

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CUATRO PLANTAS MEDICINALES Y ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS

Javier Enciso Gutiérrez^{1*}; José Amiel Pérez¹; Emilio Guija Poma¹; Alejandro Fukusaki Yoshizawa¹; Oscar Reátegui Arévalo¹; David Amiel Peña¹; Nathaly Enciso Benavides²; Elfer Valdívila³; Rafael Rodríguez Bayona⁴; Katia Neyra Landa⁴.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólicos de las plantas: *Bixa orellana* (achiote), *Eupatorium triplenerve* (asmachilca), *Physalis peruviana* (aguaymanto) y *Equisetum arvense* (cola de caballo) sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos. Asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante y los contenidos de polifenoles y flavonoides. La *Bixa orellana* y la *Physalis peruviana* mostraron la mayor capacidad antioxidante, correspondiéndole a la *Bixa orellana* las mayores concentraciones de polifenoles y flavonoides. Todas las plantas estimularon diferencialmente la proliferación de fibroblastos, habiendo mostrado el *Equisetum arvense* la mayor estimulación, pero baja capacidad antioxidante y bajos contenidos de polifenoles y flavonoides; mientras que la *Bixa orellana* y la *Physalis peruviana* estimularon moderadamente, correspondiendo la más baja estimulación de la proliferación de fibroblastos al *Eupatorium triplenerve*.

Palabras clave: fibroblastos, proliferación, antioxidantes, plantas medicinales.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF MEDICINAL PLANTS AND STIMULATION OF FIBROBLAST PROLIFERATION

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of hydro alcoholic plant extracts: *Bixa orellana* (achiote), *Eupatorium triplenerve* (asmachilca), *Physalis peruviana* (aguaymanto) and *Equisetum arvense* (cola de caballo) on the proliferation of primary cultures of fibroblasts. We also evaluated the antioxidant capacity, polyphenol and flavonoid contents of the plant extracts. Our results showed that *Bixa orellana* and *Physalis peruviana* had the highest antioxidant capacity, *Bixa orellana* had the highest concentrations of polyphenols and flavonoids. All the plant extracts stimulated differentially the proliferation of fibroblasts, however, *Equisetum arvense* had the highest stimulation but the lowest antioxidant activity, polyphenol and flavonoid contents. On the other hand, *Bixa orellana* and *Physalis peruviana* had moderately effect on the proliferation of fibroblasts, and *Eupatorium triplenerve* had the lowest effect.

Key words: fibroblasts, proliferation, antioxidants, medicinal plants.

^{1*} Universidad Científica del Sur. Laboratorio de Investigación en Biología Celular. jenciso333@yahoo.com.mx

² Universidad Científica del Sur. Estudiante de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

³ Universidad Científica del Sur. Laboratorio de Biología (Microbiología)

⁴ FFAA y PNP. Instituto de Transplantes de Órganos y Tejidos

INTRODUCCIÓN

El fibroblasto es una célula indiferenciada del tejido conectivo, que da lugar a diversas células precursoras que forman los tejidos fibrosos, de soporte y de unión del cuerpo. Se encarga de la síntesis de la matriz extracelular y produce proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibras de adhesión y fibras de soporte, principalmente colágeno fibrilar¹.

Existe una población diversa de fibroblastos, con diferencias fenotípicas que se manifiestan en una variedad de actividades sobre el estroma y sobre el sistema inmune en la producción de citoquinas de la respuesta inflamatoria; además, actúan como células alternativas presentadoras de antígenos y tienen efectos antiproliferativos indirectos sobre los linfocitos². A su vez, son estimuladas por varias citoquinas, destacando el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). El TGF- β estimula la producción de colágeno y fibronectina, principalmente en procesos de cicatrización, en tanto que el FGF estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de la matriz extracelular, además de diferenciación, migración y angiogénesis³.

Por otro lado, los antioxidantes naturales que se encuentran en las plantas, tienen la propiedad de participar en el control del estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, por lo que pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes que tengan efectos antiinflamatorios y antitumorales, actuando sobre alguno de los blancos moleculares de la carcinogénesis⁴. La determinación de la capacidad antioxidante en extractos de plantas, entonces, es importante para establecer potencialidades antiinflamatorias en ellas.

Para evidenciar actividades estimulantes o inhibitorias de la proliferación celular que tengan relación con la inflamación aguda y crónica se puede utilizar fibroblastos normales mediante diferentes técnicas; una de ellas, es la que se basa en la capacidad que tienen las células metabólicamente activas para reducir las sales de tetrazolium a compuestos de Formazán mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales que se producen de forma natural cuando las células son viables⁵.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto estimulante de la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos de cuatro extractos hidroalcohólicos de plantas y establecer la probable relación con la actividad antioxidante y contenido de polifenoles y flavonoides.

PARTE EXPERIMENTAL

Plantas y pruebas bioquímicas

Las plantas consideradas para el presente estudio fueron colectadas en Lima-Perú, y correspondieron a: *Bixa orellana* (achiote), *Eupatorium triplenerve* (asmachilca), *Physalis peruviana* (aguaymanto) y *Equisetum arvense* (cola de caballo).

Obtención de extractos

El procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico se realizó conforme se ha descrito anteriormente⁶.

Preparación de muestras para pruebas bioquímicas

Con este propósito, se pesó 20 mg del extracto hidroalcohólico seco el cual se diluyó en 10 mL de una solución hidroalcohólica (80:20% v/v). En algunos casos fue necesario realizar diluciones adicionales para que las lecturas en el espectrofotómetro estuviesen comprendidas dentro de la curva patrón. Las determinaciones analíticas se realizaron utilizando las técnicas que a continuación se describen:

- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó utilizando la técnica descrita por Szollosi y Varga⁷. La densidad óptica se leyó a 593 nm en un espectrofotómetro Spectronic modelo Genesis 6.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado; se elaboró una curva patrón que se utilizó para realizar los cálculos.

- Determinación de polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando la técnica descrita por Spanos y Wrolstad (1990)⁸, las densidades ópticas se leyeron en el espectrofotómetro a 765 nm. Para realizar los cálculos se preparó una curva patrón utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico.

- Determinación de flavonoides

Con esta finalidad se utilizó la técnica propuesta por Jia et al. (1999)⁹. La densidad óptica se leyó a 510 nm. Para realizar los cálculos se utilizó una curva patrón preparada con concentraciones variables de catequina.

Efecto sobre la proliferación celular

Células. Embriones de nueve días de ratón Balb/c procedentes del Bioterio de la UCSUR, fueron sometidos a procesamiento para la obtención de células de cultivo primario según protocolo convencional descrito previamente por nuestro grupo⁶, empleando medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) y mantenido en incubador con 5% de CO₂ a 37°C.

Obtenido el cultivo celular primario, se realizaron cuatro pasajes con las mismas condiciones del medio de cultivo, suero fetal bovino (SFB), CO₂ y temperatura; posteriormente, a partir de frascos con cultivo confluyente de células del último pasaje se realizó la siembra de las microplacas de 96 pocitos para el experimento de proliferación celular, usando tripsina al 0,5% como agente disociador de células.

Protocolo de medición de proliferación celular

Tratamiento con extractos. Las pozas de las placas de cultivo celular fueron sembradas con 5,000 células cada una y cultivadas por 24 horas a 37° C, 5% de CO₂ en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino. Transcurrido este tiempo, se añadió 50 µL de la solución de reacción a cada pocito y se incubó por 2 horas agitando uniformemente para luego medir la absorbancia en un lector de ELISA con una longitud de onda de 450-655 nm.

Cada extracto de planta fue evaluado utilizando tres diferentes concentraciones: 154, 254 y 769 µg/mL de medio de cultivo, efecto que se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones utilizadas. Paralelamente se prepararon los controles correspondientes.

Técnica de medición de la proliferación

La proliferación celular se midió mediante un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a sales de formazán, mediante la acción de deshidrogenasas mitocondriales que se producen de forma natural cuando las células son viables, denominada prueba XTT¹⁰, se expresa como Tasa de Estimulación Celular (TEC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracto hidroalcohólico y compuestos antioxidantes

Las plantas que produjeron mayor cantidad de extracto hidroalcohólico fueron las hojas de asmachilca (*Eupatorium triplenerve*) cuyo valor fue de 6,378 g, mientras que de las hojas y tallo de cola de caballo (*Equisetum arvense*) se obtuvieron 1,626 g, conforme se observa en la tabla 1. Las hojas de achiote (*Bixa Orellana*) mostraron el mayor contenido de polifenoles, así como, el más elevado valor de flavonoides, resultado que mantiene correlación con la elevada capacidad antioxidante evaluada utilizando la técnica FRAP (Ferric reducing ability power). Asimismo, puede observarse en la tabla 2 que las hojas y tallo de cola de caballo (*Equisetum*

arvense) mostró la más baja capacidad antioxidante, así como, los menores valores de los contenidos de flavonoides y polifenoles; resultados que mantienen estrecha relación con los valores de la capacidad antioxidante que, comparado con las otras plantas medicinales, fue el menor observado.

Tabla 1. Extracto hidroalcohólico expresado en gramos y porcentaje de determinadas partes de plantas medicinales.

Plantas	Parte de la planta	Extracto hidroalcohólico	
		Gramos	%
<i>Bixa orellana</i> (Achiote)	Hoja	3,7997	17,22
<i>Eupatorium triplenerve</i> (Asmachilca)	Hoja	6,378	25,32
<i>Physalis peruviana</i> (Aguaymanto)	Hoja y tallo	2,216	8,86
<i>Equisetum arvense</i> (Cola de caballo)	Hoja y tallo	1,6256	6,5

Tabla 2. Capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales.

Planta	Polifenoles (g ácido gálico/100 g peso seco)	FRAP (mM/100g peso seco)	Flavonoides (mg catequina /100 g peso seco)
<i>Bixa orellana</i> (Achiote)	3,9	1,38	77,06
<i>Eupatorium triplenerve</i> (Asmachilca)	2,3	0,2	57,45
<i>Physalis peruviana</i> (Aguaymanto)	0,69	0,795	10,84
<i>Equisetum arvense</i> (Cola de caballo)	0,64	0,102	11,1

En la tabla 2 también puede observarse que la asmachilca (*Eupatorium triplenerve*) y el aguaymanto (*Physalis peruviana*) mostraron contenidos de flavonoides y polifenoles totales cuyos valores se encuentran entre los de achiote y cola de caballo, con excepción del valor de la capacidad antioxidante del aguaymanto que fue 7,8 veces mayor que el de cola de caballo. La capacidad antioxidante del achiote fue algo menor al valor que se ha descrito para el culantro (*Coriandrum sativum*) 3,3 mmol/100 g, asimismo, se ha mostrado en otros trabajos que el extracto etanólico de *Physalis peruviana* exhibe una mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso, efecto que ha sido evaluado determinando la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, utilizando el sistema de homogenizado de hígado, mientras que su potente capacidad para captar anión superóxido se realizó utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa¹¹.

Proliferación de fibroblastos

La tasa de estimulación de la proliferación de fibroblastos (TEC) se realizó utilizando concentraciones de 154, 254 y 769 $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las plantas motivo del presente estudio, determinada por la técnica de XTT utilizando lector de ELISA a una longitud de onda de 455-650 nm. El tratamiento antes descrito permitió observar que las hojas y tallo de cola de caballo ejercieron un inusitado efecto estimulante de la proliferación del crecimiento de fibroblastos a las 24 horas de incubación (277,3%), efecto que prácticamente no se modificó a las 48 horas, conforme se muestra en la figura 1, así mismo, puede observarse que el mencionado efecto fue dependiente de la concentración del extracto hidroalcohólico de la planta antes mencionada, este efecto no mantiene relación alguna con su capacidad antioxidante, ya que mostró el valor más bajo.

Valores ligeramente menores de la tasa de activación del crecimiento celular se observó con el aguaymanto y el achiote, el primero de los nombrados ejerció un máximo efecto estimulante a las 24 horas (164,3%), valor que no se modificó a las 48 horas de incubación (168,0 %), en cambio, el achiote a las 24 horas de incubación mostró un efecto estimulatorio de la proliferación celular de 155,2%, que se incrementó ligeramente a las 48 horas (204,2%); en ambas plantas los efectos antes indicados fueron también dependientes de la concentración de los extractos hidroalcohólicos, sin embargo, en otros estudios no se evidencian efectos protectores de la carcinogénesis medidos por el foco glutatión-S-transferasa y biomarcadores del daño al ADN¹².

Wu *et al*¹³ han observado que el extracto etanólico de *Physalis peruviana* inhibe el crecimiento e induce la apoptosis de cultivo de células humanas Hep G2, efecto que probablemente ocurrió como consecuencia de la liberación de citocromo c, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 de la mitocondria al citosol, lo que produjo la activación de la caspasa-3; en cambio, no afecta la proliferación de células hepáticas normales de ratones BALB/C; asimismo, se observó en dicho trabajo que a las 48 horas de incubación la apoptosis de las células Hep G2 estuvo asociada a una elevada expresión de las proteínas p53, CD95 y CD95L.

El extracto hidroalcohólico de asmachilca tuvo un efecto estimulante de la proliferación del crecimiento de fibroblastos marcadamente menor que el achiote, habiéndose observado un incremento de 75,2% a las 24 horas de incubación que prácticamente no se incrementó a las 48 horas (75,9 %); ambos valores fueron independientes de la concentración de la planta utilizada y del tiempo de incubación, tal como se aprecia en la figura 1.

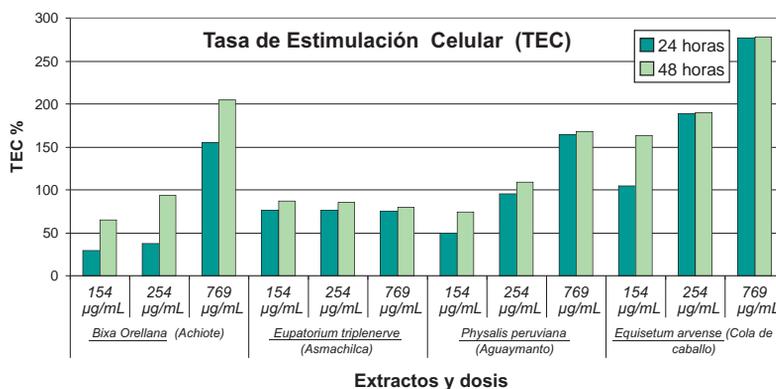


Figura 1. Tasa de estimulación de la proliferación de fibroblastos determinada por la técnica XTT, utilizando lector de ELISA a 455 - 650 nm de longitud de onda.

La evaluación citotóxica del extracto acuoso del *Clinopodium vulgare* utilizando las líneas celulares HEP2 (carcinoma epidermoide humano), A2058 (melanoma metastásico humano) y L5178Y (linfoma de ratón)¹⁴, permitió observar que el tratamiento con una concentración de 80 g/mL del extracto, produjo una considerable citotoxicidad sobre los cultivos celulares antes mencionados, ocasionando un efecto inhibitorio notablemente elevado (93%) sobre el melanoma metastásico humano, en comparación con los otros dos cultivos celulares, así mismo, produjeron efectos citotóxicos sobre los cultivos celulares que se utilizaron como controles, los que correspondieron a la célula amniótica humana cuyo crecimiento fue inhibido 16% y los cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón que fue inhibido 11%, resultados que difieren considerablemente de los obtenidos en el presente trabajo, en que los cuatro extractos hidroalcohólicos de las plantas estudiadas mostraron un efecto estimulante de la proliferación celular; asimismo, las propiedades antioxidantes descritas para la cola de caballo (*E. arvense*) en ratas¹⁵, tiene relación con los resultados mostrados en el presente trabajo, por cuyo motivo, es necesario identificar los componentes activos para estudiar sus efectos en diferentes células normales y tumorales en modelos *in vivo* e *in vitro*.

CONCLUSIONES

- Los extractos hidroalcohólicos de *Equisetum arvense*, *Physalis peruviana*, *Bixa orellana* y *Eupatorium triplenerve*, mostraron efectos estimulantes de la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos de ratón en grado diverso.
- No existe correlación entre la capacidad antioxidante de las plantas motivo del presente estudio y el efecto estimulante de la tasa de proliferación de fibroblastos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Hospital Militar Central del Perú por las facilidades que nos brindaron para la realización del presente trabajo.

Nuestro agradecimiento a CONCYTEC por haber financiado la ejecución de la presente investigación mediante Contrato de Subvención: 016-2007-CONCYTEC-OAJ.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Bray D, Lewis L, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell, **2002**. 4th Edition. Garland Publishing Inc., Londres.
2. Kundig, T. M., M. F. Bachmann, C. DiPaolo, J. J. Simard, M. Battegay, H. Lother, A. Gessner, K. Kuhlcke, P. S. Ohashi, H. Hengartner, *et al.*, Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science*, **1995**; 268: 1343–1347.
3. Giménez G. Los factores de crecimiento para fibroblastos: relaciones estructura-función en una familia peculiar de proteínas con pluriempleo. *Nefrología*, **2002**. Vol. XXII. Suplemento 5.
4. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J. Ethnopharmacol*, **2004**; 92(2-3):291-5. 0
5. Lam HW, Lin H CH, Lao S CH, Gao JL, Hong SJ, Leong CH W, t Yue PYK, Kwan YW, Leung AYH, Wang YT, Lee SM. The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on HUVEC *in vitro* and zebrafish *in vivo*. *J. Cell. Biochem*, **2008**; 103: 195-211.
6. Enciso J; Amiel J; Guija E; Fukusaki A; Reátegui, O; Amiel D; Enciso N.; Valdivia E; Rodríguez R; Neyra K. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Revista Científica*, **2008**. Vol. 5 (3/4): 164-176.

7. Szollosi R, Varga I. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method) *Acta Biol. Szeg.* **2002**; 46(3-4):125-127.
8. Spanos GA, Wrolstad RE. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *J Agrip Food Chem*, **1990**; 38:1565-1571.
9. Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, **1999**; 64: 555-599.
10. Biological Industries. Cell proliferation assay with XTT reagent cell proliferation kit. Procedure. **2008**.
11. Wu SJ, Ng LT, Huang YM, Lin DL, Wang SS, Huang SN, Lin CC. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Bio Pharm Bull*, **2005**; 28(6):963-966.
12. Agner AR, Barbisan LF, Scolastici C, Salvadori DM. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver médium-term assay. *Food Chem Toxicol*, **2004**; 42(10): 1687-93.
13. Wu SJ, Ng LT, Huang SN, Wang SS, Lin CC. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett*, **2004**; 215(2):199-208.
14. Dzhambazov B, Daskalova S, Monteva A, Popov N. *In vitro* screening for antitumor activity of *Clinopodium vulgare* (Lamiaceae) extracts. *Biol Pharm Bull*, **2002**; 25(4):499-504.
15. Dos Santos G J Jr, Martins do Monte F H, Blanco M, Bispo Lanziotti V, Maia F D, de Almeida Leal L K. Cognitive enhancement in aged rat after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties in vitro. *Pharmacol Biochem behav*, **2005**; 81(3):593-600.