



## I Jornada Científica de Farmacología y Salud

Efectos cardiacos de la (-)- epigallocatequina sobre corazones aislados de rata.

Cardiac effects of (-)- epigallocatechin on isolated rat hearts.

Loipa Galán Martínez<sup>1\*</sup>, Flor de la Caridad Heres Álvarez<sup>2</sup>, Xiomara Castelo Villalón<sup>3</sup>.

1- Dr. C. Farmacéuticas. Investigadora y Profesora Titular. Laboratorio de Electrofisiología Básica. Departamento Docencia-Investigaciones. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 17 N° 702, Vedado, La Habana, Cuba. Teléfono: 53 7 8386165. <http://orcid.org/0000-0002-0229-8934>

2- Máster en Investigación en Aterosclerosis. Especialista de I Grado en Inmunología. Investigadora y Profesora Auxiliar. Departamento Docencia-Investigaciones. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 17 N° 702, Vedado, La Habana, Cuba. <https://orcid.org/0000-0002-3426-7024>

3- Máster en Investigación en Aterosclerosis. Máster en Ensayos Clínicos. Máster en Longevidad Satisfactoria. Especialista de II Grado en Nefrología. Investigadora y Profesora Auxiliar. Departamento Docencia-Investigaciones. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 17 N° 702, Vedado, La Habana, Cuba. <https://orcid.org/0000-0001-8476-2368>

\* [loipa@infomed.sld.cu](mailto:loipa@infomed.sld.cu)

### RESUMEN

La (-)- epigallocatequina es un flavonoide que se encuentra en muchas plantas, especialmente en el té. El consumo de alimentos ricos en flavonoides tiende a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y esto se ha atribuido a actividades inespecíficas como propiedades antioxidantes, antiateroscleróticas y antiinflamatorias. Pero, las acciones directas de (-)- epigallocatequina en el músculo cardíaco aún no se conocen. Este estudio evaluó los efectos de (-) -

epigallocatequina sobre las actividades eléctricas y contráctiles de corazones de rata aislados. El electrocardiograma de superficie y la fuerza de contracción se registraron en corazones de rata aislados en control y con concentraciones crecientes de (-)- epigallocatequina de 0,001 a 3  $\mu\text{mol/L}$ . La (-)-epigallocatequina tendió a prolongar el intervalo QRS, pero este efecto es significativo solo en la concentración más alta estudiada (3  $\mu\text{mol/L}$ ). El intervalo QTc no se vio afectado significativamente por el flavonoide. Las acciones de este flavonoide en el intervalo RR fueron leves y estadísticamente significativas desde 0.03  $\mu\text{mol/L}$ . La (-)- epigallocatequina disminuyó la fuerza de contracción de corazones de rata aislados con una  $\text{IC}_{50}$  de 0,03  $\mu\text{mol/L}$ . Este flavonoide tiene acciones directas sobre el músculo cardíaco de las ratas.

**Palabras claves:** cardiovascular; (-)- epigallocatequina; flavonoides.

## **ABSTRACT**

(-)- Epigallocatechin is a flavonoid found in many plants, especially in tea. The consumption of flavonoid-rich foods tends to reduce the risk of cardiovascular diseases and this has been attributed to nonspecific activities such as antioxidant, anti-atherosclerotic, and anti-inflammatory properties. But, the direct actions of (-)-epigallocatechin on cardiac muscle still not know. This study evaluated the effects of (-)-epigallocatechin on electrical and contractile activities of isolated rat hearts. Surface electrocardiogram and force of contraction were recorded in isolated rat hearts in control and with increasing concentrations of (-)-epigallocatechin from 0.001 to 3  $\mu\text{mol/L}$ . (-)-Epigallocatechin tended to prolong the QRS interval, but this effect is significant only at the highest concentration studied (3  $\mu\text{mol/L}$ ). QTc was not significantly affected by the flavonoid. The actions of this flavonoid on RR interval were mild and statistically significant since 0.03  $\mu\text{mol/L}$ . (-)-Epigallocatechin decreased the force of contraction of isolated rat hearts with an  $\text{IC}_{50}$  of 0.03  $\mu\text{mol/L}$ . This flavonoid has direct actions on rat cardiac muscle.

**Keywords:** Cardiovascular; (-)-Epigallocatechin; Flavonoids.

## **INTRODUCCIÓN**

Las catequinas son un grupo de polifenoles naturales que se encuentran en muchas plantas, especialmente en el té verde (hojas de *Camellia sinensis*) (1-

3). Los cuatro principales derivados de la catequina que se encuentran en el té verde incluyen los isómeros epicatequina, (-) - epicatequingalato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC) y (-) - galato de epigalocatequina (EGCG) (3). EGC es un flavan-3-ol que contiene un benzopirano-3,5,7-triol unido a un resto 3,4,5-hidroxifenilo. Por tanto, la EGC se considera una molécula lipídica flavonoide (4) (Figura 1).

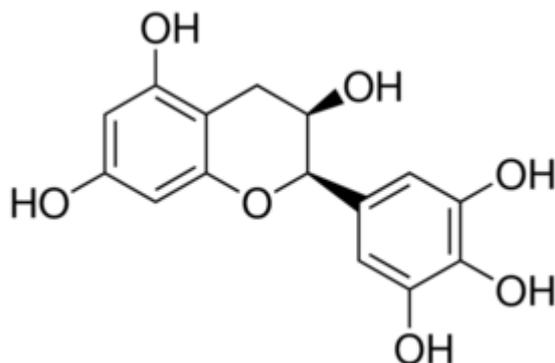


Figura 1: Estructura química de la (-)- epigalocatequina.

Los beneficios para la salud asociados con el consumo de té verde se deben a la actividad de EGCG y EGC, que están presentes en cantidades más altas (5). EGC tiene muchas propiedades cardiovasculares beneficiosas. Sin embargo, la mayoría de estos efectos son inespecíficos, como las actividades antioxidantes (1-2, 6-7), antiinflamatorias (1, 5, 7) y antiaterogénicas (8). Otra propiedad notable atribuida a las catequinas del té es la acción reductora del colesterol, que implica la regulación positiva del receptor de LDL, la reducción de la absorción de colesterol y la modulación de las vías sintéticas y metabólicas (para revisión ver Cuccioloni *et al.* (9)).

Se necesitan más investigaciones de los mecanismos celulares para investigar los efectos cardiovasculares de este flavonoide. Otros flavonoides como la naringenina, la quercetina y la genisteína tienen acciones directas sobre los músculos cardíaco y liso vascular de ratas (10). El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar los posibles efectos directos de EGC sobre las actividades eléctrica y contráctil de corazones aislados de rata.

## MÉTODOS

Se emplearon ratas Wistar machos adultos (7-8 semanas de vida, 200-250 g de peso) obtenidas del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Previo a los experimentos los animales fueron adaptados por siete días en condiciones homogéneas de iluminación, alimentación y temperatura (temperatura controlada  $25 \pm 2$  ° C, humedad relativa  $60 \pm 10\%$  y ciclos de luz / oscuridad de 12 h). Todos los procedimientos en los animales fueron conducidos acorde con las guías internacionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Las ratas fueron anestesiadas con tiopental sódico (30 mg/kg de peso corporal) y se les administró heparina sódica (5000 UI/kg de peso corporal), de acuerdo a los procedimientos aprobados por el CENPALAB.

Se realizó la técnica de corazón aislado perfundido de Langendorf (11). Los corazones fueron extraídos de las ratas previamente anestesiadas y heparinizadas. Posterior a la extracción, los corazones se depositaron en una disolución Tyrode estándar fría ( $\sim 10^{\circ}\text{C}$ ) (Ver más abajo). Después de haber sido eliminados los restos de tejidos indeseables, los corazones se canularon de manera retrógrada por la aorta y se montaron en un sistema de perfusión termorregulado ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ). El flujo se estableció a razón de 10 mL/min, con una solución de Tyrode de la siguiente composición (mmol / L): 140 NaCl, 2,5 KCl, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 Tris- hidroximetilamino metano, 10 glucosa (pH = 7,4, gasificado con O<sub>2</sub>). El ápex cardiaco se ató a la palanca de un transductor fuerza-desplazamiento para el registro de la amplitud de la fuerza de contracción cardiaca. Se colocó en el epicardio izquierdo un electrodo de registro para obtener un electrocardiograma de superficie y en la unión aurículo ventricular se colocó un electrodo de estimulación.

Cada corazón fue perfundido durante 30 minutos con disolución control (Tyrode) para alcanzar la estabilidad de la preparación, y a continuación se le perfundieron secuencialmente concentraciones crecientes de EGC, hasta finalizar con disolución control nuevamente, para observar si el corazón recuperó su actividad inicial.

Durante el experimento se registraron los parámetros fisiológicos siguientes: frecuencia cardiaca espontánea (intervalo RR), intervalo QT, QT corregido

( $QT_c = QT/\sqrt{RR}$ ), complejo QRS y amplitud de la fuerza de contracción. La amplitud de la fuerza de contracción se midió solamente en presencia de estimulación, la misma se estableció a una frecuencia de 3,33 Hz con pulsos de 2 ms de duración y de dos veces la amplitud de corriente umbral.

Para la generación de pulsos de voltaje y el registro de los trazos de voltaje y fuerza de contracción, se utilizó una computadora (compatible a IBM) equipada con un conversor análogo digital (LabMaster DMA, 125 MHz, Scientific Solutions, USA) y el programa de adquisición ACQUIS1 (versión 2; Licencia CNRS, Francia).

Se calculó el por ciento de inhibición de la fuerza de contracción para cada concentración aplicada, y se hizo un ajuste a una función de Hill para determinar el valor de concentración para el cual se alcanza el 50 % del efecto ( $IC_{50}$ ). La función de Hill está dada por la ecuación:  $y = v_{max} (x^n / (k^n + x^n))$ , donde “y” es el por ciento de inhibición de la fuerza de contracción, “ $v_{max}$ ” es el por ciento de inhibición máximo de la fuerza de contracción, “x” es la concentración estudiada, “k” es  $IC_{50}$  y “n” es la constante de Hill.

Para el procesamiento estadístico se realizó una prueba t de Student para muestras pareadas, habiéndose comprobado previamente que los datos cumplían con las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza. Se tomó como nivel mínimo de significación  $p < 0,05$ , y se expresaron los resultados como valores medios y errores estándar de la media. La elaboración de los gráficos y el procesamiento estadístico se hicieron en el programa OriginPro 8 SRO v8.0724 (MA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El intervalo QT corregido ( $QT_c$ ) del electrocardiograma de superficie no se vio afectado significativamente por EGC en concentraciones de 0,001 a 3  $\mu\text{mol/L}$  (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de diferentes concentraciones de (-)- epigallocatequina (EGC)

	QTc (mseg)	p	QRS (mseg)	p	RR (mseg)	p
Control	88.55 ± 7.2		11.80 ± 0.7		531.05 ± 18.9	
EGC						
0.001 $\mu\text{mol/L}$	84.20 ± 4.7	0.71	12.50 ± 0.1	0.36	541.48 ± 20.2	0.72
0.003 $\mu\text{mol/L}$	98.01 ± 7.1	0.46	12.65 ± 0.2	0.28	552.20 ± 20.1	0.47
0.01 $\mu\text{mol/L}$	84.20 ± 11.2	0.74	12.85 ± 0.3	0.22	605.63 ± 41.4	0.15

0.03 $\mu\text{mol/L}$	98.70 $\pm$ 0.3	0.39	13.20 $\pm$ 0.3	0.12	639.13 $\pm$ 37.5 *	0.04
0.1 $\mu\text{mol/L}$	90.02 $\pm$ 10.0	0.91	13.30 $\pm$ 0.2	0.09	669.50 $\pm$ 30.1 *	0.008
0.3 $\mu\text{mol/L}$	86.50 $\pm$ 5.5	0.86	13.40 $\pm$ 0.3	0.08	676.50 $\pm$ 33.4 *	0.009
1 $\mu\text{mol/L}$	87.40 $\pm$ 6.7	0.91	13.60 $\pm$ 0.3	0.05	682.78 $\pm$ 33.4 *	0.008
3 $\mu\text{mol/L}$	95.10 $\pm$ 13.1	0.65	13.78 $\pm$ 0.3 *	0.04	678.05 $\pm$ 34.8 *	0.009

El símbolo \* indica que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

Estos resultados pueden ser posibles porque este flavonoide podría ejercer múltiples acciones sobre diferentes canales iónicos, dando como resultado una aparente ausencia de efectos sobre el intervalo QT del electrocardiograma de superficie cardíaca. De hecho, las catequinas modulan varios canales iónicos (12-15).

El ECG mostró una tendencia a aumentar el intervalo QRS del electrocardiograma de superficie, pero solo a la concentración más alta estudiada (3  $\mu\text{mol/L}$ ) este aumento fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) (tabla 1). EGCG, catequina relacionada estructuralmente con EGC, a 30  $\mu\text{mol/L}$  prolongó el intervalo QRS de corazones aislados de cobayas que latían espontáneamente (15). El intervalo QRS depende de la actividad del canal de sodio, Kang *et al.*, 2010 demostraron que EGCG inhibía el canal de sodio cardíaco humano clonado Nav1.5, de una manera dependiente de la dosis con una inhibición del  $45,7 \pm 6,9\%$  a 100  $\mu\text{mol/L}$  (15). EGCG redujo la amplitud de la corriente del canal de sodio dependiente de voltaje de una manera dependiente de la concentración en el rango de 0.1 a 400  $\mu\text{mol/L}$  en las neuronas CA1 del hipocampo de rata (13). Por otro lado, la EGC prolongó el intervalo RR del electrocardiograma de superficie y este aumento fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) desde 0,03  $\mu\text{mol/L}$  (tabla 1). El intervalo RR se utiliza como medida de la frecuencia cardíaca. EGCG a 30  $\mu\text{mol/L}$  no afectó la frecuencia cardíaca de los corazones de cobaya (15). El extracto de té verde usado con suplementos dietéticos no alteró la frecuencia cardíaca (16). Otro estudio concluyó que *Camellia sinensis* tiene un efecto sobre la frecuencia cardíaca, disminuye la frecuencia cardíaca en las mujeres normotensas y aumenta la frecuencia cardíaca en los hombres normotensos (17).

En el presente estudio en el rango de concentración de 0,001 a 3  $\mu\text{mol/L}$ , EGC disminuyó significativamente la fuerza de contracción (FC) en corazones de rata aislados (Figura 2); concentraciones tan bajas como 0,001  $\mu\text{mol/L}$  de EGC

disminuyeron la FC en un  $28,4 \pm 8,7\%$ . Dado que el EGC cambió ligeramente el intervalo RR, los corazones se estimularon a un intervalo de estímulo de 500 ms (sobre el intervalo RR espontáneo en condición control;  $531,05 \pm 18,9$  ms) para evitar cualquier cambio dependiente de la frecuencia en la FC. Los datos experimentales se ajustaron a una función de Hill (Figura 2) y la  $IC_{50}$  estimada para la inhibición de la contracción fue de  $0,03 \pm 7,8 \mu\text{mol/L}$  para EGC. La acción de EGC sobre FC no fue reversible tras el lavado con la solución de Tyrode normal.

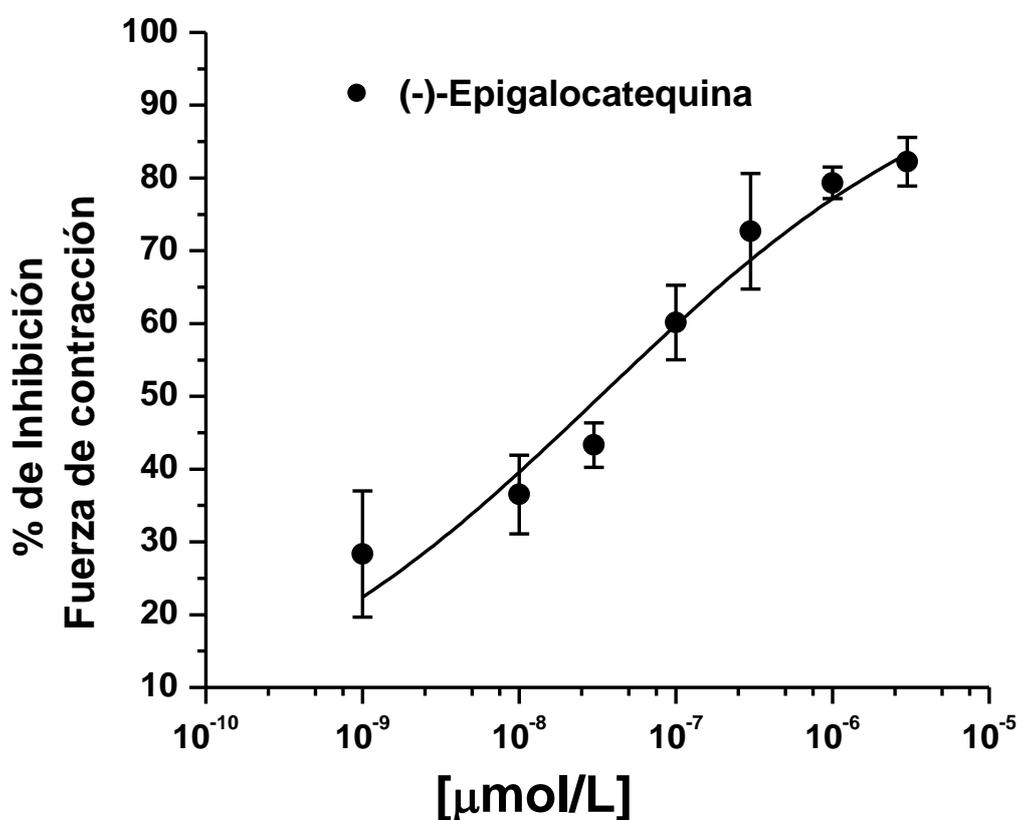


Figura 2: Efecto de (-)- epigallocatequina sobre la actividad contráctil de corazones aislados y perfundidos de ratas Wistar, sometidos a concentraciones crecientes de (-)- epigallocatequina. Los puntos representan las medias  $\pm$  errores estándares de seis experimentos para cada concentración. Se han ajustado las medias experimentales a una función de Hill.

Aunque se necesitan más estudios para ver si la EGC tiene algún efecto directo sobre los canales de calcio, la disminución de la fuerza de contracción cardíaca

por la EGC debería deberse, al menos en parte, a una inhibición de los canales de calcio. El canal de calcio tipo L fue inhibido en un 20,8% a 30  $\mu\text{mol/L}$  por EGCG, alcanzó un máximo de  $37,1 \pm 4,2\%$  a una concentración de 100  $\mu\text{mol/L}$  (15). Tadano *et al.*, 2010 informaron que EGC no tuvo efectos significativos sobre la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del miofilamento cardíaco. Sin embargo, se encontró que el EGC y el EGCG disminuían la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , eran desensibilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que actuaban mediante la unión a la troponina C cardíaca (18). A concentraciones dentro del mismo rango en el que el EGCG tiene efectos vasorrelajantes relacionados con la inhibición del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células del músculo liso (19), en los presentes resultados, la concentración de EGC relajó de forma dependiente con casi igual eficacia la contracción de los corazones de rata. Sobre la base de estos resultados, la relevancia fisiológica de la disminución de la fuerza de contracción cardíaca por EGC puede afirmarse considerando los datos disponibles sobre el nivel *in vivo* de la catequina relacionada EGCG ( $[\text{EGCG}] = 0.3\text{-}7.5 \mu\text{mol/L}$  en la sangre de los consumidores de té verde (20). La administración de tres meses con cápsulas de té verde disminuyó la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en cuatro mmHg en sujetos hipertensos obesos (21) pero no en sujetos obesos (22). Un metaanálisis reciente que incluyó once ensayos concluyó que el consumo a corto plazo ( $> 6$  meses) de té negro podría disminuir la PAS y la PAD en 1-2 mmHg y el té verde en tres mmHg (23).

Además, el tratamiento con EGCG protegió los corazones de rata de la isquemia / reperfusión *in vivo*; esto podría sugerir que el EGCG es beneficioso para el tratamiento del daño miocárdico inducido por reperfusión (24-25).

## **CONCLUSIONES**

El presente estudio reveló que EGC tiene efectos cardíacos directos. Los resultados presentados aquí confirman el papel de la catequina del té EGC, como precursor del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine* 2010; 5, 13.

2. Leung L, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 2001; 131: 2248-2251.
3. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* 1992; 21(3): 334–350.
4. Human Metabolome Database (HMDB). Record Name: (-)-Epigallocatechin. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0038361>. Consultado: 17 de mayo de 2021.
5. Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S. Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1 $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 329: 112-120.
6. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349: 699.
7. Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. Green tea polyphenols as an antioxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection, *Cardiovascular and Hematological Disorders-Drug Targets* 2007; 7(2): 135–144.
8. Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2004; 109: 2448–2453.
9. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Spina M, Tran CN, Falconi M, Eleuteri AM, Angeletti M. Epigallocatechin-3-gallate potently inhibits the in vitro activity of hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase. *J Lipid Res* 2010; 52: 897-907.
10. Galán-Martínez L, Herrera-Estrada I, Fleites-Vázquez A. Direct actions of the flavonoids naringenin, quercetin and genistein on rat cardiac and vascular muscles. *J Pharm Pharmacogn Res* 2018; 6(3), 158–166.
11. Galán L, Talavera K, Vassort G, Alvarez JL. Characteristics of Ca<sup>2+</sup> channel blockade by oxodipine and elgodipine in rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 1998; 357, 93–105.
12. Kelemen K, Kiesecker C, Zitron E, Bauer A, Scholz E, Bloehs R, Thomas D, Greten J, Remppis A, Schoels W, Katus HA, Karle CA. Green tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cardiac hERG potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364, 429-435.

13. Deng HM, Yin ST, Yan D, Tang ML, Li CC, Chen JT, Wang M, Ruan DY. Effects of EGCG on voltage-gated sodium channels in primary cultures of rat hippocampal CA1 neurons. *Toxicology* 2008; 252: 1-8.
14. Kim TH, Lim JM, Kim SS, Kim J, Park M, Song JH. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Na(+) currents in dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 2009; 604, 20-26.
15. Kang J, Cheng H, Ji J, Incardona J, Rampe D. In vitro electrocardiographic and cardiac ion channel effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate, the main catechin of green tea. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 334: 619-626.
16. Seifert JG, Nelson A, Devonish J, Burke ER, Stohs SJ. Effect of acute administration of an herbal preparation on blood pressure and heart rate in humans. *Int J Med Sci* 2011; 8, 192-197.
17. Ullah N, Khan MA, Asif AH, Shah AA, Anwar S, Wahid H, Nazir A. Effect of Green tea on Heart Rate of Male and Female. *Asian J Med Sci* 2011; 3 (4): 180-182.
18. Tadano N, Du CK, Yumoto F, Morimoto S, Ohta M, Xie MF, Nagata K, Zhan DY, Lu QW, Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Tanokura M, Ohtsuk I, Sasaguri T. Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 1034-1043.
19. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci* 1998; 63: 275–283.
20. Ullmann U, Haller J, Decourt JP, Girault N, Girault J, Richard-Caudron AS, Pineau B, Weber P. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res* 2003; 31: 88 – 101.
21. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res* 2012; 32: 421–427.
22. Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biol Trace elem Res.* 2012; 149, 315–322.

23. Hartley I, Flowers N, Holmes J, Clarke A, Stranges S, Hooper L, Rees K. Green and black tea for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: cD009934.
24. Aneja R, Hake PW, Burroughs TJ, Denenberg AG, Wong HR, Zingarelli AB. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Molecular Medicine* 2004; 10(1–6): 55–62.
25. Xuan F, Jian J. Epigallocatechin gallate exerts protective effects against myocardial ischemia/reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis and the restoration of the autophagic flux. *Int J Mol Med* 2016; 38: 328-336.