^{-4}\text{M}$ , respectivamente.

### SUMMARY

A study on the relaxing activity of some terpenic derivates (Terpinenol-4, alpha-Pinene, Borneol y Canphene) over smooth muscle, has been performed. Contraction rat isolated ileus was induced by increasing doses of either Acetylcholine or  $\text{Ca}^{2+}$  in a calcium-free medium previous despolarization by potassium.

Both Terpinenol-4 ( $10^{-8}\text{M}$ ) and alpha-Pinene ( $10^{-5}\text{M}$ ) showed "in vitro" relaxing activity of ileus through a muscatinic receptors non-mediated mechanism of action (non-competitive antagonism with Acetylcholine dose-depent). Probably this relaxing action is attained by a antagonism between Terpinenol-4 and alpha-Pinene with calcium.

## INTRODUCCION

Los terpenos son hidrocarburos pertenecientes al grupo de los aceites esenciales, cuya presencia en numerosas especies vegetales ha sido ampliamente descrita (Horster, 1973, 1974) Foster y col. 1980). Dentro del grupo de los terpenos, presentan interés farmacológico los derivados del mentano, pinano y canfano por su actividad relajante de la fibra lisa (Binet y col. 1972 a, b), expectorante (Velasco 1972), favorecedora de la lisis de los cálculos de colesterol (Bell y col. 1980) y diurética (Benigni y cols. 1962), fundamentalmente. En este trabajo experimental, presentamos el estudio "in vitro" de la actividad relajante de la fibra lisa intestinal, ejercida por un grupo de terpenos: alfa-Pineno, Terpinenol-4, Canfeno y Borneol, frente a la contracción del íleo aislado de rata inducida con acetilcolina y  $\text{CaCl}_2$ , previa despolarización con potasio en un medio de perfusión libre de calcio, como aportación al estudio del mecanismo de acción de estos fármacos, desconocido por ahora.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Material y métodos*

#### *1.- Técnica del íleo aislado de rata*

Se usaron ratas de la cepa Wistar de ambos sexos, con un peso comprendido entre 200 y 300 g. las cuales se mantuvieron 24 horas antes del sacrificio en ayunas, y con agua ad-libitum. Previa muerte y sangrado del animal se extrajo un trozo de íleo terminal de 2 a 3 cm. de longitud, el cual limpio de bridas y restos fecales fue sumergido en una copa de perfusión con Tyrode a  $36^\circ\text{C}$ , en el que burbujeaba gas carbónico. Dicho trozo de íleo fue sometido a una tensión de 2 gramos, esperando 60 minutos antes de comenzar la experiencia y cambiándose el Tyrode cada 15 minutos.

#### *2.- Curva dosis respuesta con Acetil-colina*

Pasada una hora, el íleo fue sometido a una contracción inducida por dosis acumulativas de Acetil-colina comprendidas entre  $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$  y  $3,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$  en ausencia y en presencia de las diferentes concentraciones de los terpenos empleados, concentraciones que oscilaron desde  $10^{-10}\text{M}$  a  $10^{-4}\text{M}$  respectivamente.

#### *3.- Contracción del íleo inducida por $\text{CaCl}_2$*

En otra serie de experimentos se estudió la contracción del íleo aislado inducida por dosis acumulativas de  $\text{CaCl}_2$  previa despolarización con  $\text{K}^+$  y en un medio de perfusión exento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ello el íleo fu montado en una copa de

perfusión según la técnica anteriormente descrita y pasados los 60 minutos necesarios para la estabilización previa del preparado, el Tyrode normal fue cambiado por otro líquido de perfusión con un exceso de  $K^+$  y exento de  $Ca^{2+}$  (KCl 7,5 g,  $MgCl_2$  0,245 g,  $NaHCO_3$  1,25 g, glucosa 2 g. y agua destilada hasta un litro), lo cual provocó la contracción brusca del ileo, seguida de una lenta relajación del mismo al cabo de 10 minutos, pasados los cuales alcanzó el registro la línea basal. A continuación se realizó la curva dosis respuesta usando concentraciones acumulativas de  $CaCl_2$ , comprendidas entre 0,31 y 79 mM, en ausencia y presencia de los diferentes terpenos, empleados a concentraciones que oscilaron entre  $10^{-5}M$  y  $10^{-3}M$ .

La contracción del ileo fue registrada mediante un transductor presión fuerza Staham, tipo Ul-5, conectado a un polígrafo Beckman.

### *Método estadístico*

El parámetro estudiado fue la contracción del ileo aislado de rata expresada en % de respuesta máxima e inducida por la adición acumulativa de Acetil-colina y  $CaCl_2$  al vaso de perfusión, solos y en presencia de las diferentes series de terpenos: alfa-Pineno, Terpinenol-4, Canfeno y Borneol. El cálculo de las diferencias entre los resultados obtenidos para cada serie de fármacos ensayados con respecto a su control de Acetil-colina y Calcio, se realizó mediante la aplicación del test Student para muestras apareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de  $p < 0,05$ . Estos cálculos fueron realizados en un ordenador CBM-2001 Comodore, previa lectura del programa correspondiente.

### *Fármacos empleados*

Terpinenol-4 (Koch-Light, lab.)  
alfa-Pineno (DGF)  
Canfeno (BDH, Lab.)  
Borneol (BDH, Lab.)  
Acetil-colina (clorhidrato) (Merck)  
 $CaCl_2$  (Merck)

Todos los terpenos se aplicaron directamente sobre el líquido de perfusión (Tyrode) previo cálculo de la molaridad, mientras que la Acetil-colina y el Cloruro cálcico fueron añadidos al vaso de perfusión, en solución acuosa con su molaridad correspondiente.

## RESULTADOS

### *1) Resultados obtenidos con el Terpinenol-4*

Conforme fuimos incrementando la concentración molar del Terpinenol-4 en el vaso de perfusión, la curva dosis respuesta de Acetil-colina fue aplanándose de

forma progresiva, es decir, observamos una relación dosis-efecto en el ileo aislado de rata, cuyo aplanamiento comenzó a ser estadísticamente significativo ( $p < 0,02$ ) a partir de  $10^{-8}$  M de Terpinenol-4, hasta llegar a la concentración de  $10^{-5}$  M, la cual aplanó totalmente la contracción del ileo (fig. 1). La progresiva desviación hacia la derecha de la curva dosis-respuesta con Acetil-colina en presencia de diferentes contracciones de Terpinenol-4, nos sugirió la existencia de un antagonismo no competitivo de este fármaco, frente a la Acetil-colina.

Con respecto a la contracción del ileo inducido con  $\text{CaCl}_2$ , el Terpinenol-4 mostró actividad bloqueante de dicha contracción a partir de concentraciones de  $10^{-5}$  M ( $p < 0,01$ ) (fig. 2).

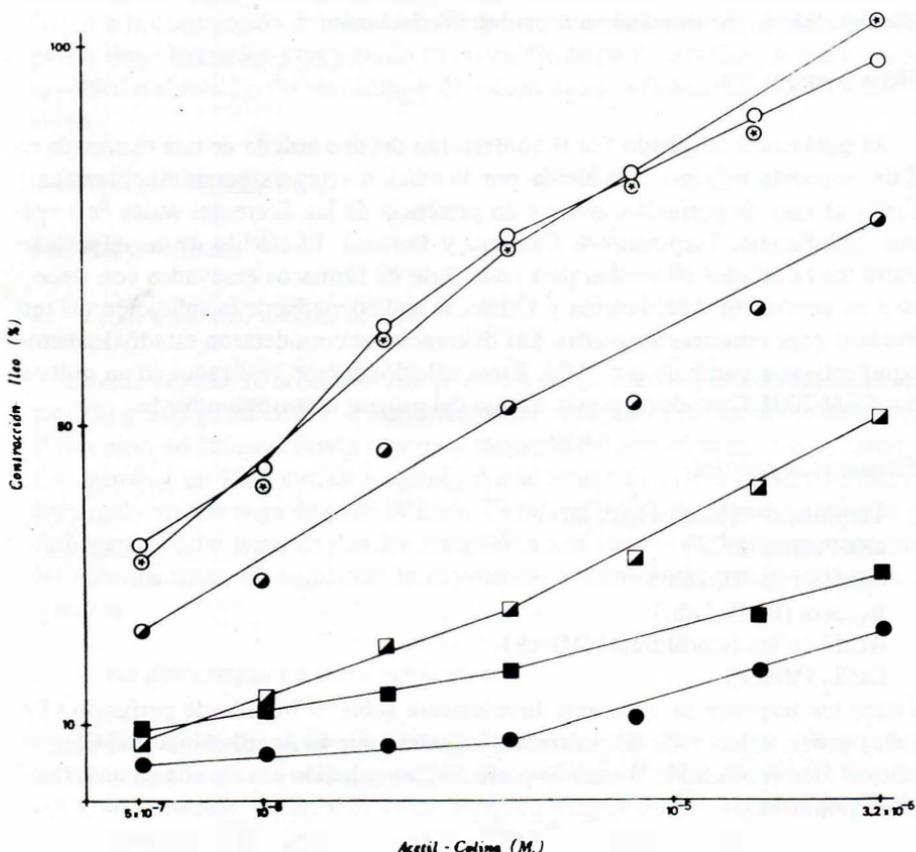


FIGURA 1.- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por la Acetil-colina sola (O) y en presencia de Terpinenol-4,  $10^{-9}$  M (⊙) (n.s.),  $10^{-8}$  M (⊚) ( $p < 0,02$ ),  $10^{-6}$  M (◻) ( $p < 0,01$ ),  $10^{-5}$  M (●) ( $p < 0,001$ ), sobre la contracción del ileo aislado de rata. Los coeficientes de correlación lineal estuvieron entre  $r = 95$  y  $r = 99$ . El cálculo de las diferencias fue realizado aplicando el test de Student para muestras apareadas ( $n = 5$ ).

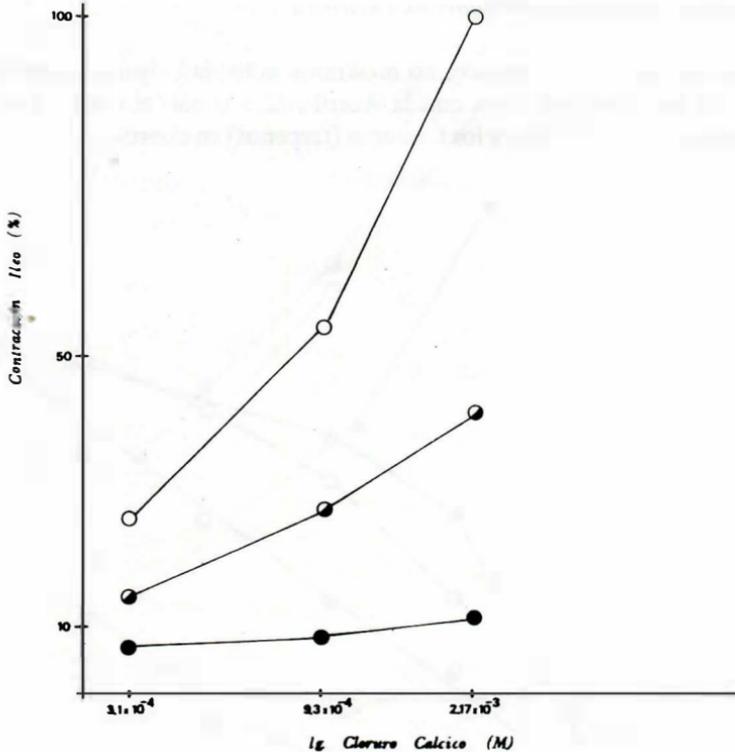


FIGURA 2 .- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por Cloruro cálcico solo (O) y en presencia de Terpinenol-4  $10^{-5}$ M (◐) ( $p < 0,01$ ) y  $10^{-4}$ M (●) ( $p < 0,01$ ), sobre la contracción del íleo aislado de rata en un medio libre de calcio. El cálculo de las diferencias fue realizado aplicando el test de Student para muestras apareadas ( $n = 5$ ).

## 2) Resultados obtenidos con alfa-Pineno

Al igual que con el Terpinenol-4, al aumentar la concentración molar de alfa-Pineno en el vaso de perfusión, la curva dosis-respuesta de Acetil-colina, también fue aplanándose y desviándose hacia la derecha gradualmente, lo cual nos sugirió igualmente la existencia de un antagonismo no competitivo entre la Acetil-colina y el alfa-Pineno. Dicho aplanamiento fue estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) a partir de la concentración de  $10^{-5}$ M (fig. 3).

En la contracción del íleo inducida con  $\text{CaCl}_2$  el alfa-Pineno comenzó a inhibir-la partiendo de concentraciones del orden de  $10^{-4}$ M ( $p < 0,05$ ) (fig. 4).

## 3) Resultados obtenidos con Canfeno y Borneol

Tanto uno como otro fármaco, no mostraron actividad alguna frente a la contracción del ileo inducida, bien con la Acetil-colina o con el  $\text{CaCl}_2$ , inclusive a concentraciones de  $10^{-3}\text{M}$  para los fármacos (terpenos) en cuestión.

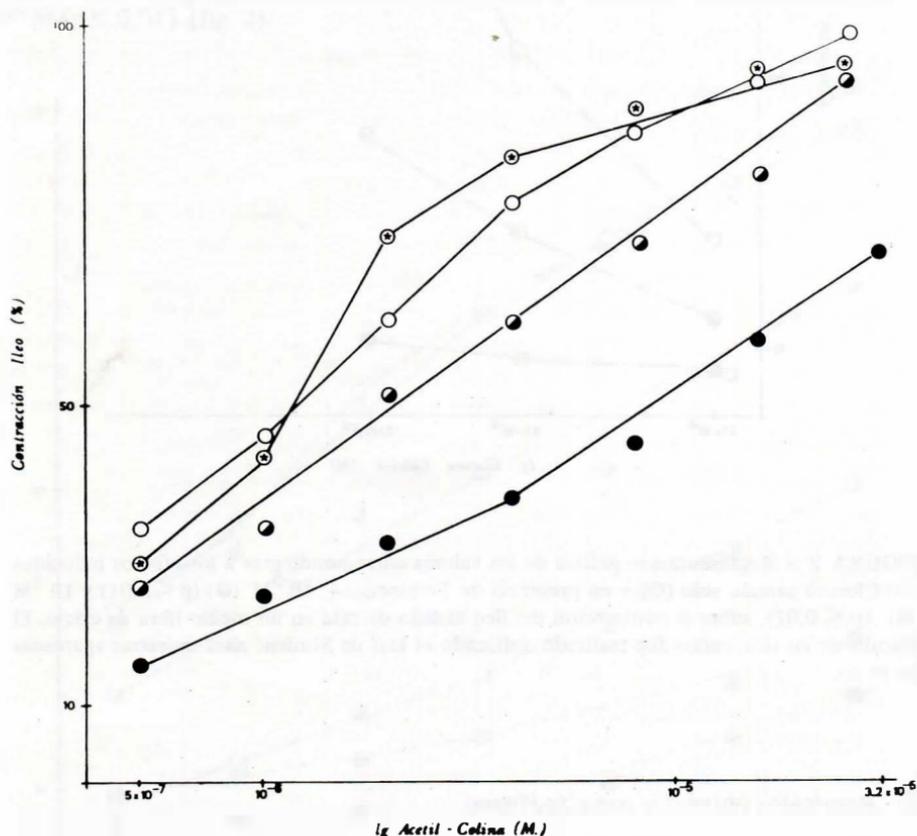


FIGURA 3.- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por Acetil-colina sola (O) y en presencia de alfa-Pineno  $10^{-7}\text{M}$  (⊕) (n.s.),  $10^{-6}\text{M}$  (⊙) (n.s.) y  $10^{-5}\text{M}$  (●) ( $p < 0,01$ ), sobre la contracción del ileo aislado de rata. Los coeficientes de correlación lineal estuvieron comprendidos entre  $r = 97$  y  $r = 99$ , respectivamente. El cálculo de las diferencias fue realizado aplicando el test de Student para muestras apareadas ( $n = 5$ ).

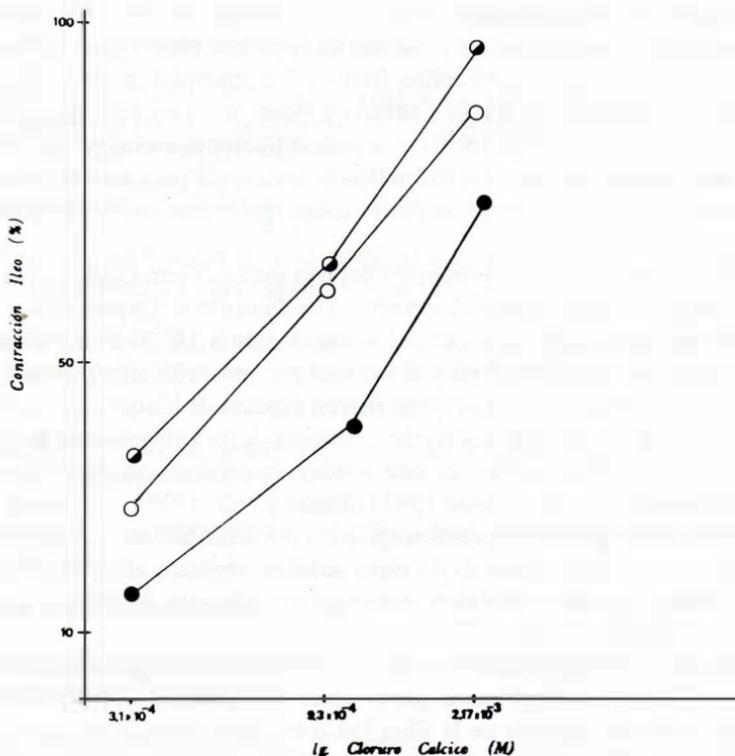


FIGURA 4 .- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por Cloruro cálcico solo (O) y en presencia de alfa-Pineno  $10^{-5}$  M (●) (n.s.) y  $10^{-4}$  M (●) ( $p < 0,05$ ), sobre la contracción del íleo aislado de rata en un medio libre de calcio. El cálculo de las diferencias fue realizado aplicando el test de Student para muestras apareadas ( $n = 5$ ).

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La contracción de la fibra lisa puede tener lugar bien por la estimulación de los receptores presentes en ella por sus respectivos agonistas: Acetil-colina, Histamina, etc., o por la entrada directa del calcio a través de los llamados canales para el calcio, existentes en la membrana celular (Bolton, 1979); esto se cumple tanto para la fibra lisa vascular (Flenkestein, 1977) como para la intestinal (Rosenberger y col. 1979). También se sabe que los derivados terpénicos pertenecientes a la serie isoprenica cíclica, tales como: Terpineno, Terpinenol-4, Pineno, Alcanfor y Timol, entre otros, poseen actividad relajante de la fibra lisa intestinal "in vitro" (Binet y col. 1972 a, b) (Ito 1973) aunque se desconoce en la actualidad su mecanismo de acción.

Los resultados obtenidos por nosotros en la contracción de la fibra lisa intestinal inducida con Acetil-colina en presencia de terpenos, observamos un antagonismo no competitivo entre Acetil-colina frente a Terpinenol-4, a partir de  $10^{-8}$ M y alfa-Pineno, a partir de  $10^{-5}$ M. El Canfeno y Borneol no mostraron actividad alguna frente a la Acetil-colina, inclusive a concentraciones elevadas ( $10^{-4}$ M); todo ello nos hace pensar que la actividad relajante observada para ambos fármacos no está mediada directamente por receptores colinérgicos muscarínicos presentes en el ileo.

Respecto al estudio de la contracción del ileo inducida con  $\text{CaCl}_2$ , en un medio libre de calcio, nosotros hemos observado que solamente el Terpinenol-4 y el alfa-Pineno fueron capaces de bloquear dicha contracción a  $10^{-5}$ M y  $10^{-4}$ M, respectivamente; mientras que el Canfeno y el Borneol no ejercieron efecto alguno. Por lo tanto si el Terpinenol-4 y el alfa-Pineno fueron capaces de bloquear la contracción inducida con  $\text{CaCl}_2$ , ello nos sugiere la existencia de un antagonismo de estos fármacos frente al Calcio, ya que en este modelo la contracción de la fibra lisa es calcio-dependiente (Edman y Shild 1961) (Nagao y cols. 1978). A pesar de ello no se puede descartar que los terpenos empleados pudieran actuar a otros niveles celulares, compartiendo la hipótesis de otros autores, respecto al mecanismo de acción del Timol, derivado terpénico, como agente relajante de la fibra lisa (Ito y Kuriyama, 1973) (Ito y cols. 1974).

Resumiendo, nosotros afirmamos según los resultados experimentales obtenidos "in vitro" lo siguiente: primero que no todos los terpenos, por el hecho de serlo, poseen actividad relajante de la fibra lisa intestinal; en segundo lugar que dentro de los fármacos empleados hemos observado una mayor actividad farmacológica relajante muscular "in vitro" (fibra lisa) para los derivados del mentano y del pinano: Terpinenol-4 y alfa-Pineno, con respecto a los derivados del grupo del canfano: Canfeno y Borneol; y en tercer lugar indicamos como probable mecanismo de acción de su efecto relajante muscular, el antagonismo frente al calcio, sin descartar la actuación de estos fármacos sobre otras estructuras y funciones celulares, como una posible acción estabilizadora de membrana, hipótesis por demostrar, ya que se trata de fármacos muy liposolubles y por lo tanto con capacidad intrínseca de actuar tanto a nivel de la membrana celular como dentro de la propia célula.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- BELL, G.D.; CLEGG, R.J.; COHN, M.R.; DUGGLEBY, J.E.; ELLIS, W.R.; MACDONALD, I.A.; MIDPLETON, B. y WHITE D.A. (1980) "Terpene Therapy for Gallstones-effects of individual monoterpenes on bile flow, bile composition and hepatic cholesterogenesis in the rat". Br. J. Pharmacol. 104-106.
- 2.- BINET, L.; BINET, P.; MIDLQUEM; ROUX M. y BERNIER, A. (1972) "Recherches sur les propriétés pharmacodynamiques (action sédative et action spasmolytique) de quelques alcools terpéniques aliphatiques". Annales pharmaceutiques françaises, 30 (9), 611-616.

- 3.- BINET, L.; BINET, P.; PIOCQUE, M.; MORIN, H.; PECHERY, C.; ROUX, M. (1972). "Le farnesol, substance psycho-sedative et spasmolyque". *Therapie*, 23, 893-905.
- 4.- BENIGNI, R.; CAPRA, C. y CATTORINI, P.E. (1962). "Pianta Medicinale". *Chimica Farmacologia e Terapia*. 1 ed: Inverni della Beffa, Milán, pág. 662-666.
- 5.- BOLTON, T.B. (1979). "Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle". *Physiological Review*. 59 (3), 606-718.
- 6.- EDMAN, K. and SCHILD, H. (1961). "Interaction of acetyl-choline, calcium and depolarization in the contraction of smooth muscle". *Nature*, 190, 350-352.
- 7.- FLECKENSTEIN, A. (1977). "Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17, 149-166.
- 8.- FOSTER, H.; NIKLAS, H. and LUTE, S. (1980). "Antispasmodic effect of some medicinal Plants". *Planta Médica*, 40, 1-11.
- 9.- HORSTER, H. (1973). "Variability of the oils of *Juniperus communis*". *Planta Médica*, 23, 353-362.
- 10.- ITEM (1974). *Planta Médica*, 25, 73-79.
- 11.- ITO, Y.; KURIYAMA, H. (1973). "Membrane properties and inhibitory innervation of the circular muscle cells of guinea-pig calcum". *J. Physiol.* 231, 455-470.
- 12.- ITO, Y.; OSA, T. y KURIYAMA, H. (1974). "The effect of thymol on the electrical and mechanical activities of the guinea-pig alimentary canal". *J. Physiol.*, 24, 343-357.
- 13.- NAGAO, T.; IKEO, T.; SATO, M.; NAKAJIMA, H. and KIYOMOTO, A. (1978). "Effect of diltiazem on calcium and noradrenaline induced contractions in isolated rabbit aorte en: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism". Vol. 11 eds. T. Kobayashi, T. Sano and N.S. Dhalla (University Park Press, Baltimore), pág. 437.
- 14.- ROSEMBERGER, L.B.; TICKU, M.K.; TRIGGLE, D.J. (1979). "The effects of  $Ca^{2+}$  antagonists on mechanical responses and  $Ca^{2+}$  movements in guinea pig ileal longitudinal smooth muscle". *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 333-347.