

ACTIVIDAD VASCULAR DE FENILPROPANOIDES: VERBASCÓSIDO

Vascular Activity of Phenylpropanoids: Verbascoside

Blanca SÁNCHEZ MACÍAS; M.^a Josefa MONTERO GÓMEZ

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Calle Lic. Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca

Correo-e: blansanmaci@usal.es; mjmontero@usal.es

RESUMEN: El verbascósido, también denominado acteósido, se ha encontrado en más de 23 familias de plantas, demostrando, entre muchas otras propiedades, utilidad in vivo como antihipertensivo. Sin embargo, su efecto en el sistema vascular no es conocido por completo. Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la reactividad vascular del verbascósido sobre aorta de rata, hipotetizando un posible efecto relajante vascular responsable de la actividad antihipertensiva. Las curvas concentración-respuesta se llevaron a cabo sobre anillos de 3 mm de longitud de aorta de rata, evaluando la respuesta a verbascósido y a fenilefrina, acetilcolina, nitroprusiato sódico y calcio en presencia de verbascósido a diferentes concentraciones molares (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M). Los resultados obtenidos muestran que el verbascósido, in vitro, no tiene un efecto relajante vascular y no afecta al tono basal de la aorta, no potencia la acción contracturante de la fenilefrina, pero, no obstante, sí reduce la relajación vascular derivada de acetilcolina. Por otro lado, potencia ligeramente la acción relajante vascular del nitroprusiato, no interfiriendo en la entrada de calcio extracelular. Así pues, la actividad antihipertensiva in vivo del verbascósido no se explica a través de la actividad in vitro vista en estos experimentos.

Palabras clave: verbascósido; acteósido; vascular; aorta; antihipertensivo; rata.

ABSTRACT: Verbascoside, also known as Acteoside, has been found in over 23 families of plants. demonstrating, among many other properties, utility in vivo as an antihypertensive. However, its effect on the vascular system is not fully known. This work aims to study the vascular reactivity of verbascoside on rat aorta, hypothesizing a possible vascular relaxing effect responsible for the antihypertensive activity. The concentration-response curves were carried out on 3 mm long rings of rat aorta, evaluating the response to verbascoside and phenylephrine, acetylcholine, sodium nitroprusside and calcium in the presence of verbascoside at different molar concentrations (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M). The results obtained show that verbascoside, in vitro, does not have a vascular relaxing effect and does not affect the basal tone of the aorta, it does not enhance the contracting action of phenylephrine, but nevertheless it does reduce the vascular relaxation derived from acetylcholine. On the other hand, it slightly enhances the vascular relaxing action of nitroprusside, not interfering with the entry of extracellular calcium. Thus, the antihypertensive in vivo activity of verbascoside is not explained by the in vitro activity seen in these experiments.

Keywords: verbascoside; acteoside; aorta; vascular; antihypertensive; rat.

1. INTRODUCCIÓN

El verbascósido es un disacárido del éster del ácido cafeico (Andary *et al.*, 1982). Se ha detectado principalmente en las especies de *Verbascum*, pero también se ha encontrado en más de 200 especies vegetales pertenecientes a 23 familias. Existe un conflicto en la literatura en cuanto a su designación. En 1963 se aisló un feniletanoide glicosídico de la muleína en *Verbascum sinuatum* L. al que denominaron verbascósido. Varios años después, el mismo compuesto fue aislado de las flores de *Syringa vulgaris* y se determinó su estructura, denominándose acteósido. A finales del siglo XIX, se descubrió que ambos compuestos eran idénticos y se recomendó la denominación verbascósido, aunque aún sigue encontrándose bajo la denominación de acteósido.

El verbascósido se ha encontrado tanto en las partes subterráneas como en las partes aéreas de la planta en niveles muy variados. Otra fuente potencialmente relevante de verbascósido incluye subproductos de la industria como, por ejemplo, en los desechos del pulverizado de la aceituna, donde se han detectado cantidades abundantes de verbascósido, además de otros compuestos fenólicos (Alipieva *et al.*, 2014).

Por otra parte, el Grupo de Investigación de Farmacognosia de la Universidad de Sevilla ha obtenido este compuesto con un rendimiento muy elevado a partir de *Acanthus mollis* L., muestra con la cual se ha elaborado este trabajo experimental.

Al realizar la revisión bibliográfica de la actividad farmacológica del verbascósido pudimos comprobar que hay descritas numerosas actividades farmacológicas, siendo las más destacadas desde el punto de vista de nuestro trabajo:

- Antihipertensiva: disminución de la presión sanguínea sistólica y diastólica (Chao-Hsiang *et al.*, 2012). Con un efecto hipotensor dosis-dependiente in vivo independiente de receptores muscarínicos e histaminérgicos en ratas anestesiadas (Aftab *et al.*, 1995).
- Antiinflamatoria: inhibe la producción de NO por la inhibición del factor AP-1, el cual es responsable (entre otros factores) de la expresión del gen de la iNOS (Lee *et al.*, 2005).
- Antioxidante: los metabolitos del verbascósido incrementan significativamente la actividad enzimática antioxidante (catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) (Cardinali *et al.*, 2012).

2. OBJETIVO

Teniendo en cuenta la participación del tono vascular en la regulación de la presión arterial, el objetivo de este TFG es el estudio del verbascósido sobre la reactividad vascular en anillos aislados de aorta en rata. Hipotetizamos que un posible efecto relajante de la pared vascular podría estar implicado en la actividad antihipertensiva descrita por otros autores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes en materia de experimentación animal: Directiva 2010/63/UE, de 22 de septiembre, y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, y se aprobaron por el Comité de Bioética de la USAL con n.º referencia 0000309. Para el estudio se emplearon ratas Wistar (hembras de 230-315 g) procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la USAL.

3.1. Preparación de los anillos de aorta

Los animales se sacrificaron, se extrajo la aorta y se colocó en solución de Krebs a 4 °C. A continuación, se eliminó el tejido conectivo y graso circundante y se cortó en anillos de 3 mm de longitud. A través de la luz de cada anillo se introdujeron dos alambres de acero inoxidable y se montó en un baño de 5 ml

con disolución Krebs, a 37 °C gaseada con carbógeno. Con uno de los alambres se fija al baño y el otro se conecta a un transductor isométrico (modelo UF-1, Harvard Apparatus, Inc., EE. UU.). Los cambios de tensión se registran mediante un programa informático para Windows, PowerLab/800 (AD Instruments, Reino Unido).

Tras el montaje, los anillos se ajustan a una tensión de 2 g y se dejan estabilizar 60 minutos, renovando la solución nutritiva cada 30 minutos y reajustando la tensión a 2 g. Después, se comprueba la integridad del endotelio, valorando la respuesta relajante a acetilcolina (Ach) en anillos previamente contraídos con fenilefrina (FE) 10^{-7} M. Posteriormente, se lava la preparación con solución de Krebs y se deja otro periodo de 60 minutos de estabilización y lavado repetido de los baños con nueva solución nutritiva, reajustando la tensión si fuese necesario. A partir de entonces se procede a la realización de curvas concentración-respuesta (C-R) con los siguientes protocolos:

- Curvas concentración-respuesta a verbascósido

El verbascósido se incorporó al baño en concentraciones molares crecientes (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}) tras obtener una respuesta estable o intervalos de 15 minutos.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes

El verbascósido, a distintas concentraciones molares (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}), se añade al baño y se deja incubar durante 15 minutos. A continuación, los anillos se precontraen con fenilefrina (FE, 10^{-7} M) y, cuando se alcanza una meseta de contracción estable, se realizan curvas acumulativas C-R a Ach (10^{-9} - 10^{-4} M), cuya acción relajante es endotelio dependiente y de nitroprusiato sódico (NTP, 10^{-9} - 10^{-4} M), para valorar la relajación independiente de endotelio.

- Curvas concentración-respuesta a agentes contracturantes

De manera similar, tras la incubación, se añaden al baño, de forma acumulativa, concentraciones crecientes de FE (10^{-9} - 3×10^{-4} M). Antes de añadir la siguiente concentración, se espera el tiempo suficiente para obtener una meseta estable de contracción.

- Curvas concentración-respuesta a calcio

En otra serie de experimentos, los anillos de aorta se mantienen durante 1 hora en Krebs libre de calcio. A continuación, se despolariza el tejido con KCl (80 mM) y después de 5 minutos se añaden al baño distintas concentraciones de verbascósido. Transcurridos 20 minutos de incubación se construyen curvas concentración-respuesta a CaCl_2 (0,5-5 mM).

3.2. *Fármacos*

Se utilizaron cloruro de acetilcolina, cloruro de fenilefrina y nitroprusiato sódico dihidratado procedentes de Sigma-Aldrich. Se prepararon disoluciones madre 10^{-1} M a partir de las cuales se prepararon diariamente el resto de las diluciones. El verbascósido fue suministrado por la Dra. Carmen Martín de la Universidad de Sevilla, obtenido de *Acanthus molli*, con un grado de pureza del 97 %. Se preparó una disolución madre 1 M a partir de la cual se realizaron el resto de diluciones.

Los componentes para la disolución de Krebs se obtuvieron de Merk o Panreac. La composición mM es la siguiente: NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; NAHCO₃ 25,0; MgSO₄·7H₂O 1,2; Glucosa 11,1. Una vez gaseada con carbógeno se ajusta el pH a 7,4. Para la solución de Krebs libre de calcio se prescinde del CaCl₂.

3.3. *Análisis de los resultados*

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. En las curvas de contracción los resultados se expresan como mg de contracción y en las de relajación como % respecto a la respuesta obtenida con el agente contracturante.

Para ajustar las curvas dosis respuesta, se utiliza el ajuste a un modelo logístico no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5 (GraphPad software Inc. EE. UU.). En todas las curvas se obtuvo el valor del efecto máximo (Emáx) y pD2 (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50 % del efecto máximo). Para realizar la comparación de las curvas y sus parámetros se utiliza una prueba F de Snedecor, en la cual se considera que las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Curvas concentración-respuesta a verbascósido*

Para valorar el posible efecto vasodilatador del verbascósido, se realizaron curvas C-R en anillos precontraídos con PE 10^{-7} M. Al contrario de lo que esperábamos el verbascósido no produjo vasodilatación, más bien observamos una ligera contracción, por lo que realizamos las curvas C-R en anillos sin contracción previa.

La contracción producida no alcanzó significación estadística frente al control. Tam y col. tampoco observaron cambios en el tono basal de arterias mesentéricas en respuesta a verbascósido (3-300 μ mol/L) (Tam *et al.*, 2002).

4.2. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina

Para evaluar si el verbascósido influía en la acción de otros contracturantes se realizaron curvas concentración-respuesta de FE en presencia de tres concentraciones diferentes de verbascósido en el baño de órganos (Figura 1). La fenilefrina es un agente simpaticomimético con efectos directos principalmente sobre los receptores alfa adrenérgicos.

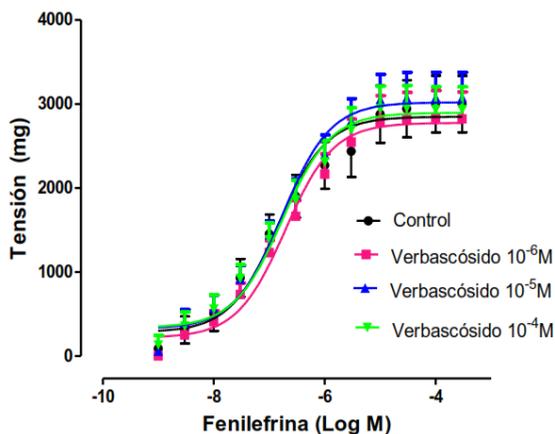


Figura 1. Curvas concentración-respuesta a FE en presencia de verbascósido a diferentes concentraciones.

No hubo una significancia estadística para demostrar que la respuesta de los anillos a FE variaba de algún modo en presencia de verbascósido. En arterias mesentéricas, otros investigadores han demostrado que el verbascósido a concentraciones muy bajas (3-50 $\mu\text{mol/L}$) desplaza la curva de fenilefrina hacia la derecha, sin afectar al efecto máximo de esta, mientras que en un rango de concentraciones similares a las utilizadas por nosotros (100-300 $\mu\text{mol/L}$) esto no ocurría (Tam *et al.*, 2002).

4.3. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh)

La acetilcolina tiene efectos relajantes del tono vascular debido a su interacción con receptores muscarínicos presentes en el endotelio de los vasos. Su activación incrementa las concentraciones de Ca^{2+} endotelial, necesario para la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la producción de óxido nítrico (NO), el cual difunde al músculo liso vascular activando la guanilato ciclasa (GC) e incrementando la producción de GMPc, el cual a su vez dará lugar a la inactivación de

las cadenas ligeras de miosina. El resultado es la relajación de la musculatura lisa vascular, que permite la vasodilatación.

En las curvas C-R se puede observar como la incubación con verbascósido reduce el efecto relajante de la acetilcolina (Figura 2). Ambas curvas son significativamente diferentes con un $p < 0,0001$. Al analizar las tres curvas de las diferentes concentraciones de verbascósido se puede observar que no hay diferencia en la respuesta según la dosis utilizada. Así pues, se trata de un efecto dosis-independiente.

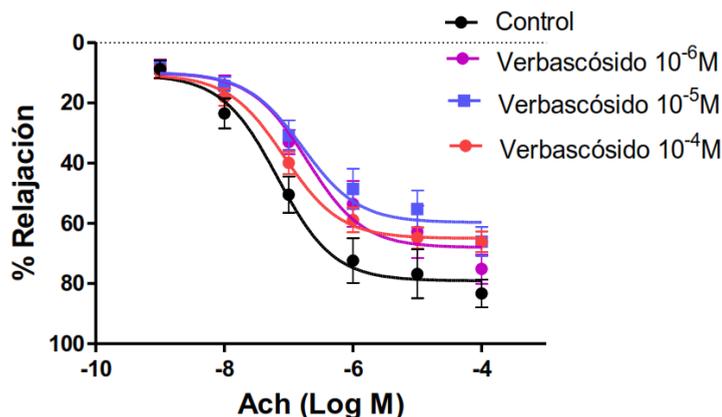


Figura 2. Curva concentración-respuesta a acetilcolina en presencia de verbascósido.

Estos resultados concuerdan con los estudios llevados a cabo por Lau *et al.* en arteria aorta (Lau *et al.*, 2004) y Tam *et al.* (Tam *et al.*, 2002) en arterias mesentéricas, donde el verbascósido disminuye la respuesta vasodilatadora a Ach, debido a la disminución de las concentraciones de GMP en el vaso. También señalan una reducción del incremento del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a Ach (Lau *et al.*, 2004). Esto provocaría que la eNOS no se activase, conllevando una disminución de la respuesta relajante a Ach.

4.4. Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico

Se estudió la acción del verbascósido sobre la respuesta a nitroprusiato sódico (NTP), un compuesto endotelio-independiente, el cual se escinde y libera óxido nítrico. Analizando los resultados vemos que se produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de relajación a NTP (Figura 3), que es dosis-independiente y siendo la concentración intermedia (10^{-5} M) la más efectiva ($p = 0,0002$). A diferencia de lo que ocurre con la Ach, el verbascósido potencia la relajación del NTP

sin afectar a la respuesta máxima. Estos resultados difieren con los obtenidos por otros investigadores, tanto en aorta (Lau *et al.*, 2004), como en vasos mesentéricos (Tam *et al.*, 2002), donde no obtuvieron diferencias en las curvas C-R a NTP.

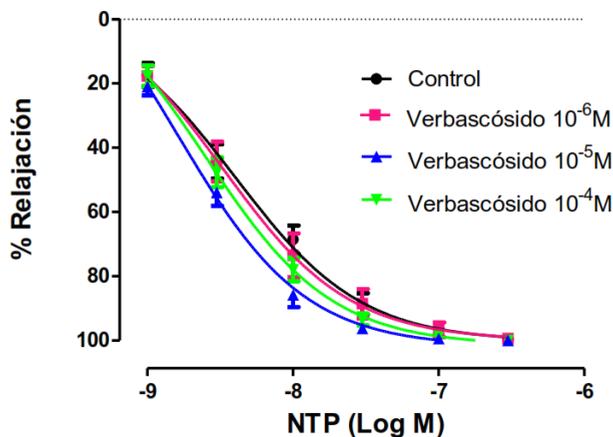


Figura 3. Curva concentración-respuesta de NTP en presencia de verbascósido.

Nuestros resultados podrían explicarse por el efecto antioxidante del verbascósido. Este ha demostrado tener efecto scavenger o captador de radicales libres (Chao-Hsiang *et al.*, 2012), además de inhibir enzimas como la xantina oxidasa (Chao-Hsiang *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2016). Esto aumentaría la biodisponibilidad del NO en el vaso y, por tanto, potenciaría su efecto vasodilatador.

4.5. Curvas concentración-respuesta a calcio

El calcio actúa como mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero; por ejemplo, el ion Ca^{2+} interviene en la contracción de los músculos y de los vasos sanguíneos. Para valorar el efecto del verbascósido en la entrada de calcio a través de canales voltaje-dependientes, se realizaron experimentos de contracción a calcio en medio Krebs con cero calcio. El verbascósido a la dosis de 10^{-5} M reduce ligeramente la entrada de calcio, aunque la diferencia entre las curvas no llega a alcanzar la significación estadística. Así pues, podemos concluir que el verbascósido no interfiere con la entrada de calcio desde el exterior.

En resumen, los resultados *in vitro* de la actividad vascular del verbascósido no explican el efecto antihipertensivo demostrado *in vivo*. Este efecto *in vivo* podría estar relacionado con la escisión del verbascósido en ácido cafeico e hidroxitiroxol (Qi *et al.*, 2013), compuestos que sí han demostrado clara actividad vasodilatadora

(Long *et al.*, 2009; Cicala *et al.*, 2003) y antioxidante (Hu *et al.*, 2014; Bertelli *et al.*, 2020) respectivamente. Por otra parte, se ha descrito un posible efecto inhibitorio de la ECA (Chao-Hsiang *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2003) por parte del verbascósido.

5. CONCLUSIONES

- El verbascósido no afecta al tono basal de los anillos de aorta.
- La incubación con verbascósido no afecta la respuesta contracturante de la fenilefrina.
- La incubación con verbascósido reduce el efecto vasodilatador de la Ach, pero potencia la respuesta vasodilatadora del NTP, siendo ambos efectos independientes de la dosis.
- Además, se descarta que modifique la entrada de calcio a través de canales voltaje-dependientes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aftab K, Ahmad M, Rizwani GH, Uddin Ahmad Anwarul Hasan Gilani V, Perveen Ahmad S. Acteoside: a New Antihypertensive Drug [Internet]. Vol. 9, Phytotherapy Research. 1995. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/303842192>
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. Biotechnology Advances. 2014.
- Andary C, Wylde R, Laffite C, Privat G, Winternitz F. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapum-genistae*. Phytochemistry. 1982.
- Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K *et al.* Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities [Internet]. Journal of Biotechnology. Elsevier B.V.; 2020 [citada 2020 feb 23]; vol. 309:29-33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31884046/>
- Cardinali A, Pati S, Minervini F, D'Antuono I, Linsalata V, Lattanzio V. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. J Agric Food Chem [Internet]. 2012 Feb 22 [citada 2020 Feb 23]; 60(7):1822-1829. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268549/>
- Chen C-H, Song T-Y, Liang Y-C, Hu M-L. Acteoside and 6-O-Acetylacteoside Down-regulate Cell Adhesion Molecules Induced by IL-1 β through Inhibition of ERK and JNK in Human Vascular Endothelial Cells. J Agric Food Chem [Internet]. 2009 Oct 14; 57(19):8852-8859. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf9028333>
- Cicala C, Morello S, Iorio C, Capasso R, Borrelli F, Mascolo N. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. Life Sci. 2003 May 23; 73(1):73-80.

- Hu T, He XW, Jiang JG, Xu XL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects [Internet]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. J Agric Food Chem; 2014 [citada 2020 Feb 23]; vol. 62:1449-1455. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24479643/>
- Lau CW, Chen ZY, Wong CM, Yao X, He Z, Xu H *et al.* Attenuated endothelium-mediated relaxation by acteoside in rat aorta: Role of endothelial [Ca²⁺]_i and nitric oxide/cyclic GMP pathway. Life Sci. 2004.
- Lee JY, Woo ER, Kang KW. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. J Ethnopharmacol. 2005.
- Long Y, Han M, Chen J, Tian X-Z, Chen Q, Wang R. The vasorelaxant effect of caffeic acid phenethyl ester on porcine coronary artery ring segments. Vascul Pharmacol [Internet]. 2009 Aug 5 [citada 2020 feb 23]; 51(2-3):78-83. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153718910900041X>
- Qi M, Xiong A, Li P, Yang Q, Yang L, Wang Z. Identification of acteoside and its major metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2013 Dec 1; 940:77-85.
- Tam WY, Chen ZY, He ZD, Yao X, Lau CW, Huang Y. Enhancement of contraction of rat mesenteric artery by acteoside: Role of endothelial nitric oxide. J Nat Prod [Internet]. 2002 [citada 2020 Feb 23]; 65(7):990-995. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12141858/>
- Wan Y, Zou B, Zeng H, Zhang L, Chen M, Fu G. Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity. Int J Biol Macromol. 2016 Dec 1; 93:609-614.