



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**“ESCRUTINIO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN
ESPECIES AMERICANAS DE MUÉRDAGO”**

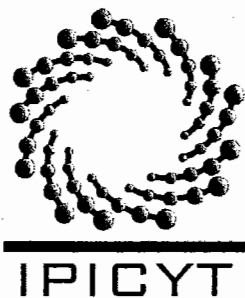
Tesis que presenta
L. en C. (BQ) Mayte Guadalupe Cervantes Badillo

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

En la especialidad de
Biología Molecular

Co-Directores de Tesis
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Roberto Valle Aguilera

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2006



La tesis “**Escrutinio de compuestos bioactivos en especies americanas de muérdago**” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mayte Guadalupe Cervantes Badillo** y aprobada el **06 de Diciembre de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Carlos Barajas López



Dr. Roberto Valle Aguilera

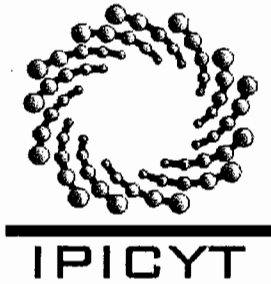


Dr. Luis Antonio Salazar Olivo



Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio 2 del Depto. de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 189522).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 026 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de diciembre del año 2006, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López	Presidente	IPICYT
Dr. Roberto Valle Aguilera	Secretario	UASLP
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mayte Guadalupe Cervantes Badillo

sobre la Tesis intitulada:

Escrutinio de Compuestos Bioactivos en Especies Americanas de Muérdago

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Roberto Valle Aguilera (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 10:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes diciembre de 2006.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A MIS PADRES: GLORIA Y LUIS

A MIS HERMANAS: MELISSA Y HADA

Gracias por su cariño y apoyo aún en la distancia.

Los llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Salazar, por su asesoría, sus consejos y por poner su confianza en mí para la realización de este proyecto.

Al Dr. Roberto Valle Aguilera, por su valiosa contribución en el desarrollo experimental del presente trabajo y su asesoría.

A la Dra. Marisela Gómez y el Dr. Eduardo Estrada, por identificar las especies de muérdago y/o proporcionarnos el material vegetal.

A la Dra. Norma Cárdenas, el Dr. Marco Chávez y Emmanuel Zavalza, por su asesoría y apoyo en la obtención de los extractos orgánicos de muérdago.

A la IZT Cytllalic Rangel, por su apoyo técnico y su compañerismo.

A la Biol. Mireya Sánchez y la M.C. Aurora Londoño, por su asesoría en la extracción y análisis del DNA.

A la QFB Marta P. Huerta, por su asesoría, su apoyo técnico y su disponibilidad en la realización de los experimentos con los anillos aórticos de cobayo. También le agradezco su extraordinaria amistad y su apoyo espiritual.

A mis compañeros de grupo, Candy, Mireya, Rebeca, Ángel y Jacqueline. Por su confianza, su amistad y todo su apoyo (académico y emocional) durante mi estancia en el laboratorio. Fue muy agradable trabajar con ustedes.

A Mercedes Venzor, por su disposición siempre que le necesitamos y por facilitarnos el trabajo con el material del laboratorio.

A todos mis compañeros de la tercera generación: Alex, Elida, Yadira, Jos, Jacinto, Sandra, Lalo, Raquel, Berna, Fer, Claudia y Pablo. Porque todos nos ayudamos de una u otra manera en nuestra formación científica y a crecer como personas.

A todos los Drs. del Depto. de Biología Molecular que intervinieron en mi formación científica durante la maestría, en especial al Dr. Sergio Casas, al Dr. Rubén López Revilla y al Dr. Gerardo Argüello, por ser más que solo mis profesores, por su amistad, su confianza y sus bromas que aligeraban el trabajo.

INDICE

Constancia de aprobación de la tesis	<i>ii</i>
Créditos institucionales	<i>iii</i>
Agradecimientos	<i>v</i>
Lista de figuras	<i>viii</i>
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales y Métodos	8
Resultados	12
Discusión	17
Referencias	22
Pies de figura	27
Figuras	31

LISTA DE FIGURAS

1. Efecto de extractos de <i>Psittacanthus calyculatus</i> sobre células HeLa	31
2. Efecto del extracto acuoso de <i>Phoradendron tomentosum</i> sobre células HeLa	32
3. Efecto de los extractos de muérdago sobre células HeLa	33
4. Patrón de DNA genómico de células HeLa tratadas con los extractos de muérdagos	34
5. Efecto del extracto acuoso de <i>Phoradendron tomentosum</i> sobre la actividad vaso-relajante en anillos aórticos de cobayo	35
6. Efecto del extracto acuoso de hoja de <i>Psittacanthus calyculatus</i> (EAHC) sobre anillos aórticos de cobayo	36
7. Efecto de concentraciones acumulativas del EAHC sobre anillos aórticos	37
8. Papel del endotelio sobre el efecto vaso-relajante del EAHC en anillos aórticos de cobayo	38
9. Efecto del L-NAME sobre la relajación inducida por el EAHC en anillos aórticos de cobayo	39
10. Efecto de donadores de NO sobre la relajación de anillos aórticos carentes de endotelio	40
11. Efecto del EAHC sobre la producción de NO por aorta de cobayo	41

RESUMEN

Los muérdagos son plantas empleadas en medicina tradicional para tratar enfermedades como cáncer e hipertensión, entre otras. Entre los compuestos bioactivos presentes en estas plantas se han identificado viscotoxinas, flavonoides, lectinas y polisacáridos. Actualmente, diversas preparaciones del muérdago europeo, *Viscum album*, se utilizan como auxiliares en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, ya que presentan actividad citotóxica e inmunoestimuladora. Por otra parte, algunos estudios muestran que algunos extractos de muérdagos presentan potencial antihipertensivo. Sin embargo, los estudios controlados sobre las propiedades terapéuticas de este grupo de plantas se han limitado al muérdago europeo. En este trabajo exploramos los efectos biológicos de extractos acuosos y orgánicos obtenidos de los muérdagos americanos *Phoradendron tomentosum* y *Psittacanthus calyculatus*. Extractos acuosos de las hojas de *P. tomentosum* y orgánicos de las hojas y flores de *P. calyculatus* resultaron citotóxicos para las células HeLa de cáncer cervicouterino humano. Por otro lado, el extracto acuoso de *P. calyculatus* presentó un efecto vaso-relajante sobre anillos aórticos de cobayo precontraídos con noradrenalina. Dicho efecto fue dependiente de la concentración del extracto, de la presencia del endotelio en el órgano, y parece actuar a través de la sintasa del óxido nítrico (NOS). Nuestros resultados sugieren que *P. calyculatus* posee propiedades anti-hipertensivas que pueden emplearse en el tratamiento contra enfermedades vasculares.

Palabras clave: Muérdago; *Psittacanthus calyculatus*; *Phoradendron tomentosum*; óxido nítrico; cáncer

ABSTRACT

Mistletoe is employed in folk medicine for treatment of various diseases such as cancer, hypertension and others. Some constituents that have been identified in these plants are viscotoxins, flavonoids, lectins and polysaccharides. At the present, several extracts of european mistletoe, *Viscum album*, are widely used for different types of cancer treatment, since they exert immunomodulatory and cytotoxic properties. Moreover, some trials show that mistletoe extracts exert antihypertensive effects. However, the controlled trials on the therapeutic properties of this group of plants have been limited to the european mistletoe.

In this work, we explored the biological effects of aqueous and organic extracts from the american mistletoes *Phoradendron tomentosum* and *Psittacanthus calyculatus*. Aqueous extracts of the *P. tomentosum* leaves and the organic extracts of the *P. calyculatus* leaves and flowers were cytotoxic to HeLa cells of human cervical cancer. On the other hand, the *P. calyculatus* aqueous extract displayed a vaso-relaxant effect on noradrenaline-precontracted guinea pig aortic rings. This vaso-relaxant effect was concentration- and endothelium-dependent and it seems to act through the nitric oxide synthase (NOS) pathway. Our results suggest that *P. calyculatus* posses anti-hypertensive properties that could be used in the treatment of vascular illness.

Key words: Mistletoe; *Psittacanthus calyculatus*; *Phoradendron tomentosum*; nitric oxide; cancer.

INTRODUCCIÓN

Los muérdagos son plantas hemiparásitas distribuidas mundialmente, que crecen sobre diversas especies arbóreas. El muérdago europeo, *Viscum album*, se ha empleado desde la antigüedad (ca. s IX AC) para el tratamiento de diversas enfermedades como hipertensión, cáncer, epilepsia, afecciones cardíacas y artritis (Mengs y cols., 2002). Esta especie de muérdago es hasta hoy la más estudiada.

Actualmente, diversas preparaciones de *Viscum album* son comercializadas en Europa como auxiliares en el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Ernst, 2002; Kienle y cols., 2003). Los estudios realizados *in vitro* o con animales de laboratorio sugieren que los extractos de muérdago podrían tener una doble actividad: un efecto citotóxico sobre las células tumorales, por una parte, y el fortalecimiento del sistema inmune por la otra (Mengs y cols., 2002). Aunque los estudios clínicos de sus efectos sobre pacientes con cáncer son limitados, algunos trabajos muestran que el empleo de los extractos o las lectinas de muérdago no interfieren con la quimioterapia, no son tóxicos para los pacientes y mejoraron la calidad de vida de los pacientes (Dohmen y cols., 2004; Schöffski y cols., 2004).

El empleo de las preparaciones comerciales de muérdago europeo en pacientes con diversos tipos de cáncer indujo un incremento significativo en las poblaciones de linfocitos B, T CD4⁺, T CD8⁺, y células asesinas (Dohmen y cols., 2004; Kienle y cols., 2003). Las preparaciones de muérdago aumentaron también la actividad de granulocitos, monocitos/macrófagos y células asesinas (Dohmen y cols., 2004; Hajtó y cols., 2005; Heinzerling y cols., 2006; Stein y cols., 1999), así como la expresión de los mRNAs de la interleucina-1 β , -6, IFN- γ y TNF- α , y la secreción de sus proteínas respectivas (Boneberg y Hartung, 2001; Hajtó y cols., 2005; Schöffski y cols., 2004). No obstante, en un trabajo se analizó el efecto de estas citocinas sobre varias líneas de células de cáncer, sin observarse un efecto en la viabilidad celular (Thies y cols., 2005). Estos resultados pueden ser de importancia ya que los pacientes bajo tratamiento anticancerígeno suelen verse afectados en su sistema inmune.

Isorel[®], una preparación comercial de muérdago europeo, resultó citotóxico para células tumorales ascíticas de Ehrlich, células CEM de leucemia humana (Zarkovic y cols., 2001), HT29 de carcinoma humano (Cazacu y cols., 2003), B16F10 de melanoma murino (Zarkovic y cols., 1998; Zarkovic y cols., 2001) y células HeLa de cáncer cervicouterino (Jurin y cols., 1993). Tales efectos citotóxicos fueron, en todos los casos, dependientes de la concentración. Por otro lado, cultivos celulares de fibroblastos normales L929 y V79 resultaron menos sensibles a Isorel[®] que las células malignas (Jurin y cols., 1993; Zarkovic y cols., 2001).

Estudios realizados con Iscador[®]Qu, otra de las preparaciones comerciales compuesta de un extracto acuoso fermentado de *Viscum album*, muestran que éste induce apoptosis y, en algunos casos, necrosis en células de cáncer de pulmón (MR65, NCI-H125 y NCI-H82), de colon (Caco-2), de mama (MCF7) y sobre una línea de células epidérmicas inmortalizadas (HaCaT). La respuesta apoptótica entre cultivos fue variable, ya que hubo líneas insensibles (0.8-4.5% apoptosis), moderadamente sensibles (24-43% apoptosis en 24 h) y extremadamente sensibles (80% apoptosis en 7 h) al tratamiento con Iscador[®]Qu. (Harmsma y cols., 2004).

En estudios *in vivo* sobre ratones con tumores inducidos, por metilcolantreno o por transplante de células cancerígenas, la aplicación de Isorel[®] redujo el tamaño del tumor, causando apoptosis y necrosis acompañada de una respuesta inflamatoria, y destruyó el tejido maligno (Zarkovic y cols., 1997; Zarkovic y cols., 2001). Además, Isorel[®] incrementó la efectividad de la radioterapia y la quimioterapia (ciclofosfamida) al ser empleado como adyuvante (Büsing, 1997; Jurin y cols., 1993).

Las evidencias sugieren que el efecto citotóxico sobre líneas tumorales pueden deberse a más de un componente de los extractos (Mengs y cols., 2002; Thies y cols., 2005; Harmsma y cols., 2004; Lyu y cols., 2001). Entre los componentes del muérdago con efecto citotóxico se han identificado flavonoides, alcaloides, lectinas, viscotoxinas y polisacáridos (Haas y cols., 2003; Kim y cols., 2004; Lee y cols., 1999; Mengs y cols., 2002), siendo las lectinas y las

viscotoxinas los principios activos a los que se les atribuyen los efectos más importantes de los extractos de muérdago.

La medicina tradicional usa también preparaciones de muérdago para el tratamiento de la hipertensión, empleando infusiones o preparaciones fermentadas de extractos alcohólicos-acuosos. Aunque los estudios farmacológicos en este campo son escasos, se han reportado extractos etanólicos o butanólicos de hojas de *Viscum album* con un efecto vaso-relajante sobre el sistema vascular (Deliorman y cols., 2000; Tenorio y cols., 2005).

El efecto vaso-relajante de un extracto butanólico de *V. album* se ensayó sobre anillos aórticos de rata. Dicho extracto produjo una respuesta vaso-constrictora sobre éstos; sin embargo, algunas fracciones derivadas del extracto indujeron una débil relajación del órgano. Por tal motivo, Deliorman y colaboradores sugirieron que el mecanismo de acción de las fracciones era inhibiendo la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en músculo liso vascular. Sin embargo, los resultados no fueron claros, ya que no se encontró una correlación entre el efecto de las fracciones del extracto y un efecto inhibitorio sobre la PDE (Deliorman y cols., 2000).

Por su parte, el efecto vasodilatador del extracto etanólico de hojas de *V. album* se estudió sobre el modelo de corazón aislado y perfundido de Langendorff. El extracto causó una disminución del ~37% en la presión de perfusión, la cual se abatió en presencia de inhibidores de la sintasa de óxido nítrico (NOS), como N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) o tricloruro de gadolinio. Conjuntamente, la producción de óxido nítrico aumentó en presencia del extracto y disminuyó en presencia del extracto e inhibidores de la NOS. Estos datos sugieren que el extracto contiene moléculas con actividad vasodilatadora que pueden actuar como inductores de la vía del óxido nítrico (Tenorio y cols., 2005).

Aunque las especies americanas de muérdago han sido poco estudiadas hasta ahora, su empleo en la medicina tradicional es igualmente extenso y estudios recientes sugieren que los muérdagos americanos pueden ser también una importante fuente de compuestos bioactivos (Johansson y cols., 2003; Rodríguez-Cruz y cols., 2003).

Extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de tallos, hojas o inflorescencias de las especies de muérdago americano *Cladocolea grahami*, *Phoradendron reichenbachianum* y *Phoradendron galeottii* mostraron diverso grado de citotoxicidad. La actividad citotóxica de dichos extractos se probó sobre cultivos de células de cáncer humano de ovario (OVCAR-5), nasofaríngeo (KB), de cervix (UISO-SQC-1) y de colon (HCT-15) y sobre células de leucemia murina (P388). Las tres especies de muérdago presentaron actividad citotóxica sobre los cultivos OVCAR, P388 Y UISO; ninguna presentó actividad importante contra el cáncer de colon y sólo *P. reichenbachianum* fue activa contra las células KB (Waizel y cols., 1994). Posteriormente, el extracto con acetona de *P. reichenbachianum* se estudió fitoquímicamente. Durante el proceso de purificación de compuestos activos, se monitoreó por la actividad citotóxica de las fracciones derivadas del extracto sobre células HCT-15. De aquí, las moléculas citotóxicas que se aislaron e identificaron fueron el ácido morónico y un nuevo triterpeno (ácido 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioico) (Ríos y cols., 2001).

Por otra parte, un extracto etanólico crudo de *Psittacanthus calyculatus* también presentó un efecto vaso-relajante en anillos aórticos de rata, el cual fue dependiente de la concentración. En este caso, los resultados indican que el mecanismo de acción es a través del endotelio. La incubación del tejido aórtico con el extracto etanólico y L-NAME abolió la relajación de los anillos precontraídos. Estos resultados indican que la relajación del tejido aórtico, inducida por el extracto, involucra la síntesis y liberación de óxido nítrico de las células endoteliales. Entre las posibles moléculas bioactivas se encuentran los flavonoides (Rodríguez-Cruz y cols., 2003). De acuerdo con las evidencias, el efecto vaso-relajante del muérdago sobre los vasos sanguíneos es mediado por el endotelio, a través de la vía de señalización que involucra la NOS.

Las patologías cardiovasculares son de gran impacto a nivel mundial, por lo que muchos grupos trabajan en la búsqueda de nuevos fármacos sintéticos o naturales para el tratamiento de dichas enfermedades. Se ha reportado que polifenoles de vino tinto (Andriambeloson y cols., 1997), extractos de *Maytenus ilicifolia* (Rattmann y cols., 2006), *Flos chrysanthemi* (Jiang y cols., 2005), *Persea*

americana (Owolabi y cols., 2005) y *Eleutherococcus senticosus* (Kwan y cols., 2004), entre otros, tienen un efecto vasodilatador que depende del endotelio y actúa a través de la vía del óxido nítrico. Dado que son pocos los estudios sobre las especies de muérdago americano, en este trabajo abordamos el potencial citotóxico y vaso-relajante de los extractos obtenidos de los muérdagos americanos *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal.

Ejemplares de muérdago de la especie *Phoradendron tomentosum* (DC) A. Gray se colectaron de árboles de mezquite de la especie *Prosopis glandulosus* Torr. var. *Torreyana* M.C. Johnst., que crecían en el ejido El Pajonal, Sta. Catarina, Nuevo León. Ejemplares de *Psittacanthus calyculatus* se colectaron de mezquites de la especie *Prosopis laevigata* (Wild) M.C. Johnst., ubicados en jardines públicos en la ciudad de Querétaro, Qro. La identidad del material botánico colectado, tanto de muérdagos como de sus hospederos, fue determinada por especialistas en taxonomía vegetal (M. Gómez-Sánchez, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y A.E. Estrada-Castañón, Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Naturales de la Universidad Autónoma de Nuevo León). Ejemplares de cada colecta de material botánico se depositaron en los herbarios de las instituciones señaladas (CFNL y QMEX, respectivamente).

Obtención de extractos.

Las partes aéreas de los ejemplares de muérdago se separaron en hojas y flores y se secaron sobre charolas de papel sin luz directa. Para la obtención de los extractos orgánicos, un kg de hojas o flores de *Psittacanthus calyculatus* pulverizadas se extrajeron de manera secuencial con hexano, diclorometano y etanol absoluto. En cada caso, las muestras se sometieron a una maceración inicial con 350 ml del solvente, seguida de percolaciones de aprox. 20 l con el mismo solvente. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente. Los extractos se concentraron por separado en rotavapor (28°C, 80 rpm). Una porción de las fracciones crudas se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener soluciones con 500 mg/ml del extracto etanólico, 100 mg/ml del extracto diclorometánico y 20 mg/ml del extracto hexánico.

Los extractos acuosos se obtuvieron de 100 g de hojas secas y pulverizadas extraídas con 500 ml con solución salina amortiguada con fosfatos

(PBS; KCl 2.7 mM, NaCl 0.14 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM) y agitación constante durante 12 horas a 4°C. Los extractos acuosos se centrifugaron a 12,000 rpm, por 30 min., a 4°C, en una centrífuga Sorvall RC5C Plus (Kendro Laboratory Products; Asheville, NC, USA) y los sobrenadantes recuperados se filtraron a través de papel Whatman (Whatman Internacional Ltd., Maidstone, England) y filtros de 0.45 µm (Millipore, Ireland) para eliminar los restos de material particulado. Posteriormente, los extractos se dializaron a través de una membrana Spectra/Por (SPECTRUM; Gardena, CA, USA) con tamaño de poro de 1 kDa contra agua bidestilada (650 volúmenes aprox.). Los extractos se esterilizaron por filtración a través de membranas con poros de 0.22 µm (Millipore, Ireland) previamente a su uso en cultivo celular.

Ensayos de citotoxicidad.

Células HeLa de cáncer cervicouterino humano se inocularon en placas de 24 pozos (Costar; Corning, NY, USA) a una densidad de 5×10^3 células/cm² en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) adicionado con 7% de suero de ternera (HyClone; Logan, UT, USA) (medio basal; MB); y se incubaron a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de 48 h, los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de los distintos extractos en MB y la supervivencia celular se evaluó mediante recuentos celulares en hematímetro, realizados por triplicado cada 24 o 48 h.

Extracción de DNA.

El DNA de las células tratadas con los extractos se extrajo con un ensayo para purificación de DNA genómico Wizard (Promega; Madison, WI, USA). Después de una precipitación con etanol, 2.5 µg de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 50 V durante 2 h. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio bajo luz UV.

Ensayos de vasodilatación.

Los experimentos se llevaron a cabo sobre anillos aórticos de cobayo macho de la cepa Hartley, con peso de 600 a 700 g. Los animales se mantuvieron con acceso a comida y agua, expuestos a ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los animales se sacrificaron con una dosis letal de 0.063g/kg de peso de pentobarbital sódico (Pfizer). Luego de que los animales perdieron el reflejo ocular, se disecó la arteria aorta, la cual se limpió de tejido adiposo y conectivo. La aorta se cortó transversalmente en anillos de 2 mm de longitud, evitando dañar el endotelio.

Los anillos aórticos de cobayo se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs (NaCl 128 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄·7H₂O 1.17 mM, NaHCO₃ 14.9 mM, KH₂PO₄ 1.11 mM, CaCl₂·2H₂O 1.1 mM, 5 g/L dextrosa) conectados a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo Grass 7D (Grass Instruments Co.; Quincy, Mass, USA). A los órganos se les aplicó una tensión inicial de 625 mg y luego de 30 min. de estabilización se indujo la contracción en los anillos aórticos con 5 μM de noradrenalina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Posteriormente, sobre este sistema se ensayaron las propiedades vaso-relajantes de los extractos acuosos de hojas de *Phoradendron tomentosum* (EAHT) o de *Psittacanthus calyculatus* (EAHC). En algunos experimentos se adicionó al ensayo N^ϑ-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico, o nitroprusiato de sodio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), un donador de óxido nítrico. En otros experimentos el endotelio se removió frotando el interior del anillo con un palillo de madera para analizar su efecto en la contracción. La señal poligráfica se procesó a través de un sistema de adquisición de datos consistente del convertidor analógico/digital PolyVIEW versión 2.5 (Grass Product Group; West Warwick, RI, USA) y los datos se almacenaron en una computadora para su análisis.

Cuantificación de nitritos.

Para detectar la producción de óxido nítrico por los anillos aórticos, analizamos su producto final estable, NO₂⁻, por la reacción de Griess (Miranda y

cols., 2001; Sun y cols., 2003). Brevemente, porciones de aortas de cobayo equivalentes a 4 anillos (8 mm) se incubaron en solución de Krebs, pH 7.4, a 37°C con oxigenación, en presencia de 1.25% de EAHC, con o sin L-NAME (600 µM). Luego de 10 min. el medio de incubación se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su uso. Alícuotas de 50 µl del medio de incubación se distribuyeron en una placa de 96 pozos, a cada uno de los cuales se adicionaron 50 µl de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) al 1% en ácido fosfórico 2.5% (J.T.Baker, México). Las mezclas se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 50 µl de N-1-Naftiletildiamina dihidroclorada (Sigma-Aldrich) al 0.1% a cada pozo y las preparaciones se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la reacción, se midió la absorbencia a 570 nm en un lector de microplacas (BioRad modelo 550; Hercules, CA, USA). La concentración de NO₂⁻ en las muestras se calculó a partir de una curva estándar de nitrito de sodio preparada para cada experimento.

Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por una ANOVA de un solo factor y los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como diferencia significativa.

RESULTADOS

Obtención de extractos de muérdago.

Colectamos muérdagos de las especies *Phoradendron tomentosum* y *Psittacanthus calyculatus*, los cuales crecían sobre árboles del género *Prosopis*. Separamos las hojas y las flores, las secamos a temperatura ambiente protegidas del sol y obtuvimos harinas de los materiales secos, con las cuales preparamos los distintos extractos. De *P. calyculatus* obtuvimos siete extractos: un extracto foliar acuoso, tres extractos foliares con solventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, diclorometano y etanol) y tres extractos florales con solventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, diclorometano y etanol). De *P. tomentosum* obtuvimos un extracto acuoso de las hojas.

Efecto citotóxico de los extractos de muérdago.

Preparaciones acuosas del muérdago europeo *Viscum album* se emplean actualmente como adyuvantes en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Dado que se conoce poco acerca de las propiedades anticancerígenas de las especies americanas, ensayamos el efecto citotóxico de los extractos obtenidos de *P. calyculatus* y *P. tomentosum* sobre las células HeLa de cáncer cervicouterino humano.

Los efectos de los extractos obtenidos de *P. calyculatus* sobre las células HeLa se muestran en la figura 1. El extracto acuoso foliar de *P. calyculatus* (EAHC) no presentó efectos citotóxicos sobre las células HeLa a ninguna de las concentraciones ensayadas (1, 3, 5 y 10%). Por el contrario, algunos de los extractos orgánicos obtenidos de las hojas o de las flores de esta especie de muérdago sí presentaron una actividad citotóxica dependiente de la concentración (figura 1B y 1C). El extracto diclorometánico de hoja (EDHC) no presentó efectos citotóxicos sobre las células HeLa a concentraciones bajas (40 y 100 $\mu\text{g/ml}$). No obstante, con 250 $\mu\text{g/ml}$ del EDHC se observó un efecto citostático sobre las

células HeLa, mientras que con 500 $\mu\text{g/ml}$ del EDHC se obtuvo un efecto citotóxico del 96% (figura 1B). Por su parte, el extracto diclorometánico floral (EDFC) presentó una actividad citotóxica más potente que el EDHC, ya que se observó un efecto citotóxico del 100% con 250, 400 y 500 $\mu\text{g/ml}$ (figura 1C). Por otro lado, concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del extracto hexánico floral de *P. calyculatus* (EHFC) mostraron solo efectos citostáticos sobre las células HeLa, ya que la densidad celular de los cultivos tratados con tales concentraciones no cambió a lo largo del tratamiento (figura 1D).

Los resultados del tratamiento de las células HeLa con el extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* (EAHT) se presentan en la figura 2. Con 0.5% (v/v) del EAHT se obtuvo un efecto citostático y con 1 y 5% (v/v) del extracto se obtuvo un efecto citotóxico del 100% (figura 2A). Dado que se han reportado proteínas termo-resistentes presentes en extractos acuosos de *Viscum* y *Phoradendron* con efecto citotóxico sobre células cancerosas (Mengs y cols., 2002; Johansson y cols., 2003), incubamos el EAHT a 100°C por 15 min. a fin de caracterizar los componentes citotóxicos del extracto. El EAHT tratado perdió su efecto citostático a 0.5%(v/v) y citotóxico al 1% (v/v) aunque mantuvo cierta citotoxicidad, ya que el 5% (v/v) mantuvo un efecto citotóxico del 100% (figura 2B).

Como se observa en las micrografías, las células de los cultivos control y tratados con DMSO se mantuvieron en buen estado (Figura 3A y 3B). Sin embargo, las células tratadas con los diferentes extractos mostraron daños como fragmentación celular y discontinuidad de la membrana celular (Figura 3 C-G).

Una vez que identificamos los extractos con actividad citotóxica sobre las células HeLa, nos preguntamos si dicho efecto induce muerte celular programada (apoptosis) o necrosis. Para ello, tratamos cultivos celulares confluentes con los distintos extractos a las concentraciones citotóxicas máximas. Posteriormente, extrajimos el DNA genómico a las 48 o 72 h de tratamiento y lo analizamos mediante electroforesis. En caso de tratarse de apoptosis veríamos un patrón de degradación característico, con bandas discretas de múltiplos de 180-200 pb. La necrosis es un evento no controlado que resulta de la pérdida de homeostasis, donde el contenido celular se dispersa. No obtuvimos un patrón claro de apoptosis

con los extractos orgánicos de *P. calyculatus* (figura 4A) o los acuosos de *P. tomentosum* (figura 4B). Sin embargo, el DNA de las células incubadas con los extractos presenta cierto grado de degradación, lo cual no se observa en las células control.

Efecto vaso-relajante de extractos de muérdago

Otra de las propiedades que la medicina tradicional atribuye a algunas especies de muérdago es la actividad anti-hipertensiva. Para determinar si las especies de muérdago estudiadas tienen potencial anti-hipertensivo, analizamos su capacidad vaso-relajante sobre anillos aórticos de cobayo macho adulto. El EAHT no presentó un efecto relajante; por el contrario, los anillos aórticos tratados con este extracto sufrieron una contracción mayor e irreversible, ya que luego de retirarles el EAHT y lavarlos permanecieron contraídos (Figura 5).

Por el contrario, el EAHC presentó un efecto vaso-relajante sobre los anillos aórticos de cobayo contraídos con noradrenalina (5 μ M); dicho efecto dependió de la concentración, tanto en ensayos con dosis únicas (figura 6) o acumulativas (figura 7). En ambos casos se obtuvo casi un 100% de relajación con la máxima concentración, 10% (v/v) del EAHC. Luego de aplicar el extracto lavamos los anillos con solución de Krebs y aplicamos noradrenalina para comprobar el estado del anillo; la respuesta contráctil se mantuvo (datos no mostrados), lo cual evidencia que no hubo daño del tejido aórtico.

En los ensayos hasta aquí realizados, la aplicación de los extractos indujo un incremento variable y transitorio (EAHC) o permanente (EAHT) de la contracción en los anillos aórticos. Dado que tal contracción puede deberse a la presencia de iones potasio en los extractos, sometimos éstos a diálisis, con lo que la concentración de potasio pasó de 122 mEq/L a 0.5 mEq/L. Tras la eliminación del potasio, el efecto vaso-relajante del EAHC mejoró notablemente, ya que una concentración de 1.25% (v/v) relajó un 90% los anillos aórticos contraídos con noradrenalina (figura 8A), es decir, una concentración casi 10 veces menor que la empleada en las condiciones anteriores.

En la curva de respuesta mostrada en la figura 8A, una concentración tan baja como 0.156% (v/v) del EAHC ocasionó una relajación del órgano del 27%, aunque con una caída lenta pero significativa. Con el 0.312% (v/v) obtuvimos una relajación del 67%, cuya caída fue mas rápida y definida. Con 0.625% (v/v) y 1.25% (v/v) el tejido se relajó un 86% y 90% respectivamente, aunque la diferencia entre estas dos últimas concentraciones no fue estadísticamente significativa. En el recuadro de la figura 8A se muestra la respuesta relajante de diez anillos aórticos (correspondientes a cinco cobayos) a las distintas concentraciones.

Dado que el efecto vaso-relajante del EAHC puede actuar a través del endotelio, o bien directamente sobre el músculo liso vascular, realizamos algunos ensayos sobre anillos aórticos sin endotelio. Luego de la remoción de éste, la respuesta relajante del EAHC se abolió, lo cual indica que los compuestos activos actúan a través del endotelio (figura 8B).

Una de las principales vías vaso-relajantes que trabajan a través del endotelio involucra la sintasa del óxido nítrico (NOS). En esta vía, el NO producido por las células endoteliales difunde a las células de músculo liso y estimula la síntesis de GMPc, dando como resultado la relajación del vaso. A fin de determinar si el EAHC actúa a través de la vía NOS, indujimos la contracción de los anillos aórticos de cobayo en ausencia y en presencia de 600 μ M de N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor competitivo de la NOS. La aplicación de 1.25% del EAHC a anillos aórticos precontraídos en ausencia de L-NAME indujo una relajación del órgano de aproximadamente el 90%, confirmando los resultados anteriores (figura 9A). Por el contrario, la presencia del inhibidor de NOS canceló el efecto vaso-relajante del extracto de muérdago (figura 9B).

La participación del NO en el efecto vaso-relajante del EAHC se evaluó adicionalmente ensayando el efecto de un compuesto donador de NO sobre el sistema y cuantificando la deposición de nitritos inducida por el EAHC. Anillos aórticos carentes de endotelio, precontraídos con noradrenalina, mostraron una relajación total cuando se les aplicó 0.1 μ M de nitroprusiato de sodio (figura 10A), un compuesto que libera NO (Moncada y cols., 1988). Ensayos paralelos tratados con 10% de EAHC no mostraron relajación alguna sino cuando se adicionó al

ensayo el nitroprusiato de sodio (figura 10B). Por otro lado, la concentración de nitritos (los productos finales estables del NO) aumentó marcadamente en el medio de ensayo de los anillos aórticos, cuando estos se trataron con EAHC y disminuyó significativamente cuando los tejidos se incubaron en presencia del extracto y el inhibidor de la NOS, L-NAME (figura 11).

DISCUSIÓN

El muérdago ha sido empleado en medicina tradicional para tratar enfermedades como cáncer e hipertensión. Diversas preparaciones de muérdago con diferencias en su composición debidas al método de preparación, al árbol hospedero y la época de colecta, son actualmente comercializadas como una terapia complementaria en el tratamiento contra el cáncer (Mengs y cols., 2002). Los estudios realizados a la fecha para evaluar el potencial anticancerígeno de extractos derivados del muérdago muestran que éstos tienen actividad citotóxica sobre líneas celulares cancerígenas (Cazacu y cols., 2003; Harmsma y cols., 2004; Jurin y cols., 1993; Ríos y cols., 2001; Waizel y cols., 1994; Zarkovic y cols., 1998; Zarkovic y cols., 2001). Así mismo, su uso disminuye el tamaño de tumores en animales de laboratorio (Zarkovic y cols., 1997; Zarkovic y cols., 2001), mejora los resultados de la quimioterapia y la radioterapia (Büsing, 1997; Jurin y cols., 1993) y estimula el sistema inmune induciendo la secreción de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6 (Boneberg y Hartung, 2001; Thies y cols., 2005; Stein y cols., 1999). Por otro lado, algunos reportes muestran actividad anti-hipertensiva de algunas preparaciones de muérdago (Deliorman y cols., 2000; Rodríguez-Cruz y cols., 2003). En este trabajo estudiamos el potencial anticancerígeno y anti-hipertensivo de diversos extractos obtenidos de las especies de muérdago *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum*, dos especies de plantas nativas que se emplean en la medicina tradicional y pueden ser una importante fuente de compuestos bioactivos. Obtuvimos extractos acuosos de ambas especies y extractos orgánicos de polaridad creciente de hojas y flores de *P. calyculatus*. Esto nos permitió monitorear la presencia de moléculas con actividad citotóxica o vaso-relajante de distinta naturaleza química.

El potencial anti-cancerígeno de los extractos se evaluó sobre células HeLa de cáncer cervicouterino, tomando como parámetros la proliferación celular y la integridad del DNA. Nuestros resultados muestran que las especies estudiadas de muérdagos americanos poseen compuestos citotóxicos sobre células de cáncer

cervicouterino humano. Aunque el extracto acuoso de hojas de *P. calyculatus* no tuvo efecto citotóxico sobre las células HeLa, el extracto acuoso de *P. tomentosum* y las fracciones orgánicas de hojas y flores de *P. calyculatus* presentaron efectos citotóxicos sobre las células HeLa, los cuales dependieron de la concentración. Las fracciones orgánicas más potentes de *P. calyculatus*, fueron las de diclorometano (DCM) de flor y hoja, lo que denota la presencia de compuestos de mediana polaridad. Trabajos anteriores reportan fracciones medianamente polares (extracción con acetona) con actividad citotóxica de otras especies de muérdagos americanos (Ríos y cols., 2001; Waizel y cols., 1994).

La incubación del extracto acuoso de *P. tomentosum* a 100°C nos permitió concluir que la actividad citotóxica se debe a la presencia de moléculas termolábiles y termoestables. Estas últimas pudieran corresponder a tioninas, las cuales se han descrito en *Viscum album* (Mengs y cols., 2002) y en el género *Phoradendron* (Johansson y cols., 2003; Li y cols., 2002). Las tioninas son polipéptidos termoestables que se componen de 46 a 50 aminoácidos. Su citotoxicidad está asociada con un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, dando lugar a una despolarización e influjo de iones Ca^{2+} , generando daño mitocondrial, lo que da lugar a la muerte celular (Johansson, 2003). Se ha mostrado que estas proteínas también generan especies de oxígeno reactivo, e inducen la expresión de la proteína de membrana mitocondrial Apo2.7, un marcador para la detección de células apoptóticas (Johansson y cols., 2003).

Por otra parte, el efecto citotóxico termolábil pudiera corresponder a las lectinas, las cuales se han identificado tanto en *Viscum* como en *Phoradendron* como los principios activos del muérdago (Lee y cols., 1999; Luther y cols., 1980; Olsnes y cols., 1982; Thies y cols., 2005; Valentiner y cols., 2002). Las lectinas de muérdago inducen apoptosis por un mecanismo que aun no es claro y tienen actividad de RNA *N*-glicosidasa: hidrolizan un enlace específico del rRNA 28S de los ribosomas, inactivando así la síntesis de proteínas (Endo y cols., 1989).

Varias líneas celulares en presencia de extractos de muérdago sufren apoptosis, ya que muestran alteraciones apoptóticas típicas, tal como contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Bonenberg y

Hartung, 2001; Mengs y cols., 2002). Los cultivos celulares tratados con nuestros extractos sufrieron deterioro y muerte celular, tal como se muestra en las micrografías y las curvas de proliferación. Nuestros resultados sugieren que el tipo de muerte inducida por los extractos es necrosis, puesto que después de dos días de tratamiento se observa un barrido en el DNA genómico de las células incubadas con los extractos, más no se distingue la degradación típica de la apoptosis. Algunas estrategias que pueden seguirse para descifrar el mecanismo de muerte celular inducida por los extractos de muérdago ensayados incluyen la identificación con anticuerpos de caspasas en estado activo, proteínas que sufren degradación durante la apoptosis como gelsolina, paxilina, vimentina, citoqueratina 18 o anexina V. Otra vía de apoptosis es a través de la pérdida de la integridad de la mitocondria, por lo que de reactivos como 2',7'-diclorofluoresceína diacetato o clorometil-X-rosamina son de gran utilidad (Harmsma y cols., 2004; Lavastre y cols., 2002).

Otro de los usos del muérdago en la medicina tradicional es su putativo efecto anti-hipertensivo. En el presente trabajo probamos los extractos acuosos de *P. tomentosum* (EAHT) y *P. calyculatus* (EAHC). El EAHT no mostró efectos vaso-relajantes, ya que al aplicarlo en el ensayo obtuvimos una mayor contracción del órgano. Por el contrario, al aplicar 10% (v/v) del EAHC sobre los anillos aórticos contraídos, obtuvimos una vasodilatación casi total, a pesar del alto contenido de sales de potasio que contenía el extracto *per se*. Luego de dializarlo, su eficiencia aumentó diez veces. El efecto vaso-relajante del EAHC dependió de la concentración. La relajación debida al EAHC fue del ~90%, muy superior al mostrado por extractos butanólicos obtenidos de *V. album*, los cuales tuvieron solo un 25% de efecto relajante (Deliorman y cols., 2000). Además, la relajación inducida por el EAHC no fue transitoria como en el caso extractos etanólicos de esta misma planta obtenidos por otros grupos (Rodríguez-Cruz y cols.; 2003), ya que en nuestro caso la relajación se mantuvo al menos por 20 minutos.

Nuestros resultados muestran que el EAHC actúa a través del endotelio, ya que la eliminación de éste abolió el efecto relajante en su totalidad. Existen dos vías de relajación no transitoria dependientes del endotelio, i) por la acción de la

prostaciclina o ii) por la acción de óxido nítrico (NO). La relajación inducida por el EAHC no se afectó en presencia de indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, una enzima clave en la síntesis de prostaciclina (datos no mostrados). Por el contrario, el efecto vaso-relajante del EAHC se suprimió completamente con L-NAME, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NOS). Ese compuesto inhibe también la producción de NO inducida por el EAHC en los anillos aórticos. Estos resultados apuntan a que la síntesis y liberación del NO está involucrada en la respuesta relajante.

Los efectos del NO derivado del endotelio son versátiles por lo que tienen una gran influencia en la función e integridad vascular. Los ratones carentes de eNOS (eNOS $-/-$) son viables y fértiles, sin embargo presentan hipertensión, pobre actividad vaso-relajante, tienen válvulas aórticas anormales, problemas de crecimiento, agregación de plaquetas y adhesión de leucocitos (Albrecht y cols, 2003; Li y Förstermann, 2000). En vista de los efectos protectores del NO, los compuestos que incrementen la actividad de eNOS y/o su expresión son de gran interés terapéutico.

Diversos flavonoides, lignanos y compuestos fenólicos han sido identificados como principios activos presentes en muérdago. En nuestros ensayos, sin embargo, este tipo de compuestos se perdieron durante la diálisis de los extractos, ya que su peso es menor a 1 kDa. Por tanto, pudiera ser que las sustancias responsables de los efectos observados sean macromoléculas como azúcares, polifenoles, proteínas, etc. Experimentos de fraccionamiento del EAHC actualmente en curso, permitirán identificar la naturaleza de los compuestos responsables del efecto vaso-relajante.

En conclusión, nuestros resultados muestran diversas actividades biológicas de *P. calyculatus* y *P. tomentosum*, puesto que el extracto acuoso de *P. calyculatus* no presentó un efecto citotóxico como el de *P. tomentosum*. Por otro lado, el extracto acuoso de *P. calyculatus* mostró un efecto vaso-relajante, mientras que el extracto de *P. tomentosum* llevó al anillo aórtico a un estado de contracción mayor e irreversible. Respecto a los extractos orgánicos de *P. calyculatus*, solo los extractos diclorometánicos de hoja y flor, y el hexánico de flor

presentaron un efecto citotóxico. Tanto el efecto citotóxico como el relajante dependieron de la concentración.

Dentro de las perspectivas del presente trabajo está la separación de los extractos, ya sea por métodos químicos o bioquímicos, a fin de identificar los compuestos puros responsables de la actividad citotóxica y de la actividad vaso-relajante. Con ello no solo se podrían identificar nuevos fármacos y sus mecanismos de acción, sino que además es posible llegar a un conocimiento más profundo de las funciones celulares.

REFERENCIAS

- Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H (2003) Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* **199**:8-17
- Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R (1997) Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* **120**:1053-1058
- Boneberg EM, Hartung T (2001) Mistletoe lectin-1 increases Tumor Necrosis Factor- α release in Lipopolysaccharide-stimulated whole blood via inhibition of Interleukin-10 production. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:996-1000
- Büsing A (1997) Mistletoe: a history with an open end. *Anticancer Drugs* **8** (supl. 1):1-2
- Cazacu M, Oniu T, Lungoci C, Mihailov A, Cipak A, Klinger R, Weiss T, Zarkovic N (2003) The influence of Isorel on the advanced colorectal cancer. *Cancer Bioth Radioph* **18**:27-34
- Deliorman D, Calis I, Ergun F, Dogan BS, Buharalioglu CK, Kanzik I (2000) Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album ssp. album*. *J Ethnopharmacol* **72**:323-329
- Dohmen W, Breier M, Mengs U (2004) Cellular immunomodulation and safety of standardized aqueous mistletoe extract PS76A2 in tumor patients treated for 48 weeks. *Anticancer Res* **24**:1231-1238
- Endo Y, Oka T, Tsurugi K, Franz H (1989) The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* **248**:115-118
- Ernst E (2002) Cancer therapy with mistletoe: Hope or hype? *J Herb Pharmacother* **2**:3-5
- Haas K, Bauer M, Wollenweber E (2003) Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. *Z Naturforsch* **58c**:464-470
- Hajtó T, Hostanska K, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P. (2005) Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album*

- Agglutinin-I*): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:59-67
- Harmsma M, Grommé M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FCS (2004) Differential effects of *Viscum album* extract Iscador®Qu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **25**:1521-1529
- Heinzerling L, Von Baehr V, Liebenthal C, Von Baehr RD, Volk HD (2006) Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. *J Clin Immunol* **26**:347-359
- Jiang HD, Cai J, Xu JH, Zhou XM, Xia Q (2005) Endothelium-dependent and direct relaxation induced by ethyl acetate extract from *Flos Chrysanthemi* in rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol* **3**:221-226
- Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Ek B, Thunberg E, Samuelsson G, Larsson R, Bohlin L, Claeson P (2003) Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cell Mol Life Sci* **60**:165-175
- Jurin M, Zarkovic N, Hrzenjak M, Ilic Z (1993) Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album* L. preparation Isorel®. *Oncology* **50**:393-398
- Kienle GS, Berrino F, Büssing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H (2003) Mistletoe in cancer. A systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* **8**:109-119
- Kim YK, Kim YS, Choi SU, Ryu SY (2004) Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. *Arch Pharm Res* **27**:44-47
- Kwan CY, Zhang WB, Sim SM, Deyama T, Nishibe S (2004) Vascular effects of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*): endothelium-dependent NO- and EDHF-mediated relaxation depending on vessel size. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**:473-480

- Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K, Girard D (2002) Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* Agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* Agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal Paxillin and Vimentin proteins via caspases. *J Immunol* **168**:1419-1427
- Lee HS, Kim YS, Kim SB, Choi BE, Woo BH, Lee KC (1999) Isolation and characterization of biologically active lectin from Korean mistletoe, *Viscum album* var. *Coloratum*. *Cell Mol Life Sci* **55**:679-682
- Li H, Förstermann (2000) Structure-activity relationship of staurosporine analogs in regulating expression of endothelial nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **57**:427-435
- Li S, Gullbo J, Lindholm P, Larsson R, Thunberg E, Samuelsson G, Bohlin L, Claeson P (2002) Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochem J* **366**:405-413
- Luther P, Theise H, Bishnu C, Karduck D, Uhlenbruck G (1980) The lectin from *Viscum album* L.- Isolation, characterization, properties and structure. *Int J Biochem* **11**:429-435
- Lyu SY, Park WB, Choi KH, Kim WH (2001) Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:534-541
- Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E (2002) Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res* **22**:1399-1408
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**:62-71
- Moncada S, Palmer R, Higgs EA (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrosovasodilator. *Hypertension* **12**:365-372
- Olsnes S, Stripe F, Sandvig K, Pihl A (1982) Isolation and characterization of Viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). *J Biol Chem* **257**:13263-13270

- Owolabi MA, Jaja SI, Coker HAB (2005) Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia* **76**:567-573
- Rattmann YD, Cipriani TR, Sasaki GL, Iacomini M, Rieck L, Marques MCA, da Silva-Santos JE (2006) Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (*Celastraceae*) leaves. *J Ethnopharmacol* **104**:328–335
- Ríos MY, Salinas D, Villarreal ML (2001) Cytotoxic Activity of Moronic Acid and Identification of the New Triterpene 3,4-seco-Olean-18-ene-3,28-dioic Acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Med* **67**:443-446
- Rodríguez-Cruz ME, Pérez-Ordaz L, Serrato-Barajas BE, Juárez-Oropeza MA, Mascher D, Paredes-Carbajal (2003) Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *J Ethnopharmacol* **86**:213-218
- Schöffski P, Riggert S, Fumoleau P, Campone M, Bolte O, Marreaud S, Lacombe D, Baron B, Herold M, Zwierzina H, Wilhelm-Ogunbiyi K, Lentzen H, Twelves C (2004) Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumine) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for research and treatment of cancer new drug development group. *Ann Oncol* **15**:1816-1824
- Stein GM, Pfüller U, Schietzel M (1999) Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album* L.) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Res* **19**:2925-2928
- Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H (2003) Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* **3**:276-284
- Tenorio FA, del Valle L, González A, Pastelín G (2005) Vasodilator activity of aqueous extract of *Viscum album*. *Fitoterapia* **76**:204-209
- Thies A, Nugel D, Pfüller U, Moll I, Schummacher U (2005) Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of melanoma cells in vitro. *Toxicology* **207**:105-116

- Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U (2002) The cytotoxic effect of mistletoe lectins I,II and III on sensitive multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. *Toxicology* **171**:187-199
- Waizel BJ, Herrera SJ, Alonso CD, Villareal OML (1994) *Estudios preliminares de la actividad citotóxica de muérdagos mexicanos: Cladocolea grahami, Phoradendron reichenbachianum y Phoradendron galeoffli (Loranthaceae)*. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 40:133-137.
- Zarkovic N, Kalisnik T, Loncaric I, Miletic M, Borovic S, Mang S, Kissel D, Konitzer M, Jurin M, Grainza S (1998) Comparison of the effects of *Viscum album* Lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth in vitro and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Bioth Radioph* **13**:121-131
- Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer M, Mang S (2001) An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel[®]. *Cancer Bioth Radioph* **16**:55-62
- Zarkovic N, Zarcovik K, Grainca S, Kissel D, Jurin M (1997) The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumor-host relationship. *Anticancer Drugs* **8** (supl.1):S17-22.

PIES DE FIGURA

Figura 1. Efecto de extractos de *Psittacanthus calyculatus* sobre células HeLa. Células HeLa inoculadas en DMEM suplementado con 7% de suero de ternera se trataron a partir de las 48 h de cultivo (↓) con diferentes concentraciones de extractos acuosos de hojas (EAHC; A), diclorometánico de hojas (EDHC; B) o de flores (EDFC; C), o con extractos hexánicos de flores (EHFC; D) de *Psittacanthus calyculatus*. En los días señalados se realizaron recuentos celulares por triplicado para cada tratamiento. El asterisco representa diferencias significativas respecto al control. $P < 0.05$.

Figura 2. Efecto del extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* sobre células HeLa. Células HeLa inoculadas en DMEM suplementado con 7% de suero de ternera se trataron a partir de las 48 o 72 h de cultivo (↓) con diferentes concentraciones de un extracto acuoso crudo de hojas de *Phoradendron tomentosum* (EAHT; A) o con el extracto tratado a 100 °C durante 15 min (B). En los días señalados se realizaron recuentos celulares por duplicado para cada tratamiento. El asterisco representa diferencias significativas respecto al control. $P < 0.05$.

Figura 3. Efecto de los extractos de muérdago sobre células HeLa. Células HeLa inoculadas en DMEM suplementado con 7% de suero de ternera se trataron con diferentes concentraciones de los extractos de *P. calyculatus* o *P. tomentosum*. El estado físico de las células se captó después de dos días de tratamiento. Aumento de 40x. A) Control; B) DMSO 0.5%; C) EDHC 500 µg/ml; D) EDFC 250 µg/ml; E) EHFC 100 µg/ml; F) EAHT 0.5%; G) EAHT 100°C 5%

Figura 4. Patrón de DNA genómico de células HeLa tratadas con los extractos de muérdagos. Células HeLa inoculadas en DMEM suplementado con 7% de suero de ternera se trataron con diferentes concentraciones de los

extractos de *P. calyculatus* o *P. tomentosum*. Después de 2 o 3 días de tratamiento se extrajo el DNA de las células con un ensayo de purificación de DNA genómico Wizard (Promega). Después de una precipitación con etanol, 2.5 µg de DNA se sometieron a electroforesis en agarosa 1.5% a 50 V por 2 h. El DNA fue visualizado por tinción con bromuro de etidio bajo luz UV. M1) marcador de 100 pb; M2) Marcador de 1 kb; 1) control 48 h; 2) control 72 h; 3) DMSO 0.5% 48 h; 4) DMSO 0.5% 72 h; 5) EDHC 250 µg/ml 48 h; 6) EDHC 250 µg/ml 72 h; 7) EDHC 500 µg/ml 48 h; 8) EDHC 250 µg/ml 48 h; 9) EHFC 100 µg/ml 48 h; 10) EAHT 0.5% 48 h; 11) EAHT 1% 48 h; 12) EAHT 1% 72 h 13) EAHT 100°C 5% 48 h; 14) EAHT 100°C 5% 72 h 15) EAHT 100°C 7% 72 h.

Figura 5. Efecto del extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* (EAHT) sobre la actividad vaso-relajante en anillos aórticos de cobayo. Anillos aórticos (2 mm) de cobayo macho (600 a 700 g) se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, los anillos aórticos se contrajeron con 5 µM de noradrenalina y posteriormente se aplicó 1% (v/v) del EAHT. El registro es representativo de la respuesta en dos individuos.

Figura 6. Efecto del extracto acuoso de hoja de *Psittacanthus calyculatus* (EAHC) sobre anillos aórticos de cobayo. Anillos aórticos de cobayo macho (600 a 700 g) de 2 mm de longitud se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, los anillos se contrajeron con noradrenalina (5 µM) y posteriormente se aplicó el EAHC a las concentraciones señaladas. Los registros son representativos de la respuesta en cuatro individuos.

Figura 7. Efecto de concentraciones acumulativas del EAPh sobre anillos aórticos. Anillos aórticos (2 mm) de cobayo macho (600 a 700 g) se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, los anillos aórticos se contrajeron con 5 μ M de noradrenalina. Posteriormente se aplicó el EAHC en concentraciones acumulativas: 1.25-10%. El registro es representativo de seis experimentos individuales.

Figura 8. Papel del endotelio sobre el efecto vaso-relajante del EAHC en anillos aórticos de cobayo. Anillos aórticos (2 mm) de cobayo macho (600 a 700 g) con (A) o sin endotelio (B) se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, los anillos aórticos se contrajeron con 5 μ M de noradrenalina y posteriormente se aplicó el EAHC a las concentraciones señaladas. El inserto muestra las respuestas en diez preparaciones diferentes montadas a partir de cinco individuos.

Figura 9. Efecto del L-NAME sobre la relajación inducida por el EAHC en anillos aórticos de cobayo. Anillos aórticos (2 mm) con endotelio intacto se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, se indujo su contracción con noradrenalina (5 μ M) en ausencia (A) o presencia (B) de L-NAME (600 μ M) y posteriormente se aplicó el EAHC. Los registros son representativos de la respuesta en cinco individuos.

Figura 10. Efecto de donadores de NO sobre la relajación de anillos aórticos carentes de endotelio. Anillos aórticos (2 mm) de cobayo macho (600 a 700 g) a

los que previamente se removió el endotelio, se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min. de estabilización, los anillos se contrajeron con 5 μ M de noradrenalina y su relajación se indujo con nitroprusiato de sodio (A) o con EAHC y nitroprusiato de sodio (B). Los registros son representativos de la respuesta en tres individuos.

Figura 11. Efecto del EAHC sobre la producción de NO por aorta de cobayo.

Porciones de aortas de cobayo equivalentes a 4 anillos (8 mm) se incubaron en solución de Krebs pH 7.4, a 37°C con oxigenación, en presencia de 1.25% de EAHC, con o sin L-NAME (600 μ M). Luego de 10 min. se recuperó el medio de incubación y se estimó la producción de NO mediante la cuantificación espectrofotométrica (570 nm) de nitritos por la reacción de Griess. Los resultados se muestran como la concentración de nitritos promedio inducida por el extracto \pm S.D. en fragmentos aórticos obtenidos de cinco individuos diferentes. Un asterisco denota diferencia significativa respecto al control. Dos asteriscos denotan diferencia significativa respecto al EAHC. $P < 0.05$.

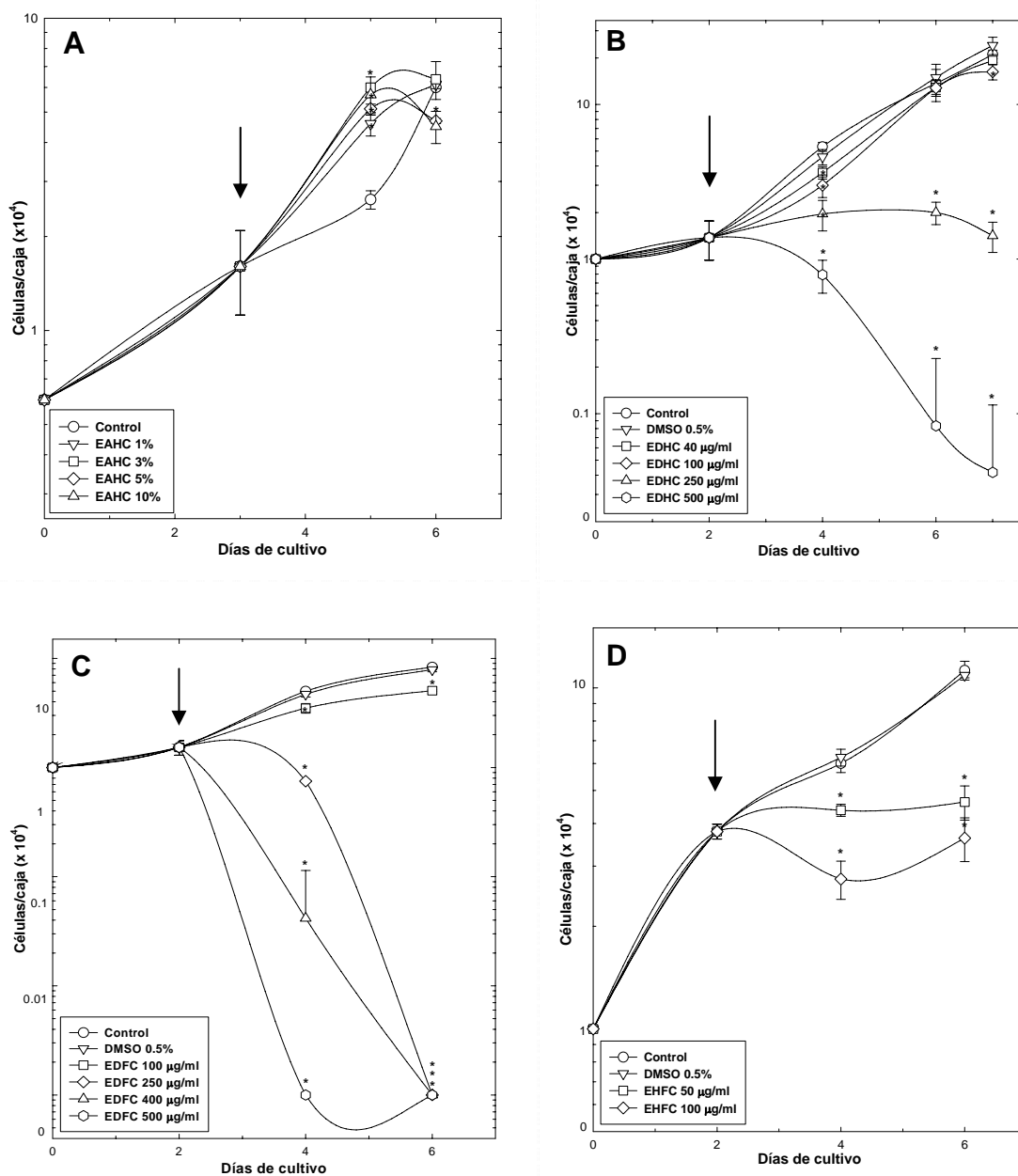


Figura 1. Efecto de extractos de *Psittacanthus calyculatus* sobre células HeLa.

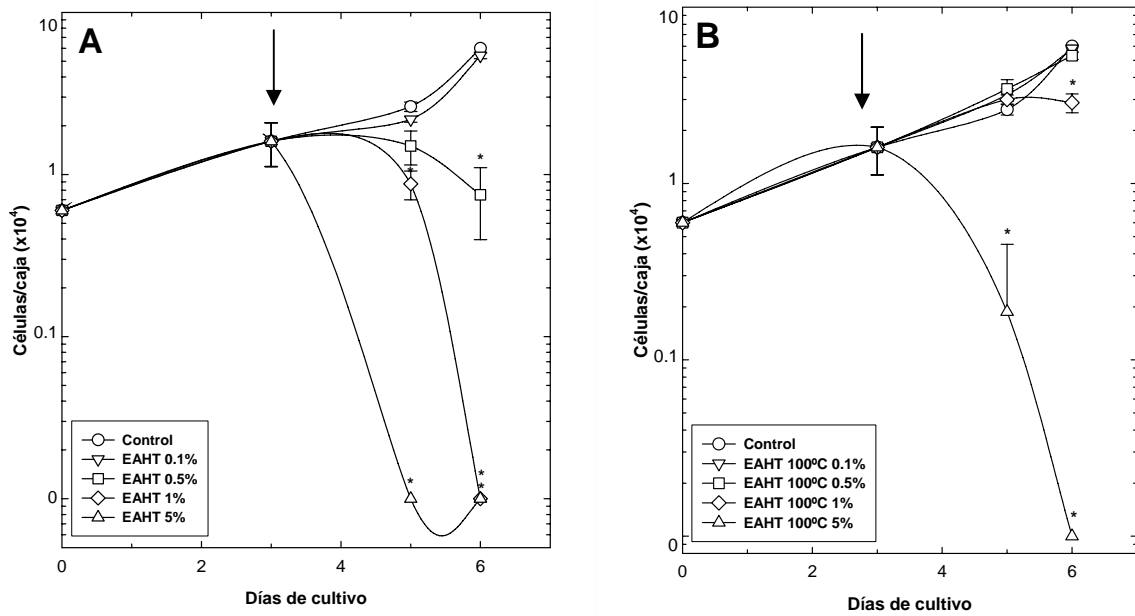


Figura 2. Efecto del extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* sobre células HeLa.

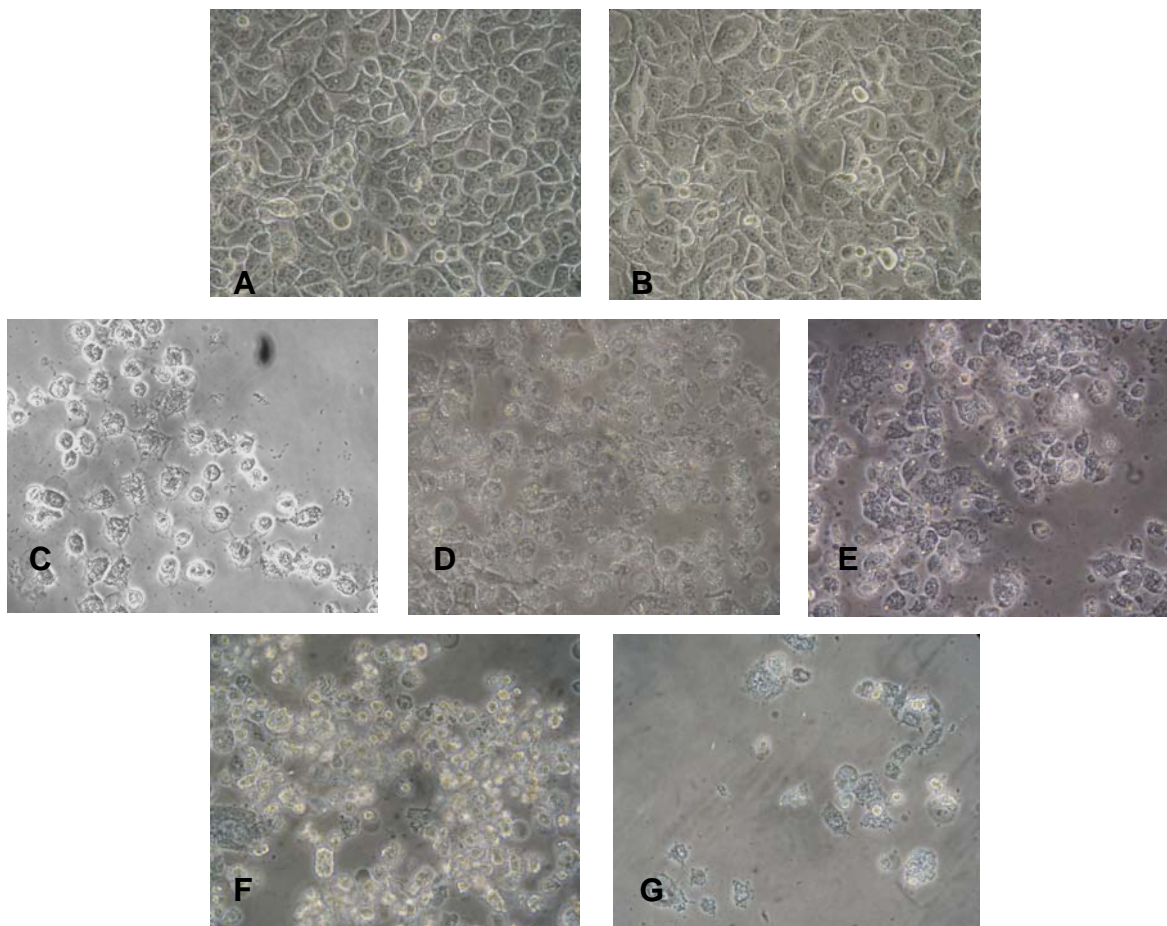


Figura 3. Efecto de los extractos de muérdago sobre células HeLa.

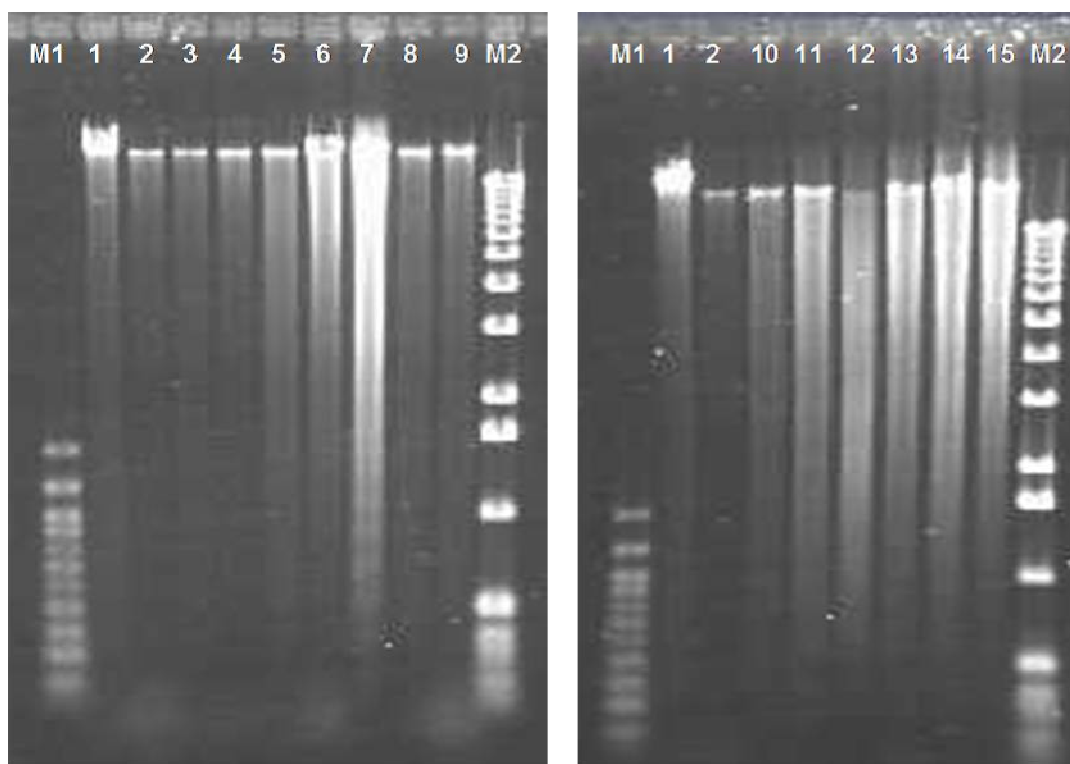


Figura 4. Patrón de DNA genómico de células HeLa tratadas con los extractos de muérdagos.

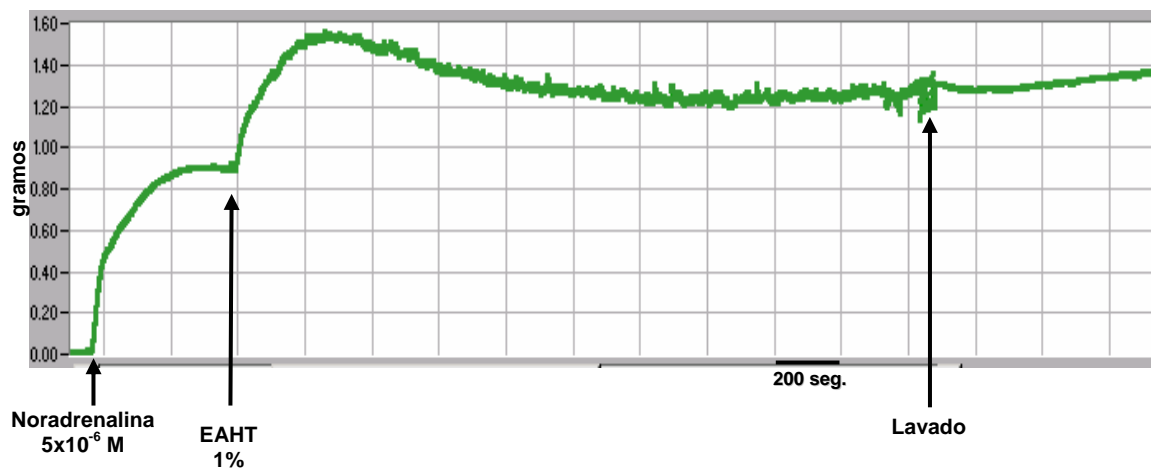


Figura 5. Efecto del extracto acuoso de *Phoradendron tomentosum* sobre la actividad vaso-relajante en anillos aórticos de cobayo.

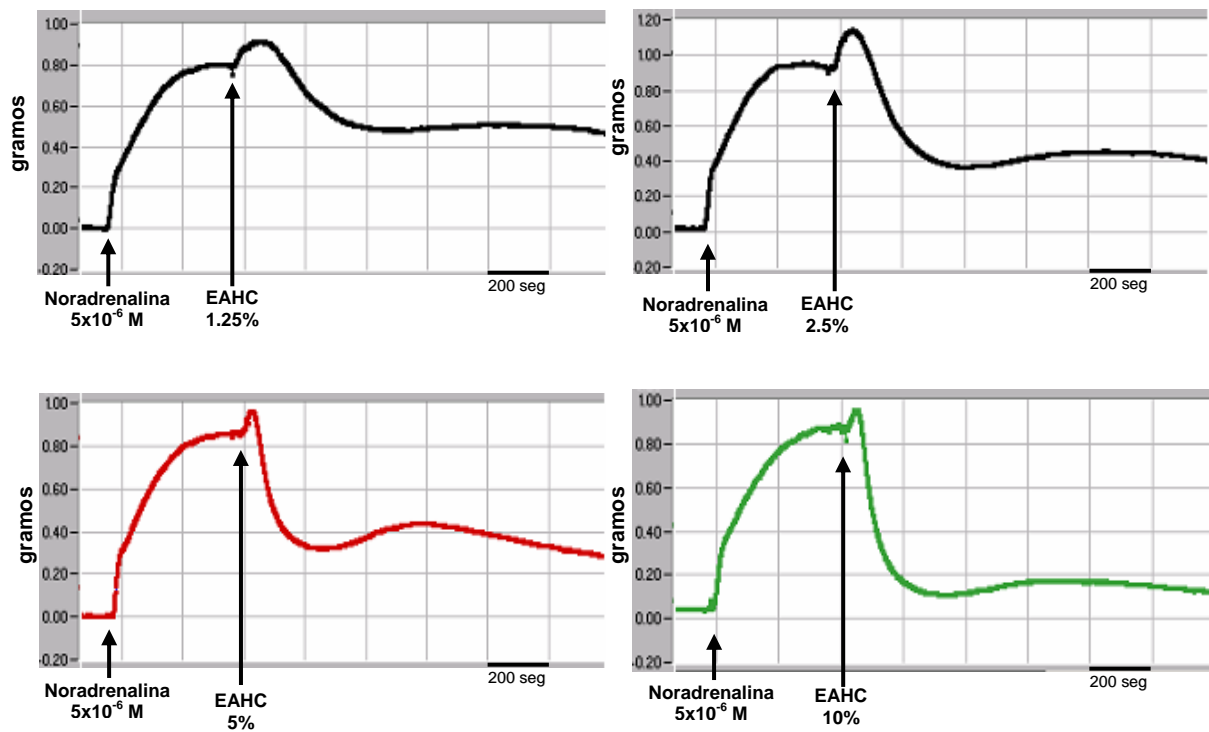


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de hoja de *Psittacanthus calyculatus* (EAHC) sobre anillos aórticos de cobayo.

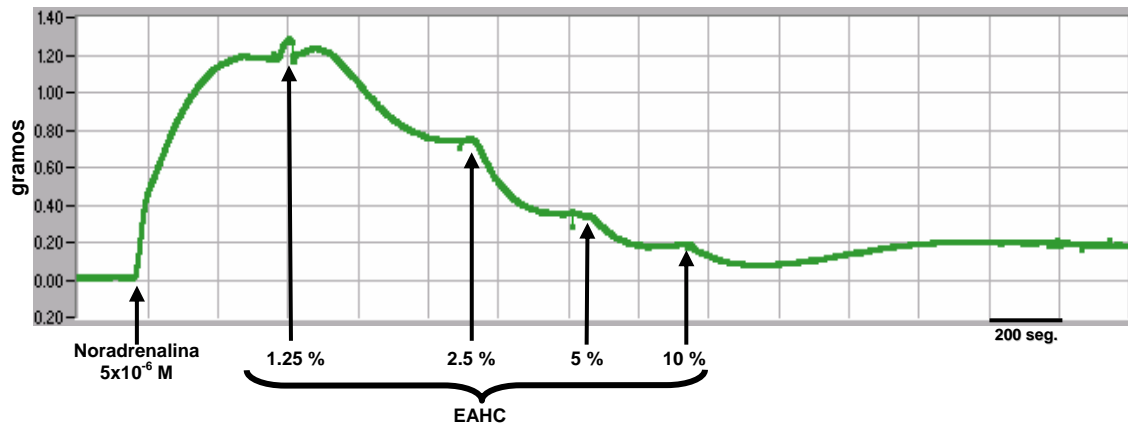


Figura 7. Efecto de concentraciones acumulativas del EAHC sobre anillos aórticos.

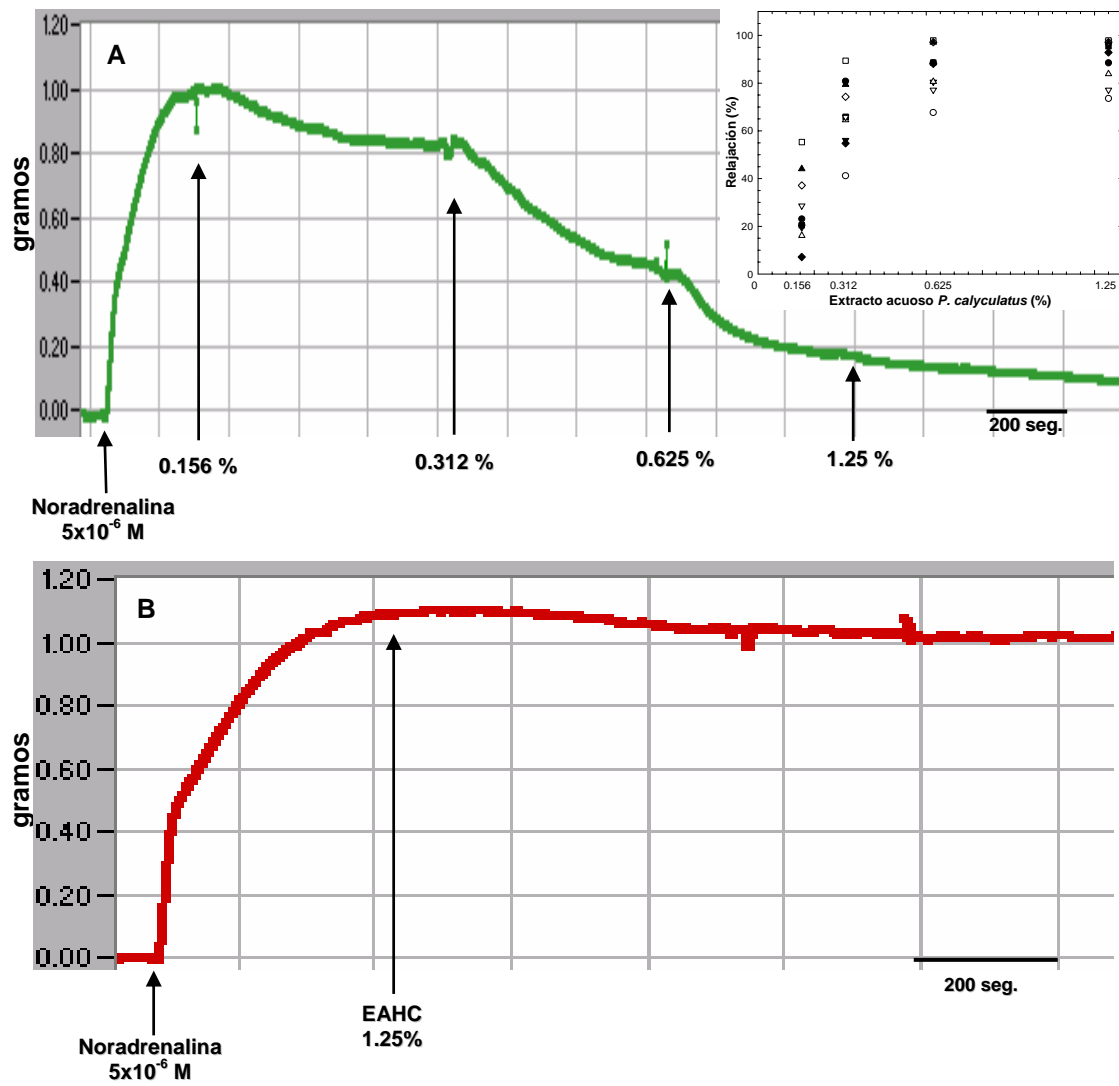


Figura 8. Papel del endotelio sobre el efecto vaso-relajante del EAHC en anillos aórticos de cobayo.

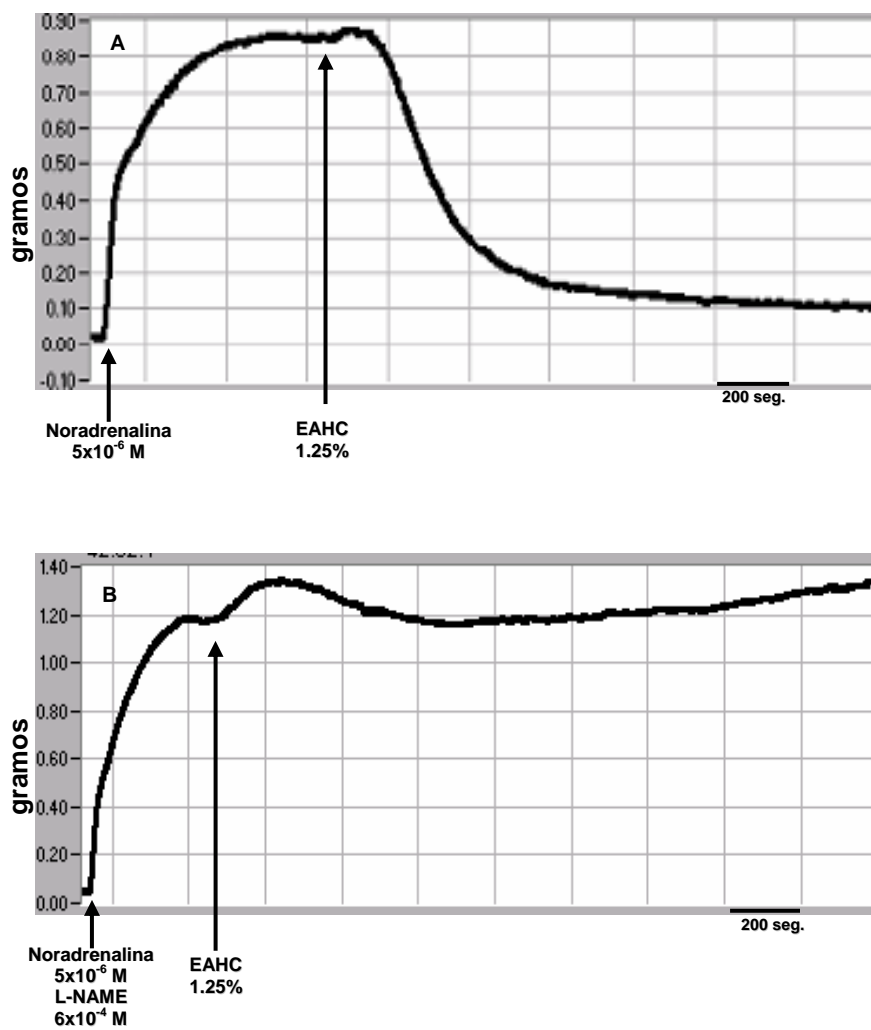


Figura 9. Efecto del L-NAME sobre la relajación inducida por el EAHC en anillos aórticos de cobayo.

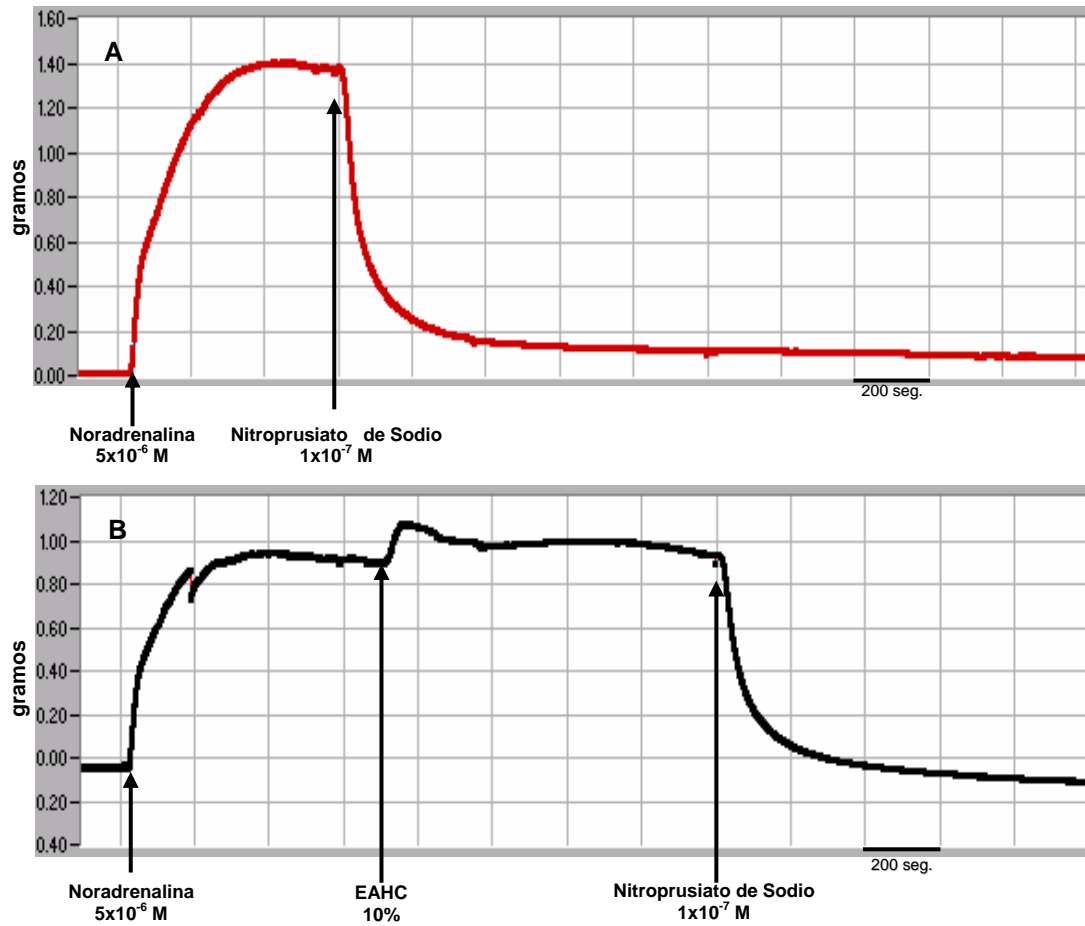


Figura 10. Efecto de donadores de NO sobre la relajación de anillos aórticos carentes de endotelio.

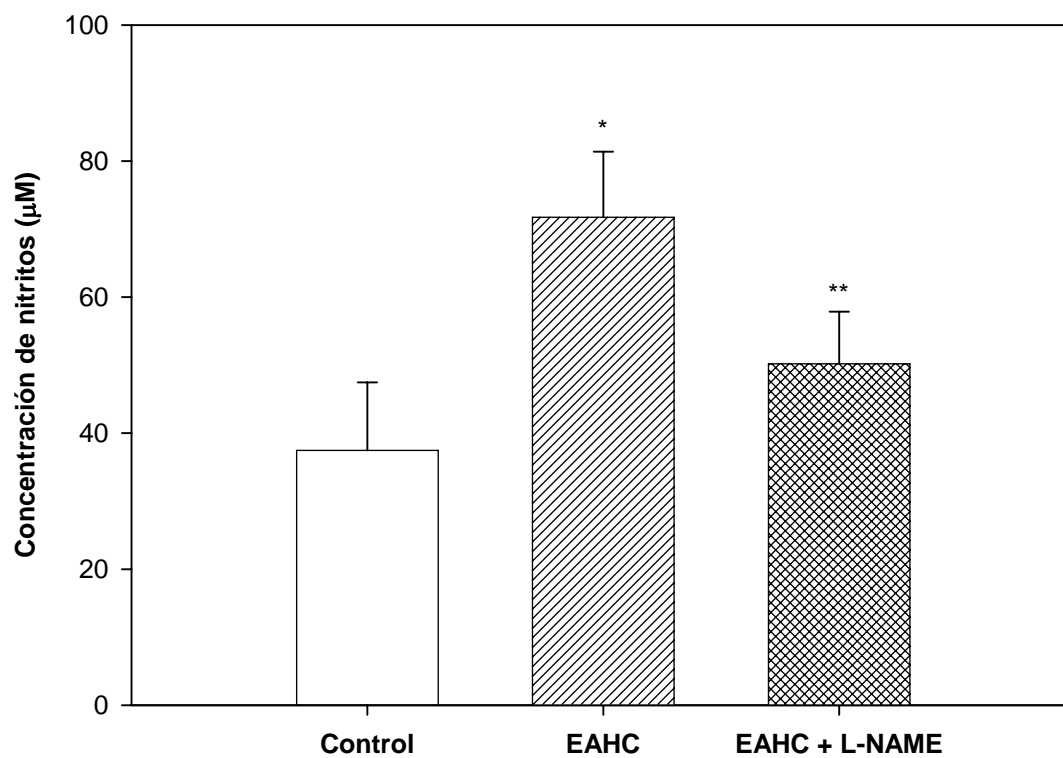


Figura 11. Efecto del EAHC sobre la producción de NO por aorta de cobayo.