

Fracción metanólica de *Ligaria cuneifolia* “muérdago criollo”: efecto sobre parámetros hemorreológicos y secreción biliar

Mariana Ferrero¹, Diego Crosetti¹, Alicia Dominighini¹, María de Luján Álvarez², María Teresa Ronco², Marcelo L. Wagner³, Alberto Gurni³, Cristina Carnovale^{2*} y Alejandra Luquita¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

² Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET. Suipacha 570 (2000) Rosario. Argentina.

³ Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. Correo electrónico: ifise1@citynet.net.ar; carnovale@ciudad.com.ar.

Resumen

El tratamiento de ratas con el extracto crudo de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) (Lc) por vía intraperitoneal produce incremento de la viscosidad sanguínea, disminución del colesterol plasmático y aumento de la excreción biliar. En este trabajo se analizó el efecto de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* sobre las propiedades hemorreológicas en condiciones *ex vivo* e *in vitro* y sobre la excreción biliar. Para los estudios *ex vivo* se emplearon ratas Wistar machos adultas; a un lote se suministró concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* y 1-vinil-2-pirrolidona, y al otro lote, 1-vinil-2-pirrolidona. Los estudios *in vitro*, se realizaron con muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca; se fraccionaron en tres alícuotas iguales que fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C con solución fisiológica, 1-vinil-2-pirrolidona y fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* y 1-vinil-2-pirrolidona. Se demostró un efecto directo del 1-vinil-2-pirrolidona (PVP) y de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* sobre la membrana eritrocitaria que produjo un cambio de forma de discocito a esferostomatocito (IM más negativo). Asimismo, se observó una disminución de la deformabilidad eritrocitaria que evidenció una interacción del PVP y de la fracción metanólica con la membrana globular. El cambio de discocito a estomatocito y la rigidez eritrocitaria producen aumento de la viscosidad sanguínea. El descenso de colesterol plasmático se debería al aumento de la excreción biliar de colesterol y de sales biliares, que conducen al aumento del flujo biliar observado.

Methanolic fraction of *Ligaria cuneifolia* (Argentine mistletoe): effect on rheological properties and biliary secretion

Summary

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) (Lc) aqueous extract-treated rats by via intraperitoneal (i.p.) show increased blood viscosity and decreased plasma cholesterol (Chol) levels, and increase of biliary excretion. In this work, we analyze the effect of the vehicle polyvinylpyrrolidone (PVP) and that of the Methanolic Fraction of the extract of Lc (MFLc) on hemorrheological properties *ex vivo* and *in vitro*, and on

Palabras clave: *Ligaria cuneifolia* - viscosidad sanguínea - colesterol plasmático - deformación eritrocitaria - excreción biliar - polivinilpirrolidona.

Key words: *Ligaria cuneifolia* - whole blood viscosity - plasma cholesterol - erythrocyte deformability - biliary excretion - polyvinylpyrrolidone.

biliary excretion. For ex vivo conditions, adult male Wistar rats were divided in five experimental groups (n=5 each one) which were injected, every 24 h during 3 days by via i.p., with: 1.- saline solution (Control); 2.- 1-vinil-2-pirrolidona (PVP) 4.7 mg/kg bw; 3.- MFLc 9.5 mg/kg bw plus PVP 4.7 mg/kg bw; 4.- PVP 125 mg/kg bw; and 5.- MFLc 230 mg/kg bw plus PVP 125 mg/kg bw. Intended for in vitro conditions, blood samples obtained by heart puncture were divided into three fractions, which were incubated with: saline solution (Control) (n=5), PVP 125mg% (n=5), and MFLc 250 mg% plus PVP 125 mg% (n=5). We demonstrate a direct effect of PVP alone and of MFLc “per se” on the erythrocyte membrane resulting in a cell shape change from dyscocyte to spherostomatocyte (MI more negative) as well as a decrease in erythrocyte deformability (increased RI). These changes induce an increase in blood viscosity. Decreased plasma Chol is a consequence of an increased bile salts biliary excretion.

Introducción

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) –popularmente conocida como “liga”, “liguilla” o “muérdago criollo”– es una planta hemiparásita de amplia distribución en las zonas centro y norte de la República Argentina (Abbiatti, 1946). En la medicina popular la infusión de esta planta se utiliza como hipotensor y para dar mayor fluidez a la sangre, y así disminuir el exceso de colesterol, de manera similar al muérdago europeo (Wagner y col., 1998).

Ambas especies parecen semejantes en estado vegetativo, pero el análisis de las características anatómicas permitió comprobar que existen diferencias entre ellas, lo cual posibilitó detectar la existencia de mezclas o el reemplazo de la especie europea por la especie argentina en drogas en polvo (Fernández y col., 1998; Varela y Gurni, 1995).

En estudios farmacológicos y fitoquímicos del “muérdago criollo” se demostró la presencia de tiramina (Graziano y col., 1967) que tiene actividad simpático-mimética, por lo cual la administración del extracto de liga podría producir hipertensión arterial. En un estudio realizado por Taira y col. (1994) se estableció que en las infusiones de *L. cuneifolia* existiría un agente vasoactivo con efecto presor, mediado por acción directa sobre los adrenorreceptores alfa, y un agente hipotensor, mediado por adrenorreceptores beta. En la Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario se constató que al aplicar el tratamiento por vía intraperitoneal (dosis crecientes de extracto entero de *L. cuneifolia* (Lc): 15; 25; 35; 55 y 83 mg/kg PC) en ratas, se observa un aumento de la viscosidad sanguínea, producto del aumento en la rigidez eritrocitaria, relacionado,

a su vez, con una disminución del colesterol plasmático al 50% de su concentración plasmática. Esta disminución en el nivel de colesterol plasmático se debería a un incremento en la velocidad de la excreción biliar de colesterol y las sales biliares (producto del metabolismo hepático del colesterol), lo que conduce al aumento de flujo biliar total (Mengarelli y col., 2001). Extractos de *L. cuneifolia* aplicados por vía intravenosa (dosis de Lc: 25 y 55 mg/kg PC) no ocasionó modificaciones significativas en los parámetros biliares ni en el nivel plasmático de colesterol; sin embargo, en el tratamiento por vía intraperitoneal, se encontró un aumento en el índice de rigidez y en la viscosidad sanguínea. Este tratamiento reflejaría una acción directa de *L. cuneifolia* sobre la viscosidad interna del glóbulo rojo (CHbCM) como factor intrínseco dominante (Dominighini y col., 2004).

En este trabajo se utilizó la fracción metanólica de Lc, con el propósito de identificar los componentes del “muérdago criollo” que promoverían los cambios observados en el nivel hemorreológico y en la secreción biliar. Los estudios fueron realizados *ex vivo* e *in vitro*.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en Sierra Chica, localidad de Carlos Paz, Córdoba (República Argentina), el hospedante fue el “chañar” (*Geoffroea decorticans* (H. et A.) Burk. –Fabaceae–). Se realizó la desecación entre 55 y 60 °C por medio de una corriente de aire; posteriormente, se pulverizó 50 g del material hasta

obtener un polvo fino, por medio de un molino de cuchillas rotativas.

Se realizaron tres extracciones con metanol al 80% durante 24 horas, cada una a temperatura ambiente (Waterman and Mole, 1994). Tras este proceso el material fue remitido por el equipo de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA a la Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR.

Animales

Se utilizaron 26 ratas Wistar macho cuyo peso estaba entre los 400 y 450 g; fueron distribuidas de a dos por jaula y se mantuvieron en condiciones luz/oscuridad un período de 12 horas. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar normal y agua. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo según la *Guía para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio*, (National Institutes of Health, Publicación n° 86-23, modificada en 1985).

Experimentos ex vivo

Previo a la administración de la fracción metanólica, se extrajo 1 ml de sangre de la vena de la cola para la detección de los valores basales de hematocrito y colesterol. Por otra parte, la administración de la fracción metanólica del *Lc* (FMLc) requirió, dadas sus características de solubilidad, la asociación con polivinilpirrolidona (PVP), como vehiculizante. Las ratas tratadas recibieron un volumen de 0,2 ml de las dosis crecientes (mg/kg de peso corporal). Un grupo de animales utilizado como control recibió solución fisiológica por vía intraperitoneal. Distintos grupos de animales tratados recibieron, por la misma vía: FMLc en asociación con PVP, con dosis de 9,5 y 230 mg/kg PC de FMLc, más 4,7 y 125 mg/kg PC, de PVP, respectivamente. La dosis de PVP corresponde al 50% de la dosis de FMLc. Asimismo, dos grupos de animales recibieron únicamente el vehiculizante (PVP), con dosis de 4,7 y 125 mg/kg PC.

Procedimientos y determinaciones

El día del experimento, 24 h después de la última administración, las ratas fueron pesadas y anestesias con pentobarbital sódico (50 mg/kg PC) i.p. Se cateterizó el conducto biliar y se recolectó bilis

cada 15 min durante 60 min, manteniendo la temperatura corporal ($38,0 \pm 0,5$ °C) con lámpara de calentamiento durante todo el experimento. Al final de la recolección se procedió a extraer sangre por punción cardíaca, y el hígado fue extraído, lavado y pesado. Una muestra de hígado se colocó en formol al 10% para su estudio histológico; el fragmento se embebió en parafina y luego fue cortado y coloreado con hematoxilina-eosina y tricrómica de *Masson-Alcian blue*.

Determinaciones en bilis

- Volumen biliar por gravimetría, considerando una densidad biliar de 1,0 g/ml.
- Flujo biliar, calculado y expresado en $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ de hígado.
- Concentración de sales biliares por el método de Talalay modificado por Berthelot (Talalay P., 1960; Berthelot y col., 1970).
- Concentración de colesterol por el método enzimático de esterasa-oxidasa (Henry y col., 1974). La velocidad de excreción de los constituyentes biliares fue calculada como el producto de la concentración por el flujo biliar.

Determinación de parámetros reológicos en sangre

- Viscosidad sanguínea y plasmática con viscosímetro rotacional Wells- Brookfield LVT-CP a una velocidad de corte de 230 s^{-1} . Con estos valores se obtuvo el parámetro: a) viscosidad sanguínea relativa, estandarizada a un hematocrito del 45%, con lo que se elimina la influencia de la viscosidad plasmática y del porcentaje de glóbulos rojos sobre la viscosidad; b) el parámetro resultante es afectado principalmente por la deformabilidad eritrocitaria.
- Deformabilidad eritrocitaria por el método de filtración por membranas de nucleopore (Reid, Barners y col., 1976) en aparato automatizado construido en la Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR.
- Hematocrito por micrométodo.
- Contaje de glóbulos rojos con cámara de Newbauer.
- Volumen corpuscular medio: por cálculo a partir del hematocrito (Hto) y el número de glóbulos rojos.
- Colesterol por método colorimétrico.
- Osmolaridad plasmática y sérica por descenso relativo de la presión de vapor.

Experimentos *in vitro*

El día del experimento las ratas fueron pesadas y anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg PC i.p.). Se procedió a extraer sangre por punción cardíaca. El volumen de sangre obtenido se fraccionó en tres alícuotas iguales (4 ml cada una), en la primera alícuota se le agregó 83 μ l de 25 mg% del extracto metanólico de *L. cuneifolia*, a la segunda alícuota se le agregó 83 μ l de 12,5mg% del vehiculizante 1-vinil-2-pirrolidona (PVP) y a la última alícuota se agregó 83 μ l de solución fisiológica, que se utilizó como control. Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 min.

Al finalizar la incubación se realizaron las siguientes determinaciones:

-Deformabilidad eritrocitaria e índices hematimétricos por los métodos mencionados.

-Fragilidad osmótica; se prepararon soluciones de NaCl de concentraciones crecientes (entre 0 y 290 mOsm/kg) y se incubaron glóbulos rojos en esas soluciones durante 30 minutos. Luego se determinó fotocolorimétricamente el porcentaje de hemólisis, se consideró 100% de hemólisis al tubo con agua destilada. Finalmente, se construyeron las curvas de hemólisis, graficando el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NaCl (Dacie y Lewis, 1970).

-Forma celular; se determinaron por microscopía directa de la alícuota de sangre entera, adjudicando un índice de acuerdo con la clasificación de Bessis (1973). La cantidad de células observadas es de 150 por cada alícuota.

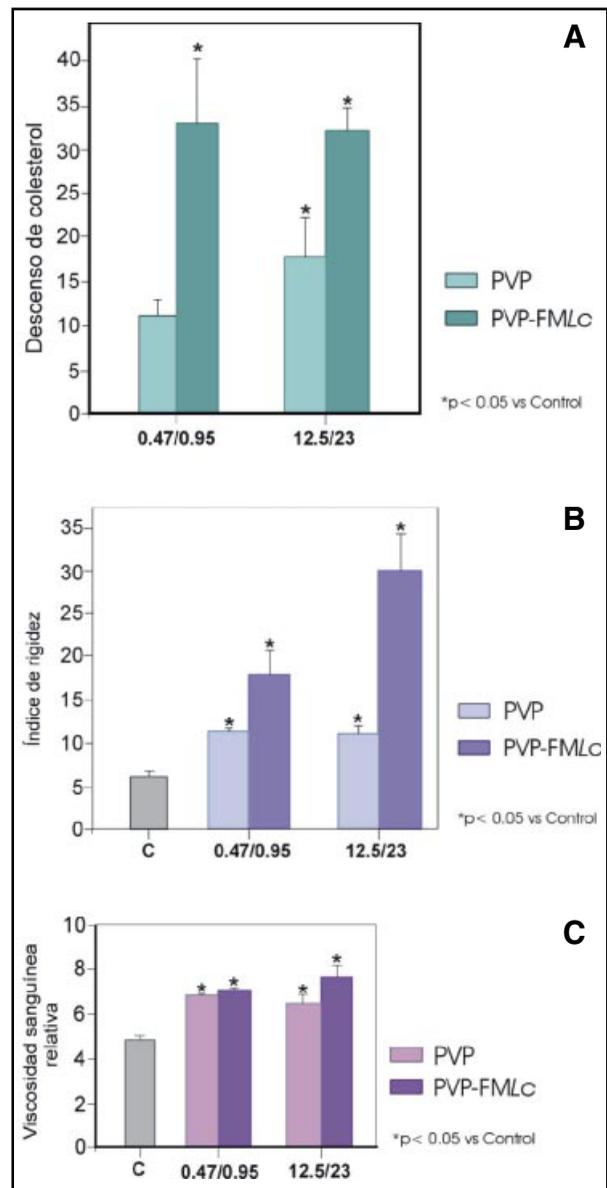
Resultados

Parámetros hemorreológicos por vía intraperitoneal

Como puede observarse en el gráfico 1 A, la administración por vía intraperitoneal de la asociación fracción metanólica de *Ligaria cuneifolia*-polivinilpirrolidona (FMLC-PVP) produce un descenso estadísticamente significativo en el nivel plasmático de colesterol. Asimismo, se evidenció un descenso, aunque cuantitativamente menor, con la inyección del vehiculizante (PVP), con la dosis de 125 mg/kg de peso.

El índice de rigidez (IR), indicador de la deformabilidad eritrocitaria, aumentó en todos los casos; el aumento fue mayor con la administración de FMLC-PVP (Gráfico 1 B).

Gráfico 1.- Efecto de FMLC sobre el descenso del colesterol plasmático y los parámetros hemorreológicos en experimentos *in vivo*

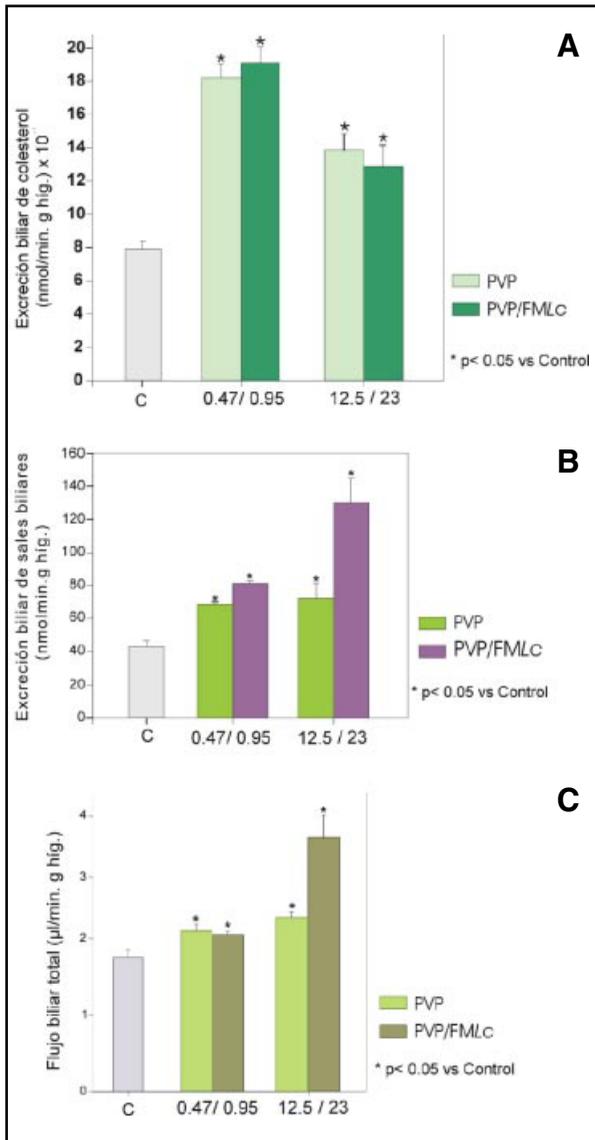


Con respecto a la viscosidad sanguínea relativa, como se observa en el gráfico 1 C, se evidenciaron aumentos significativos con FMLC-PVP y con el vehiculizante (PVP).

Parámetros biliares

El tratamiento con FMLC-PVP se asoció con un aumento en la velocidad de excreción de sales biliares y de colesterol libre. Estos cambios se acompañaron con el incremento en el flujo biliar total (Gráfico 2).

Gráfico 2.- Efecto de FMLc sobre el flujo de bilis parámetros biliares en experimentos *in vivo*



La administración intraperitoneal de PVP también generó modificaciones similares en los parámetros: aumento en la velocidad de excreción de sales biliares y de colesterol libre, así como en el flujo biliar total (Gráficos 2 A, B y C).

Parámetros hemorreológicos in vitro

En el gráfico 3 A puede observarse que el vehiculizante (PVP) produce un aumento significativo de la deformabilidad eritrocitaria (estimada por medio del IR) respecto del control (C). FMLc produce un

aumento significativo respecto de C y respecto de PVP.

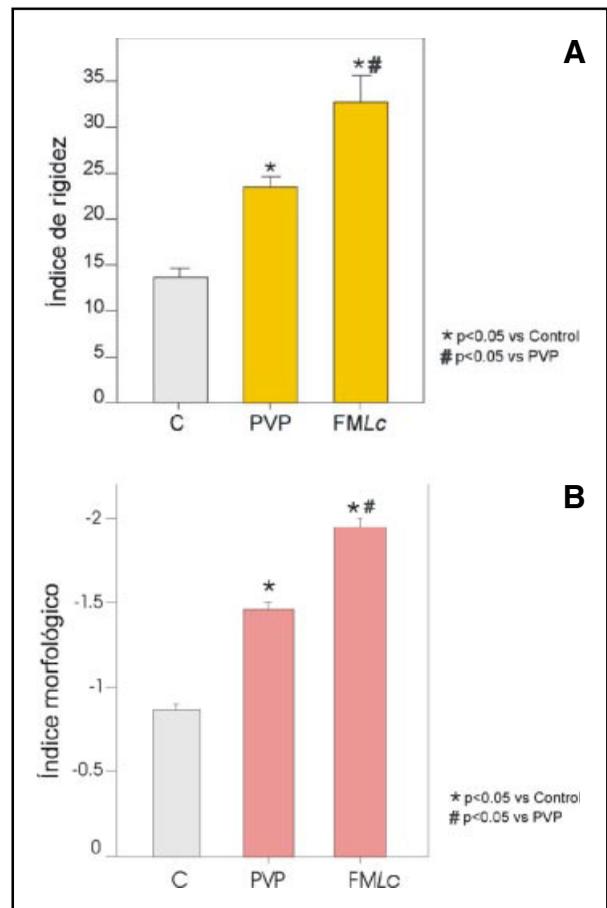
Forma celular

Se analizó por medio del cálculo del índice morfológico (IM). Como puede observarse en el gráfico 3 B, el PVP produjo una disminución significativa del IM respecto de C. La FMLc produjo una disminución significativa de IM respecto de C y de PVP.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM)

La incubación con PVP no produjo modificaciones significativas de este índice hematimétrico, como tampoco la incubación con FMLc.

Gráfico 3.- Efecto de FMLc sobre el índice de rigidez y el índice morfológico en experimentos *in vitro*



Volumen corpuscular medio (VCM)

La incubación con PVP no produjo modificaciones significativas de este índice hematimétrico, como tampoco la incubación con FMLc.

Fragilidad osmótica

Se registró un ligero aumento de los parámetros (β y X50) que determinan la fragilidad osmótica, sin ser estadísticamente significativo.

Discusión

En trabajos previos, (Mengarelli y col., 2001; Dominighini y col., 2004) utilizando el extracto total de *L. cuneifolia*, se constató un descenso del colesterol plasmático, asociado a una menor deformabilidad eritrocitaria (índice de rigidez aumentado). El descenso en el nivel de colesterol estaría implicado en la disminución de la deformabilidad al generarse modificaciones en el contenido de este lípido en la membrana eritrocitaria. Esto podría relacionarse con una alteración en la relación superficie-volumen del eritrocito. La deformabilidad eritrocitaria es un determinante primordial de la viscosidad sanguínea, pues ambos valores están relacionados en forma inversa. En concordancia con esto, se evidenciaron aumentos en la viscosidad sanguínea relativa.

El descenso en el nivel plasmático de colesterol tendría origen en el aumento de su excreción en el nivel biliar, ya que se observaron incrementos en la velocidad de excreción de sales biliares (principal vía de eliminación de colesterol en el organismo) y de colesterol libre, y también del flujo biliar total.

Con la administración intraperitoneal de la fracción metanólica de *L. cuneifolia*, se observaron modificaciones similares. Esto podría indicar que las sustancias comprendidas en la FMLc se relacionan con los cambios en los niveles hemorreológico y biliar que induce la *L. cuneifolia*. Por su parte, se evidenciaron cambios de características semejantes con la administración del vehiculizante (PVP), posiblemente al efecto de enmascaramiento, principalmente en dosis bajas de FMLc. Esta acción indicaría que la polivinilpirrolidona es una sustancia que tiene un efecto propio sobre los parámetros hemorreológicos y de secreción biliar. No obstante este hecho, la tendencia a generar los cambios ana-

lizados, fue mayor para la asociación FMLc-PVP, que para el vehiculizante (PVP).

Conclusiones

La fracción metanólica de *L. cuneifolia* se relaciona con un descenso en el nivel plasmático de colesterol asociado a un aumento en el índice de rigidez, es decir, a una menor deformabilidad eritrocitaria. Estos cambios conducen a una viscosidad sanguínea aumentada.

Sus efectos en el nivel biliar se reflejaron en una mayor velocidad de excreción de sales biliares y de colesterol libre y aumentos en el flujo biliar total. Estos cambios, en cuanto a los parámetros de secreción biliar, estarían íntimamente relacionados con las modificaciones observadas en el nivel sanguíneo.

La polivinilpirrolidona, utilizada como vehiculizante, es una sustancia que muestra capacidad de inducir por sí misma cambios en los niveles hemorreológico y biliar, especialmente en dosis bajas de FMLc.

Los resultados obtenidos por incubación *in vitro* con la fracción metanólica demostraron un efecto directo del PVP y de la FMLc sobre la membrana eritrocitaria; produce un cambio de forma de discocito a esferoestomatocito (IM más negativo). Asimismo, se observó una disminución de la deformabilidad eritrocitaria (IR aumentado) que evidencia una interacción del PVP y de la FMLc con la bicapa lipídica.

Referencias bibliográficas

- Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Revista del Museo de La Plata* (nueva serie) 7 (sección botánica): 1-110.
- Berthelot, P.; Erlinger, S.; Dhumeaux, D. and Preaux, A.M. (1970). "Mechanism of phenobarbital induced hypercholerisis in the rat". *Am. J. Physiol.* 819: 809-813.
- Bessis M., (1973). "Red Cell Shape". *Physiology, Pathology, Ultrastructure*" 1-23, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (1970). *Hematological Practica*, 2ª Edición, Toray, Barcelona,.
- Dominighini, A.; Ferrero, M.; Mengarelli, G.; Ron-

- co, M.T.; Álvarez M.; Wagner, M.; Gurni, A.; Carnovale, C. and Luquita, A. (2004). "Hemorheologic changes induced by aqueous extract of *Ligaria cuneifolia*: treatment by two different administration routes. *Clin. Hemorheol & Microcirc.* 31(2):113-21.
- Fernández, T.; Wagner, M.; Varela, B., Ricco, R.; Hajos, S.; Gurni, A. and Álvarez, E. (1998). "Study of an Argentine Mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 62: 25-34.
- Graciano, M.N.; Widner, G.A. and Coussio, J.D. (1967). "Flavonoids from the Argentine mistletoe, *Psittacanthus cuneifolia*". *Phytochemistry* 6, 1709-1711.
- Henry, R.J.; Cannon, D.S. and Winkelmann, J.W. (1974). *Clinical Chemistry Principles and Techniques*. Harper y Row: 1440-1449.
- Mengarelli, A.; Dominighini, M.; Ferraro, M.L.; Álvarez, M.; Wagner, M.; Gurni, A.; Carnovale, C. and Luquita, A. (2001). "Evaluation of hemorheologic parameters and biliary secretion in *Ligaria cuneifolia* (Argentine mistletoe) extracted treated rats". *Pharmaceutical Biology*, Swets & Zeitlinger 39(6): 435-439.
- Reid, H.L.; Barnes, A.J.; Lock, P.J.; Dormandy, J.A. and Dormandez, T.L. (1976). "A simple method for measuring erythrocyte deformability". *J. Clin. Pathol.* 29: 855-858.
- Taira, C.A.; Wagner, M.L.; Adrados, H.M.; Piño, R. y Gurni, A.A. (1994). "Estudio Farmacológico de un Agente Vasoactivo presente en *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia*". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 13(2): 91-95.
- Talalay, P. (1960). "Enzymatic analysis of steroid hormones". *Meth. Biochem. Anal.* 8: 119-143.
- Varela, B.G. y Gurni, A.A. (1995). "Anatomía foliar y caulinar comparativa del muérdago criollo y del muérdago europeo". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 14(1): 21-29.
- Wagner, M.L.; Fernández, T.; Varela, B.; Álvarez, E.; Ricco, R.; Hajos, S. and Gurni, A. (1998). "Anatomical, Phytochemical and Immunochemical Studies on *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Lorantaceae)". *Pharmaceutical Biology* 36(2): 1-9.
- Waterman, P.G. and Mole, S. (1994). "*Analysis of Phenolic Plant Metabolites*". Backwell Scientific Publications, Oxford, 238.