

Efecto antiestrés del extracto del pericarpio de la *Punica granatum* L. En células mononucleares humanas de sangre periférica

Grecia Méndez Corao^{1*}, José Ángel Cova² y Jacqueline Pérez¹

¹Laboratorio de Investigaciones en Cultivos Celulares. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. ²Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Recibido: 27-04-04 Aceptado: 29-09-04

Resumen

Las células mononucleares (CMSP), de sangre periférica, se separan por la técnica de ficoll-hypaque, se ajustan a 2×10^5 cel/pozo y se incuban con un extracto acuoso del pericarpio de la granada (*Punica granatum* L.) (PRE), con y sin sulfato ferroso, a concentraciones de 25, 12,5, 10, 7,5, 5 y 2,5 μg /pozo. Un duplicado fue sometido a estrés de CO_2 . El porcentaje de viabilidad para todas las concentraciones usadas en presencia de sulfato ferroso fue 99% y 98% sin sulfato ferroso. El duplicado estresado, a concentraciones superiores a 7,5 μg /pozo, mostró una viabilidad superior al 80%. Se demuestra baja toxicidad de PRE, con o sin sulfato ferroso, garantizando su uso en estudios humanos sin riesgo tóxico y con efecto antiestrés.

Palabras clave: Antiestrés; linfocitos; polifenoles; *Punica granatum*; toxicidad.

Antistress effect of the pericarp extract from *Punica granatum* L. In human peripheral blood mononuclear cells

Abstract

Mononuclear cells (CMSP) from peripheral blood, were separated using ficoll-hypaque technique, adjusted to 2×10^5 cell/well and incubated with an aqueous extract (PRE) from the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum* L.), with and without ferrous sulphate, at 25, 12.5, 10, 7.5, 5 and 2.5 μg /well. One duplicate was tested under CO_2 stress. Viability for the whole range with ferrous sulphate was 99% and without ferrous sulphate 98%. The stress duplicate, for ratios over 2.5 μg /well, shows viability over 80%. The results showed a low toxicity for PRE, with and without ferrous sulphate, warranting its use in human, without toxic risk and with anti-stress effect.

Key words: Antistress; mononuclear cell; polyphenols; *Punica granatum*; toxicity.

Introducción

El granado (*Punica granatum* L.) de la familia Punicáceas, es un árbol pequeño, de frutas cuyo pericarpio es de color amarillo

rojizo, de pulpa ácida y con gran cantidad de semillas (1). Los varios efectos farmacológicos referidos a esta planta datan de tiempos remotos: Recomendada como vermífugo por Celso, Discordio y Plinio, es mencionada en

* Autor para la correspondencia. E-mail: gmendez@ula.ve

los Papiros de Ebers (Egipto, 1550 BC), en la mitología griega y en la Biblia (2).

En estudios más recientes se han reportado: Actividad antimicrobiana contra varias bacterias (3, 4), incluyendo el *Staphylococcus aureus* (5).

Actualmente se ha incrementado el interés en la actividad antioxidante (6-8), actividad antimutagénica (9, 10), actividad antiviral (11, 12), reductor de los síntomas de la peritonitis crónica. (13) y antimicótico (14). Se han realizado algunos estudios en ratones donde se reporta que la punicalagina no tiene efecto tóxico (15)

En cuanto a los estudios fotoquímicos, varios constituyentes han sido reportados: A partir de material foliar se han aislado y caracterizado: corilagina, punicafolina, granatina A y B (16), la estrictinina, además de los galotaninos: 1, 2, 4, 6-tetragaloilglucosa y 1, 2, 3, 4, 6-pentagaloilglucosa (17). La punicalagina y la punicalina han sido aisladas del pericarpio (18) cuyas estructuras se encuentran en una mezcla en equilibrio de sus anómeros α y β (19). El ácido carboxílico brevifolina, brevifolina, corilagina, 3,6-(R)-hexahidroxi-difenil-(α/β)- 1C_4 -glucopiranososa, 1, 2, 6-tri-o-galoil- β - 4C_1 -glucopiranososa, 1, 4, 6-tri-o-galoil- β - 4C_1 -glucopiranososa, ácido elágico, 3, 4, 8, 9, 10-pentahidroxi-dibenzob,d-piran-6-ona, granatina B, punicafolina y geraniina, fueron aislados de la hoja, y los autores reportan una nueva interpretación de la RMN y han establecido la estructura de un nuevo compuesto, el 1, 2, 3-tri-o-galoil- β - 4C_1 - glucopiranososa (20). También se han reportaron dos nuevos elagitaninos: el ácido dielágico ramnosil (1 \rightarrow 4) glucopiranosido y el 5-O-galoilpunicacorteína D (21) (Figura 1).

A pesar de la extensa información, en cuanto a las propiedades terapéuticas del granado, son pocos los estudios que evalúan la toxicidad de este fruto y el conocimiento de esta área, es de gran importancia previo uso masivo en humanos. En este sentido,

Amorin *et al.* no encontraron efectos tóxicos ni mutagénicos, en ratones tratados con un extracto acuoso de la granada (22). Sin embargo estos estudios fueron realizados en ratones y la evidencia en líneas celulares humanas es escasa.

En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico de la *Punica granatum* sola o en combinación con sulfato ferroso, en células humanas susceptibles del sistema inmunológico. Así mismo, estudiamos el efecto citoprotector del compuesto en este grupo celular, cuando es expuesto a condiciones conocidas como de "estrés fisiológico" que incluyen hipoxia, hipercapnia e hipotermia.

Materiales y Métodos

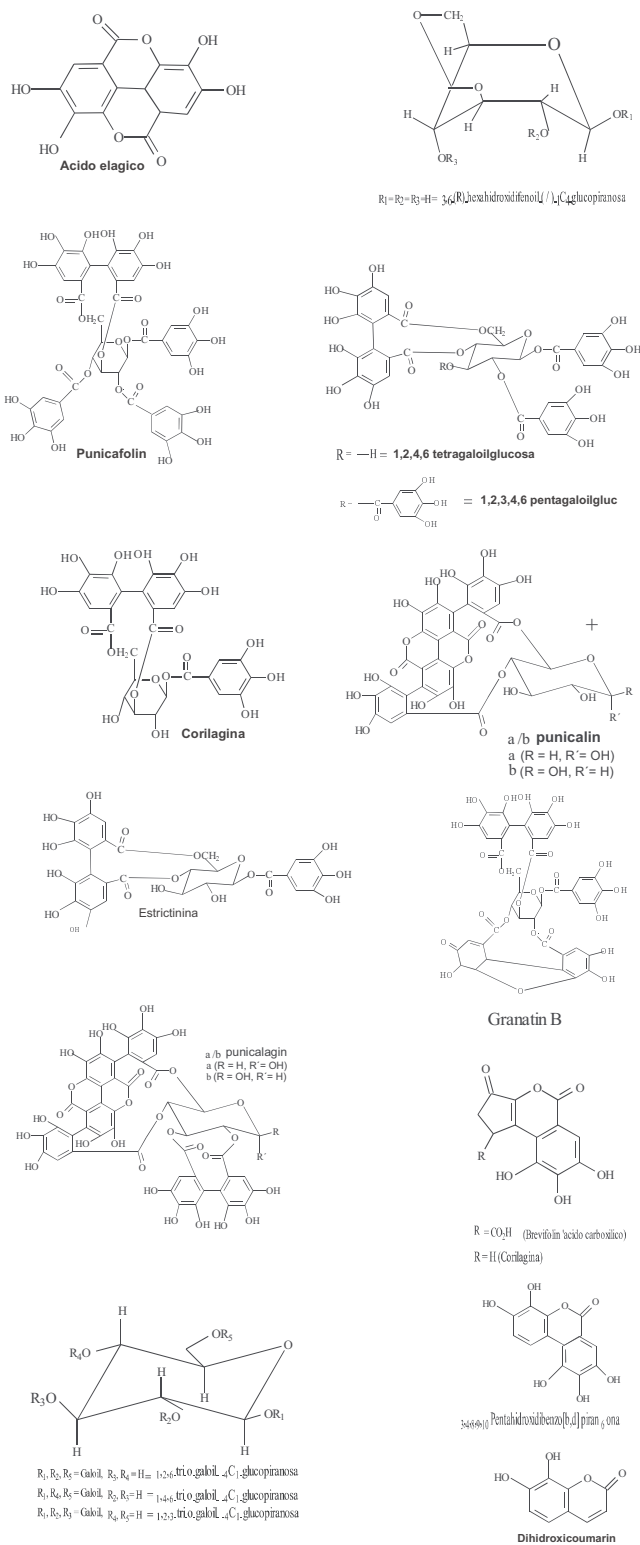
Preparación del extracto y diluyentes

El extracto se preparó a partir del pericarpio de la granada (PRE) licuando en agua destilada (25% p/v), y calentado hasta ebullición por 10 min, se centrifugó (20,000 g por 30 min), y el sobrenadante fue autoclavado (121°C, 15 min) y diluido para obtener una concentración de 1mg/mL: este fue el stock empleado en el ensayo (12, 23).

La solución de sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) fue usada para potenciar la acción antioxidante de los polifenoles del extracto de la granada. El $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ se preparó a una concentración de 4,8 mmol/L, fue esterilizada por filtración a través de Acrodiscos (Gelman Sciences) de 0,22 μm de poro, usada inmediatamente después de su preparación y protegida de la luz. Las muestras se prepararon al mezclar el extracto con el sulfato ferroso o agua en una proporción de 2,3:1 (extracto: sulfato ferroso o extracto: agua, según el caso).

Material biológico

Las células mononucleares (CMSP) fueron obtenidas de sangre periférica de donantes voluntarios sanos, por venopunción en el antebrazo derecho. La alícuota fue diluida v/v con una solución buffer fosfato sa-

Figura 1. Principales componentes reportados en la *Punica granatum L.*

lina (PBS) y sometida a separación lenta para la obtención de los linfocitos (ficoll-hypaque) (24, 25), centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min a 18°C. Transcurrido este tiempo se extrajo la capa media de la separación resultante, la cual contenía las CMSP. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y centrifugadas (1300 rpm por 10 min a 18°C). Después del último lavado se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero bovino fetal y antibióticos. Se realizó el conteo celular usando un microscopio invertido.

Ensayo biológico

Las células fueron resuspendidas en medio hasta lograr una concentración final de 2×10^6 cel/mL y 100 μ L de esta suspensión celular colocada en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

Las células fueron incubadas con PRE a concentraciones de 25, 12,5; 10, 7,5; 5 y 2,5 μ g/pozo con y sin la adición de sulfato ferroso, por 48 horas. Finalizado el período de incubación se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con el colorante trypan blue (26) y se comparó con el grupo control o células incubadas sin el extracto.

Actividad antiestrés

Una replica de las muestras bajo idénticas condiciones anteriormente descritas, fue sometido a un flujo continuo de CO₂ durante 40 min hasta lograr hipercapnia, a temperatura ambiente entre 25 y 28°C (hipotermia) y bajas presiones de oxígeno (hipoxia).

Resultados

El porcentaje de viabilidad celular de las muestras incubadas con el extracto más sulfato ferroso fue de 99% para todas las concentraciones usadas en el estudio, comparado al control. La viabilidad celular de las muestras incubadas con el extracto sin sulfato ferroso estuvo en el rango entre 99 y 98%, representado en la Tabla 1.

Tabla 1
Porcentajes de viabilidad celular de las células mononucleares humanas de sangre periférica expuestas al PRE con y sin sulfato ferroso

Concentración (g/pozo)	Viabilidad celular (%)	
	PRE sin sulfato ferroso	PRE con sulfato ferroso
2,5	98	99
5	99	99
7,5	99	99
10	99	99
12,5	100	99
25	99	99

PRE: Extracto del pericarpio de la *Punica granatum*.

Las células estresadas, en términos generales, disminuyeron su viabilidad a concentraciones bajas de PRE con o sin sulfato ferroso (53% y 60% respectivamente, a la concentración de 2,5 μ g/pozo). El aumento de la concentración de PRE (7,5 μ g/pozo en adelante) provocó un aumento en la viabilidad celular de 81 y 100% (con y sin sulfato ferroso respectivamente). Se estableció que la presencia del extracto protegió a las células del estrés y este efecto parece ser dosis-dependiente, tal como se representa en la Figura 2.

Discusión y Conclusión

Los estándares internacionales de evaluación de compuestos, con potencial uso en medicina, recomiendan la realización de estudios preclínicos usando líneas celulares establecidas o células humanas cultivadas *in vitro*. Para el caso de células humanas, se prefieren aquellas más susceptibles al efecto tóxico de las sustancias, como lo son los glóbulos rojos y otras células de la sangre (28). Las células mononucleares, presentes en la sangre, son muy lábiles al efecto de una gran variedad de estímulos como las radiaciones, bacterias y compuestos. En vista

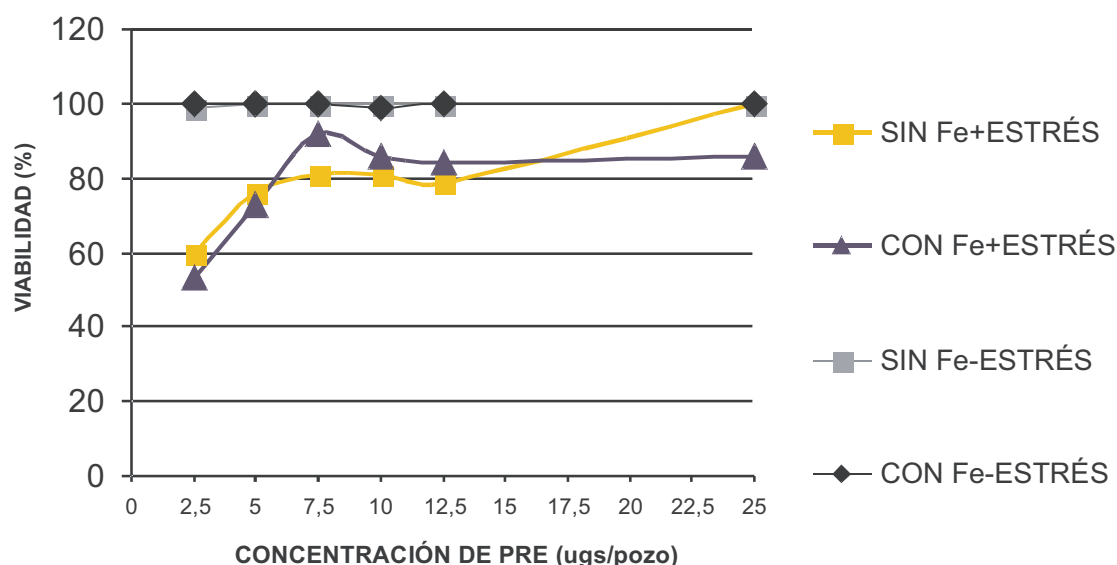


Figura 2. Gráfica comparativa de la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica humana (%), incubadas a varias concentraciones del extracto de *Punica granatum* L. (g/pozo) en presencia o ausencia de sulfato ferroso, sometidas a estrés de CO₂, hipoxia e hipotermia, comparadas contra duplicados de células no estresadas. SIN Fe= PRE sin FeSO₄, CON Fe= PRE con FeSO₄, + estrés= sometido a estrés, -estrés= no sometido a estrés.

de esta característica se seleccionó el presente sistema para evaluar el efecto tóxico del compuesto en estudio. La adición de sulfato ferroso al extracto, no reveló una diferencia importante en la viabilidad celular, representados en la Tabla 1, abriendo nuevos caminos para interpretar las propiedades farmacológicas que se atribuyen a la granada y la capacidad potenciadora del Ion ferroso (12, 23). El mecanismo de acción, posiblemente se debe a su capacidad de actuar como agente antioxidante (29). En un estudio realizado por Martell y Taqui Khan (1973), empleando el reactivo de Udenfriend, el cual consiste en una mezcla de Fe(II)-EDTA-ácido ascórbico-oxígeno molecular, los autores usaron esta reacción para hidroxilar sustratos orgánicos, y encontraron la formación de radicales hidroxilo, como el generado en la reacción de Fenton (30), nosotros podríamos especular que los polifenoles de PRE podrían estar involucrados en este tipo de reacción y actuar de manera similar al EDTA, por otra parte, el ácido ascórbico que podría estar libre en el extrac-

to, actuando como la especie coordinada al Ion ferroso, potenciando la acción, pero al mismo tiempo los mismos polifenoles podrían ser hidroxilados y actuar como agentes barredores de radicales libres. La producción de metabolitos dañinos para las células, podrían ser elaborados como consecuencia del propio estrés celular, pero compuestos polifenólicos presentes en el extracto de *Punica granatum* L., sin efecto tóxico (31), probablemente ejercieron un efecto protector (32).

Las plantas son probablemente la fuente más importante de agentes terapéuticos, una gran cantidad de principios activos, usada hoy en día como drogas, han sido aisladas del mundo vegetal (27). Nuevos agentes terapéuticos sin efectos tóxicos son siempre bienvenidos.

En este trabajo, nosotros encontramos que la granada, empleada por el hombre desde tiempos antiguos, adjudicándole un sin número de actividades farmacológicas, no exhibió efectos citotóxicos importantes

sobre las células mononucleares humanas, garantizando su uso en estudios en humanos, sin riesgo tóxico. Además demostró proteger a estas células del efecto deletéreo inducido en el laboratorio.

Agradecimientos

El desarrollo de esta investigación ha sido posible gracias al apoyo financiero otorgado por el CDCH/T ULA Código FA 2570103-A. Al Dr. Luis Sarmiento por su colaboración en este estudio.

Referencias Bibliográficas

- JOHN S. Dictionary of Popular Names of Plants, London, pp. 232, 1982.
- GRAVES R. The Greek myths, Penguin, Edinburgh, pp. 89-93, 1955.
- JIMÉNEZ MISAS CA., ROJAS HERNÁNDEZ NM., LÓPEZ ABRAHAM AM. IV. *Rev Cubana Med Trop* 31(1): 29-35, 1979.
- HOLETZ FB., PESSINI GL., SANCHES NR., CORTEZ DA., NAKAMURA CV., FILHO BP. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(7):1027-1031, 2002.
- MACHADO TB., PINTO AV., PINTO MC., LEAL IC., SILVA MG, AMARAL AC., KUSTER RM, NETTO-DOS SANTOS KR. *Int J Antimicrob Agents* 21(3): 279-284, 2003.
- CHIDAMBARA MURTHY KN., JAYAPRAKASHA GK., SINGH RP. *J Agric Food Chem* 50(17): 4791-4795, 2002.
- NODA Y., KANEYUKI T., MORI A., PACKER L. *Agric Food Chem* 250(1):166-171, 2002.
- AVIRAM M., DORNFELD L., KAPLAN M., COLEMAN R., GAITINI D., NITECKI S., HOFMAN A., ROSENBLAT M., VOLKOVA N., PRESSER D., ATTIAS J., HAYEK T., FUHRMAN B. *Drugs Exp Clin Res* 28(2-3): 49-62, 2002.
- KIM ND., MEHTA R., YU W., NEEMAN I., LIVNEY T., AMICHAY A., POIRIER D., NICHOLLS P., KIRBY A., JIANG W., MANSEL R., RAMACHANDRAN C., RABI T., KAPLAN B., LANSKY E. *Breast Cancer Res Treat* 71(3): 203-217, 2002.
- ALEKPEROV UK. *Eur J Cancer Prev* 11 (2): S8-11, 2002.
- ZHANG J., ZHAN B., YAO X., GAO Y., SHONG J. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 20(9): 556-8, 576, 1995.
- STEWART GSAB., JASSIM SAA., DENYER SP., NEWBY P., LINLEY K., DHIR VK. *J Appl Microbiol* 84: 777-783, 1998.
- SASTRAVAHA G., YOTNUENGNIT P., BOONCONG P., SANGTHERAPITIKUL P. *J Int Acad Periodontol* 5(4):106-15, 2003.
- VASCONCELOS LC., SAMPAIO MC., SAMPAIO FC., HIGINO JS. *Mycoses* 46(5-6):192-196, 2003.
- CERDA B., CERON JJ., TOMAS-BARBERAN FA., ESPIN JC. *J Agric Food Chem* 51(11): 3493-501, 2003.
- OKUDA T., YOSHIDA T., MORI K., HATANO T. *Heterocycles* 15:1323-1326, 1981.
- TANAKA T., NONAKA G., NISHIOKA Y. *Phytochemistry* 24: 2075-2078, 1985.
- MAYER W., GORNER A., ANDREA K. *Liebigd Annual Chemistry*: 1976-1986, 1977.
- SCHILLING G., SCHICK H. *Liebigd Annual Chemistry*: 2240-2245, 1985.
- NAWWAR MAM., HUSSEIN SAM., MERFORT Y. *Phytochemistry* 36(3):793-798, 1994.
- EL-TOUMY SA., RAUWALD HW. *Phytochemistry* 61(8): 971-974, 2002.
- VIDAL A., FALLARERO A., PEÑA B., MEDINA M., GRA B., RIVERA F., GUTIERREZ Y., VUORELA P. *J Ethnopharmacology* 89: 295-300, 2003.
- CORAO G. *Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of Punica granatum L.* (PhD Dissertation), School of Pharmacy and Biomolecular Sciences. University of Brighton. (UK), pp. 80-88, 2001.
- MILTENIYI S., MULLER W., WEICHEL W. *Cytometry* 11:231-238, 1990.

-
25. HANSEL TT., DE VRIES IJ., IFF T. **J Immunol Methods** 145:105-110, 1991.
 26. COLIGAN J., KRUISBEEK A., MARGULIE D., SHEVACH E., STROBER W. **Current Protocols in Immunology. Greene Publishing Associates, Inc. and John Willey & Sons, Inc.** (3), pp. A.3.3-A.3.4, 1995.
 27. HOSTETTMANN K., MARSTON A., WOLFENDER JL. **Phytochemistry of plants used in traditional medicine.** Clarendon Press Oxford, London, (UK). pp. 16-45, 1995.
 28. LOVSCHALL H., EISKJAER M., ARENHOLT-BINDSLEV. **Toxicol in vitro** 16: 455-461, 2002.
 29. MASAKI H., ATSUMI T., SACURAI H. **Biological Pharmacy Bull** 18(1): 59-63, 1995.
 30. MARTELL AE., TAQUI KMM. **Metal ion catalysis of reactions of molecular oxygen.** In: Inorganic Biochemistry, ed. Gunther L Eichhorh. Elsevier. Amsterdam. (2), pp. 654-686, 1973.
 31. VIDALA., FALLARERO A., PENA BR., MEDINA ME., GRA B., RIVERA F., GUTIÉRREZ Y. VUORELA. **J Ethnopharmacol** 89(2-3): 295-300, 2003.
 32. HORA J.J., MAYDEW E.R., LANSKY E.P., DWIVEDI C. **Med Food Fall** 6(3):157-61, 2003.