

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS
"DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ"
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ARTÍCULO ORIGINAL

EVALUACIÓN FOTOHEMOLÍTICA *IN VITRO* DE *PARTHENIUM HYSTEROPHORUS* L

Por:

MSc. Deodely Bermúdez Toledo¹, Dra. CM. María Boffill Cárdenas², MSc. Arianna Valido Díaz³, Lic. Celia María Martínez Montalbán⁴ y Téc. Nieves Iglesias Rodríguez⁵

1. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Bioquímica General. Centro de Toxicología. Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara. Investigadora Agregada. Instructora. UCM-VC. e-mail: deodelybt@ucm.vcl.sld.cu
2. Licenciada en Química. Doctora en Ciencias Médicas. Profesora Titular y Consultante. UCM-VC.
3. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural. Aspirante a investigadora. Centro de Toxicología. Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara.
4. Licenciada en Tecnología de la Salud. Perfil Laboratorio Clínico. Centro de Toxicología. Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara.
5. Técnico en Veterinaria y Zootecnia. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara.

Resumen

La prueba de fotohemólisis es empleada para determinar el potencial fototóxico de productos que dañan la membrana del eritrocito bajo la acción de la luz ultravioleta-visible. En el presente trabajo, se evaluó el efecto fotoirritante de *Parthenium hysterophorus* L. como prueba de estimación de riesgo, según técnicas *in vitro* de toxicología. También se determinaron los metabolitos secundarios del extracto vegetal, responsables de los efectos observados. Los resultados mostraron hemólisis en concentraciones muy bajas, y la concentración hemolítica 50 para las muestras irradiadas y las no irradiadas fue de 0,02 mg/ml y 0,05 mg/ml, respectivamente. Por otro lado, los valores de densidad óptica y el factor hemolítico obtenidos fueron inferiores al rango de clasificación en cada caso. Mediante el tamizaje fitoquímico, se comprobó la presencia de determinados metabolitos y en diferentes proporciones que pudieran ser los responsables, en parte, del efecto fotohemolítico obtenido. Se concluyó que el extracto blando de la especie *Parthenium hysterophorus* L. no es fotoirritante.

Descriptor DeCS:
ERITROCITOS
PARTHENIUM HYSTEROPHORUS
AGENTES HEMOLÍTICOS

Subject headings:
ERYTHROCYTES
PARTHENIUM HYSTEROPHORUS
HEMOLYTIC AGENTS

Introducción

Muchas sustancias son capaces de producir fotoirritabilidad bajo la acción de radiaciones ultravioletas de la luz solar sobre la piel, y para ello, las células rojas sanguíneas son ampliamente usadas como modelo biológico para identificar agentes potencialmente fototóxicos como prueba de estimación de riesgo, basado en el efecto que pudieran tener algunas sustancias sobre las membranas celulares y proteínas funcionales y estructurales¹⁻⁴

El ensayo de fotohemólisis, también conocido como Photo-RBC, permite determinar la capacidad que tiene un producto de dañar las membranas eritrocitarias, oxidar la hemoglobina en presencia de la luz ultravioleta (UV), o ambas, de modo que permite conocer el efecto beneficioso o perjudicial de este sobre las membranas biológicas⁵.

Parthenium hysterophorus L, comúnmente conocida como escoba amarga, es una planta medicinal de amplio uso por la población; sin embargo, en la referencia etnomédica y bibliográfica se alega que la exposición por contacto de esta planta produce dermatitis alérgica severa, en dependencia del tiempo de exposición⁶⁻⁸; a pesar de ello, son escasos los estudios toxicológicos preclínicos que avalen el potencial fototóxico de esta especie. En el presente estudio, se evaluó el efecto fotoirritante de esta especie vegetal como prueba de estimación de riesgo.

Métodos

La planta fue recolectada en el huerto de plantas medicinales de la Unidad Básica de Producción Cooperativa "Octubre Victorioso" de Villa Clara, en horas de la mañana. La parte aérea fue secada a la sombra, molinada y finalmente tamizada. Posteriormente, se procedió a la elaboración de un extracto hidroalcohólico por el método de repercolación en el Laboratorio Provincial de Plantas Medicinales de Villa Clara, con su correspondiente control de la calidad, a partir del cual, luego de un proceso de rotoevaporación (rotoevaporador IKA-Labortechnik), se obtuvo un extracto blando, del cual se evaluaron seis concentraciones por triplicado con el empleo de solución amortiguadora salino fosfato (PBS) como vehículo para mantener el pH a 7,4 y la osmolaridad del medio. Las concentraciones de estudio fueron: 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,12 mg/ml basado en los sólidos totales, de modo que la mayor concentración será aquella que coincida con la mínima concentración para lograr el 100 % de hemólisis.

Para la determinación del efecto fotohemolítico, se procedió según el protocolo 81 de las técnicas *in vitro* en Toxicología (INVITTOX), y se empleó la clorpromazina como control positivo, por su reconocida acción fotohemolítica.

Las células rojas de sangre humana fueron lavadas con PBS, para lo cual se preparó una suspensión de eritrocitos en una proporción de 0,8 ml de glóbulos suspendidos en 1ml de PBS. Se empleó sangre de los diferentes grupos sanguíneos al demostrarse, mediante estudios previos, la no existencia de diferencias estadísticas significativas en relación con el comportamiento fotohemolítico en cada caso⁹.

Se prepararon dos placas idénticas: una de ellas se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente cubierta en papel de aluminio, y la otra bajo una lámpara de luz UV con una intensidad de radiación ultravioleta A (UVA) de 960 mw/cm², ambas durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de exposición, la placa expuesta a la irradiación permaneció 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, fue transferido el contenido de las placas a tubos y centrifugados durante 10 minutos (aproximadamente 3500 rpm). Para evaluar el punto final, se determinó la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante a 540 nm, el cual se monitorizó a 540 nm contra un blanco de eritrocitos en PBS, además de un blanco con extracto. El 100 % de hemólisis se obtuvo incubando los eritrocitos en agua destilada.

Los procedimientos experimentales se realizaron de forma rápida y hábil para minimizar los efectos cinéticos, debido a que la hemólisis y la formación de metahemoglobina no se detienen con el cese de la irradiación.

La concentración del extracto que produjo un 50 % de los eritrocitos hemolizados (CH₅₀), tanto de muestras irradiadas (MI) como de no irradiadas (MNI) fue determinada por regresión lineal. Los

valores de CH₅₀ de los extractos sin irradiar e irradiados fueron comparados, y se obtuvo la relación CH₅₀ (MNI)/CH₅₀(MI) que posteriormente permitirá emitir un criterio de clasificación.

El ensayo de oxidación de la hemoglobina tiene la finalidad de determinar la formación de metahemoglobina intracelular y extracelular. Este se realizó en las mismas condiciones que el ensayo de fotohemólisis.

El extracto se probó por triplicado en una concentración de sólidos totales de 10 mg/mL, y se añadió 200 µL de una solución de Tritón x-100 al 1 %, para solubilizar las células remanentes a razón de 200 µL en cada pocillo de las placas irradiadas y no irradiadas, después de la incubación en la oscuridad. Se centrifugaron y se realizó una lectura espectrofotométrica a 630 nm para determinar la cantidad de metahemoglobina.

El valor de la máxima cantidad de metahemoglobina es la diferencia de densidad óptica (ΔDO) a 630 nm entre las muestras de la placa irradiada y la no irradiada.

Los productos potencialmente fototóxicos serán aquellos cuyo factor hemolítico = CH₅₀ muestra no irradiada/ CH₅₀ muestra irradiada ≥3, ΔDO ≥ 0,05 o ambos.

Finalmente, los metabolitos secundarios principales del extracto hidroalcohólico se determinaron cualitativamente mediante técnicas de tamizaje fotoquímico, entre las que se encuentran los ensayos de: Shinoda, espuma, ninhidrina, Dragendorff, cloruro férrico, resina, Baljet, Borntrager, Liebermann-Burchard, Fehling y Kedde¹⁰.

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows. Se determinó la media aritmética de la variable estudiada (absorbancia) para cada una de las concentraciones de estudio, además de los valores de CH₅₀ que fueron obtenidos mediante el programa Excel versión 6.0 por el método de regresión lineal, partiendo de las curvas dosis-respuestas. La significación estadística del porcentaje hemolítico en cada uno de los momentos (antes de la irradiación y postirradiación) se determinó a través de la prueba no paramétrica de los rangos con signos de Wilcoxon. Se consideró un nivel de significación p < 0,05 (significativo).

Resultados

En la figura se muestran los resultados obtenidos mediante la prueba de fotohemólisis en presencia del extracto de estudio, y se observó cómo la hemólisis de los glóbulos rojos se produce en concentraciones muy bajas.

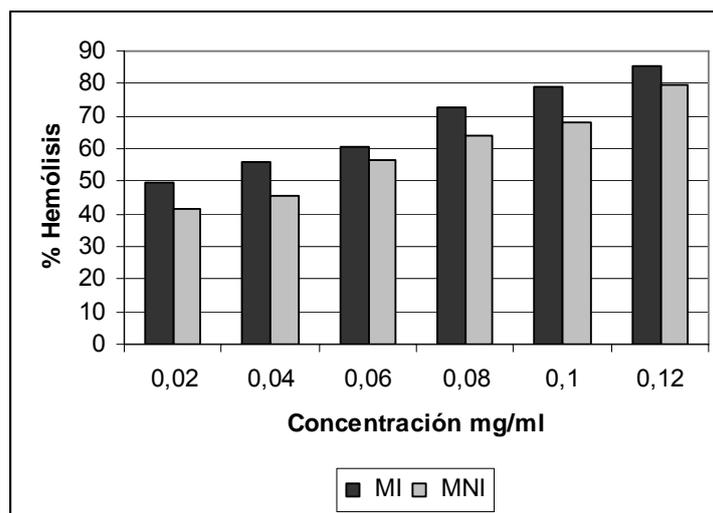


Figura Efecto fotohemolítico de *Parthenium hysterophorus* L.
 MI: muestras irradiadas.
 MNI: muestras no irradiadas.

La actividad hemolítica obtenida de las muestras sin irradiar en las diferentes concentraciones de estudio fue menor en relación con las muestras expuestas a la luz UV y, a pesar de este comportamiento, es de señalar que se evidenció una actividad hemolítica significativa en ambos momentos con valores marcados en las concentraciones de 0,04 mg/ml, 0,08 mg/ml y 0,1 mg/ml. Las diferencias estadísticas entre cada una de las muestras (sin exposición a la luz UV y con ella) en relación con el porcentaje hemolítico, fueron significativas ($p = 0,028$), y los valores de CH_{50} para las MI y las MNI fueron de 0,02 mg/ml y 0,05 mg/ml, respectivamente.

La relación entre los valores de CH_{50} de las MNI y la CH_{50} de las MI (factor hemolítico) obtenidos en la prueba de fotohemólisis fue de 2,5, lo que permite emitir como resultado concluyente que el extracto de ensayo se considera no fotoirritante, según criterio de clasificación.

La prueba de oxidación de la hemoglobina arrojó una cifra de ΔDO inferior al rango permisible, y el valor obtenido fue 0,012. Los resultados obtenidos en este ensayo confirman el criterio de que el extracto de la planta de estudio se considera no fotoirritante.

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la parte aérea de la planta resultó positivo para los ensayos de ninhidrina (+), Dragendorff (+), Shinoda (+) y el ensayo de Liebermann-Burchard (+++), lo que indica la presencia de aminoácidos libres, alcaloides, flavonoides, y triterpenos y esteroides en mayor proporción.

Discusión

Mediante el tamizaje fitoquímico se comprobó la presencia de flavonoides y alcaloides, y a pesar de las evidencias científicas en relación con el efecto antioxidante de estos metabolitos secundarios, la existencia de aminoácidos libres pudiera contribuir, al menos en parte, al efecto hemolítico obtenido en ambas muestras (irradiadas y no irradiadas). Estos metabolitos pueden provocar daños a nivel de la membrana celular y, por consiguiente, la lisis del eritrocito, en dependencia de sus estructuras químicas^{11,12}. Por otro lado, informes farmacognósticos refieren la presencia de partenina (lactona sesquiterpénica) como el componente más abundante en la planta, la cual actúa como potente clastógeno y citotóxico^{7,13}; a ello pudiera deberse, mayoritariamente, el incremento de la inestabilidad de la membrana celular y, como consecuencia, la lisis del eritocito.

A pesar de las diferencias estadísticas entre los porcentajes hemolíticos obtenidos en ambos momentos (sin exposición a la luz UV y con exposición a ella), las muestras no irradiadas mostraron valores de hemólisis marcados y también en concentraciones bajas, por lo que, si se analiza el comportamiento del extracto vegetal de estudio en relación con la fotohemólisis obtenida, se puede inferir que el efecto de conjunto de la aplicación del extracto vegetal a las muestras sanguíneas y la incidencia de la luz ultravioleta, no es la causa directa de la lisis celular, sino la presencia de determinados metabolitos secundarios que pueden determinar, finalmente, el efecto neto observado en las membranas eritrocitarias. De ahí que los mayores valores de hemólisis correspondan a las muestras irradiadas, en las cuales se incrementa la sensibilidad de la membrana celular por la acción de la luz UV. Estudios previos *in vitro* con el empleo de la prueba de hemólisis o RBC evidenciaron valores detectables de hemólisis para concentraciones también muy bajas de la planta en estudio, y se registró una CH_{50} de 0,08 mg/ml. Si tenemos en cuenta que el ensayo RBC evalúa el efecto del producto analizado durante 10 min de contacto con los glóbulos rojos sin exposición a la luz UV, y que la prueba de fotohemólisis lo hace por un tiempo de exposición de 90 min –de los cuales 60 min frente a las radiaciones de luz UV y el resto incubado en la oscuridad– se puede relacionar la actividad hemolítica marcada obtenida, tanto en muestras irradiadas como en las no irradiadas, con la presencia de determinados metabolitos secundarios que pudieran interferir en la estabilidad de las membranas celulares precipitando la hemólisis, y no con la incidencia de la luz UV ni con el tiempo de contacto con las membranas eritrocitarias⁹.

Por otra parte, a pesar de que la relación entre los valores de CH_{50} de las MNI y MI fue inferior a 3, el factor hemolítico obtenido se considera muy cercano al rango permisible, lo cual motiva la realización de estudios ulteriores en relación con este comportamiento. Ello puede deberse a la cantidad relativa de estos metabolitos secundarios que contribuyan mayoritariamente al efecto del extracto blando de *Parthenium hysterophorus* L. sobre las membranas biológicas.

Abstract

Photohemolysis test is used for determining the phototoxic potential of products that damage the erythrocyte membrane under the action of ultraviolet-visible light. Through this paper the photoirritant effect of *Parthenium hysterophorus* L., was evaluated as a risk assessment test, according to in vitro techniques in toxicology. Also secondary metabolites of the vegetable extract responsible for the effects we could perceive were determined. The results showed hemolysis at low concentrations and the hemolytic concentration 50 for irradiated and non-irradiated samples was 0,02 mg/ml and 0,05 mg/ml, respectively. On the other hand, the optical density values and the hemolytic factor obtained were lower than the classification range in each case. The presence of certain metabolites which could be, in part, and in different proportions responsible for the hemolytic effect that was obtained, was confirmed by phytochemical sifting. We got to a conclusion; the *Parthenium hysterophorus* L. soft extract is photoirritant.

Referencias bibliográficas

1. Vargas F, Rivas C, Zoltan T, Fuentes A, Padrón L, Díaz Y, *et al.* Photodegradation and in vitro phototoxicity of aceclofenac. *Pharmazie*. 2007;2(5):337-41.
2. Munday R, Smith BL, Munday CM. Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone. *J Appl Toxicol*. 2007;27(3):262-9.
3. Vargas F, Izzo C, Zoltan T, López V. Studies on the *in vitro* phototoxicity of the antidiabetes drug gliclazide. *Avances en Química*. 2006;1(3):3-12.
4. Wu TK, Wang YK, Chen YC, Feng JM, Liu YH, Wang TY. Identification of a *Vibri furnissii* oligopeptide permease and characterization of its *in vitro* hemolytic activity. *J Bacteriol*. 2007;189(22):8215-23.
5. González Madariaga Y, Boffill Cárdenas M, Bermúdez Toledo D, Castillo Alfonso O, Martínez Montalbán C, Martínez Bernal Y. Evaluación fotohemolítica *in vitro* de *Cissus sicyoides* L. y *Achyranthes aspera* L. *Rev Cubana Plant Med*. 2010;15(3):126-32.
6. Saucedo Hernández Y, Mohamad Safa B, González Bedía M, González San Miguel H, Bravo Sánchez L, Jorge Rodríguez E, *et al.* Especificidad de la cromatografía líquida de alta eficacia para evaluar estabilidad química basada en partenina del follaje seco pulverizado de *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga). *Rev Cubana Plant Med*. 2010;15(1):3-17.
7. Saucedo Hernández Y, Mohamad Safa B, González Bedía M, González San Miguel H, Bravo Sánchez L, Jorge Rodríguez E, *et al.* Estabilidad del polvo de *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga) basado en el contenido de partenina mediante cromatografía líquida de alta eficacia. *Rev Cubana Plant Med*. 2009;14(3):4-13.
8. Valdés FA. Actividad antimalárica *in vitro* y citotoxicidad de algunas plantas medicinales cubanas seleccionadas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(4):197-201.
9. González Madariaga Y, Boffill Cárdenas M, Bermúdez Toledo D, Sánchez Álvarez C, Castillo Alfonso O. Evaluación del ensayo de fotohemólisis en el sistema de Clasificación ABO Rh+. *Medicentro Electrónica [Internet]*. 2007 [citado 29 feb. 2011];11(1):[aprox. 5 p.]. Disponible en: <http://www.vcl.sld.cu/sitios/medicentro/paginas%20de%20acceso/Sumario/ano%202007/v11n1a07/evaluacion.htm>
10. Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Pueblo y Educación; 2001.
11. Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Moran C, Clapes P, *et al.* Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology*. 2004;201(1-3):87-93.
12. Pignatello R, Noce C, Campisi A, Acquaviva R, Bucolo C, Puglisi G, *et al.* Evaluation of cell tolerability of a series of lipoamino acids using biological membranes and a biomembrane model. *Curr Drug Deliv*. 2007;4(2):109-21.

13. Águila Gil B, Meneses Castillo R, González Mata L, Madrigal Lesxay E, Fernández Fernández D. Extracto acuoso de Escoba amarga. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev Cubana Plant Med. 2000;5(3):123-24.

Recibido: 30 de febrero de 2011

Aprobado: 28 de septiembre de 2011