

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS  
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL  
SANTA CLARA, VILLA CLARA

EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE FOTOHEMÓLISIS EN EL SISTEMA DE  
CLASIFICACIÓN ABO Rh+

Por:

MSc. Yisel González Madariaga<sup>1</sup>, Dra. CM. María de los Ángeles Boffill Cárdenas<sup>2</sup>, Lic. Deodelsys Bermúdez Toledo<sup>3</sup>, MSc. Carmen Sánchez Álvarez<sup>4</sup> e Ing. Orestes Castillo Alfonso<sup>5</sup>

1. Investigadora agregada. Instructora adjunta. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. e-mail: [yiselgm@iscm.vcl.sld.cu](mailto:yiselgm@iscm.vcl.sld.cu)
2. Doctora en Ciencias Médicas. Especialista en Bioquímica. Unidad de Toxicología Experimental. Profesora Titular y Consultante. ISCM-VC. e-mail: [bofill@iscm.vcl.sld.cu](mailto:bofill@iscm.vcl.sld.cu)
3. Reserva científica. UTEX. ISCM-VC.
4. Especialista A en Medicina Veterinaria. Unidad de Toxicología Experimental. Instructora adjunta. ISCM-VC. e-mail: [csa@iscm.vcl.sld.cu](mailto:csa@iscm.vcl.sld.cu)
5. Instructor adjunto. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. e-mail: [orecas@iscm.vcl.sld.cu](mailto:orecas@iscm.vcl.sld.cu)

### **Resumen**

El estudio realizado evaluó la diferencia de susceptibilidad de los cuatro grupos sanguíneos del sistema de clasificación ABO Rh+, en el ensayo de fotohemólisis, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos pudieran ser importantes en la explicación de diversos fenómenos relacionados con reacciones adversas, así como que contribuirían al aporte de pruebas que avalen este método en el pesquisaje toxicológico de sustancias. Se empleó la prueba de fotohemólisis para evaluar el grado de hemólisis y oxidación de la hemoglobina. En los grupos evaluados, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los ensayos realizados. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que el empleo de un tipo en particular de grupo sanguíneo humano Rh+ no altera de forma significativa la respuesta al daño fotohemolítico, frente a un agente fotosensible como la clorpromazina.

**Descriptores DeCS:**

SISTEMA DEL GRUPO SANGUINEO ABO  
HEMOLISIS  
AGENTES FOTOSENSIBILIZADOS  
CLORPROMAZINA

**Subject headings:**

ABO BLOOD-GROUP SYSTEM  
HEMOLYSIS  
PHOTOSENSIBILIZING AGENTS  
CHLORPROMAZINE

### **Introducción**

En la actualidad, los estudios *in vitro* han alcanzado tal desarrollo, que su exactitud, rápida ejecución y relativa poca complejidad, así como su factibilidad económica y confiabilidad, van ganando cada vez más adeptos dentro de la comunidad científica, y aceptación por las entidades reguladoras<sup>1,2</sup>.

Los ensayos de hemólisis y fotohemólisis constituyen una herramienta útil y barata para detectar, tanto la actividad tóxica como la farmacológica, lo cual redundaría en un impacto extraordinario en la ciencia aplicada. La detección de efectos tóxicos, en un momento temprano de la investigación, ahorraría tiempo, dinero y contribuiría a replantear otro tipo de formulación o uso propuesto inicialmente. La presencia de actividad farmacológica abriría las puertas a un sinnúmero de investigaciones que tendrían como objetivo la comprobación de efectos terapéuticos de gran impacto social, como anticancerígenos y antioxidantes, entre otros<sup>3</sup>.

El ensayo de fotohemólisis, también conocido como Photo-RBC, permite conocer el grado de hemólisis que puede provocar un producto al ser incubado con un agente fotosensible en presencia de luz ultravioleta y, de esta forma, se evalúa el efecto perjudicial o beneficioso de la luz en la acción del producto sobre las membranas celulares<sup>4-7</sup>. El protocolo de fotohemólisis se encuentra en proceso de validación interlaboratorio, aunque algunos lo utilizan de forma sistemática, fundamentalmente en la evaluación de cosméticos<sup>1</sup>.

Las respuestas fototóxicas o fotoalérgicas de drogas administradas por vía sistémica son frecuentemente informadas como reacciones adversas. El mecanismo de daño fototóxico pudiera ser dilucidado con el empleo de este modelo, y descartar que la toxicidad dérmica postirradiación no se deba a la activación de especies tóxicas del oxígeno en la epidermis, la dermis, o ambas, sino a daños en los eritrocitos<sup>8,9</sup>.

El objetivo de este estudio es evaluar la diferencia de susceptibilidad de este ensayo, teniendo en cuenta los diferentes tipos de grupos sanguíneos en el humano que no han sido aún explorados; su análisis, sobre la base de datos experimentales, podría ser muy útil en la explicación de diferentes fenómenos relacionados con reacciones adversas, así como el diseño de estrategias para evitar o minimizar el daño fotohemolítico en una persona en particular; por otra parte, contribuiría al aporte de pruebas que demuestren la aplicabilidad y eficacia del empleo de este método en estudios fármaco-toxicológicos.

## **Métodos**

Se realizó un estudio para comprobar la susceptibilidad fotohemolítica de los cuatro grupos sanguíneos de clasificación ABO Rh+ en el humano. Las muestras de donantes sanos fueron obtenidas en el Banco Central de Sangre de la provincia.

La evaluación de la fotohemólisis se efectuó según protocolo 81 del INVITOX10, para determinar el por ciento de hemólisis en cada caso.

Modelo biológico:

Sangre humana de los diferentes tipos de grupos sanguíneos del sistema ABO Rh+: A+, B+, AB+, O+.

Sistema de ensayo y reactivos

La sustancia de ensayo utilizada fue clorpromazina de calidad farmacéutica, proveniente de la industria médico-farmacéutica, en ampolla de 25 mg/mL de solución acuosa. El resto de los reactivos utilizados provinieron de la Compañía Química Sigma.

Procedimiento

El agente fotohemolítico clorpromazina se disolvió en PBS y se preparó una solución madre de 0,6 mg/mL. La mayor concentración probada del producto coincidió con la mínima concentración para lograr el 100 % de hemólisis. Cada una de ellas se evaluó por triplicado, tanto para el ensayo de fotohemólisis como para el de la oxidación de la hemoglobina.

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

### Determinación del por ciento de hemólisis

Se prepararon dos series de placas idénticas: una de ellas se dejó en la oscuridad, envuelta en papel de aluminio, y la otra se colocó debajo de la luz ultravioleta durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de exposición, la placa expuesta a la luz se dejó 30 minutos a oscuras. Posteriormente, se traspasó el contenido de las placas a tubos y se centrifugó durante 5 minutos (aproximadamente 3500 rpm). Para evaluar el punto final, se determinó la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante a 540 nm, contra un blanco de eritrocitos en PBS (monitorización de la hemólisis espontánea). El 100% se consiguió incubando los eritrocitos en agua destilada.

### Determinación de la oxidación de la hemoglobina

Este ensayo se realizó en las mismas condiciones que el de fotohemólisis.

Se añadieron 200  $\mu$ L de una solución de Tritón X-100 al 1%, para solubilizar las células remanentes en cada una de las placas no irradiadas e irradiadas después de la incubación en la oscuridad. Posteriormente, se centrifugaron las mezclas y se realizó una lectura espectrofotométrica a 630 nm para determinar la cantidad de metahemoglobina (meta-Hb).

La concentración de metahemoglobina es directamente proporcional a la densidad óptica a 630 nm. El valor de la máxima cantidad de meta-Hb se determinó por la diferencia de densidad óptica a 630 nm, entre las muestras de la placa irradiada y la no irradiada:

$$\Delta DO = [DO (+) - BI] - [DO (-) - BI]$$

DO (+): DO a 630 nm de la muestra irradiada

DO (-): DO a 630 nm de la muestra no irradiada

BI: DO a 630 nm del blanco a la misma concentración

Los resultados obtenidos, tanto en el ensayo de fotohemólisis como en el de la oxidación de la Hb, fueron procesados mediante el paquete estadístico Static Graphics versión 4.1 para Windows. Se realizó una prueba de ANOVA con un intervalo de confianza de 95 % para obtener el valor de significación de la diferencia entre los grupos sanguíneos.

## Resultados

En la prueba de fotohemólisis, los resultados obtenidos para las muestras irradiadas y las no irradiadas de los cuatro grupos sanguíneos del sistema ABO Rh+ evaluados se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1 Resultados de la prueba de fotohemólisis en muestras irradiadas. Los valores se corresponden con la media de tres experimentos.

[Clorpromazina] mg/mL	Por ciento de hemólisis			
	A+	B+	AB+	O+
0,3	100	100	100	100
0,15	25,6	38,9	36,05	43
0,075	19,05	30,2	28,55	42,55
0,0375	6,5	9,75	3,0	9,5
0,01875	2,25	3,5	1,75	2,0
0,001	2	2,75	1,00	1,85

Tabla 2 Resultados de la prueba de fotohemólisis en muestras no irradiadas. Los valores se corresponden con la media de tres experimentos.

[Clorpromazina] mg/mL	Por ciento de hemólisis			
	A+	B+	AB+	O+
0,3	100	100	100	100
0,15	18	19,5	21,15	17,95
0,075	9,35	8,75	15,75	10,15
0,0375	3,7	14,35	12,6	2,6
0,01875	1,2	3,25	2,5	1,9
0,001	1,45	1,35	1,8	2,65

La prueba de ANOVA aplicada, tanto en las muestras irradiadas como en las no irradiadas, para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los grupos sanguíneos evaluados, confirmó la ausencia de estas. En el caso de las muestras irradiadas, se obtuvo un valor de significación de 0,8899, para un nivel de confianza del 95 %. En cuanto a las muestras no irradiadas, el valor de significación obtenido fue de 0,9984 para  $\alpha = 0,05$ .

En el ensayo de la oxidación de la hemoglobina, efectuada en los cuatro grupos sanguíneos evaluados, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Valores de la DO obtenidos a 630 nm en la prueba de oxidación de la hemoglobina. Los valores se corresponden con la media de tres experimentos.

[Clorpromazina] mg/mL	ADO			
	A+	B+	AB+	O+
0,3	0,221	0,176	0,396	0,242
0,15	0,208	0,2	0,356	0,172
0,075	0,124	0,165	0,283	0,163
0,0375	0,118	0,095	0,153	0,117
0,01875	0,049	0,057	0,023	0,013
0,001	0,004	0,002	0	0,005

## Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la ausencia de diferencias significativas entre las respuestas al daño fotohemolítico de los grupos sanguíneos del sistema ABO Rh+, frente al agente fotohemolítico clorpromazina. Las diferencias morfológicas entre los eritrocitos humanos pertenecientes a los grupos sanguíneos evaluados, dadas fundamentalmente por la presencia en cantidades significativas de carbohidratos, proteínas y glicolípidos, que forman los conocidos marcadores antigénicos<sup>11</sup>, –el grupo O+ es el único que carece de estas estructuras–, resultaron insuficientes para producir un cambio significativo en la respuesta fototóxica. Aunque, de igual forma a la obtenida por otros investigadores<sup>12,13</sup>, se obtuvieron valores de hemólisis superiores en el grupo de muestras irradiadas. A partir de la concentración de 0,01875 mg/ml, no se observaron diferencias significativas en la respuesta hemolítica, probablemente porque en este caso tiene más peso la demora producida en el procesamiento de las muestras, que permitió la llegada de una pequeña dosis de luz a estas.

La diferencia en la estructura química de los marcadores antigénicos tampoco introduce variación en la susceptibilidad a la formación de metahemoglobina en los eritrocitos, después de la incubación con la clorpromazina y la luz ultravioleta. Por otra parte, el incremento obtenido en la DO de las muestras irradiadas, en comparación con aquellas que no fueron irradiadas, es totalmente esperado, lo que evidencia una mayor pérdida de células a iguales concentraciones del agente fotohemolítico.

En los resultados obtenidos, se observó que el grado de oxidación de la hemoglobina en los grupos evaluados fue similar y se correspondió con los resultados esperados; esto nos permite establecer que no existen diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad fotohemolítica.

### **Summary**

The study assessed the difference in susceptibility of the four blood groups of the ABO Rh+ classification system during the photohemolysis assay, taking into account that the results could be important for the interpretation of several phenomena related to adverse reactions and that it would contribute to the evidence supporting the use of this method in the toxicological screening of substances. The photohemolysis test was used to assess the hemolysis and oxidation level in the hemoglobin. There were no significant differences among the assessed groups in any of the assays that were carried out. The obtained results allow us to conclude that the use of a human Rh+ blood group type in particular does not alter significantly the response to the photohemolytic damage with a photosensibilizing agent such as chlorpromazine.

### **Referencias bibliográficas**

1. Pape WJW, Maurer T, Pfannenbecher U, Winfried S. The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA Validation Programme on Phototoxicity (Phases II). ATLA. 2001. Mar;29:145-62.
2. Repetto G. Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos. Rev Toxicol. 1995;12:3-9.
3. Vreman HJ, Wong RJ, Stevenson DK. Phototherapy: current methods and future directions. Semin Perinatol. 2004 Oct;28(5):326-33.
4. Kahn G, Fleischaker B. Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. Invest. Dermatol. 1971;56:85-90.
5. Hetherington AM, Johnson BE. Photohemolysis. Photodermatology. 1984;1:255-60.
6. Benavides T, Martinez 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 Sep 1;201(1-3):87-93.
7. Nam C, An S, Lee E, Moon S, Kang J, Chang I. An *in vitro* phototoxicity assay battery (photohaemolysis and 3T3 NRU PT test) to assess phototoxic potential of fragrances. ATLA. 2004;32(Suppl 1):693-7.
8. Vives MA, Infante MR, García E, Selve C, Maugras SM, Vinardell MP. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derived surfactants. Chem Biol Interact. 1999;118:1-18.
9. Schaubberger G, Maier H, Cabaj A, Schmalwieser AW. Evaluation of the goodness of fit of solar simulated radiation to a reference solar spectrum for photobiological experiments. Med Phys. 2004 Sep;31(9):2509-19.
10. Pape WJW, Brandt M, Pfannenbecker U. Combined *in vitro* assay for photohemolysis and hemoglobin oxidation as part of a phototoxicity test system assessed with various phototoxic substances. Toxicol In Vitro. 1994;(8):755-7.
11. Brzezinska-Sieboldzinska E. Species differences in the susceptibility of erythrocytes exposed to free radicals *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Apr;27(3):211-7.
12. Viola G, Miolo G, Vedaldi D, Dall'Acqua F. *In vitro* studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine. Il Farmaco. 2000;55:211-8.
13. Vargass F, Carbonell K, Camacho M. Photochemistry and *in vitro* phototoxicity studies of levomepromazine (methotrimeprazine), a phototoxic neuroleptic drug. Pharmazie. 2003 May;58(5):315-9.