

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Interacción fluoruro de sodio con *Moringa oleifera* en sangre periférica de pez cebra *Danio rerio*.

Álvarez M¹, Guadarrama R, Arias M, Perdomo L, Navarro E

¹Sección de Microscopia Instituto Anatómico José Izquierdo Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela

Proyecto Grupal: PG-09-8653-2013

Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico

UCV.

Resumen

La interacción entre agentes químicos inorgánicos y la medicina herbaria, ha motivado la búsqueda de modelos experimentales para evaluar la relación toxicidad/protección vinculada con la misma. Un ejemplo de esta interacción proviene del Flúor, contaminante químico oxidativo y del extracto acuoso de la *Moringa oleífera* (*M.oleífera*), planta altamente consumida por su potencial nutritivo. En el presente trabajo se hizo uso del pez cebra adulto *Danio rerio* para evaluar los efectos de la interacción entre ambos, hasta el presente poco estudiada. Se estimó la CL₅₀ del Fluoruro de Sodio (NaF) y del extracto acuoso de *M.oleífera*, haciendo uso de programa GraphPad Prism versión 6.6. Se analizaron, por microscopia, las poblaciones celulares presentes en extendidos de sangre periférica, obtenidos luego de 24 h de tratamiento. Las tinciones histoquímicas de Feulgen y Naranja de Acridina permitieron determinar alteraciones nucleares en la población eritrocitaria. Los datos obtenidos fueron analizados a través de Excel y el programa ImageJ. Se obtuvo un valor de $0,75 \pm 0,29$ mg/ml para la CL₅₀ del NaF y de $11,00 \pm 3,01$ mg/ml para la CL₅₀ de *M.oleífera*. Se determinó que NaF, induce un aumento de neutrófilos y eosinófilos que se reduce en presencia de *M.oleífera* y una disminución de linfocitos que se revierte en el grupo combinado. La presencia de cuerpos apoptóticos en eritrocitos tratados con NaF presentó una reducción, estadísticamente significativa, en presencia de *M.oleífera*. Los resultados demuestran una relación toxicidad/protección y en particular, una relación hematotóxicidad/hematoprotección, hasta el momento poco estudiada y por otra parte permiten sugerir que el extracto acuoso de *M. oleífera* podría ser consumido de forma segura, aportando al organismo una posible acción hematoprotectora ante el daño tóxico promovido por el Flúor.

Palabras claves: Fluoruro de sodio, *Moringa oleífera*, hematotoxicidad, hematoprotección, pez cebra, apoptosis.

Summary

Sodium Fluoride interaction with *Moringa oleifera* in peripheral blood of Zebrafish *Danio rerio*.

The interaction between inorganic chemical agents and herbal medicine has motivated the search for experimental models to evaluate the relationship toxicity / protection related to it. An example of this interaction comes from the fluorine, oxidative chemical contaminant on the aqueous extract of *Moringa oleifera* (*M.oleifera*), a plant highly consumed for its nutritional potential. In the present work the adult zebrafish *Danio rerio* was used to evaluate the effects of the interaction between both, until the present little studied. The LC₅₀ of Sodium Fluoride (NaF) and *M.oleifera* aqueous extract was estimated using GraphPad Prism software version 6.6. Cell populations present in peripheral blood spreads, obtained after 24 h of treatment, were analyzed by microscopy. The histochemical stains of Feulgen and Acridine Orange allowed determining nuclear alterations in the eritrocitaria population. The data obtained were analyzed through Excel and the ImageJ program. A value of 0.75 ± 0.29 mg / ml was obtained for the LC₅₀ of NaF and 11.00 ± 3.01 mg / ml for the LC₅₀ of *M.oleifera*. It was determined that NaF induces an increase of neutrophils and eosinophils which is reduced in the presence of *M.oleifera* and a decrease in lymphocytes that reverts in the combined group. The presence of apoptotic bodies in NaF treated erythrocytes showed a statistically significant reduction in the presence of *M.oleifera*. The results show a toxicity/protection relationship and in particular, a hematotoxicity / hematoprotection ratio, until now little studied and, on the other hand, suggest that the aqueous extract of *M. oleifera* could be safely consumed, giving the organism a possible action hematoprotective against the toxic damage promoted by fluoride.

Key words: Sodium fluoride, *Moringa oleifera*, hematotoxicity, hematoprotection, zebrafish, apoptosis.

Introducción

La interacción entre agentes químicos inorgánicos y la medicina herbaria¹, ha motivado la búsqueda de modelos experimentales para evaluar la relación toxicidad/protección vinculada con la misma. Un ejemplo de esta interacción lo constituye el uso de Flúor y el extracto acuoso de la planta *Moringa oleífera* (*M.oleífera*). El Flúor, un contaminante químico oxidativo, es un sólido moderadamente soluble en agua, que se caracteriza por tener una amplia distribución en el medio ambiente y ser causa de numerosos efectos adversos para la salud; entre los que se incluye la alteración en el sistema hematopoyético. Así, variaciones en el tamaño y forma de los eritrocitos, alteraciones en la cuenta leucocitaria, eosinofilia y linfopenia, entre otros cambios, han sido registrados². Por su parte, la *M.oleífera*, es una planta de la familia Moringaceae, que ha sido reconocida por sus potenciales propiedades nutritivas, medicinales y fitoterapéuticas³, por lo que en los últimos años, ha sido motivo de numerosas investigaciones⁴. Entre los pocos datos encontrados que ilustran la interacción Flúor y *M.oleífera*, en una posible relación hematotóxicidad-hematoprotección, cabe destacar la experimentación "in vivo", realizada en terneros criados en ambientes altamente contaminados con Flúor, y que fueron tratados con extracto de la semilla de *M. oleífera*⁵. En esta investigación se demostró que los animales superaron el estado anémico, así como el estado de defensa inmunológico, característico de la acción tóxica del Flúor. Dicha experiencia, ha motivado la búsqueda de nuevos modelos de experimentación que contribuyan con un mayor conocimiento respecto a la posible acción protectora y particularmente hematoprotectora de esta planta, que en nuestro país ha presentado un acelerado repunte en su consumo, por parte de la población, debido al registrado alivio que produce como tratamiento de numerosas dolencias, como el insomnio, inflamaciones, hipertensión, cáncer, entre otras⁶. En tal sentido en el presente trabajo se ha propuesto estudiar la interacción entre el Fluoruro de sodio (NaF) y un extracto acuoso de *M.oleífera*, para evaluar, en extendidos de sangre periférica de una población de peces cebra *Danio rerio*, la posible relación toxicidad/protección hasta el presente poco conocida.

Materiales y métodos

El fluoruro de sodio (NaF) utilizado, fue obtenido a través de la compañía "Representaciones Levizon C.A", Rif. J-0010985-9. Las soluciones fueron preparadas de manera individual, disolviendo 0.25, 0.50, 0.75, 1,1.25, 1.50, 1.75 y 2 mg de NaF en 500 ml de agua de pecera previamente filtrada. La *M. oleífera* utilizada fue recolectada en la granja Yaguare, ubicada en San Sebastián de los Reyes del estado Aragua y trasladada al herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (UCV), donde fue caracterizada y registrada por la Dra. Orsiny, con las siglas MYF

29336". El extracto acuoso de *M. oleifera* fue preparado por decocción y de manera individual, colocando, durante 12 min, un peso de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mg de hojas secas, en 500 mL de agua destilada hervida. Transcurrido este tiempo, las soluciones fueron filtradas y recolectadas en frascos ámbar hasta ser utilizadas en los respectivos bioensayos. Cada concentración fue evaluada sobre una población de adultos de pez cebra *Danio rerio*, obtenidos de una casa comercial y acondicionados en el laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la UCV. Una vez obtenidas las respectivas CL₅₀, de cada solución se procedió a establecer los grupos de experimentación: I: control, II: extracto acuoso de *M.oleifera*, III: Solución de NaF y IV: extracto acuoso de *M.oleifera* + Solución de NaF, para un tratamiento de 24 horas a temperatura ambiente. Los datos obtenidos fueron analizados y procesados mediante el Programa GraphPad Prism, versión 6.0. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los peces controles y tratados, fueron anestesiados por hipotermia. Una vez alcanzada la inmovilización del pez, se procedió a realizar un corte a nivel de la arteria aorta de la aleta caudal y a la obtención de la muestra sanguínea⁷, con la cual fue realizado el extendido sanguíneo. Seguidamente, se procedió a realizar el conteo celular y a evaluar la morfología de las células sanguíneas, para lo cual los extendidos fueron contrastados con la tinción Feulgen⁸ y la sonda fluorescente Naranja de Acridina⁹. Los datos fueron expresados en promedio más o menos la desviación estándar ($X \pm DE$). Estos fueron graficados y analizados a través de programas estadísticos que permitieron establecer los cambios estadísticamente significativos en todos los parámetros medidos, utilizando un límite de significación de $p < 0.05$, GraphPad Prism versión 6, para el cálculo de la CL₅₀, y el programa Excel 2010, para el análisis de los datos obtenidos del conteo celular.

Resultados

La CL₅₀, para el NaF, fue de $0.7 \pm 0,3$ mg/ml (Fig.1), mientras que para el extracto acuoso de *M.oleifera* a las 24 h de tratamiento, fue de 11 ± 3 mg/ml (Fig.2). Ambas concentraciones fueron estimadas con un 90% de confiabilidad. Cabe destacar que los cambios celulares de mayor valor significativo, en cuanto a la actividad protectora ejercida por el extracto acuoso de *M. oleifera* ante la toxicidad inducida por NaF, fueron registrados con la concentración de 8 mg/ml del extracto acuoso de *M.oleifera* (CL₅₀-), en combinación con 1 mg/ml de NaF (CL₅₀+). Bajo estas condiciones, el incremento de los neutrófilos como respuesta al NaF, se redujo significativamente en presencia del extracto acuoso de *M.oleifera* (Fig.3a). Esta misma tendencia fue observada con la población de eocinofilos (Fig.3b). A diferencia de los linfocitos, en donde la reducción de los mismos en presencia de NaF, presentó un incremento en presencia del extracto acuoso de *M.oleifera*, tendiendo a los valores control (Fig.3c). Los cambios registrados para los

monocitos no fueron significativos. (Fig.3d), El conteo del número de células en el grupo combinado (M+Fs), fue muy similar a los valores control de cada una de ellas. No hubo diferencia significativa. Respecto a los eritrocitos, mayor población celular registrada, cabe destacar que estos presentaron significativas anormalidades nucleares. Así, se observó que el NaF, 1 mg/ml (Fig.4a), promovió un alto porcentaje de núcleos lobulados y de tamaño reducido (flechas), en comparación a los núcleos de eritrocitos del control (Fig.4b) y el grupo de eritrocitos tratados con 8 mg/ml de extracto acuoso de *M.oleifera* (Fig.4c). Dichas anormalidades en la estructura nuclear no fueron registradas en los eritrocitos del grupo combinado (M+Fs) (Fig.4d). Sin embargo, el número de núcleos en forma ovalada (doble flecha), se aumentó respecto al número de núcleos de forma redondeada ($P < 0.05$). El marcaje con NA permitió poner en evidencia la presencia de cuerpos apoptóticos (Fig.5). El número de estos fue de $162,5 \pm 10,61$ bajo la acción del NaF (Fig.5a), contado por cada 200 células, en comparación a la baja presencia de estos cuerpos en el grupo control (Fig.5b) y el grupo tratado con 8 mg/ml de *M.oleifera* (Fig.5c). Estos cuerpos apoptóticos no fueron observados en el grupo combinado (M+Fs).

Discusión

Los resultados expuestos permitieron ratificar la actividad hematotóxica promovida por el NaF a una concentración letal de 1 mg/ml, así como demostrar que la concentración de 8mg/ml de *M-oleifera*, reduce las señales de hematotóxicidad inducidas por éste. Se sugiere por tanto, una posible acción hematoprotectora por parte del extracto acuoso de *M. oleifera* a concentraciones subletales, ante una severa acción tóxica promovida por el NaF. Al igual que otros investigadores, se demuestra la acción protectora con el uso del extracto acuoso de las hojas. Cabe destacar que las múltiples actividades biológicas del extracto acuoso de *M.oleifera*, incluyendo la antiproliferación celular, la acción hepatoprotectora, antiinflamatoria, antinociceptiva, antiaterosclerótica, oxidativa, protectora del daño del ADN, antiperoxidativo, cardioprotector, han sido atribuidas a la presencia de compuestos bioactivos funcionales tales como; Ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, fitoesteroles, azúcares naturales, vitaminas, minerales y ácidos orgánicos¹⁰. A pesar que en nuestra investigación no se aportan elementos de la fitoquímica del extracto acuoso de *M.oleifera*, resulta evidente que se estuvo promoviendo una acción antioxidativa y protectora contra el daño, que sobre el material nuclear de los eritrocitos ejerció el NaF. Particularmente el flavonoide quercitina, es uno de los compuestos más estudiados en las hojas de *M. oleifera*, por lo que hasta el presente es el componente que reúne los requisitos para ejercer esa efectiva función antioxidante¹¹. Su capacidad antioxidante podría ejercer su función ajustando el estado redox celular a una respuesta adaptativa o estrés¹², como el inducido por el NaF. En tal sentido, la reducción de las anormalidades nucleares en la población eritrocitaria de los

peces tratados con la mezcla *M.oleifera* + NaF, podría por tanto ser interpretada como una consecuencia de la reducción del estrés oxidativo o peroxidación lipídica inducido por el NaF. Estos resultados reconocerían acción antioxidante de la planta *M.oleifera* ante la reconocida característica oxidativa del NaF, en una relación toxicidad/protección y particular, hematotóxicidad / hematoproteccion, hasta el momento poco estudiada. Por otra parte los resultados permitirían sugerir el extracto acuoso de *M. oleífera* podría ser consumido de forma segura, permitiendo aportar al organismo una posible acción hematoprotectora ante el daño toxico promovido por el Flúor. Futuros experimentos han de ser realizados para poder establecer el o los posibles mecanismos vinculados con la relación establecida entre el NaF y la *M.oleifera*.

Fluoruro de sodio

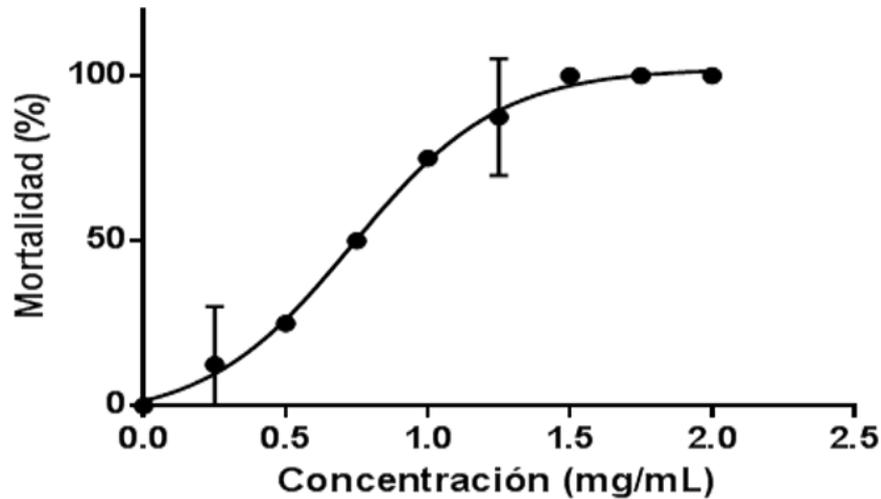


Fig.1. Relación entre la concentración de Fluoruro de Sodio (NaF) y porcentaje de mortalidad (%M). N=8, para cada concentración. Se expresa el valor medio y su desviación estándar $\bar{x} \pm DE$. $CL_{50} = 0,7 \pm 0,3$ mg/ml. 24h.

M. oleifera

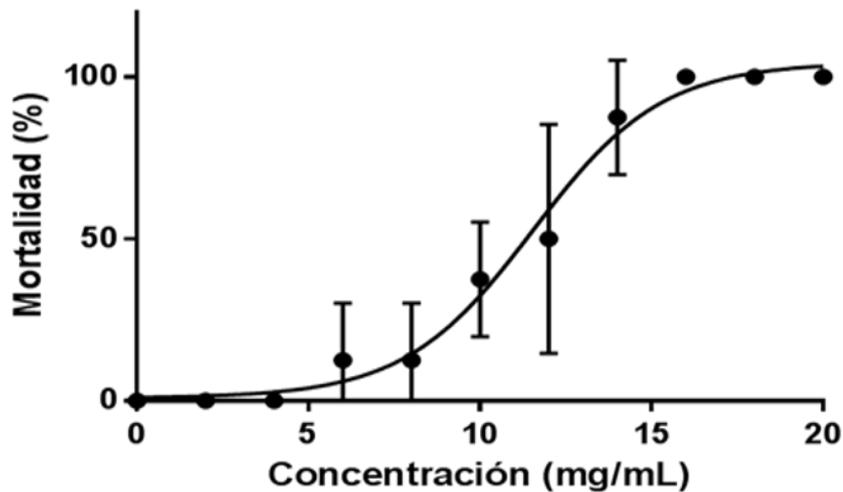


Fig.2. Relación entre la concentración del extracto acuoso de *M. oleifera* y porcentaje de mortalidad. N=8, para cada concentración. Se expresa el valor medio y su desviación estándar $\bar{x} \pm DE$. $CL_{50} = 11 \pm 3$ mg/ml. 24h.

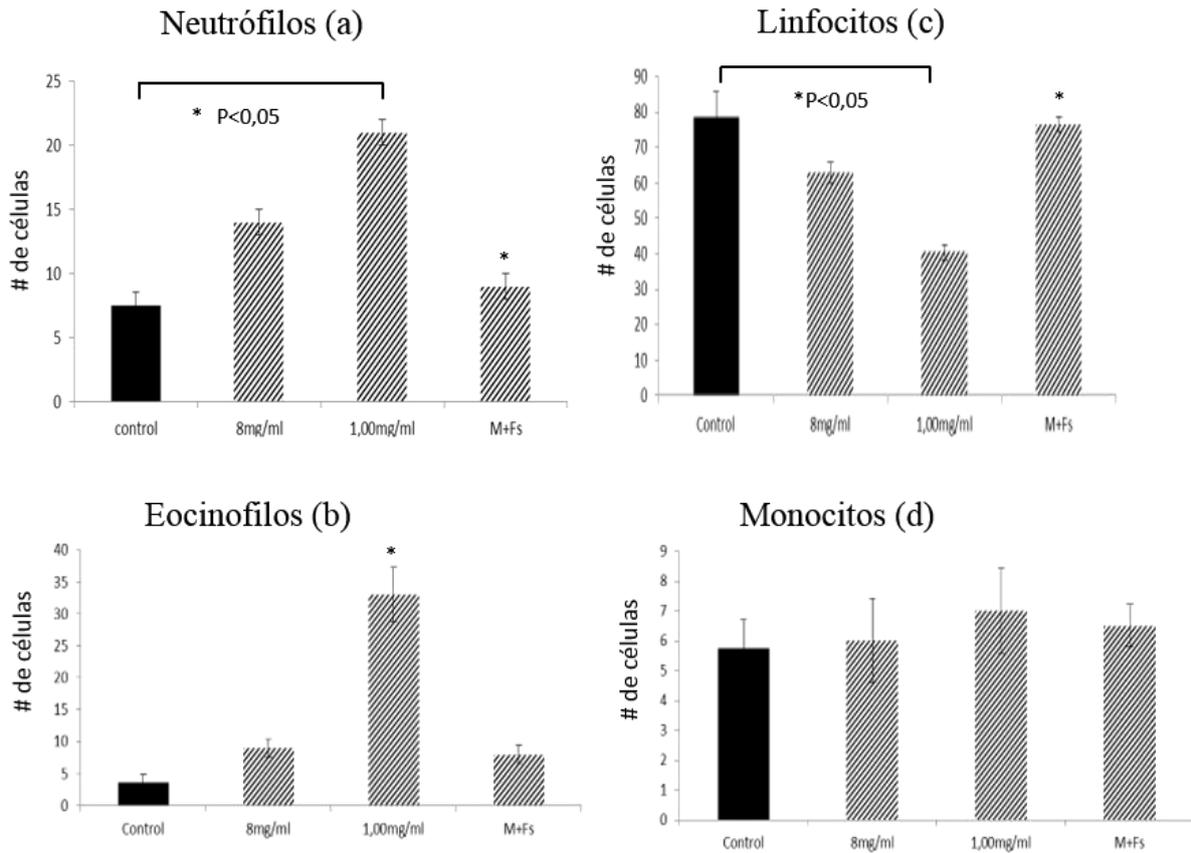


Fig.3. Variación en el número de células sanguíneas de pez cebra *Danio rerio*, en función de las concentración subletal CL₅₀- de *M.oleifera* (8mg/ml) y toxica CL₅₀+ NaF (1mg/ml).* (p<0,05). Grupo combinado (M+F5).

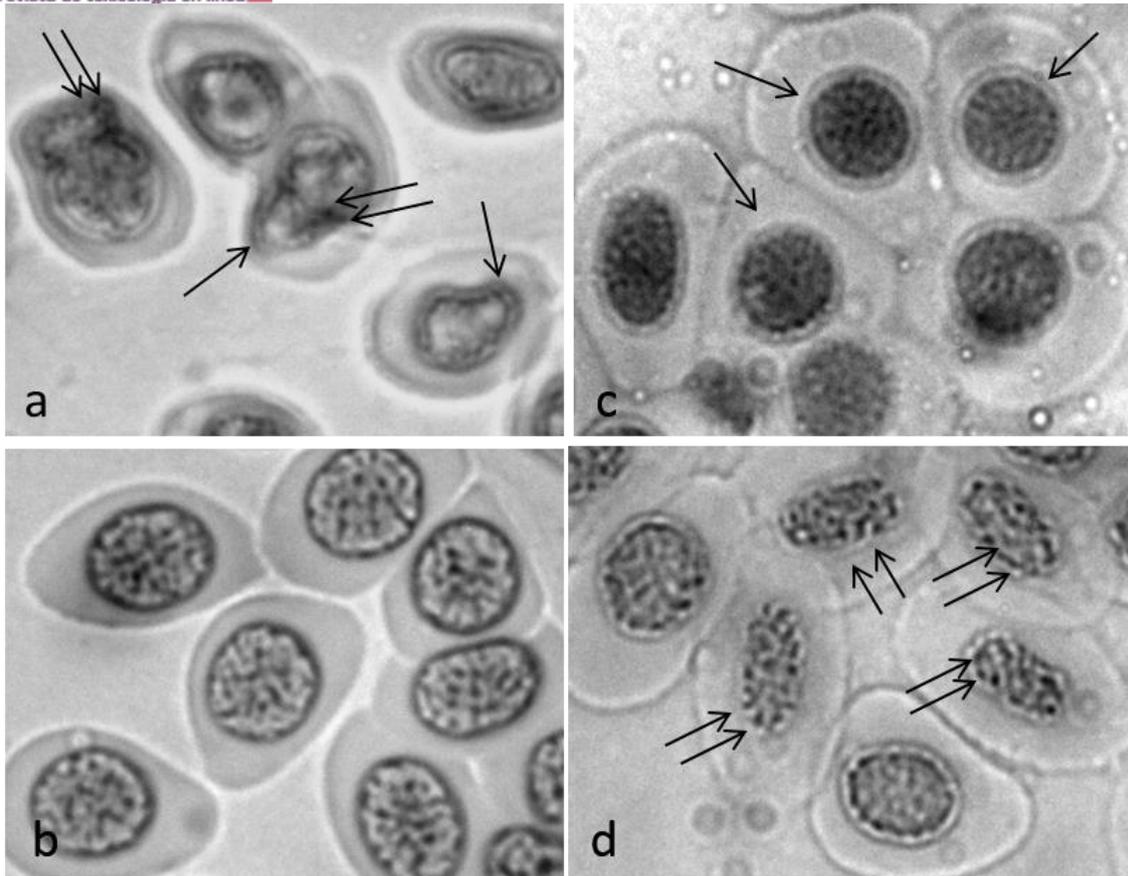


Fig.4. Eritrocitos de sangre periférica de pez cebra *Danio rerio* tratados con $CL_{50}+$ de NaF (a), en comparación con los grupos control (b), *M.oleifera* (c) y la mezcla *M.oleifera* + NaF (d). Coloración de Feulgen. Se destacan los núcleos lobulares (flechas) y los núcleos ovalados de cromatina condensada hacia la periferia (doble flechas). Magnificación: 100x.

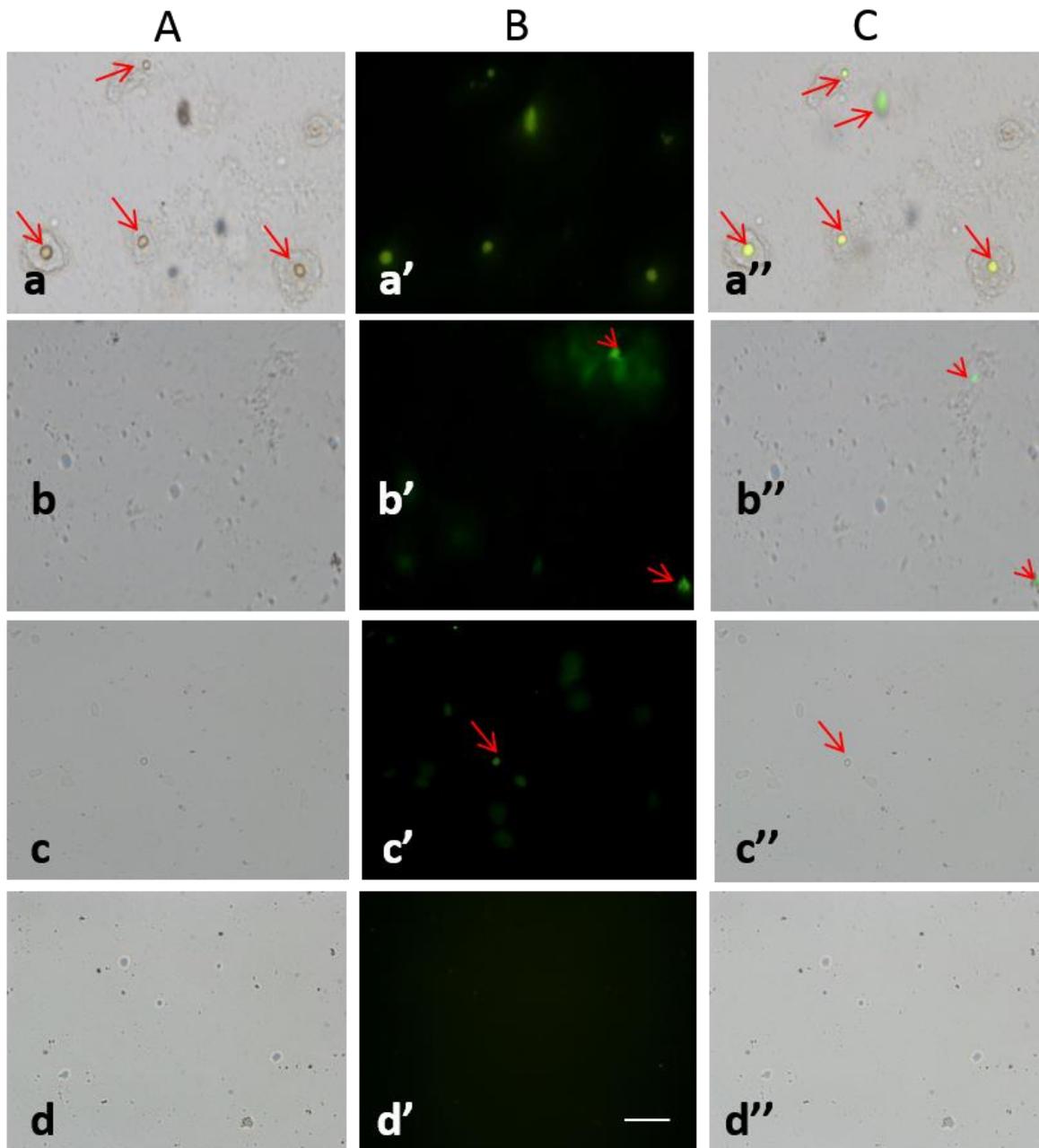


Fig.5. Micronúcleos de cromatina condensada revelados con Naranja de Acridina. Se muestran: panel A sin irradiación, a) grupo NaF (a), b) grupos control, c) extracto acuoso de *M.oleifera*, d) grupo mezcla. Panel B, con irradiación fluorescente $\lambda= 490-500$ nm; a', b', c', y d', en donde se destacan los cuerpos apoptoticos con mayor frecuencia en el tratamiento con NaF, y por ultimo, la composición, Panel C, imágenes mostrando la relocalización; a'', b'', c'' y d''. Barra=50 μ m.

Bibliografía

1. Moreale J, González T. Evaluación de las interacciones farmacológicas de las hierbas medicinales. *Biomedicina, Uruguay*. Noviembre. 2012, 7 (3); p. 6-21.
2. Machalinska A, Wiszniewska B, Tarasiuk J, Machalinski B. Morphological effects of sodium fluoride on hematopoietic organs in mice. *Fluoride* 2002; 35: 231-238.
3. Olson, M. E. Introduction to the Moringa Family. In *Themiracle tree: The multiple attributes of Moringa*, L. J. Fuglie(ed.) Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation, Wageningen/ Church World Service, New York. 2011; p. 11-28.
4. Pirrò S, Zanella L, Kenzo M, et al. MicroRNA from *Moringa oleifera*: Identification by High Throughput Sequencing and Their Potential Contribution to Plant Medicinal Value. Zheng Y, ed. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): e0149495. doi:10.1371/journal.pone.0149495.
5. Mandal KD, Das MR, Pati M, et al. Effect of *Moringa oleifera* on hematological parameters of calves reared in industrial fluorotic area. *Veterinary World*. 2015; 8(11):1364-1369. doi:10.14202/vetworld.2015.1364-1369.
6. Fahey, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal*. 2005. Disponible en: <http://www.TFLJournal.org/article.php/20051201124931586>
7. Gabriela L. Pedroso, Thais O. Hammes, Thayssa D.C. Escobar., Laisa B. Fracasso, Luiz Felipe Forgiarini, Themis R. da Silveira. Blood Collection for Biochemical Analysis in Adult Zebrafish <http://www.jove.com/video/3865>. Consultado el 08/04/2017.
8. <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/metodo-tincion-feulgen>. Consultado el 08/04/2017.
9. Álvarez, M, Urbina, G, & Perdomo, L. Excretion Product of *Shigella dysenteriae* (SdyEP) Induced Cell Death in Early Larval Stage of Zebrafish (*Danio rerio*): Acridine Orange and Ethidium Bromide (AO/EB) in vivo Staining. *International Journal of Morphology*. 2013; 31(4):1175-1180.
10. Tiloke C, Phulukdaree A, Chuturgoon AA. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13:226. doi: 10.1186/1472-6882-13-226.
11. Singh, B. N., B. R. Singh, R. L. Singh, D. Prakash, R. Dhakarey, G. Upadhyay y H. B. Singh. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47:1109-1116.
12. Terao J. Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochem Pharmacol*. 2017 Apr 1. pii: S0006-2952(17)30183-1. doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.021. [Epub ahead of print].

Recibido: 10/04/17

Aceptado: 11/04/17