

Trabajo Original

Toxicología Experimental

## **Acrilamida y *Amaranthus dubius* L en células sanguíneas de pez Cebra *Danio rerio***

**Alvarez M<sup>1</sup>, Vanessa G., Arias M., Perdomo L., Navarro E**

<sup>1</sup>Sección 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 presencia de Acrilamida (ACR), en alimentos de la dieta diaria, ha incentivado la búsqueda de estrategias que permitan proteger contra la acción de este potencial agente hematotóxico. En el presente trabajo se ha propuesto como posible agente protector el extracto acuoso de *A. dubius L*, una planta conocida como pira, de alto potencial antioxidante y reconocida por invaluable valor nutritivo. Peces cebras adultos jóvenes *Danio rerio*, fueron sometidos a la CL<sub>50</sub> de ACR, 2,80 mM, durante 24 horas, a temperatura ambiente. Otro grupo de peces fueron tratados, en igual condición, con concentraciones crecientes del extracto acuoso de hojas frescas de *A.dubius L*, en un rango entre 2 y 16 mg/ml, en presencia o no de ACR. Transcurrido el tratamiento, los peces fueron anestesiados por hipotermia y se realizó la extracción de la sangre periférica, la cual fue analizada a través de extendidos sanguíneos. Los mismos fueron analizados con la tinción de Feulgen y las señales de muerte celular fueron registradas con Naranja de Acridina. ACR promovió un incremento significativo  $p < 0,05$ , en el porcentaje de neutrófilos y monocitos así como una disminución significativa de linfocitos; mientras que dichas células no presentaron cambios significativos con el extracto acuoso de *A.dubius L*, respecto a los valores control. Igual situación fue registrada en los extendidos sanguíneos provenientes del tratamiento combinado. Los eritrocitos, como mayor población registrada, mostraron una marcada hipocromía y fragmentación nuclear. El extracto acuoso de *A.dubius L*, resultó ser no letal, aun en las más altas concentraciones. Los cambios morfológicos en la población de eritrocitos no fueron observados en las células del tratamiento combinado ACR + *A. dubius L*. Los resultados obtenidos demuestran el potencial hematoprotector de esta planta contra la acción hematotóxica de la ACR.

**Palabras claves.** Acrilamida, *Amaranthus dubius L*, hematotóxicidad, hematoprotección, pez cebras, apoptosis.

## Summary

### **ACRYLAMIDE AND *Amaranthus dubius L* IN BLOOD CELLS OF ZEBRAFISH *Danio rerio*.**

The presence of Acrylamide (ACR), in foods of the daily diet, has encouraged the search of strategies to protect against the action of this potential hematotoxic agent. In the present work the aqueous extract of *A. dubius L.*, a plant known as pyre, of high antioxidant potential and recognized for its invaluable nutritional value, has been proposed as a possible protective agent. Young adult zebrafish *Danio rerio*, were subjected to the LC<sub>50</sub> of ACR, 2.80 mM, for 24 hours at room temperature. Another group of fish was treated, in the same conditions, with increasing concentrations of aqueous extract of *A. dubius L* fresh leaves, ranging between 2 to 16 mg / ml, with or without the presence of ACR. After the treatment, the fish were anesthetized by hypothermia and the extraction of the peripheral blood was performed, which was analyzed through blood spreads. They were analyzed with Feulgen staining and cell death signals were recorded with Acridine Orange. ACR promoted a significant increase  $p < 0.05$ , in the percentage of neutrophils and monocytes as well as a significant decrease in lymphocytes; Whereas those cells did not show significant changes with the aqueous extract of *A. dubius L*, relative to the control values. The same situation was registered in the blood spreads from the combined treatment. Erythrocytes, as the largest recorded population, showed marked hypochromic and nuclear fragmentation. The aqueous extract of *A. dubius L* was found to be non-lethal, even at the highest concentrations. The morphological changes in the erythrocyte population were not observed in the cells of the combined treatment ACR + *A. dubius L*. The obtained results demonstrate the hematoprotective potential of this plant against the hematotoxic action of the ACR.

**Keywords.** Acrylamide, *Amaranthus dubius L*, hematotoxicity, hematoprotection, zebrafish, apoptosis.

## Introducción

La constante exposición que tiene el hombre a una gran cantidad de sustancias químicas presentes en el ambiente que lo rodea, ha comenzado a revelarse como un verdadero problema de salud pública, ya que muchas de estas sustancias han comenzado a ser detectadas en los alimentos de consumo cotidiano. Un ejemplo de ello es la Acrilamida<sup>1</sup> (ACR), una sustancia generada al cocinar, a temperaturas por encima de los 120°C, alimentos ricos en carbohidratos<sup>2</sup>. La ACR, ha sido descrita como un compuesto de degradación con un alto potencial hematotóxico, ya que promueve la formación de los denominados aductos de hemoglobina, marcadores biológicos en los casos de intoxicaciones por agentes nocivos<sup>3,4,5,6</sup>. En los últimos años se ha incrementado, por parte de la población mundial, la búsqueda de productos naturales que permitan el alivio de molestias de diferente etiología así como una vía de desintoxicación eficiente de bajos riesgos. Particularmente, el *Amaranthus dubius L*, (*A.dubius.L*) ha repuntado como un ejemplo de ello, debido en parte, a su alto potencial nutritivo, asociado a su alto contenido proteico, así como su riqueza en cuanto a grasas, fibras y vitaminas<sup>7</sup> y su eficiencia en el tratamiento de enfermedades como la anemia ferropénica<sup>8</sup>. Adicionalmente, ha sido promovida por su importante potencial antioxidante<sup>9</sup>. Si *A.dubius.L*, ha sido asociada con una posible acción protectora contra la acción hematotóxica promovida por la ACR, no está claramente establecido. Es por ello que la presente investigación se ha propuesto evaluar el posible papel protector de un extracto acuoso de *A.dubius L* contra las posibles alteraciones en las células sanguíneas de sangre periférica de peces cebra adultos *Danio rerio*, tratados con la ACR.

## Materiales y métodos

Peces cebra adultos jóvenes, *Danio rerio*, fueron obtenidos de una casa comercial. Una vez incorporados al laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo"; fueron acondicionados en los acuarios de la institución, con alimento en hojuelas, 4 veces al día, a una temperatura entre 25 y 26 °C y a un pH 7,8. Una vez acondicionados, los mismos fueron divididos en cuatro grupos; 1) Control, 2) ACR, 3) Extracto acuoso *A.dubius L*, 4) ACR+*A.dubius L*, a las concentraciones de trabajo calculadas previamente. En el caso de la ACR, particularmente 2,8 mM, dentro de un rango de concentraciones de 1 a 5 mM. Para el extracto acuoso de *A.dubius L*, muestras de hojas frescas de la planta fueron obtenidas de una población cercana a la institución, ya que es una planta que crece libremente en cualquier área de la ciudad. La muestra fue remitida al departamento de botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y fue identificada por la Dra. J. Orsini, resultando coincidir con la encontrada en Herbario Víctor Manuel Ovalles, correspondiente a las siglas MYF-29334. Para la

preparación del extracto acuoso, se partió de un peso de hojas equivalente a 10 mg/ml, concentración que consume normalmente la población en forma de infusión. Sin embargo, se procedió a considerar 3 concentraciones por encima, particularmente 12, 14 y 16 mg/ml y 3 concentraciones por debajo 4,6 y 8 mg/ml, para determinar la concentraciones letales y subletales de la misma. Previamente se demostró que no hubo letalidad para el extracto acuoso, inclusive en altas concentración y se decidió como concentración de trabajo 10 mg/ml. Los respectivos tratamientos tuvieron un tiempo de duración de 24 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento los peces, controles y tratados, fueron anestesiados por hipotermia para la posterior extracción de la sangre periférica<sup>10</sup> y realización de los respectivos extendidos sanguíneos o frotis, para su análisis. Estos fueron sometidos a la reacción de Feulgen<sup>11</sup>, técnica utilizada en histología para teñir selectivamente el DNA de las células. Esta técnica consiste en la hidrolización del DNA mediante una dilución débil de ácido clorhídrico que libera las bases púricas, quedando libres los radicales aldehídos de las pentosas, y en la coloración con leucofucsina, que pone de manifiesto los grupos aldehído. y a la Naranja de Acridina<sup>12</sup>, para la determinación de señales de muerte celular.

## Resultados

En la revisión de los extendidos sanguíneos de los distintos grupos controles y experimentales, se pudo determinar que, respecto a los controles, el grupo ACR presentó un incremento significativo,  $p < 0,05$ , en el porcentaje de neutrófilos y monocitos, así como una disminución significativa de linfocitos. Estas células, no presentaron cambios significativos con el extracto acuoso de *A.dubius L*. Igual situación fue registrada en los extendidos sanguíneos provenientes del tratamiento combinado. Particularmente respecto a los eritrocitos, la mayor población cuantificada, se determinó una reducción significativa en población eritrocitaria en la sangre periférica de peces tratados con ACR. En el tratamiento combinado la población eritrocitaria fue muy similar a los valores del control. Cabe destacar que al comparar la población eritrocitaria control (Fig.1a), con la población tratada con el extracto acuoso de *A.dubius L*, (Fig.1b), se observó una similar apariencia morfológica entre estas células. Así, se pudo describir en ambos grupos, a los eritrocitos reconocidos con facilidad por su citoplasma eosinofílico y núcleo condensado de forma ovoide y orientado de manera paralela al eje largo de la célula. No se detectaron cuerpos apoptóticos en control (Fig.1c), y escasos en el grupo *A.dubius L* (Fig.1d). Sin embargo, contrastando la población eritrocitaria proveniente del tratamiento con ACR (Fig.2a), con la proveniente de la mezcla (Fig.2b), se pudo evidenciar la marcada diferencia morfológica entre ambos grupos celulares. Así, se puso en evidencia un exacerbado desarreglo del citoplasma y del material nuclear; éste con apariencia de núcleos fragmentados (flechas). Se detectó un elevado número de cuerpos apoptóticos

en los eritrocitos tratados con ACR (Fig.2c), el cual se presentó reducido en el grupo de la mezcla ACR+extracto acuoso de *A.dubius L* (Fig.2d)

## Discusión

Como es sabido, la intensidad de una respuesta biológica es proporcional a la concentración de la sustancia en los fluidos corporales del organismo expuesto. A medida que aumenta la concentración de la sustancia, la gravedad de la respuesta tóxica aumentará hasta que a una concentración suficientemente alta la sustancia se hace letal. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que efectivamente la concentración de 10 mg/ml del extracto acuoso de *A.dubius.L*, considerada como la concentración de base consumida por la población consultada, no resultó letal en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, inclusive, a mayores concentraciones del rango ensayado, indicando así, que el uso de esta planta posee un cierto grado de confiabilidad que garantiza su consumo como posible agente terapéutico. Además, fue corroborada la acción hematotóxica de ACR, y se demostró que la concentración del extracto acuoso de hojas frescas de la planta, promueve un posible efecto protector, o acción hematoprotectora, contra esta acción hematotóxica de ACR. Dicha acción protectora, por vez primera demostrada, quedó expresada fundamentalmente a través del mantenimiento de los valores sanguíneos de la población celular hematopoyética en comparación con los valores control y por otra parte a través de la reducción de la muerte celular por apoptosis inducida por la ACR sobre la población eritrocitaria. Cabe destacar que la toxicidad de la ACR, ha sido asociada a un incremento del stress oxidativo promovido por una elevada producción de especies reactivas de oxígeno<sup>13</sup>. Como es sabido, esta situación compromete a los equivalentes reductores como NADPH, entre otros, con lo cual se podría estar comprometiendo la homeostasis del estado oxidativo y por ende la activación y desencadenamiento de la cascada de eventos celulares vinculados con la apoptosis<sup>14</sup>. Nuestros resultados no nos permiten aseverar que sea la ruta oxidativa la activada en la presente experiencia experimental, sin embargo la obtención de numerosos cuerpos apoptóticos en el tratamiento con ACR y por otra parte la reducción de dichos cuerpos en presencia del extracto acuoso de *A.dubius L*, que pone en evidencia su acción antioxidante, así lo sugieren.

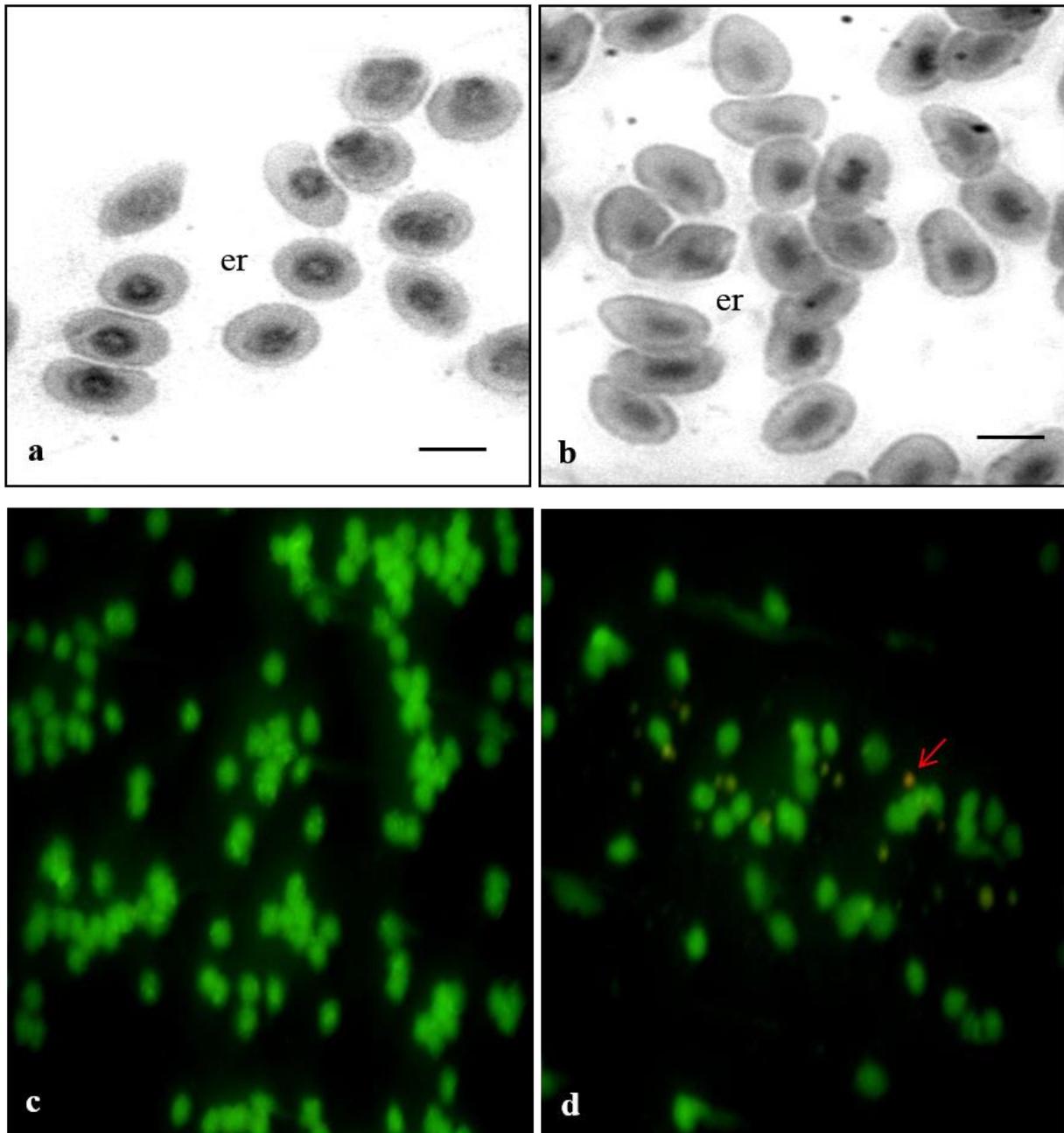


Fig.1. Población de eritrocitos (er) control (a) y tratados con *A.dubius L* (b) contrastados con el reactivo de Feulgen. Población eritrocitaria control (c) y tratada (b).Determinación de cuerpos apoptoticos con Naranja de Acridina. (flecha). Barra=10 $\mu$ m.

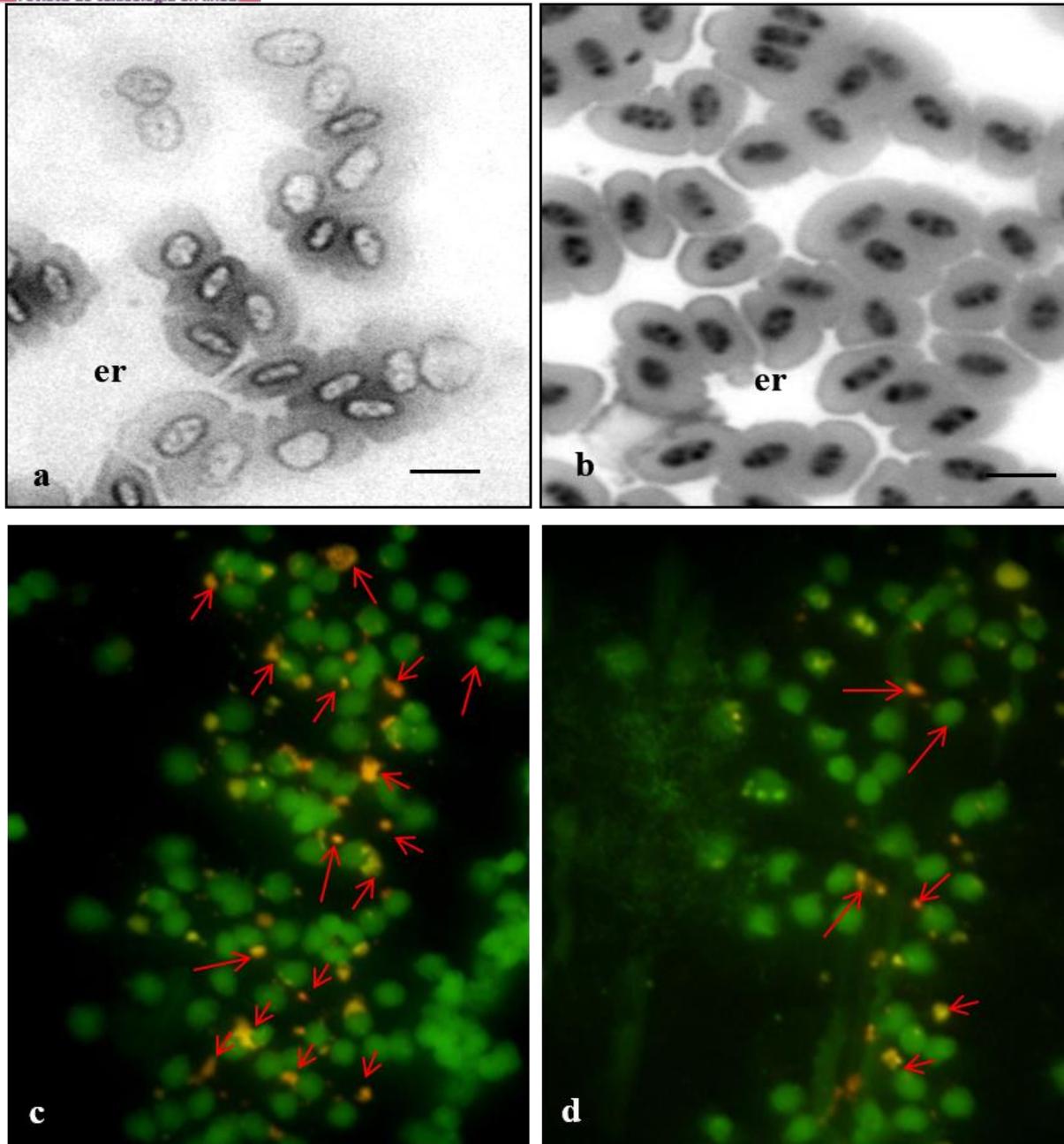


Fig.2. Población de eritrocitos (er) tratados con ACR (a) y tratados con ACR+A.dubius L (b) contrastados con el reactivo de Feulgen. Población eritrocitaria tratados ACR (c) y la mezcla (d).Determinación de cuerpos apoptoticos con Naranja de Acridina. Se destaca la presencia de cuerpos apoptoticos (flechas). Barra=10µm.

---

## Bibliografía

1. Masson L, Muñoz J. R, Romero N, Camilo C, Encina C, Hernández L, Castro J. Acrilamida en patatas fritas: Revisión actualizada. Consultado en Junio, 2016. Disponible en: [http://www.captura.uchile.cl/jspui/bitstream/2250/6054/1/Masson\\_Lilia.pdf](http://www.captura.uchile.cl/jspui/bitstream/2250/6054/1/Masson_Lilia.pdf).
2. Eltawila MM, Al-Ansari AM, Alrasheedi AA, Neamatallah AA. Dietary exposure to acrylamide from cafeteria foods in Jeddah schools and associated risk assessment. *J Sci Food Agric*. 2017 Mar 14. doi: 10.1002/jsfa.8314. [Epub ahead of print].
3. García A, Alfaro M, Pilar M. Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Rev. Sanid Milit Mex*. 2007; 61 (6).384-388.
4. Baum M, Bertow D, Fauth E, Thielen S, Zankl H, Eisenbrand G. Toxicology of acrylamide: Concentration-response relationships of acrylamide and glycidamide in human blood. *BLL*. 2005. 57-64.
5. Fennell T, Sumner S, Snyder R, Burgess J, Spicer R, Bridson W. Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans. *Toxicological Sciences* 2005; 85, 447-459.
6. Paulsson B, Larsen K, Törnqvist M. Hemoglobin adducts in the assessment of potential occupational exposure to acrylamides-three case studies. *Scand J Work Environ Health*. 2006; 32(2):154-159.
7. Montero-Quintero K, Moreno-Rojas R, Molina E, Sánchez-Urdaneta A.B. Composición química del *Amaranthus dubius*: una alternativa para la alimentación humana y animal. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2011, 20 Supl. 1: 619-627.
8. Tufts HR, Harris CS, Bukania ZN, Johns T. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Kenyan Leafy Green Vegetables, Wild Fruits, and Medicinal Plants with Potential Relevance for Kwashiorkor." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2015 (2015): 807158. PMC. Web. 8 Apr. 2017.
9. Koné WM, Koffi AG, Bomisso EL, Tra Bi FH. Ethnomedical Study and Iron Content of Some Medicinal Herbs Used in Traditional Medicine in Cote D'Ivoire for the Treatment of Anaemia. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2012; 9(1):81-87.
10. 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.
11. <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/metodo-tincion-feulgen>. Consultado el 08/04/2017.
12. 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.

**13.**Claus A, Carle R, Schieber A.Acrylamide in cereal products: A review.J. Cereal Sci.2008; 47:118-133.

**14.**Yilmaz BO, Yildizbayrak N, Aydin Y, Erkan M. Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells.Hum Exp Toxicol. 2016 Jan 1:960327116686818. doi: 10.1177/0960327116686818. [Epub ahead of print]

**Recibido: 08/04/17**

**Aceptado: 10/04/17**