

INVESTIGACIÓN BÁSICA

El extracto acuoso de Viscum album induce la expresión de las sintasas de óxido nítrico inducible y endotelial en corazón aislado y perfundido de cobayo. Evidencia del mecanismo de vasodilatación coronaria^S

Fermín Alejandro Tenorio López,* Leonardo del Valle Mondragón,* Gabriela Zarco Olvera,* Juan Carlos Torres Narváez,* Gustavo Pastelín Hernández*

Resumen

Se evaluó farmacológicamente el efecto de un extracto acuoso de *Viscum album* en el modelo de corazón aislado y perfundido según Langendorff en corazones de cobayo macho normotensos, registrándose la resistencia vascular coronaria, la presión intraventricular izquierda, la liberación de óxido nítrico en el líquido de perfusión, la producción de guanósil monofosfato cíclico en tejido ventricular y la expresión de las sintasas de óxido nítrico inducible y endotelial por Western Blot, en ausencia y presencia de bloqueantes e inhibidores tales como cloruro de gadolinio 6 μM , N^o-nitro-L-arginina metil éster 100 μM y 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona 10 μM . Se observó que el extracto acuoso de *V. album* induce un descenso significativo en la resistencia vascular coronaria, la cual cursa con incrementos sustanciales en la producción de óxido nítrico y guanósil monofosfato cíclico. El análisis de la expresión de las sintasas de óxido nítrico indicó que el extracto induce significativamente la expresión de ambas isoformas en corazón de cobayo. Tales efectos fueron inhibidos en presencia de los bloqueantes e inhibidores respectivos. Así, la vasodilatación de este extracto está mediada por la vía óxido nítrico/guanilato ciclasa soluble. Adicionalmente, el extracto ejerce un efecto inotrópico positivo mediado por tiramina por un mecanismo de estimulación β_1 -adrenérgica.

Summary

VISCUM ALBUM AQUEOUS EXTRACT INDUCES INDUCIBLE AND ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASES EXPRESSION IN ISOLATED AND PERFUSED GUINEA PIG HEART. EVIDENCE OF THE CORONARY VASODILATION MECHANISM

The pharmacological effect of a *Viscum album* aqueous extract was evaluated on the Langendorff isolated and perfused heart model in normotense male guinea pig hearts. Coronary vascular resistance, left intraventricular pressure, nitric oxide release in the perfusion liquid, cyclic guanosine monophosphate production, and analysis of inducible and endothelial nitric oxide synthases expression by Western Blot in ventricular tissue were recorded in absence and presence of blockers and inhibitors, such as 3 μM gadolinium chloride, 100 μM N^o-nitro-L-arginine methyl ester and 10 μM 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,2-a]quinoxalin-1-one. *V. album* aqueous extract exerts a significant decrease in the coronary vascular resistance, which courses with significant increases in nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production. Analysis of the expression of both nitric oxide synthases revealed that this extract significantly induces the expression of both isoforms in guinea pig hearts. These effects were inhibited by the presence of blockers and inhibitors. The coronary vasodilation induced by the extract is mediated by the nitric oxide/soluble guanylyl cyclase pathway. In addition, this extract shows a positive inotropic effect which that is tyramine-mediated by means of β_1 -adrenergic stimulation. (Arch Cardiol Mex 2006; 76: 130-139)

* Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

^S Trabajo merecedor del premio Arturo Rosenblueth al investigador joven en el área básica XX Congreso Interamericano de Cardiología, Cancún, 28, I- 1, II, 2006.

Correspondencia: Fermín Alejandro Tenorio López. Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D.F.). Tel: 55-73-29-11 Exts. 1317 ó 1344 Fax: 55-73-09-26 E-mail: fatl@att.net.mx ft24@hotmail.com

Recibido: 8 de febrero de 2006

Aceptado: 23 de febrero de 2006

Palabras clave: *Viscum album*. Vasodilatación coronaria. Óxido nítrico. Sintasa de óxido nítrico inducible. Sintasa de óxido nítrico endotelial. Guanosín monofosfato cíclico.

Key words: *Viscum album*. Coronary vasodilation. Nitric oxide. Inducible nitric oxide synthase. Endothelial nitric oxide synthase. Cyclic guanosine monophosphate.

Introducción

Estudios recientes estiman que existen en el mundo 600 millones de personas que padecen hipertensión arterial sistémica.¹⁻³ La hipertensión promueve la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular, además de presentar efectos deletéreos sobre las células endoteliales.⁴⁻⁶ La evidencia actual sugiere que la hipertensión, mediante incrementos del estrés oxidativo, causa daño endotelial, lo cual genera respuestas que rompen el balance de los mecanismos de constricción/dilatación, proliferación/antiproliferación, trombosis/antitrombosis y fibrinólisis/antifibrinólisis.^{5,6} Adicionalmente, hay nuevas evidencias de que la inflamación sistémica desempeña un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares en donde el endotelio vascular desempeña una función crucial en el control del flujo sanguíneo, de la homeostasis, la fibrinólisis y la inflamación, por lo que cambios en la función endotelial podrían ser el fundamento de la asociación entre la inflamación y el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular.⁷⁻¹⁰

La relajación del músculo liso vascular es desencadenada por una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos los cuales interactúan con receptores específicos localizados en la membrana celular de las células del músculo liso vascular, o bien, en el citoplasma, generando así segundos mensajeros intracelulares, los cuales reducen el tono del músculo liso vascular mediante mecanismos que incluyen: (1) la inhibición de la síntesis de un agonista contráctil, (2) el bloqueo de receptores que median la contracción del músculo liso vascular y (3) el cierre de canales de calcio localizados en la membrana plasmática.¹¹ Se ha visto que los segundos mensajeros intracelulares involucrados en la relajación del músculo liso vascular son los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), generados por la actividad de las adenilato y guanilato ciclasas, respectivamente.^{12,13} La relajación mediada por GMPc es activada por óxido nítrico (NO), el cual es un modulador paracrino en diversos procesos fisiológicos en sistemas tales como el cardiovascular, el nervioso y el inmune.¹¹

El NO se genera mediante la conversión de la *L*-arginina, en presencia de oxígeno molecular, a *L*-citrulina y óxido nítrico,¹¹ con la participación de un sistema enzimático denominado sintasa de óxido nítrico,¹⁴ del cual existen 3 isoformas: (1) NOS 1, o sintasa de óxido nítrico cerebral, (2) NOS-2, o sintasa de óxido nítrico inducible y (3) NOS-3, o sintasa de óxido nítrico endotelial.¹⁵ El blanco más importante del óxido nítrico es la guanilato ciclasa soluble (GCs),^{11,12,16} la cual es una enzima que se expresa en el citoplasma de la mayoría de células del sistema cardiovascular,¹³ en donde el NO se une a la porción hemo del dominio de unión de la GCs, incrementando la concentración intracelular de GMPc.¹⁷⁻¹⁹ La vía óxido nítrico-guanilato ciclasa soluble (NO-GCs) es la responsable de la relajación del músculo liso vascular producida por muchos agentes,¹¹ incluyendo a nitrovasodilatadores, histamina, acetilcolina, estrógenos, insulina, hormona liberadora de corticotrofina, polifenoles,²⁰ (-)-epicatequina,²¹ quercetina,²² crisina,²³ elagitaninos,²⁴ y alfa-naftoflavona,²⁵ entre otros, por lo que una búsqueda racional de fármacos con actividad vasorrelajante aislados de fuentes naturales podría representar una alternativa terapéutica.

Viscum album L. (Loranthaceae), comúnmente conocido como muérdago, es una planta semiparásita siempre verde que se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo. En el marco de la medicina tradicional, ha sido empleada en el tratamiento de la epilepsia y la dermatitis en Europa. Posteriormente, se ha observado que posee propiedades vasodilatadoras, inotrópica negativa, sedantes antiespasmódicas, anticancerígenas y antidiabéticas.²⁶⁻²⁸ Aunque se ha reportado el aislamiento de algunos de sus componentes químicos,²⁹⁻³³ no existen reportes en la literatura que muestren cuál es el mecanismo mediante el cual extractos de *Viscum album* L. ejercen su efecto vasodilatador, por lo que este estudio pretende dilucidar si el mecanismo de vasodilatación de extractos de muérdago está mediado por la vía NO/GCs.

Material y métodos

Obtención del material vegetal

El material vegetal en estudio fue adquirido en el Mercado de Sonora de la ciudad de México. Éste

fue identificado y autenticado como *Viscum album* L. por la Unidad de Investigación en Ecología Vegetal de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se separaron manualmente las hojas y los tallos, y se lavaron con abundante agua corriente. Posteriormente, fueron secados en un horno de secado (AN74, H.W. Andersen Products, Inc., Hawriver, North Carolina, USA) a una temperatura de 35°C durante dos días, rotando continuamente el material vegetal. Por separado, los tallos y hojas fueron preservados en bolsas de papel estraza, a las cuales se les incorporó un sobre de tela de fibra de vidrio con cloruro de calcio anhidro grado ACS como agente secante (JT Baker, Xalostoc, Estado de México, México). Una vez obtenido el material vegetal en estudio, éste se almacenó en un lugar fresco y seco, protegido de la luz, hasta su empleo.

Preparación del extracto

Las hojas secas de *Viscum album* L. fueron trituradas finamente en un mortero de porcelana (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Doscientos gramos de hojas secas se maceraron con una mezcla extractiva de etanol-agua (8:2 vol/vol) a temperatura ambiente durante siete días, monitoreando el avance de la extracción mediante cromatografía en capa fina. El extracto se concentró *in vacuo* en un evaporador de película rotatorio (Evapotec 421-1655, Haake Buchler, Berlin, Germany) hasta evaporación total del etanol empleado en la extracción. El concentrado acuoso se filtró primero a través de gasa de algodón y posteriormente con filtros de membrana de ésteres mixtos de celulosa de 0.45 µm (Corning Glass Works, Corning, New York, USA). Los filtrados se preservaron en viales para criogenia de polipropileno (Corning Costar Corporation, Cambridge, Massachusetts, USA) a una temperatura de -70°C hasta momentos antes de su uso.

Evaluación farmacológica

La actividad biodinámica del extracto acuoso de *Viscum album* L., se evaluó mediante la preparación de corazón aislado y perfundido según Langendorff³⁴ en corazones aislados de cobayo macho normotensos (900 a 950 g de peso corporal), previa autorización del Comité de Ética para el uso y cuidado de animales de experimentación de esta institución. Como líquido de perfusión, se empleó una disolución Krebs-Henseleit

de composición (mM): NaCl 117.8, NaH₂PO₄·H₂O 1.2, Na₂EDTA 0.027, KCl 6.0, CaCl₂·2H₂O 1.6, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 24.88 y dextrosa 5.55, a una velocidad de flujo de 10 mL/min a una temperatura de 37°C y un pH de 7.4, con saturación de carbógeno al 5% (Aga Gas, Tlalnepantla, Estado de México, México). El extracto se administró en bolos seriados (5 a 35 µL) mediante un dosificador (Hamilton, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) adyacente a la cánula de perfusión, referidos ambos en la aorta ascendente según Langendorff.³⁴ Bajo estas condiciones, se midió la contracción intraventricular izquierda, por inserción de un balón de látex (Rubber) en el ventrículo izquierdo, conectado a un transductor hidroneumático (Statham 7320, Statham Instruments Inc., Hato Rey, Puerto Rico). La presión de perfusión coronaria fue medida mediante un transductor de presión (Gould P23ID, Gould Instruments, Cleveland, Ohio, USA), referido en la aorta ascendente, a nivel de los ostium derecho e izquierdo. Los registros respectivos se realizaron en un polígrafo (Grass 79D, Grass Instruments Co., Quincy, Massachusetts, USA). La frecuencia cardíaca se mantuvo constante a 1 Hz mediante estimulación con un marcapaso epicárdico ventricular (Grass-SIU5, Grass Instruments Co., Quincy, Massachusetts, USA). Se registró en forma continua un electrograma auriculoventricular, empleando para ello un osciloscopio (Tektronix 7904, Tektronix Guernsey Ltd., Beaverton, Oregon, USA). El efecto y la eficacia de los fármacos, fueron determinados bajo un estudio de curvas dosis-respuesta gradual y por infusión continua (0.3 mL/min) a dosis sostenida. La resistencia vascular coronaria se calculó como la razón presión de perfusión coronaria/flujo, según Langendorff.³⁴

Cuantificación de NO

El óxido nítrico fue medido en el perfusado de las coronarias, por la técnica de Kelm,³⁵ bajo espectrometría de UV-Vis por coeficiente de extinción (411-401 nm) a temperatura ambiente en un espectrómetro de doble haz (SLM-Aminco DW2000, SLM-Instruments Inc., Urbana, Illinois, USA).

Cuantificación de GMPc

Segmentos ventriculares izquierdos de los grupos de corazones estudiados, fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido una vez terminada cada una de las series experimentales

realizadas. Éstos, se pulverizaron mecánicamente mediante un homogenizador de tejido (Polytron 16433J, Daigger, Vernon Hills, Illinois, USA) en frío (0 a 4°C), suspendidos previamente en una disolución al 5% de ácido tricloroacético. Los homogenizados obtenidos de esta manera, fueron centrifugados a 1,500 rpm por gramo de tejido durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recolectaron y se lavaron cinco veces con cinco volúmenes de agua saturada con éter. Posteriormente, el éter fue eliminado bajo atmósfera de nitrógeno. El contenido de GMPc se determinó en muestras acetiladas, según los protocolos establecidos por el propio fabricante del kit de detección utilizado en el estudio (Cyclic GMP EIA Kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA). La detección fue realizada a 415 nm, empleando para ello un espectrómetro con módulo lector de microplacas (Cary 4000, Varian, Mulgrave, Victoria, Australia). La sensibilidad del ensayo fue de 1.0 fmoles/mg de tejido. Las variaciones intraensayo resultaron ser menores a 2.5%, con una confiabilidad de los resultados del 99.71%.³⁶

Evaluación de la expresión de NOS-2 y NOS-3 por Western Blot

Las muestras de tejido ventricular de corazones de cobayo, fueron lavadas en disolución amortiguadora de fosfatos (PBS) y posteriormente homogeneizadas en una disolución amortiguadora de lisis clorhidrato de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris•HCl) 50 mM, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) 0.1 mM, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.1 mM, leupeptina 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, NP-40 al 1% (vol/vol), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%, ácido deoxicólico al 0.1% y un ajuste de pH de 7.5, según Shah y colaboradores.³⁷ La cuantificación de proteínas en las muestras de tejido fue realizada por el método de Lowry.³⁸ Se realizó un gel de poliacrilamida según el método de Laemmli,³⁹ para lo cual se utilizó como gel superior una disolución de acrilamida al 5% y como gel inferior separador, una disolución al 7.5%. La corrida electroforética se realizó a 120 V durante una hora. En cada electroforesis se incluyó un patrón de peso molecular para NOS [LKB *pan-NOS* MW_{NOS}]. Después de la separación electroforética de las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (LKB 2117-250 Novablot) a 50 mA durante 16 horas. Una vez

transferidas las proteínas se procedió a la coloración de la membrana de nitrocelulosa con una disolución de rojo Ponceau durante 15 minutos para verificar si la transferencia había sido adecuada. Posteriormente se decoloraron con agua destilada. Seguidamente, se procedió al bloqueo de la membrana con una disolución de TBS-Tween 20 al 0.1% y albúmina bovina al 4% durante una hora a temperatura ambiente con agitación continua. Antes de su empleo, las membranas se incubaron por espacio de 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, éstas fueron lavadas 3 veces con TBS, cada lavado se efectuó a temperatura ambiente y con 10 minutos de agitación continua. Se utilizaron conjugados anti-IgG de ratón para la NOS-2 y anti-IgG de bovino para la NOS-3, diluidos 1:1000 en TBS-Tween 20 al 0.1%, los cuales se incubaron por espacio de una hora a temperatura ambiente con agitación continua. El revelado se realizó, primeramente, con una disolución de fluoresceína por nebulización y bajo luz ultravioleta (LKB 1101-5 UVLightTest). Posteriormente, se lavó con agua destilada y se realizó un segundo revelado con una disolución de 3,3-diaminobencidina durante 10 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada.

Estudio cromatográfico

Para el estudio cromatográfico cualitativo, se emplearon cromatoplasmas para cromatografía en capa fina de aluminio recubiertas con gel de sílice GF₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany), con revelador para luz ultravioleta, de 25 mm de ancho por 60 mm de alto y 0.25 mm de espesor. También, se empleó una columna confeccionada en vidrio borosilicato de alta resistencia (Pyrex), de 12 mm de diámetro por 600 mm de alto, empacada con gel de sílice 60 para cromatografía en columna (Merck México S.A., Naucalpan de Juárez, Estado de México, México), con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, disolventes grado analítico (Merck México S.A., Naucalpan de Juárez, Estado de México, México), tales como acetato de etilo, éter etílico, *n*-butanol, isopropanol, etanol, metanol y acetonitrilo, además de agua desionizada, obtenida de un desionizador (Simplicity, Millipore SAS, Molsheim, France). Se emplearon técnicas de revelado cromatográfico bajo luz ultravioleta, vapores de yodo y reacciones químicas específicas de óxido-reducción y complejométricas coloridas, bajo un análisis tanto en capa fina como a la gota.

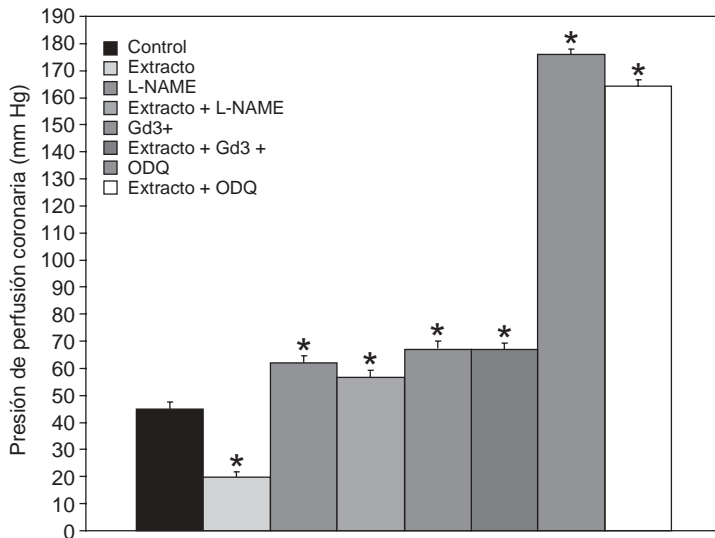


Fig. 1. Efecto de un extracto acuoso de muérdago (*Viscum album*) sobre la resistencia vascular coronaria. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar; $n = 10$ por grupo; * $P < 0.05$ vs control.

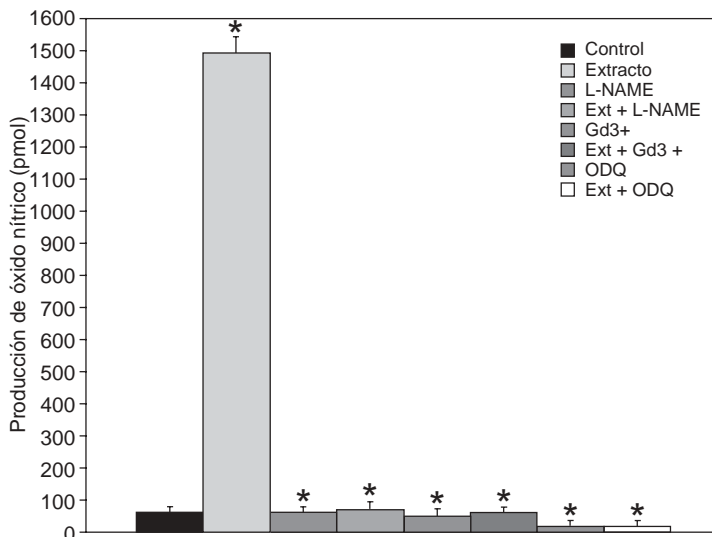


Fig. 2. Efecto sobre la producción de óxido nítrico (NO). Los datos corresponden a la media \pm el error estándar; $n = 10$ por grupo; * $P < 0.05$ vs control.

Fármacos

Para este estudio, los fármacos empleados fueron:

- Dinitrato de isosorbida (*ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA*).
- Pentoxifilina (*ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA*).

- Digoxina (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA*).
- Cloruro de gadolinio (III) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA*).
- *N*^o-nitro-*L*-arginina metil éster (*L-NAME*) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA*).
- 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-ona (ODQ) (*Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, USA*).
- Citrato de sildenafil (*SynFine Research, Richmond Hill, Ontario, Canada*).
- Tiramina (*ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA*).

Estadística

El análisis estadístico empleado en este estudio consistió en un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba *t* de Student para datos pareados,⁴⁰ con una $n = 10$ por grupo y una $P < 0.05$.

Resultados

La evaluación farmacológica realizada al extracto acuoso de *Viscum album* L., en el modelo de corazón aislado y perfundido según Langendorff,³⁴ confirma que éste posee un efecto vasodilatador coronario, cuando es infundido continuamente a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en corazones de cobayo macho (*Fig. 1*), pues se observa una disminución estadísticamente significativa de la resistencia vascular coronaria respecto al grupo control. Para corroborar si dicho efecto es mediado por la liberación de óxido nítrico, bloqueamos inespecíficamente la síntesis de NO con *L-NAME* 100 μM ,^{14,41} y una vez bloqueada según se infiere por el incremento en la resistencia vascular coronaria, observamos que al infundir simultáneamente el extracto acuoso con *L-NAME*, no se observa descenso en la presión de perfusión coronaria. Para dilucidar si en este proceso de vasodilatación participan los canales iónicos activados por estiramiento⁴² y otros sistemas de lanzadera de este ion,¹⁶ decidimos bloquear éstos con cloruro de gadolinio (III) 3 μM ,⁴³⁻⁴⁵ observando que al bloquear esta vía se produce un incremento en la resistencia vascular coronaria, el cual no se revierte al infundir simultáneamente el extracto con cloruro de gadolinio (III). Para evaluar si en el efecto farmacológico observado está implicada la vía NO-GCs, empleamos ODQ 10 μM como bloqueador específico de esta vía.^{46,47} Una vez

bloqueada ésta, según se infiere por el incremento en la resistencia vascular coronaria observada, el extracto de muérdago no es capaz de revertir el efecto vasoconstrictor del ODQ.

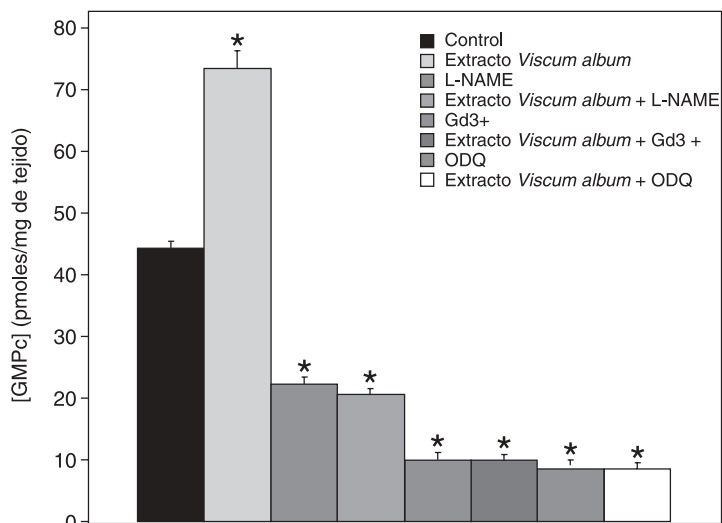


Fig. 3. Efecto sobre la producción de GMPc en tejido ventricular de corazón de cobayo. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar; $n = 10$ por grupo; * $P < 0.05$ vs control.

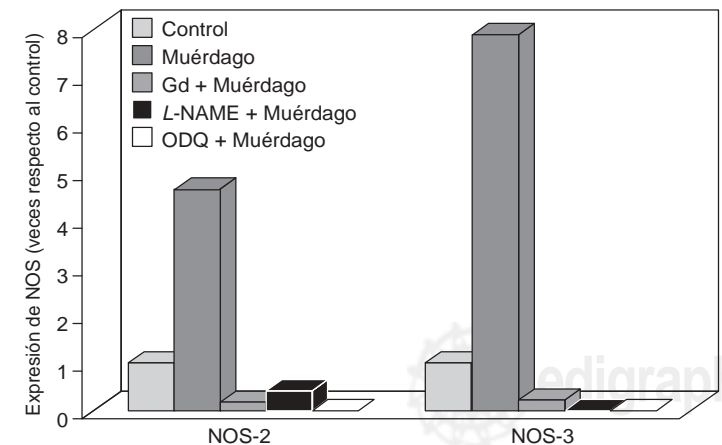


Fig. 4. Evaluación de la expresión de las sintasas de óxido nítrico inducible (NOS-2) y endotelial (NOS-3) por Western Blot en tejido ventricular de corazón de cobayo. PM = Peso molecular.

Estos efectos observados en la presión de perfusión coronaria son consistentes con la producción de óxido nítrico, en donde el extracto promueve una liberación importante de este mediador paracrino, viéndose abatida de un modo considerable cuando se bloquean las vías de señalización de éste con *L-NAME* 100 μ M, *Gd³⁺* 3 μ M y ODQ 10 μ M, respectivamente, en donde el extracto no es capaz de restaurar la liberación de NO cuando sus vías de señalización se encuentran bloqueadas (Fig. 2), siendo el NO liberado en el endotelio vascular coronario un mediador para la producción de GMPc, la cual es incrementada sustancialmente por la infusión continua del extracto de *Viscum album* L., y disminuida de manera sustancial con *L-NAME* 100 μ M, *Gd³⁺* 3 μ M y ODQ 10 μ M, en donde la infusión simultánea del extracto acuoso con alguno de los bloqueadores anteriormente señalados, no es capaz de incrementar la liberación del segundo mensajero GMPc (Fig. 3).

El análisis por Western Blot de tejido ventricular de corazones de cobayo, mostró la presencia de dos proteínas con un peso molecular de 135 y 140 kDa, las cuales fueron reconocidas, respectivamente, por el anticuerpo específico contra NOS-2 y NOS-3. El inmunoblotting marcado con los sueros anti-IgG de ratón para NOS-2 y anti-IgG bovino para NOS-3, mostró en cada caso, que la administración del extracto, a una dosis de 450 μ g, induce la expresión tanto de NOS-2 como de NOS-3 (4.6487 y 7.8917 veces sobre el control, respectivamente), según se observa en los resultados mostrados en la Figura 4.

El extracto acuoso de muérdago genera un descenso en la resistencia vascular coronaria significativamente mayor al observado con fármacos vasodilatadores empleados en la práctica clínica (dinitrato de isosorbida, pentoxifilina y citrato de sildenafil) y con un sesquiterpeno aislado de *Magnolia grandiflora*, el vulgarenol,⁴⁸ según se muestra en la Figura 5.

En la literatura especializada,²⁶⁻³² se ha reportado que el extracto acuoso de *V. album* L., ejerce un efecto inotrópico negativo. Los estudios de reactividad química selectiva cualitativa muestran que el extracto contiene flavonoides glicosilados, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, polifenoles y tiramina (Tabla I), por lo que decidimos evaluar el efecto del extracto sobre la presión de perfusión coronaria, observado que, bajo un modelo de corazón aislado y perfundido según Langendorff³⁴

en infusión continua a una concentración de 0.1 µg/mL, se observa un efecto inotrópico positivo, en comparación con el grupo control (Fig. 6), el cual es un efecto dosis-dependiente, siendo máximo a una dosis de 25 µg y comparable al observado con un estándar de tiramina, aunque no tan eficaz como el efecto inotrópico positivo ejercido por la digoxina, un digitálico empleado en la práctica clínica para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (Fig. 7).

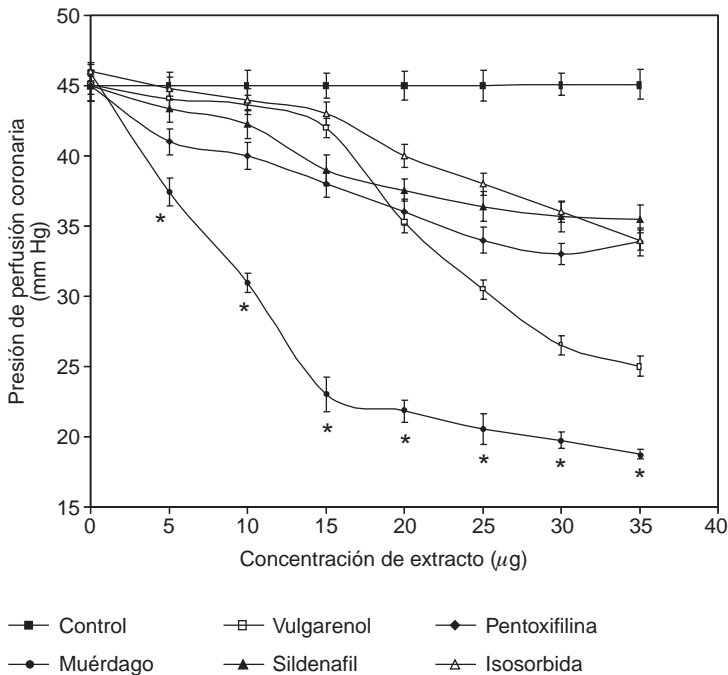


Fig. 5. Comparación del efecto vasodilatador coronario de un extracto acuoso de muérdago (*Viscum album*) con fármacos vasodilatadores. Los datos corresponden a la media ± el error estándar; n = 10 por grupo; * P < 0.05 vs control.

Discusión

La evaluación farmacológica realizada al extracto acuoso de *Viscum album* L. permite establecer que el extracto posee propiedades vasodilatadoras a nivel del endotelio coronario. Dicho efecto es más eficaz al generado por el dinitrato de isosorbida, la pentoxifilina, el citrato de sildenafil y el vulgarenol, cursando con incrementos sustanciales en la liberación del mediador paracrino NO, del segundo mensajero GMPc y de la expresión de las sintasas de óxido nítrico inducible (NOS-2) y endotelial (NOS-3), respectivamente.

Por los resultados obtenidos, puede inferirse que la vasodilatación a nivel del endotelio coronario causada por el extracto acuoso de muérdago es un proceso calcio-dependiente, observándose además una producción incrementada de óxido nítrico, el cual activa a la guanilato ciclasa soluble, incrementándose así la concentración de GMPc, por lo que este efecto vasorrelajante está mediado por la vía NO-GCs.

Adicionalmente, en años recientes se ha reportado que metabolitos secundarios aislados y purificados de varias plantas,²⁰⁻²⁵ poseen propiedades vasodilatadoras mediadas en gran medida por la vía NO-GCs, por lo que se ha propuesto que algunos de ellos actúen como inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc (fosfodiesterasa 3),⁵³ por lo que estos compuestos podrían representar a futuro alternativas terapéuticas en el tratamiento de la hipertensión y otras afecciones cardiovasculares, haciendo que la investigación en el área de los productos naturales sea un área en creciente expansión.

Un hallazgo particularmente interesante en este trabajo es el inotropismo positivo mostrado por el extracto acuoso de muérdago en el modelo de

Tabla I. Pruebas cualitativas de reactividad química selectiva para la identificación de compuestos activos en el extracto acuoso de *Viscum album* L.

Prueba	Compuesto que identifica	Resultado
Reacción de Carr-Price ⁴⁶	Flavonoides glicosilados	(+) positivo
2-difenilacetil-1,3-indandiona-1-hidrazona en medio ácido fuerte ⁴⁷	Flavonoides	(+) positivo
Bencidina en medio ácido moderado ⁴⁶	Terpenos	(+) positivo
Zinc y azul de metileno en medio moderadamente ácido ⁴⁸	Sesquiterpenos	(+) positivo
Aldehído cinámico ⁴⁶	Polifenoles	(+) positivo
Cloruro de oro (III) y rodamina base S1 en medio ácido moderado ^{48,49}	Tiramina	(+) positivo

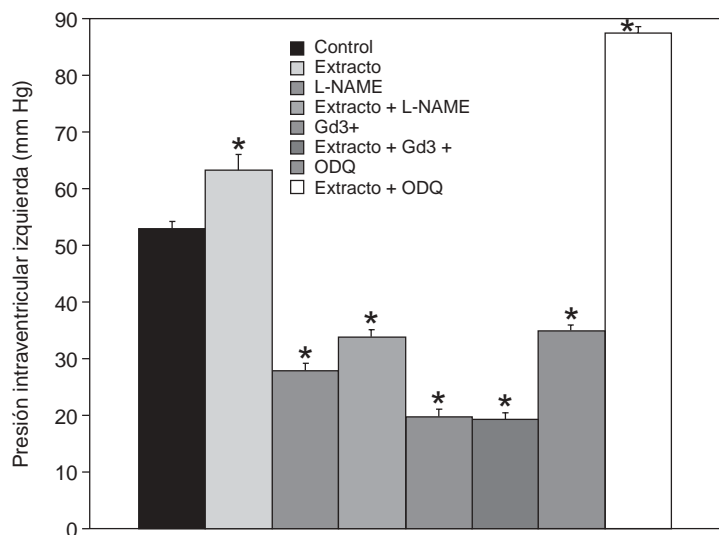


Fig. 6. Efecto de un extracto acuoso de muérdago (*Viscum album*) sobre la presión intraventricular izquierda.

Los datos corresponden a la media \pm el error estándar; $n = 10$ por grupo; * $P < 0.05$ vs control.

corazón aislado y perfundido según Langendorff,³⁴ el cual está mediado principalmente por tiramina, cuyo efecto inotrópico positivo causado por una estimulación β_1 -adrenérgica, está plenamente demostrado.^{48,54,55}

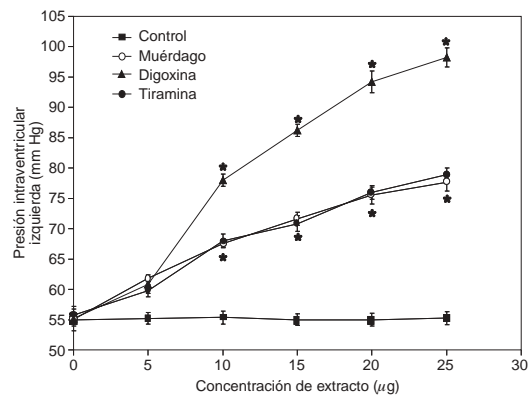


Fig. 7. Comparativo entre el efecto inotrópico positivo de extractos acuosos de *Viscum album* y digoxina. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar; $n = 10$ por grupo; * $P < 0.05$ vs control.

Conclusión

El efecto vasodilatador coronario ejercido por el extracto acuoso de *Viscum album* L. está mediado esencialmente por la vía NO-GCs, encontrándose además un efecto inotrópico positivo, el cual es causado por tiramina mediante un mecanismo de estimulación β_1 -adrenérgica.

Referencias

1. CRUICKSHANK JK: *Worldwide prevalence, awareness, treatment and control of hypertension*. Journal of Hypertension 2004; 22: 21-24.
2. VELÁZQUEZ-MONROY O, ROSAS-PERALTA M, LARA-ESQUEDA A, PASTELÍN-HERNÁNDEZ G, Grupo ENSA 2000, ATTIE F, TAPIA-CONYER R: *Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000*. Archivos de Cardiología de México 2002; 72(1): 71-84.
3. LLOYD-JONES DM, EVANS JC, LARON MG, LEVY D: *Treatment and control of hypertension in the community: a prospective analysis*. Hypertension 2002; 40: 640-646.
4. TOMLINSON JW, OWEN KR, CLOSE CF: *Treating hypertension in diabetic nephropathy*. Diabetes Care 2003; 26(6): 1802-1805.
5. PEPINE CJ: *Systemic hypertension and coronary artery disease*. American Journal of Cardiology 1998; 82(3A): 21H-24H.
6. FADL YY, ZAREBA W, MOSS AJ, MARDER VJ, SPARKS CS, MILLER-WATELET LF, CARROLL ER: *History of hypertension and enhanced thrombogenic activity in postinfarction patients*. Hypertension 2003; 41: 943-949.
7. CLAXTON CR, BRANDS MW: *Nitric oxide opposes glucose-induced hypertension by suppressing sympathetic activity*. Hypertension 2003; 41: 274-278.
8. CHIA S, QADAN M, NEWTON R, LUDLAM CA, FOX K, NEWBY DE: *Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2003; 23: 695-701.
9. LIP GYH: *Hypertension, platelets, and the endothelium: the "thrombotic paradox" of hypertension (or "Birmingham paradox") revisited*. Hypertension 2003; 41: 199-200.
10. BIEDERMANN BC: *Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity*. News in Physiological Science 2001; 16(4): 84-88.
11. CARVAJAL JA, GERMAIN AM, HUIDOBRO-TORO JP, WEINER CP: *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. Journal of Cellular Physiology 2000; 184: 409-420.

12. SODERLING SH, BEAVO JA: *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions*. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12: 174-179.
13. LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP, WALDMAN SA: *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. *Pharmacological Reviews* 2000; 52: 375-413.
14. MONCADA S, HIGGS A, FURCHGOTT R: *XIV International Union of Pharmacology. Nomenclature in the nitric oxide research*. *Pharmacological Reviews* 1997; 49(2): 137-142.
15. WANDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J: *Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells*. *TRENDS in Plant Science* 2001; 6(4): 177-182.
16. QUIGNARD JF, FRAPIER JM, HARRICANE MC, ALBAT B, NARGEOT J, RICHARD S: *Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide*. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 185-193.
17. IGNARRO LJ: *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology (Nobel Lecture)*. *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 1882-1892.
18. FURCHGOTT RF: *Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide (Nobel Lecture)*. *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 1870-1880.
19. MURAD F: *Discovery of some biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel Lecture)*. *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 1856-1868.
20. NDIAYE M, CHATAIGNEAU T, ANDRIANTSITOHAINA R, STOCLET JC, SCHINI-KERTH VB: *Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 10(2): 371-377.
21. HUANG Y, CHAN NW, LAU CW, YAO XQ, CHAN FL, CHEN ZY: *Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)-epicatechin*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1427(2): 322-328.
22. DUARTE J, PEREZ-PALENCIA R, VARGAS F, OCETE MA, PEREZ-VIZCAINO F, ZARZUELO A, TAMARGO J: *Anti-hypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats*. *British Journal of Pharmacology* 2001; 135(1): 117-124.
23. DUARTE J, JIMENEZ R, VILLAR IC, PEREZ-VIZCAINO F, JIMENEZ J, TAMARGO J: *Vasorelaxant effects of the biflavonoid chrysin in isolated rat aorta*. *Planta Medica* 2001; 67(6): 567-569.
24. MULLEN W, MCGINN J, LEAN ME, MACLEAN MR, GARDNER P, DUTHIE GG, YOKOTA T, CROZIER A: *Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(18): 5191-5196.
25. CHENG YW, LI CH, LEE CC, KANG JJ: *Alpha-naphthoflavone induces vasorelaxation through the induction of extracellular calcium influx and NO formation in endothelium*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakologie* 2003; 368(5): 377-385.
26. FUKUNAGA T, KAJIKAWA I, NISHIYA K, WATANABE Y, TAKEYA K, ITOKAWA H: *Studies of the constituents of the european mistletoe, Viscum album L*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1987; 35(8): 3292-3297.
27. GRAY AM, FLATT PR: *Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant Viscum album (mistletoe)*. *Journal of Endocrinology* 1999; 160: 409-414.
28. ADSERSEN A, ADSERSEN H: *Plants from Reunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects – an experimental and ethnobotanical evaluation*. *Journal of Ethnopharmacology* 1997; 58: 189-206.
29. SAMUELSSON G: *Phytochemical and pharmacological studies on Viscum album L. I. Viscotixin, its isolation and properties*. *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 1958; 62(8): 169-189.
30. SAMUELSSON G: *Phytochemical and pharmacological studies on Viscum album L. II. Improvements of the isolation method for viscotoxin*. *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 1959; 63(16): 415-425.
31. WAGNER H, FEIL B, SELIGMANN O, PETRICIC J, KALOGJERA Z: *Phenylpropanes and lignans of Viscum album cardioactive drugs V*. *Planta Medica* 1986; 2: 102-104.
32. DELIORMAN D, CALIS I, ERGUN F, SÖNMEZ B, KEMAL-BAHARALIOGLU C, KANZIK I: *Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from Viscum album ssp. album*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 72: 323-329.
33. DELIORMAN D, CALIS I, ERGUN F: *A new acyclic monoterpene glucoside from Viscum album ssp. album*. *Fitoterapia* 2001; 72(2): 101-105.
34. DÖRING H, DEHNERT H: *The isolated perfused heart according to Langendorff*. *Friburgo de Brisgovia, Biomesstechnik-Verlag*, 1988: 1-70.
35. KELM M, SCHRADER J: *Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart*. *European Journal of Pharmacology* 1988; 155(3): 317-321.
36. HAGEN V, BENDIG J, FRINGS S, ECKARDT T, HELM S, REUTER D, KAUPP UB: *Highly efficient and ultrafast phototriggers for cAMP and cGMP by using long-wavelength UV/Vis activation*. *Angewandte Chemie International Edition* 2001; 40: 1046-1048.
37. SHAH V, HADDAD FG, GARCIA-CARDENA G, FRANGOS JA, MENNONE A, GROSZMANN RJ, SESSA WC: *Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids*. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100: 2923-2930.

38. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry 1951; 193: 265-275.
39. LAEMMLI UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970; 227: 680-685.
40. BOX G, HUNTER W: *Estadística para Investigadores: Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos*. 3a Ed. México. Reverté, 1999: 345-580.
41. OBST M, GROSS V, JANKE J, WELLNER M, SCHNEIDER W, LUFT FC: *Pressure natriuresis in AT₂ receptor-deficient mice with L-NAME hypertension*. Journal of the American Society of Nephrology 2003; 14: 303-310.
42. SUÁREZ J, TORRES C, SÁNCHEZ L, DEL VALLE L, PASTELÍN G: *Flow stimulates nitric oxide release in guinea pig heart: role of stretch-activated ion channels*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 261: 6-9.
43. NICOLISI AC, KWOK CS, CONTNEY SJ, OLINGER GN, BOSNJAK ZJ: *Gadolinium prevents stretch-mediated contractile dysfunction in isolated papillary muscles*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2001; 280: H1122-H1128.
44. LAMBERTS RR, VAN RIJEN MHP, SIPKEMA P, FRANSEN P, SYS SU, WESTERHOF N: *Increased coronary perfusion augments cardiac contractility in the rat through stretch-activated ion channels*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2002; 282: H1334-H1340.
45. GUI-RONG L, BAUMGARTEN CM: *Modulation of cardiac Na⁺ currents by gadolinium, a blocker of stretch-induced arrhythmias*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2001; 280: H272-H279.
46. FEELISCH M, KOTSONIS P, SIEBE J, CLEMENT B, SCHMIDT H: *The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation*. Molecular Pharmacology 1999; 56: 243-253.
47. ELLIS JL: *Role of soluble guanylyl cyclase in the relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea and human bronchus*. Molecular Pharmacology 1997; 280: 1215-1218.
48. DEL VALLE-MONDRAGÓN L, TENORIO-LÓPEZ FA, TORRES-NARVÁEZ JC, ZARCO-OLVERA G, PASTELÍN-HERNÁNDEZ G: *Estudio de los extractos de Magnolia grandiflora sobre el músculo cardíaco de cobayo*. Archivos de Cardiología de México 2004; 74(2): 108-117.
49. LINSKENS HF, JACKSON JF: *Liquid chromatography in plant sciences*. Berlin, Springer-Verlag, 1987: 25-35, 56-90, 121-200.
50. KIWALTH R, KIMARI O: *Start of the nuclear magnetic resonance*. New York, D'Evan Nostrand, 1988: 234.
51. TATSIME-OHI K, HIYAMOTO Y: *Functional analysis*. New York, Shendo, 1989: 7-51.
52. FEIGL F, ANGER V: *Pruebas a la gota en análisis orgánico*. México, El Manual Moderno, 1978: 772.
53. RUCKSTUHL M, BERETZ A, ANTON R, LANDRY Y: *Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors*. Biochemical Pharmacology 1979; 28: 535-538.
54. SCOTT HJ, DONALD PG, FULLER WR: *In vivo cardiovascular responses to isoproterenol, dopamine and tyramine after prolonged infusion to isoproterenol*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1984; 231(3): 633-639.
55. KOBAYASHI M, SHIMOTORI M, CHIBA S: *Direct effects of catecholamines and tyramine on sinoatrial conduction in isolated and blood-perfused dog atria*. Japanese Heart Journal 1984; 25(2): 195-205.