

Implementación de la técnica en órgano aislado vascular como herramienta para la validación de plantas medicinales: Estudio del efecto vasodilatador de la *Salvia scutellarioides**

JORGE HERNÁN RAMÍREZ, M.D., M.Sc.¹, MAURICIO PALACIOS, M.D., M.Sc.¹,
OSCAR GUTIÉRREZ, M.D., M.Sc.²

RESUMEN

Introducción: La *Salvia scutellarioides* es una planta con efecto antihipertensivo y diurético. En este estudio se evalúa su efecto vasodilatador con la técnica de órgano aislado vascular.

Objetivos: Estandarizar la técnica de órgano aislado vascular y estudiar el efecto de *S. scutellarioides* en la vasoconstricción por estimulación de receptores $\alpha 1$.

Metodología: Se colocaron anillos de aorta de rata en un equipo de baño de órganos (BIOPAC®) a una temperatura de 37°C y burbujeo constante de gas carbónico. Los cambios en la tensión se registraron con un transductor de tensión isométrica y un equipo de adquisición de datos. En la estandarización, se realizaron seis curvas de concentración-tensión con fenilefrina a las horas 1, 3 y 5, para determinar la tensión máxima (T_M) y la concentración efectiva 50 (EC_{50}). Finalmente, se obtuvieron curvas de concentración-tensión para fenilefrina con *S. scutellarioides* a una concentración de 10 mg/dl y 20 mg/dl.

Resultados: En la estandarización de la técnica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la T_M y la EC_{50} para fenilefrina en la primera, tercera y quinta horas. La administración de *S. scutellarioides* ocasionó una disminución concentración dependiente de la T_M sin cambios en la EC_{50} .

Discusión: La técnica de órgano aislado implementada es viable hasta por cinco horas y no ocasiona desensibilización de receptores $\alpha 1$. La disminución de la T_M por la *S. scutellarioides* se explica por un efecto de tipo $\alpha 1$ antagonista no competitivo. Se requieren estudios para aislar principios activos que permitan iniciar ensayos clínicos fase I en los seres humanos.

Palabras clave: *Salvia*; Hipertensión; Mastranto; Etnofarmacología; Órgano aislado vascular; Vasoconstricción.

Implementation of the isolated vascular tissue model as a device for the validation of medicinal plants: Study of the vasodilator activity of *Salvia scutellarioides*

SUMMARY

Introduction: *Salvia scutellarioides* is a plant with antihypertensive and diuretic properties. In this study, its vasodilator effect is evaluated using the isolated organ technique.

Objectives: To standardize the isolated vascular organ, and to study the effect of *S. scutellarioides* in vasoconstriction by $\alpha 1$ receptors stimulation.

Methodology: Rat aortic rings were placed in an organ bath equipment (BIOPAC®), at 37°C temperature and constant carbogen gas bubbling. Tension changes were registered with an isometric tension transducer and data acquisition equipment. During the standardization, six curves of concentration-tension with phenylephrine at 1, 3 and 5 hours were registered, in order to determine maximum tension (T_M), and the effective concentration 50 (EC_{50}). Finally, three concentration-tension curves were obtained for phenylephrine with *S. scutellarioides* at a concentration of 10 mg/dl and 20 mg/dl.

Results: During the technique standardization, no statistically significant differences were found in T_M for phenylephrine at 1, 3 and 5 hours. The administration of *S. scutellarioides* produced a T_M dose dependent reduction with no EC_{50} changes.

* Estudio financiado por COLCIENCIAS, proyecto código 11060413079.

1. Profesor Auxiliar, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: jorgehramirez31@yahoo.com e-mail: maopalacios@yahoo.com
2. Profesor Asistente, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: ogutie@uniweb.net.co

Recibido para publicación abril 28, 2006 Aceptado para publicación enero 4, 2007

Discussion: The implemented isolated organ technique is viable up to 5 hours, and does not produce $\alpha 1$ receptors desensibilization. The T_M diminution by *S. scutellarioides* is explained by a non competitive $\alpha 1$ antagonism effect. Studies to isolate active principles for allowing the initiation of phase I human clinical trials are required.

Keywords: *Salvia; Hypertension; Mastranto; Ethnopharmacology; Vascular isolated organ; Vasoconstriction.*

Los estudios en órgano aislado son una herramienta útil para evaluar la actividad farmacológica de una molécula en los receptores, canales y enzimas de un tejido^{1,2}. Recientemente, se ha incrementado el uso de técnicas *in vitro* en el área de la etnofarmacología para evaluar el efecto de extractos y moléculas derivadas de plantas. El creciente uso de esta técnica por la comunidad científica internacional se debe a que es poco costosa, pues requiere menos animales en comparación con los modelos *in vivo* y permite evaluar en poco tiempo la actividad farmacológica de una gran variedad de extractos y moléculas de origen vegetal³.

Colombia cuenta con la mayor biodiversidad vegetal por km² del planeta y ocupa el segundo lugar en número de especies después de Brasil. Sin embargo, más de 99% de las especies vegetales no han sido estudiadas como fuente potencial de medicamentos, pese a que una amplia proporción de colombianos depende del uso de plantas medicinales. Por lo anterior, es necesario aplicar métodos costo-efectivos, que empleen un reducido número de animales y permitan evaluar en el menor tiempo posible la actividad farmacológica de la biodiversidad de plantas nacionales. La investigación en la etnofarmacología colombiana es una necesidad prioritaria del país para permitir la apropiación social del conocimiento, importante para evitar la bio-piratería en la era de la globalización y el libre comercio⁴⁻⁶.

En este estudio se presenta cómo se aplicó la técnica de órgano aislado vascular, los efectos del tiempo en la contracción del músculo liso y la acción de dosis repetidas de fenilefrina en la sensibilidad de los receptores $\alpha 1$. Por último, se evaluó la propiedad vasodilatadora de la *Salvia scutellarioides* (Lamiaceae), una planta muy utilizada por la población colombiana para el tratamiento de la hipertensión arterial y que recientemente este mismo grupo informó como antihipertensiva y diurética^{7,8}.

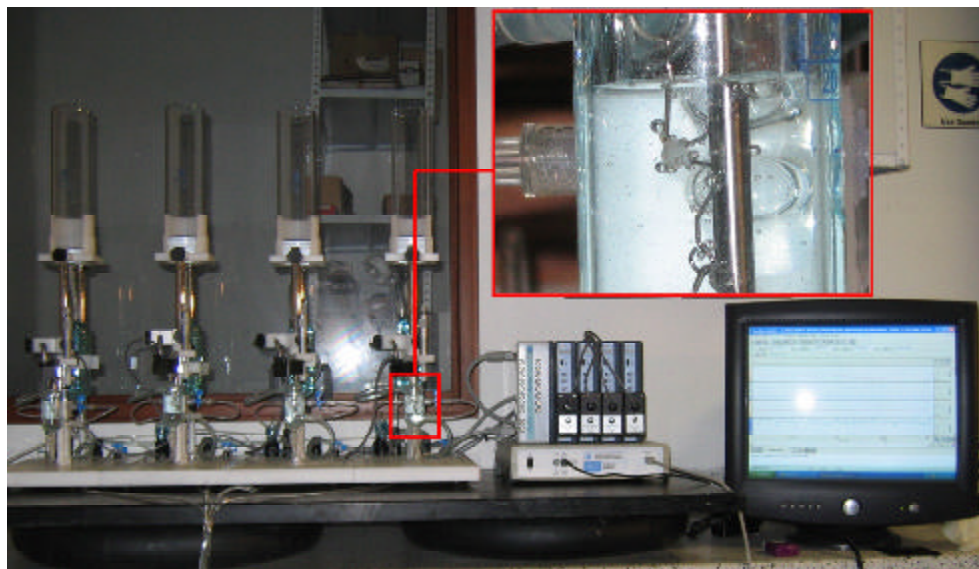
El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle, Acta N° 16 de julio 18 de 2002.

MATERIALES Y MÉTODOS

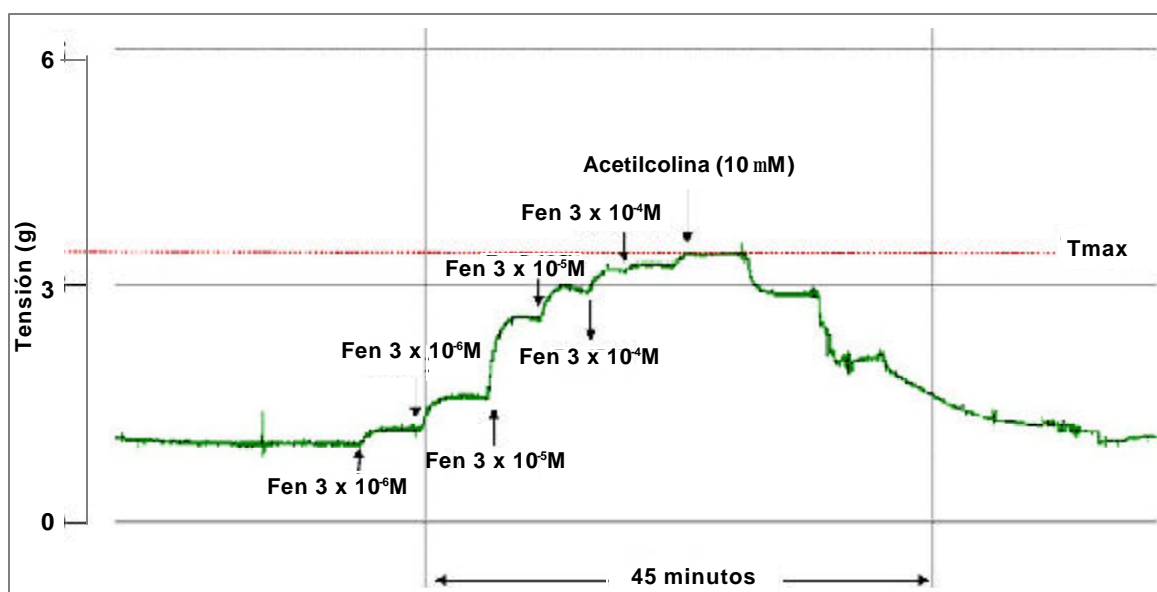
Preparación del tejido. Se anestesiaron cinco ratas Sprague-Dawley machos con peso de 200 a 250 g con pentobarbital (100 mg/kg) para extraer la aorta torácica por toracotomía. La arteria se colocó en una caja de petri con solución de Krebs-Henseleit (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ y 5.6 mM glucosa) a 4°C más suplemento continuo de carbógeno (CO₂: 5% - O₂: 95%). Dentro de la solución se seccionó en forma cuidadosa la aorta con un bisturí para obtener tres anillos concéntricos de 5 mm cada uno, aproximadamente; además, el endotelio se removió con un tubo PE-100 de polietileno. Para el montaje, cada anillo vascular se fijó en sus extremos opuestos con dos alambres de plata y se colocó en un baño de órganos [Tissue Bath Station, BIOPAC™] con solución de Krebs-Henseleit (20 ml) a 37°C más suplemento continuo de carbógeno (Fotografía 1).

Uno de los alambres se fijó al baño de órganos y el otro a un transductor isométrico de 50 g [TSD125, BIOPAC™] conectado a un equipo de adquisición de datos [MP-100, BIOPAC™] y éste al computador. La tensión basal aplicada a los anillos vasculares fue de 1 g. Los resultados de la tensión del músculo liso vascular y los efectos de los medicamentos se observaron en tiempo real con el uso de Acknowledge software v. 3.07 para Windows XP® (Gráfica 1). Todos los resultados se almacenaron en formato electrónico para posteriores análisis.

Determinación del efecto del tiempo en la contracción del músculo liso vascular. Una vez acoplado el anillo vascular en el baño de órganos, se procedió a estimular la respuesta tisular durante la primera hora de experimentación al añadir KCl (25 mM) cada 20 minutos y cambiando continuamente la solución de Krebs-Henseleit. Transcurrida la primera hora y una vez alcanzada la estabilización del tejido, se hizo una curva de concentración vs tensión con fenilefrina (SIGMA®) añadida al baño de órganos de manera acumulativa (10 nM a 100 μ M). Luego de obtener la tensión máxima (T_M) con fenilefrina, se adicionó acetilcolina (10 μ M) para comprobar la no viabilidad del endotelio. La curva con fenilefrina se repitió a la tercera, quinta y séptima horas en seis anillos vasculares



Fotografía 1. *Montaje de órgano aislado vascular.* Se muestran las estaciones de baño de órganos con el equipo de adquisición de datos. En el recuadro se observa la aorta suspendida por dos ganchos de plata, en solución de Krebs-Henseleit y con suplemento continuo de gas carbógeno.



Gráfica 1. *Adquisición de datos Acknowledge Software 3.07.* La gráfica muestra la adquisición de datos y la contracción del músculo liso vascular inducido por fenilefrina (fen). La acetilcolina no ocasionó una disminución de la tensión máxima (T_M) comprobando la destrucción del endotelio en los anillos vasculares.

para determinar los cambios temporales de la tensión máxima del músculo liso vascular *in vitro* y la desensibilización de los receptores α_1 a la fenilefrina.

Efecto de la *S. scutellarioides* en músculo liso vascular. El lugar donde se obtuvo la planta, la certifica-

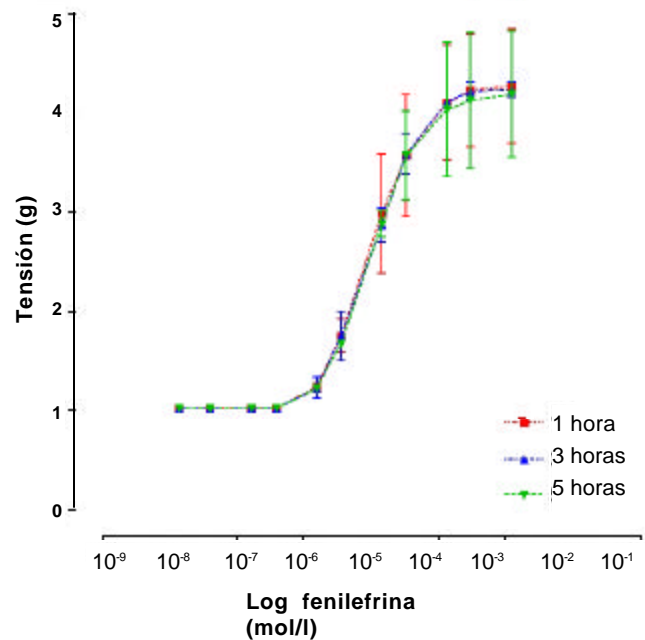
ción por biología botánica y los procesos para preparar el extracto se describen con detalle en una publicación previa⁷. El efecto del extracto acuoso de *S. scutellarioides* se determinó con el uso de tres anillos vasculares. Durante la primera hora se realizó con cada anillo vascular una

curva control concentración-tensión con fenilefrina. A la tercera y quinta horas se obtuvo una nueva curva con fenilefrina más el extracto acuoso de *S. scutellarioides* a una concentración de 10 mg/dl y 20 mg/dl, respectivamente.

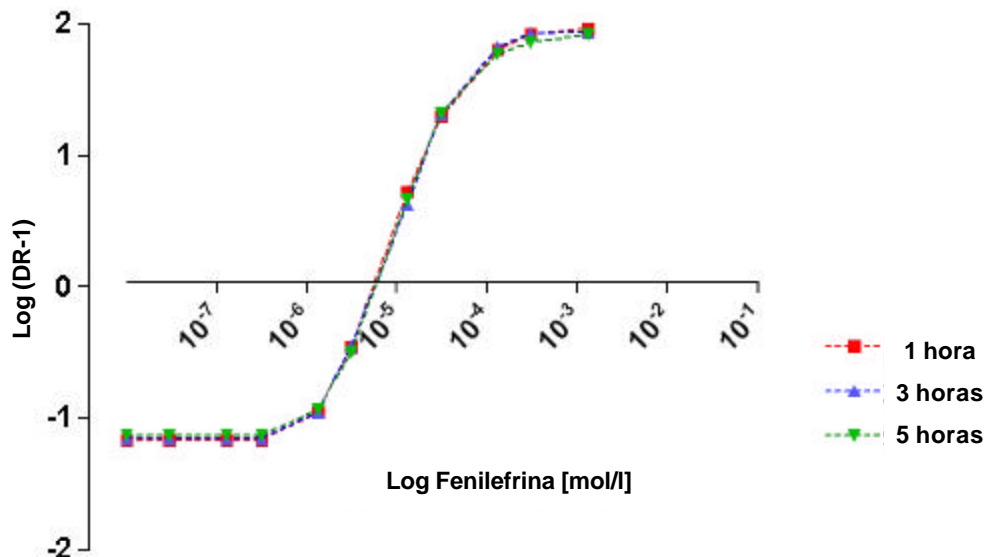
Análisis estadístico. Los datos de la tensión obtenida con las concentraciones de fenilefrina se analizaron y graficaron con el programa GraphPad Prism® 4.02 para Windows XP®. Para calcular la concentración de la droga que ocasionó 50% de la tensión máxima (EC_{50}) se utilizó el análisis de Hill⁹. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías (concentración vs. tensión) aceptándose *a priori* una $p < 0.05$ como indicador de diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se muestran como la media del grupo \pm error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

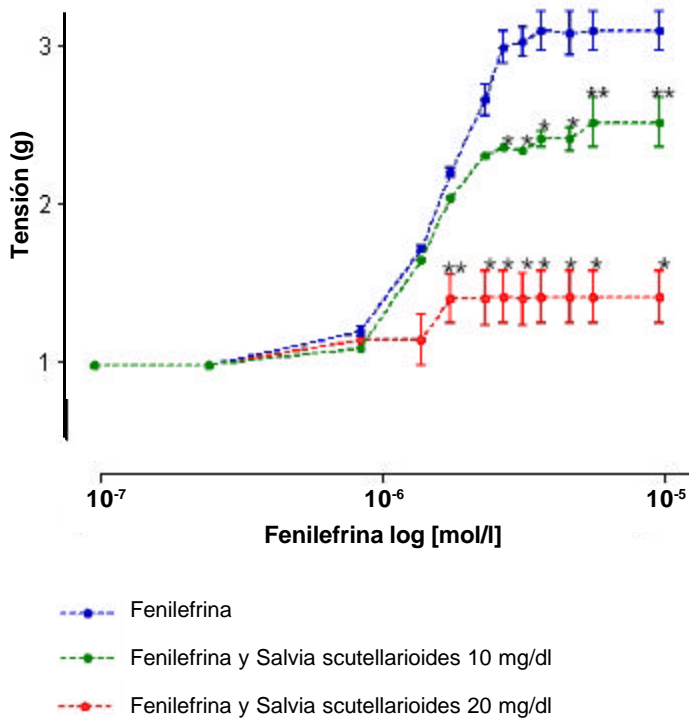
Efecto del tiempo en la contracción del músculo liso vascular y EC_{50} para fenilefrina. La tensión máxima para fenilefrina en la tercera y quinta horas no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con la curva control de la primera hora (Gráfica 2).



Gráfica 2. Curva Log fenilefrina (mol/l) vs. tensión (g). Muestra la curva de tensión obtenida con dosis acumulativas de fenilefrina a la primera, tercera y quinta horas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas. Los datos se expresan como la media del grupo \pm SEM.



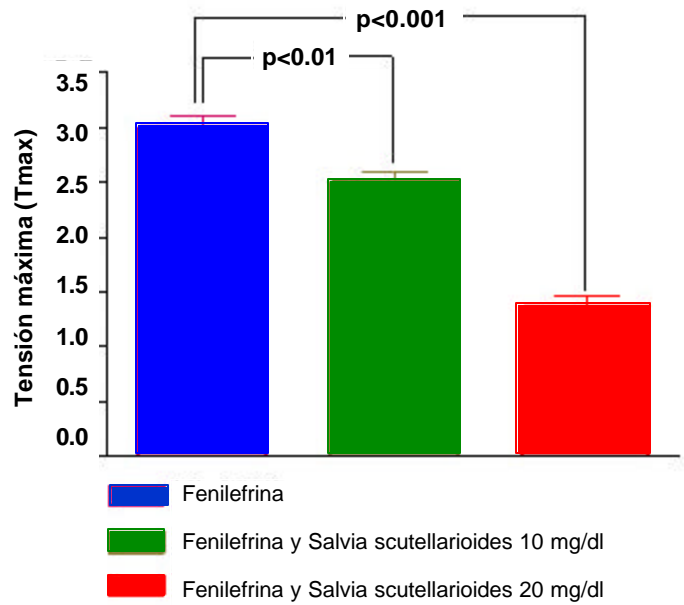
Gráfica 3. Análisis de Hill. La grafica muestra la concentración necesaria de fenilefrina para alcanzar 50% de la tensión máxima (EC_{50}). La EC_{50} para fenilefrina no mostró diferencias a la primera, tercera y quinta horas de experimentación.



Gráfica 4. Efecto de *S. scutellarioides* en el órgano aislado vascular. La gráfica muestra el efecto de *S. scutellarioides* en la disminución de la T_M del músculo liso vascular con fenilefrina (n=3). Los datos se expresan como la media del grupo ± SEM. **p<0.01; *p<0.001

A la séptima hora de experimentación no se obtuvo una respuesta contráctil con fenilefrina en ninguno de los anillos vasculares estudiados. El análisis de Hill (Gráfica 3) dio como resultado una EC₅₀ de 5.4 x 10⁻⁶ mol/l de fenilefrina para las curvas obtenidas a la primera, tercera y quinta horas de experimentación.

Efecto de *S. scutellarioides* en la contracción del músculo liso vascular. La tensión máxima para la fenilefrina en combinación con el extracto acuoso de *S. scutellarioides* a una concentración de 10 mg/dl fue 2.44 ± 0.13, equivalente a una disminución de la tensión máxima de 17% en comparación con la curva control para fenilefrina (p<0.01). Con el extracto acuoso de *S. scutellarioides* a una concentración de 20 mg/dl se obtuvo una tensión máxima para fenilefrina de 1.4 ± 0.15, igual a una disminución de la tensión máxima de 54% en comparación con la curva control para fenilefrina (p<0.001) (Gráficas 4 y 5). El extracto acuoso de *S. scutellarioides* en las concentraciones estudiadas no produjo diferencias en la EC₅₀ para la fenilefrina.



Gráfica 5. Efecto de *S. scutellarioides* en la T_M para fenilefrina. La gráfica muestra los efectos de la administración del extracto acuoso de *S. scutellarioides* en la T_M para fenilefrina.

DISCUSIÓN

Los estudios en órgano aislado se consideran como una técnica útil para evaluar los efectos de fármacos y extractos derivados de plantas en el músculo liso. Sin embargo, la técnica de órgano aislado vascular presenta como desventaja la dificultad de mantener el tejido viable para los ensayos farmacológicos. Esto se debe a la excesiva manipulación quirúrgica del tejido, a la hipoxia tisular por burbujeo inconstante del gas carbónico y a concentraciones inapropiadas de electrólitos en la solución de Krebs¹. Además, con el transcurrir de los minutos el músculo liso vascular puede presentar fatiga y disminución de la tensión máxima, y ocasionar un factor de confusión cuando se toma como control la primera curva para el agonista. Otro factor que ocasiona dificultades para ejecutar la técnica, es la desensibilización de los receptores ocasionada al administrar agonistas, fenómeno que ocurre por la fosforilación del receptor o recaptura de éste al citoplasma en un proceso mediado por β-arrestina y clatrina¹⁰.

En la reproducción del modelo de órgano aislado vascular no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tensión máxima por fenilefrina de la primera, tercera y quinta horas. Sin embargo, a la séptima

hora no se obtuvo respuesta contráctil con fenilefrina, por lo que los experimentos en órgano aislado vascular sólo se deben realizar por un máximo de cinco horas. La EC_{50} para la fenilefrina a la primera, tercera y quinta horas no mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la sensibilidad de los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos se mantuvo sin cambios durante las cinco horas de experimentación. La implementación de esta técnica permitirá evaluar las plantas colombianas con efectos en el músculo liso vascular, como un método de filtro para la búsqueda de principios activos con acción cardiovascular.

S. scutellarioides (10 mg/dl y 20 mg/dl) ocasionó una disminución en la tensión máxima con fenilefrina sin alterar su EC_{50} . Este tipo de efecto se debe a que por lo menos una de las moléculas que componen el extracto acuoso de *S. scutellarioides* tiene un efecto de tipo antagonista de tipo no competitivo, de receptores de $\alpha 1$ ¹¹. Otras plantas de la familia Lamiaceae como la *Satureja obovata* y la *Orthosiphon aristatus* presentan un efecto vasodilatador parecido al de la *S. scutellarioides*^{12,13}. Además, recientemente se describió la protección contra el estrés oxidativo de las células endoteliales y la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular por la *Salvia miltiorrhiza*^{14,15}.

El efecto vasodilatador de *S. scutellarioides* puede explicar la disminución de la tensión arterial diastólica en el modelo de las ratas hipertensas por L-NAME⁷. Sin embargo, se debe aclarar que la acción farmacológica de una planta puede resultar de la acción aditiva y/o sinérgica de varios principios activos¹⁶, por lo que otros mecanismos como el aumento de la diuresis y natriuresis pueden también explicar el efecto antihipertensivo de *S. scutellarioides*⁸. Recientemente, se determinó que *S. scutellarioides* no presentaba toxicidad subaguda cuando se administraba durante 28 días en ratas Wistar¹⁷. La continuidad de los estudios con *S. scutellarioides* se justifica debido a la relativa seguridad de la planta en seres humanos, el amplio uso en la medicina tradicional colombiana y los resultados positivos obtenidos en los modelos animales e *in vitro*. Específicamente, se deben aislar los principales principios activos de la planta y definir sus características farmacodinámicas, con lo que se puede dar comienzo a los ensayos clínicos fase I en seres humanos.

REFERENCIAS

1. Enna SJ, Sullivan JP, Kenakin T, Fernaky JW, Porsolt RD, Williams M. Protocols in isolated tissue. In: *Curr Protocols Pharmacol*. New York: John Wiley & Sons; 2002. p. 4.1-4.10.
2. Alm R, Edvinsson L, Malmsjo M. Organ culture: a new model for vascular endothelium dysfunction. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 8.
3. Gebhardt R. *In vitro* screening of plant extracts and phyto-pharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Med* 2000; 66: 99-105.
4. Calle R. Juridical and sociocultural problems on the definition of a law concerning property, usage and access to genetic resources in Colombia. *J Ethnopharmacol* 1996; 51: 127-142.
5. Baker JT, Borris RP, Carte B, Cordell GA, Soejarto DD, Cragg GM, et al. Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. *J Nat Prod* 1995; 58: 1325-1357.
6. Soejarto DD, Fong HH, Tan GT, Zhang HJ, Ma CY, Franzblau SG, et al. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bio-prospecting: issues on intellectual property and benefit-sharing. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 15-22.
7. Ramírez JH, Palacios M, Gutiérrez JO. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colomb Med* 2006; 37: 53-60.
8. Ramírez JH, Palacios M, Gutiérrez O. Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas. *Biomedica* 2006; 26: 145-149.
9. Endrenyi L, Fajsz C, Kwong FH. Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. *Eur J Biochem* 1975; 51: 317-328.
10. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 1-24.
11. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 319-356.
12. Matsubara T, Bohgaki T, Watarai M, Suzuki H, Ohashi K, Shibuya H. Antihypertensive actions of methylripariochromene A from *Orthosiphon aristatus*, an Indonesian traditional medicinal plant. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 1083-1088.
13. Sánchez DR, V, Somoza B, Ortega T, Villar AM. Isolation of vasodilatory active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata*. *Planta Med* 1996; 62: 272-274.
14. Wang H, Gao X, Zhang B. Tanshinone: an inhibitor of proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 93-98.
15. Ding M, Zhao GR, Ye TX, Yuan YJ, Guo ZX. *Salvia miltiorrhiza* protects endothelial cells against oxidative stress. *J Altern Complement Med* 2006; 12: 5-6.
16. Spinella M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. *Altern Med Rev* 2002; 7: 130-137.
17. Ramírez JH, Palacios M, Tamayo O, Jaramillo R, Gutiérrez O. Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 109: 348-353.