

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación fotohemolítica *in vitro* de *Cissus sicyoides* L. y *Achyranthes aspera* L.***In vitro* photohemolytic assessment of *Cissus sicyoides* L. y *Achyranthes aspera***

Yisel González Madariaga,^I María de los A. Boffill Cárdenas,^{II} Deodelsys Bermúdez Toledo,^{III} Orestes Castillo Alfonso,^{IV} Celia M. Martínez Montalbán,^V Yusnel Martínez Bernal^{VI}

^I Máster en Bioquímica General. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Auxiliar. Auxiliar. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias Médicas. Licenciada en Química. Investigadora Titular. Profesora Titular. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

^{III} Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada. Instructora. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

^{IV} Ingeniero Agrónomo. Asistente. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

^V Licenciada en Laboratorio Clínico. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

^{VI} Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigador. Instructor. Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: los eritrocitos son células útiles para la identificación de agentes potencialmente fototóxicos administrados por vía sistémica, así como para el estudio de los mecanismos de fototoxicidad que involucran procesos de estrés oxidativo.

OBJETIVO: evaluar el efecto fotohemolítico de extractos blandos de partes aéreas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) y *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae).

MÉTODOS: se utilizó un protocolo *in vitro* que emplea como modelo biológico eritrocitos humanos, los que se irradian con luz ultravioleta durante 90 min para evaluar el daño en las membranas eritrocitarias, por detección de hemoglobina

liberada al medio.

RESULTADOS: se observó un leve grado de hemólisis, el efecto fotohemolítico fue inferior a los controles positivos.

CONCLUSIONES: los extractos de las plantas se clasificaron como no irritantes, lo cual sugiere que la hemólisis observada puede ser causada por la inestabilidad de la membrana del eritrocito, debido a la presencia de diferentes metabolitos en los extractos estudiados.

Palabras clave: fotohemólisis, eritrocitos, *in vitro*, *Cissus sicyoides*, *Achyranthes aspera*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: erythrocytes are useful cells to identify potentially phototoxic agents provided by systemic administration as well as to study the phototoxicity mechanisms involving oxidative stress processes.

OBJECTIVE: to evaluate the photohemolytic effect of soft extracts from aerial parts of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) and *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae).

METHODS: an *in vitro* protocol using human erythrocytes as biological model; they were ultraviolet light-radiated for 90 minutes to evaluate damage in erythrocyte membranes on the basis of detected hemoglobin released into the medium.

RESULTS: mild hemolysis was observed, being the photohemolytic effect lower than that of positive controls.

CONCLUSIONS: the extracts from these plants were rated as non-irritating, which suggests that observed hemolysis may be caused by unstable erythrocyte membranes resulting from the existence of different metabolites in the studied extracts.

Key words: photohemolysis, erythrocytes, *in vitro*, *Cissus sicyoides*, *Achyranthes aspera*.

INTRODUCCIÓN

Los eritrocitos humanos han sido usados de modo tradicional para identificar agentes potencialmente fototóxicos administrados por vía sistémica en humanos. Estas células son también muy útiles para el estudio de los mecanismos de fototoxicidad que incluyen los procesos de oxígeno dependencia y los que involucran a radicales libres.^{1,2}

Este ensayo es un método alternativo que estudia el efecto fotoirritante de diversos compuestos. Por él se determina la capacidad potencial de diversos productos que dañan la membrana de los eritrocitos u oxidan la hemoglobina bajo la acción de la luz UV-VIS (o ambas cosas). Se basa en la determinación de la concentración hemolítica 50 % (CH₅₀) de un determinado producto y la determinación de esta misma concentración después de haber expuesto los eritrocitos a la luz UV.

En el presente estudio se evaluaron las plantas *Cissus sicyoides* L y *Achyranthes aspera* L. de gran uso en la población como plantas medicinales.

MÉTODOS

Las plantas fueron colectadas en áreas aledañas a la Universidad Médica de Villa Clara y depositadas en el herbario perteneciente a la Universidad Central de Las Villas con número de voucher ULV 08954 para *A. aspera* y ULV 08668 para *C. sicyoides*.

Se emplearon las partes aéreas de cada una en la elaboración de los extractos hidroalcohólicos, en el caso de *A. aspera* a 40 % y *C. sicyoides* a 60 %. A partir de estos extractos hidroalcohólicos se obtuvieron los extractos blandos de cada planta. Seguidamente los extractos se disolvieron en PBS y se ajustaron 6 concentraciones. La mayor concentración probada del producto fue aquella que coincidió con la concentración mínima para lograr 100 % de hemólisis. A partir de esta se prepararon diluciones dobles y cada concentración se evaluó por triplicado.

La determinación del efecto hemolítico se procedió según el protocolo 81 del INVITTOX.³ Para el ensayo de fotohemólisis la lámpara utilizada tenía una intensidad de radiación UV de UVA 960 mw/cm. La clorpromazina es un producto fotohemolítico, que fue utilizado como control positivo.

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.

Se prepararon dos 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 min. Transcurrido el tiempo de exposición la placa expuesta a la luz se dejó 30 min en la oscuridad. Posteriormente se traspasó el contenido de las placas a tubos y se centrifugó durante 5 min a 3 500 rpm. Para evaluar el punto final se determinó la cantidad de hemoglobina liberada en el sobrenadante a 540 nm. Se consiguió 100 % de hemólisis al incubar los eritrocitos en agua destilada.

La concentración del extracto que produce 50 % de los eritrocitos hemolizados (CH_{50}), se determinó por regresión lineal; se obtuvo la relación que señala el efecto hemolítico: CH_{50} muestra no irradiada/ CH_{50} muestra irradiada.

En el ensayo de oxidación de la hemoglobina se determinó la formación de meta-hemoglobina intracelular y extracelular y se realizó en las mismas condiciones que el ensayo de fotohemólisis.

El extracto se probó por triplicado a una concentración de sólidos totales de 10 mg/mL, y se añadió 200 mL de una solución de Tritón X-100 1 %, para solubilizar las células remanentes a razón de 200 mL en cada pocillo de las placas irradiadas y no irradiadas después de la incubación en la oscuridad. Se centrifugó 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 sea mayor o igual que 3, o ΔDO en el ensayo de la oxidación de la hemoglobina sea mayor o igual que 0,05 (o ambos).

La prueba estadística que se empleó fue Mann-Whitney, para precisar si existían diferencias significativas entre los grupos.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra el efecto hemolítico de las concentraciones ensayadas con el extracto de *A. aspera*. El cálculo de la concentración hemolítica 50 % (CH₅₀) arrojó valores de 0,81 mg/mL para las muestras irradiadas y de 0,92 mg/mL para las no irradiadas, lo que estadísticamente no presentó diferencias.

Tabla 1. Efecto fotohemolítico de *Achyranthes aspera*

Concentración <i>A. aspera</i> mg/mL	% hemólisis	
	Muestra irradiada	Muestra no irradiada
0,7	31,94	21,43
0,8	45,85	26,58
0,9	66,82	46,9
1	89,03	71,74
1,1	92,53	85,87
1,2	99,85	93,38
CH ₅₀	0,81	0,92

CH₅₀: concentración hemolítica 50 %.

En la tabla 2 se observa el efecto fotohemolítico del extracto de *C. sicyoides*. Las muestras irradiadas y no irradiadas mostraron valores menores de CH₅₀ que las determinadas para la otra planta evaluada. Este resultado muestra que *C. sicyoides* presenta un mayor efecto hemolítico que el observado con *A. aspera*.

Tabla 2. Efecto fotohemolítico del *Cissus sicyoides* L.

Concentración <i>C. sicyoides</i> L. mg/mL	% hemólisis	
	Muestra irradiada	Muestra no irradiada
0,1	5,15	3,92
0,2	17,59	6,91
0,3	32,08	19,64
0,4	58,87	31,19
0,5	77,4	52,18
0,6	89,36	66,12
CH ₅₀	0,37	0,50

CH₅₀: concentración hemolítica 50 %.

Las CH₅₀ obtenidas en el ensayo de fotohemólisis, así como la relación CH₅₀ muestras no irradiadas (MNI)/ CH₅₀ muestras irradiadas (MI), son mostradas en la tabla 3. En ninguno de los extractos se presentó una relación mayor que 3. También se refieren los valores de densidad óptica a 630 nm (DO630) de los extractos, correspondiente al ensayo de oxidación de la hemoglobina. En ambos casos este valor fue menor que 0,05.

Tabla 3. Comparación de las CH₅₀ en el ensayo de fotohemólisis de las plantas estudiadas

Plantas estudiadas	CH ₅₀ MI (mg/mL)	CH ₅₀ MNI (mg/mL)	CH ₅₀ MNI /CH ₅₀ MI	DO 630
<i>Cissus sicyoides</i> L.	0,37	0,50	1,35	0,012
<i>Achyranthes áspera</i>	0,81	0,90	1,11	0,02

CH₅₀: concentración hemolítica 50 %, MI: muestras irradiadas, MNI: muestras no irradiadas.

DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mostraron en la composición fitoquímica de las plantas evaluadas, la presencia de flavonoides, aminoácidos libres y alcaloides. Es importante destacar la presencia de fenoles o taninos y quinonas en *C. sicyoides* a diferencia de *A. áspera*. De igual forma los alcaloides se encuentran en una proporción mucho menor en *A. áspera* que en *C. sicyoides*. Esos metabolitos pudieran tener efecto en el comportamiento de estas plantas en el modelo de eritrocitos utilizados. Por una parte existen evidencias de los efectos antioxidantes de compuestos fenólicos y alcaloides,⁴⁻⁶ sin embargo la presencia de quinonas pudiera precipitar la hemólisis.⁷ Por lo tanto, la cantidad relativa de estos

metabolitos en los extractos evaluados determinará finalmente el efecto neto observado en las membranas eritrocitarias.

La presencia de quinonas en la composición fitoquímica de *C. sicyoides*, con actividad hemolítica reportada, puede explicar que el estudio del efecto hemolítico se realizó en un rango de concentraciones menor que en el caso de *A. aspera*.

Evaluando el comportamiento de estos extractos en relación con la fotohemólisis se puede plantear que aunque ocurre hemólisis en las muestras, el efecto de conjunto de la aplicación de los extractos a las muestras sanguíneas y la incidencia de la luz ultravioleta, no es la causa directa de la lisis celular, pues no se presentaron diferencias significativas entre el comportamiento de la muestras irradiadas y las no irradiadas; más bien la hemólisis se produce por la inestabilidad de la membrana del eritrocito debido a la presencia de diferentes metabolitos en los extractos estudiados, que son capaces de producir la lisis celular cuando se incrementa el tiempo de contacto entre el extracto y los glóbulos rojos. Previamente se habían efectuado estudios *in vitro*,⁸ con el empleo de la prueba de hemólisis o RBC y solo *A. aspera* había mostrado valores detectables de hemólisis, que registró un valor de la CH₅₀ de 1,67 mg/mL. Estos ensayos nada más evalúan el efecto del producto analizado durante 10 min de contacto con los glóbulos rojos. Si se tiene en cuenta que la prueba de fotohemólisis el tiempo de exposición es de 90 min, de ellos 60 min frente a las radiaciones de luz UV y el resto incubando en la oscuridad, se puede inferir que este incremento en el tiempo de contacto con las membranas de los eritrocitos influye en la reducción de la CH₅₀ observada, incluso en las muestras no irradiadas.

Estos resultados, que permiten conocer el potencial fototóxico, muestran que ninguno de los extractos de las plantas estudiadas son fotoirritantes. Como se había planteado anteriormente, la hemólisis producida no es debido a la influencia de la luz ultravioleta sobre las membranas de eritrocitos pretratadas con los extractos de las plantas, sino al contenido de los metabolitos secundarios y al tiempo de incubación o contacto de las plantas con las membranas eritrocitarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
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. Pape W. Red blood cell test system. The ERGATT/FRAME databank of *in vitro* techniques. 1992;37(Pt 1):1-14.
4. Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton PJ, Ayuso MJ. Antioxidant activity of *Plantago bellardii* All. *Phytother Res*. 2005;19(12):1074-6.
5. Pérez RM, Vargas R, Martínez FJ, García EV, Hernández B. Antioxidant activity of alkaloids from *Bocconia arborea*. A study on six testing methods. *Ars Pharmaceutica*. 2003;44(1):5-21.

-
6. Shen G, Van Kiem P, Cai XF, Li G, Dat NT, Choi YA. Solanoflavone, a new biflavonol glycoside from *Solanum melongena*: seeking for antiinflammatory components. Arch Pharm Res. 2005;28(6):657-9.
 7. 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.
 8. González Y, Boffill M, Bermúdez. D, Castillo O, Sánchez C. Hemólisis producida por