

EFECTO ANTIINFLAMATORIO IN VITRO Y SEGURIDAD EN RATAS DEL EXTRACTO ACUOSO ATOMIZADO DE LA RAÍZ DE *Krameria lappacea* (RATANIA)

In vitro antiinflammatory effect and safety on rats of atomized aqueous extract from *Krameria lappacea* (ratania) root

Américo Fernández, Jorge Arroyo A., Pablo Bonilla R., Gloria Tomás, Fátima Medina, Julio Chenguayén, Manuel Marín, Elsa Béjar, Oscar Huamán

RESUMEN

El objetivo ha sido determinar la actividad antiinflamatoria in Vitro en glóbulos rojos de ratas y saber la seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania), asimismo el marcador de estrés oxidativo (malondialdehído MDA). La actividad antiinflamatoria in vitro (Hernández *et al.* 2006) fue en glóbulos rojos de rata enfrentados a 10, 50, 100 y 200 ug/mL de extracto, una solución control (agua destilada 1mL) y solución de referencia hidrocortisona a 400 ug/mL; la seguridad se realizó en ratas albinas cepa Holtzmann distribuidas en tres grupos: normal con suero fisiológico 5 mL/kg, un grupo con inoculación vía subcutánea de un compuesto constituido por dietilamina y nitrito de sodio en tres glándulas mamarias, y el tercero además del inóculo recibió 300 mg/kg del extracto administrado por vía oral una vez al día durante 30 días, luego se les extrajo muestra de sangre por punción cardiaca, siendo sacrificados por dislocación cervical, se determinó el marcador de estrés oxidativo por el método de Buege & Aust (1978) y parámetros bioquímicos. Se observó mayor eficacia antiinflamatoria al utilizar ratania en concentración de 50 y 200 ug/mL; disminución del MDA ($p < 0.404$); colesterol total ($p < 0.003$); triglicéridos ($p < 0.043$); proteínas totales ($p < 0.0001$) albúmina ($p < 0.203$); TGO ($p < 0.093$); TGP ($p < 0.023$); Fosfatasa alcalina ($p < 0.670$). Concluyéndose que en las condiciones experimentales se ha demostrado que *Krameria lappacea* (ratania) tiene actividad antiinflamatoria in vitro.

Palabras clave: *Krameria lappacea*, ratania, antiinflamatorio in vitro.

SUMMARY

The objective has been to determine the antiinflammatory activity in Vitro in red globules of rats and to know the security in rates of the watery extract atomizado of *Krameria's lappacea* root (ratania), also the marker of oxidativo stress (malondialdehído MDA). The antiinflammatory activity in vitro (Hernández *et al.* 2006) was in red globules of rat faced 10, 50, 100 and 200 ug/mL of extract, a solution control (distilled water 1mL) and solution of reference hidrocortisona to 400 ug/mL; the security was realized in albino rats Holtzmann distributed in 3 groups: normal with physiological whey 5 mL/kg, A group with inoculation subcutaneous route of a compound constituted by dietilamina and nitrito of sodium in three mammary glands, and the third in addition to inoculate received 300 mg/kg of the extract administered by oral route to the day for 30 days, then it extracted sample of blood to them by cardiac puncture, being sacrificed by cervical dislocation, the scoreboard of stress decided oxidativo for the method of Buege and Aust (1978) and biochemical parameters. Greater antiinflammatory efficiency was observed when using ratania in concentration of 50 and 200 ug/mL; decrease of the MDA ($p < 0.404$); total cholesterol ($p < 0.003$); triglicéridos ($p < 0.043$); total proteins ($p < 0.0001$) albumen ($p < 0.203$); TGO ($p < 0.093$); TGP ($p < 0.023$); alkaline Fosfatasa ($p < 0.670$). It Concluded wath in the experimental conditions there has been demonstrated that *Krameria lappacea* (ratania) has antiinflammatory activity in vitro.

Key words: *Krameria lappacea*, ratania, in vitro antiinflammatory.

¹ Sección de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. pbonillar@unmsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son agentes protectores de las células vegetales bajo condiciones estresantes tales como lesiones, infecciones, excesiva exposición a la luz UV (Harborne *et al.* 1999; Williams *et al.* 2004)^{1,2}

Muchos estudios indican que se vienen ensayando variados compuestos fenólicos como son los flavonoides con gran actividad quimioprotectora, y al parecer estarían actuando en todas las etapas de la carcinogénesis, por presentar actividad antiangiogénica (Middleton *et al.* 2000)³, actividad antioxidante (Kameoka *et al.* 1999); actividad antiproliferativa (inhibición del daño en el ADN y enzimas implicadas en la transducción de señales como quinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas, etc (Erhart *et al.* 2005)⁵. En animales de experimentación se reporta que algunos flavonoides presentan capacidad para reducir el número de las metástasis pulmonares y aumentar la supervivencia de los animales, aunque su mecanismo de acción aún no es claro (MacGregor *et al.* 1978, Brown 1980)^{6,7}

Recientemente se han relacionado con su capacidad para inhibir las metaloproteínas (Menon *et al.* 1998)⁷; así como, en su capacidad para originar enlaces de hidrógeno que estabilizan las proteínas de la membrana basal, especialmente el colágeno haciéndolas menos susceptibles a la degradación proteolítica (Caltagirone *et al.* 2000)⁸

Los compuestos fenólicos ocurren en los alimentos de origen vegetal; poseen varios grupos hidrófilo (OH), los que servirían para atrapar los radicales libres.

La presente investigación se realizó con la finalidad de demostrar la actividad antiinflamatoria *in vitro* en glóbulos rojos de ratas y saber la seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania), asimismo determinar el marcador de estrés oxidativo (malondialdehído MDA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Ratas albinas cepa Holtzmann machos de 200 ± 20 gramos de peso corporal.

Extracto acuoso atomizado de raíz de *Krameria lappacea* (ratania).

Dietilamina QP Sigma.

Nitrito de sodio QP Sigma.

Ácido clorhídrico QP Sigma.

Métodos

Determinación la actividad antiinflamatoria mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos. Hernández *et al.* 2006.⁹

Se ha recolectado sangre de ratas albinas cepa Holtzmann sanas, se mezcló con igual volumen de solución de Alsever estéril, se centrifugó a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lavó los glóbulos rojos con solución isosalina (0.85%, pH=7.2) por tres veces, inmediatamente después se llevó los eritrocitos al 10% v/v con solución isosalina, obteniendo así la suspensión de glóbulos rojos. Se ensayó el extracto atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) en cuatro niveles de concentración 10, 50, 100 y 200 ug/mL, frente a una solución control (agua destilada 1ml) y solución de referencia hidrocortisona a 400 ug/ml en una cantidad de 1 ml.; en medio de buffer fosfato 7.2 (0.15 M) con solución isosalina (0.85% pH=7.2) 2ml; se incubó en baño maría a 37 °C durante 30 minutos, para luego centrifugar, extraer la solución sobrenadante y estimar su contenido de hemoglobina en el espectrofotómetro UV - visible a una longitud de onda de 560 nm.

El porcentaje de hemólisis se calculó asumiendo que la hemólisis producida por agua destilada que fue 100%. Se puede calcular el porcentaje de estabilización o protección de membrana de los glóbulos rojos.

Preparación de las ratas para la evaluación del marcador de estrés oxidativo^{10, 11} en sangre de ratas y la seguridad¹².

Se utilizaron ratas previamente preparadas con un inocular aplicado vía subcutánea en tres glándulas mamarias en un volumen de 0.1 mL de un ión nitrosoamino como resultado de la mezcla (2.0 mL de dimetilamina + 0.5 g de NaNO₂ + dos gotas de HCL, en aceite de oliva csp 20 mL).

Se dispuso de un grupo control normal, grupo con aplicación del ión nitrosoamino y un grupo con el ión nitrosoamino más tratamiento con el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* 300 mg/kg, administrado por vía oral una vez al día durante 30 días. Luego se procedió a extraer

sangre por punción cardiaca a todos los animales, para determinar algunas enzimas, lípidos, proteínas y el marcador de estrés oxidativo.

Determinación del marcador del estrés oxidativo (actividad antioxidante)

Según la técnica de Buege & Aust (1978)¹⁰; Suárez S. (1995)¹¹, midiendo la producción de malondialdehído (MDA) que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA), forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm.

Procedimiento: en un tubo de centrifuga de tapa rosca pipetear 0.05 ml de suero en buffer fosfato 50 mM/L pH 7.0, adicionar 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se mezcló, se llevó a baño maría hirviente por 10 minutos; se enfrió y agregó 1.5 mL de TBA al 0.67% en HCl 0.25N, se llevó otra vez a baño maría hirviente por 30 minutos; se enfrió, centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos; se separó el sobrenadante a otro tubo con ayuda de una pipeta pasteur; se hizo las lecturas de los sobrenadantes en el espectrofotómetro a 535 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar $1.56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehido-tiobarbitúrico.

Determinación de algunas enzimas, lípidos y proteínas (González, 2004¹²) en sangre de ratas tratadas

Se determinó en sangre el nivel de colesterol total, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, TGO, TGP y Fosfatasa alcalina.

RESULTADOS

1. Se observó mayor hemólisis en el grupo control, siendo mucho menor en los grupos tratados (tabla 1); y siendo la eficacia antiinflamatoria, mejor al utilizar ratania en concentración de 50 y 200 ug/mL (Fig. 1).
2. En la figura 2, se muestra una disminución del malondialdehído (MDA) en ratas con inducción de cáncer de mama que utilizaron ratania, aunque los resultados no indican diferencia significativa ($p < 0.404$).
3. Se encontró una reducción en los niveles de colesterol total ($p < 0.003$); triglicéridos ($p < 0.043$); TGO ($p < 0.093$); TGP ($p < 0.023$); un incremento de proteínas totales ($p < 0.0001$) albúmina ($p < 0.203$); aumento de fosfatasa alcalina ($p < 0.670$) pero dentro de los valores permitidos (tabla 2).

Tabla 1. Datos de la actividad antiinflamatoria por estabilización de la membrana de glóbulos rojos de ratas normales (*in vitro*)

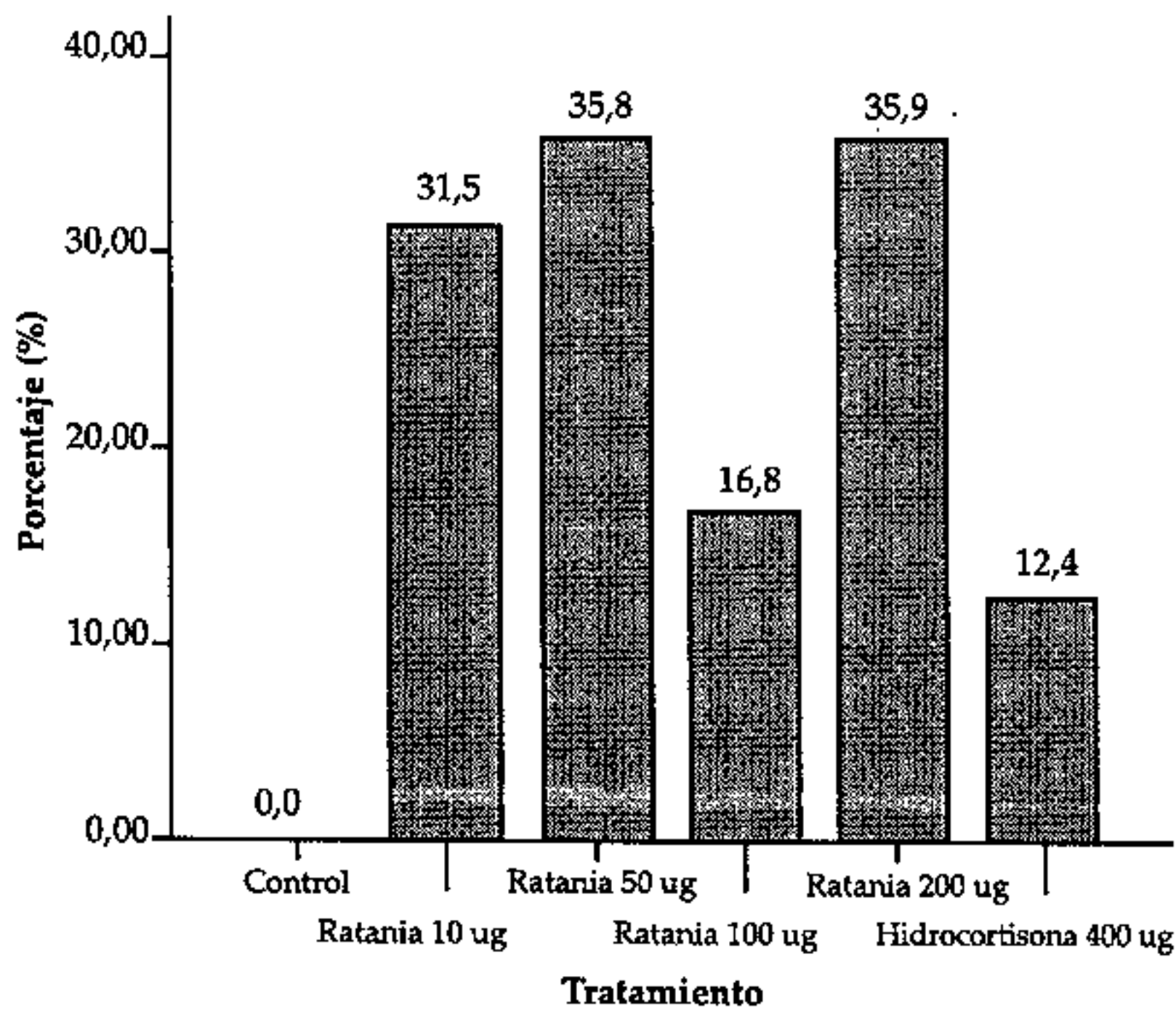
Tratamiento	n	Media	% de variación	Error Estándar	Intervalo confianza 95%	
					Bajo	Alto
Control	3	1.86	0	0.17	1.13	2.59
Ratania 10 ug	3	0.20	89.2	0.07	-0.12	0.52
Ratania 50 ug	3	0.23	87.6	0.10	-0.20	0.65
Ratania 100 ug	3	0.11	94.1	0.04	-0.08	0.29
Ratania 200 ug	3	0.25	86.6	0.08	-0.08	0.59
Hidrocortisona 400 ug	3	0.08	95.7	0.02	-0.01	0.17

La diferencia de medias indica que el grupo control es estadísticamente significativo al compararlo con los diferentes tratamientos ($p < 0.000001$). % de variación = $((\text{Control} - \text{tratamiento}/\text{control}) \times 100)$

Tabla 2. Parámetros bioquímicos evaluados en ratas tratadas, y que recibieron por vía oral 300 mg/kg del extracto acuoso atomizado de *Krameria lappacea* (ratania), durante 30 días.

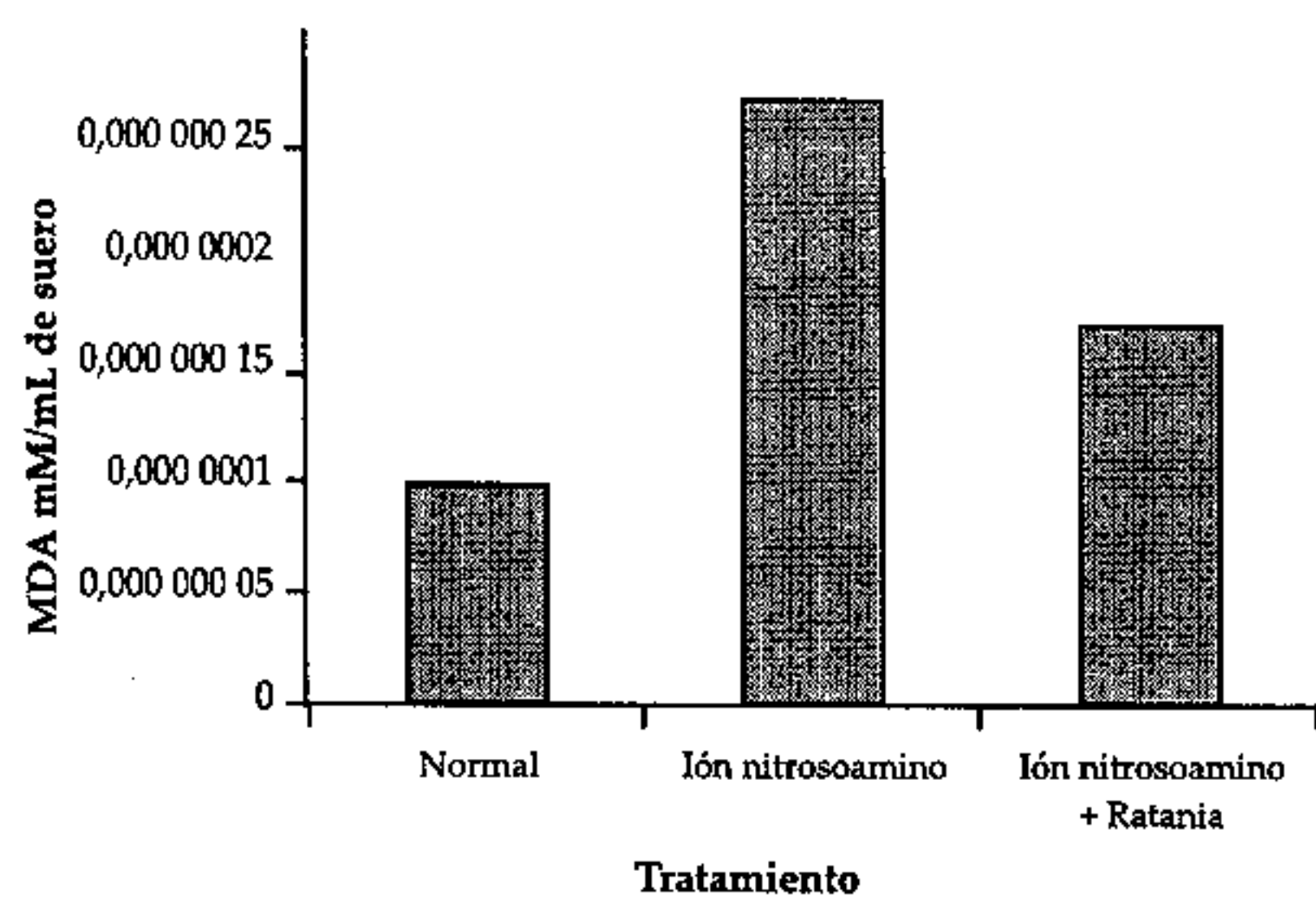
Parámetro bioquímico	Tratamiento	n	Media	% de variación	Error Estándar	Intervalo confianza 95%	
						Bajo	Alto
Colesterol total	Normal	8	190.8	0	4.7	179.7	201.8
	Control ión nitrosoamino	11	170.9	10.4	7.0	155.3	186.6
	Ratania y ión nitrosoamino	7	153.7	19.4	5.6	140.0	167.4
Triglicéridos	Normal	8	155.0	0	20.9	105.7	204.3
	Control ión nitrosoamino	11	101.9	34.3	11.2	77.0	126.8
	Ratania y ión nitrosoamino	7	102.3	34	16.4	62.2	142.4
Proteínas totales	Normal	8	4.4	0	0.1	4.1	4.7
	Control ión nitrosoamino	11	5.6	Sube 27.3	0.2	5.2	5.9
	Ratania y cáncer	7	5.4	Sube 22.7	0.1	5.1	5.6
Albumina	Normal	8	2.7	0	0.2	2.2	3.2
	Control ión nitrosoamino	11	3.2	Sube 18.5	0.2	2.8	3.6
	Ratania y cáncer	7	3.2	Sube 18.5	0.2	2.8	3.6
TGO	Normal	8	20.8	0	3.7	12.0	29.5
	Control ión nitrosoamino	11	13.3	36.1	1.3	10.4	16.1
	Ratania y ión nitrosoamino	7	18.4	11.5	2.5	12.2	24.7
TGP	Normal	8	24.3	0	3.5	16.0	32.5
	Control ión nitrosoamino	11	11.9	51.0	1.8	7.9	15.9
	Ratania y ión nitrosoamino	7	21.6	11.1	4.9	9.5	33.7
Fosfatasa alcalina	Normal	8	167.8	0	13.5	135.7	199.8
	Control ión nitrosoamino	11	168.3	Sube 4.5	14.8	135.4	201.2
	Ratania y ión nitrosoamino	7	188.7	Sube 12.5	25.5	126.2	251.2

Colesterol total (p<0.003); Triglicéridos (p<0.043); Proteínas totales (p<0.0001) Albumina (p<0.203); TGO (p<0.093); TGP (p<0.023); Fosfatasa alcalina(p<0.670)



p < 0,0001

Figura 1. Porcentaje de protección de la membrana de los glóbulos rojos de ratas normales por el extracto acuoso atomizado de ratania.



p < 0,404

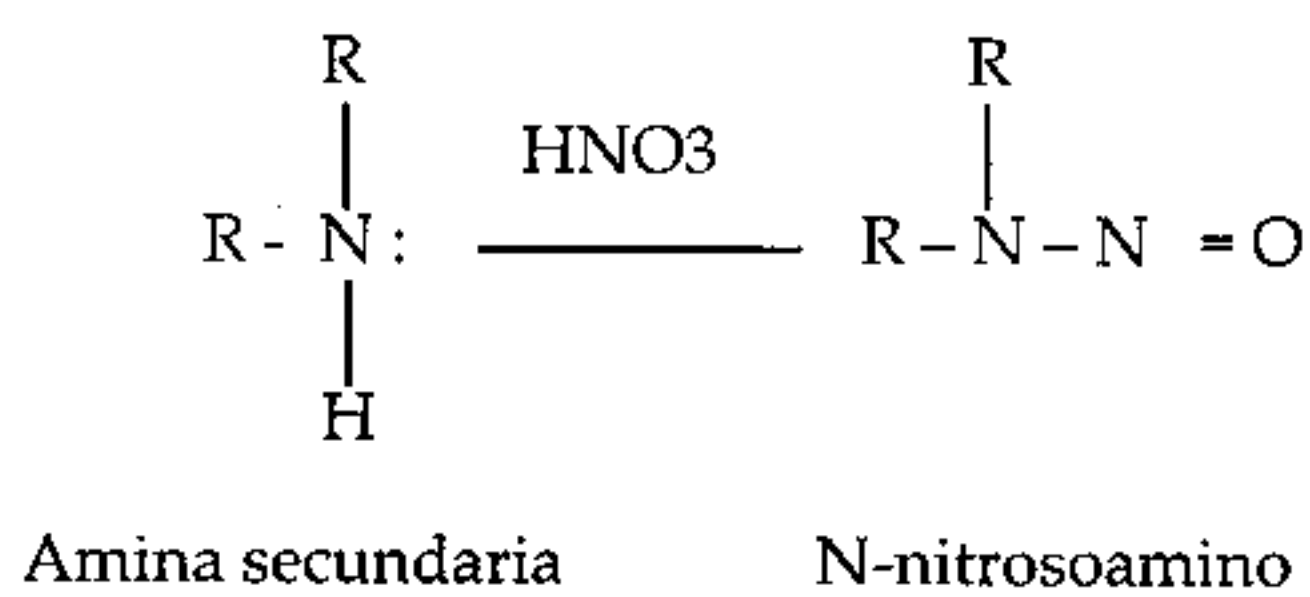
Figura 2. Nivel de marcador de estrés oxidativo

DISCUSIÓN

Una prueba de utilidad en el estudio y desarrollo de un fármaco es precisamente la determinación

de su actividad hemolítica. Un candidato a fármaco debe atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina intracelular evitando que en este proceso se afecten la proteína y el glóbulo rojo, estructural y funcionalmente (Valdés 1997)¹³. Un agente químico extraño, en dependencia de su concentración, puede alterar el equilibrio iónico del medio, provocar la deshidratación, aumentar la fragilidad y la destrucción celular. Además cada muestra posee características reológicas propias, como por ejemplo el envejecimiento celular. El tiempo de vida medio de los glóbulos rojos normales es de 120 días y se conoce que en el torrente sanguíneo circulan células con variabilidad en la edad, de las cuales las más próximas al tiempo de vida medio son las más propensas al daño y la lisis celular. (Junqueira et al. 1996)¹⁴

Se ha buscado inducir cáncer de mama al inocular en la glándula mamaria 0.1 mL de una mezcla conteniendo dietilamina, nitrito de sodio y ácido clorhídrico concentrado con la finalidad de formar un ión nitrosoamino, porque las aminas secundarias reaccionan con ácido nitroso para producir N-nitrosoaminas:



Estos compuestos que se forman han demostrado ser carcinógenos, por ejemplo: N-Nitroso-N-metilamina. Se ha demostrado que pequeñas cantidades de N-nitrosoaminas causan cáncer en animales de laboratorio (Caret 1984; Wade 2000)^{15, 16}. Muchas nitrosaminas son sintetizadas probablemente dentro de nuestro cuerpo, en vez de haber entrado por contaminación ambiental. La reducción catalizada por enzima de nitrato (NO₃⁻) produce nitrito (NO₂⁻), el cual se combina con las enzimas presentes en el cuerpo para formar N-nitrosaminas, las que son altamente reactivas. Se debe mencionar que para la génesis de un cáncer efectivo se requiere mucho tiempo de exposición al agente inductor que aproximadamente estaría sobre los cuatro meses.

El método para determinar la actividad antiinflamatoria mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos se fundamenta en la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos por

un efecto protector del corticoide y extracto acuoso atomizado de *Krameria lappacea* (ratania) en estudio.

Los esteroides antiinflamatorios estabilizan la membrana de los lisosomas, partículas intracelulares que contienen proteasas y enzimas hidrolíticas, las que forman los mediadores químicos de la inflamación de manera que así pueda evitarse la desintegración de dichos lisosomas que se producen en los procesos inflamatorios y son responsables del daño y otros fenómenos inflamatorios que así son impedidos. (Brunton et al. 2006)¹⁷.

La raíz de *Krameria lappacea* (ratania), por el estudio fitoquímico ha revelado la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides), que son agentes protectores de las células vegetales bajo condiciones estresantes tales como lesiones, infecciones, excesiva exposición a la luz UV (Harborne et al. 1999; Williams et al. 2004)^{1,2}.

Muchos estudios indican que se vienen ensayando variados compuestos fenólicos como son los flavonoides con gran actividad quimioprotectora, y al parecer estarían actuando en todas las etapas de la carcinogénesis, por presentar actividad antiangiogénica (Fotsis et al. 1997)¹⁸, actividad antioxidante (Burda et al. 2001)¹⁹; actividad antiproliferativa (inhibición del daño en el ADN y enzimas implicadas en la trasducción de señales como kinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas, etc (Casagrande et al. 2001)²⁰. En animales de experimentación se reporta que algunos flavonoides presentan capacidad para reducir el número de las metástasis pulmonares y aumentar la supervivencia de los animales, aunque su mecanismo de acción aún no es claro (Menón, 1998)⁷; la actividad antiinflamatoria Fig. 1 y Tabla 1, ha sido confirmada en la presente investigación; así como la actividad antioxidante, al disminuir el marcador de estrés oxidativo (Fig. 2).

La actividad antiinflamatoria de *Krameria lappacea* (ratania) evidenciado en este estudio podría estar relacionado con un potencial quimioprotector del cáncer.

Al evaluar algunos parámetros bioquímicos evaluados en ratas tratadas con el ión nitrosoamino, y que además recibieron por vía oral 300 mg/kg del extracto acuoso atomizado de *Krameria lappacea* (ratania), durante 30 días, se encontró una reducción en los niveles de colesterol total (p<0.003); tri-

glicéridos ($p < 0.043$); TGO ($p < 0.093$); TGP ($p < 0.023$); un incremento de proteínas totales ($p < 0.0001$) albúmina ($p < 0.203$); aumento de fosfatasa alcalina ($p < 0.670$) pero dentro de los valores permitidos (tabla 2).

El extracto acuoso atomizado de *Krameria lappacea* (ratania) en las condiciones experimentales ha demostrado tener actividad antiinflamatoria y reducir el marcador de estrés oxidativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harborne JB, Baxter H. *Handbook of Natural Flavonoids*, 2 vols. Wiley, Chichester, 1999.
2. Williams CA, Grayer RJ. *Anthocyanins and other flavonoids*. *Natural Products Reports* 2004, 21: 539-573.
3. Middleton E, Kandaswami Jr C, Theoharides TC. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacological Reviews* 2000, 52: 673-751.
4. Kameoka S, Leavitt P, Chang C, Kuo K. *Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids*, *Cancer Lett.* 1999, 146:161-167.
5. Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Goßke R. *Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells*. *Apoptosis* 2005; 10: 611-617.
6. MacGregor J, Jurd L. *Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in Salmonella typhimurium*, *Mut. Res.* 1978, 54: 297-309.
7. Menon LG, Kuttan R, Nair MG, Chang YC, Kuttan G. *Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells*. *Nutr Cancer* 1998; 30: 74-7.
8. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali P G, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. *Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth metastatic potential*. *Int J Cancer* 2000; 87: 595-600.
9. Hernández Y, Mollineda N, González D. *Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la Boldoa purpurascens Cav.* *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. Vol. VII, N° 10, Octubre/2006.
10. Buege J, Aust S. *Microsomal lipid peroxidation*. *Methods in Enzymology*. 1978; 52: 302-310.
11. Suárez S. *Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios*. Tesis de Maestría en Bioquímica. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1995.
12. González J. M. *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*. Editorial Masson. Segunda edición 2004.
13. Valdés Y. *Propiedades biológicas de los 1-O-alkilglicérols de origen marino*. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana. 1997.
14. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología Básica*. 4ª ed. España: Masson; 1996.
15. Wadel. G. *Química Orgánica* 2000, p. 913.
16. Carey Francis. *Química Orgánica*, 2000, p.823.
17. Brunton L, Lazo J and Parker K. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th Ed. Mc Graw Hill, 2006.
18. Fotsis T, Pepper MS, Akatas E, Breits S, Rasaku S. *et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and «in vitro» angiogenesis*. *Cancer Research* 1997; 57: 2946-51.
19. Burda S, Oleszek W. *Antioxidant and antiradical activities of flavonoids*. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2774-9.
20. Casagrande F, Darbon J M. *Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent Kinases CDK2 and CDK1*. *Bioch Pharma* 2001; 61: 1205-15.