

Toxicidad aguda y a dosis repetidas de Bromelina obtenida de tallos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr).

Acute toxicity at repeated doses of broealine obtained from the pineapple stems (*Pineapple comosus* (L) Merr).

Lic. Roxanna Báez Morales (1), Dra. Hilda Torres Alcalá(2), Lic. Evileidys Vázquez A (3), Ing. Martha Hernández T (4), Dr. José L. Bello G (5).

RESUMEN

La Bromelina (EC 3.4.22.32) es una enzima proteolítica aislada y purificada a partir de diferentes órganos de la piña [*Ananas comosus* (L) Merr]; tiene múltiples usos en la industria biotecnológica, alimentaria y en el campo de la medicina se destaca por su uso como antiinflamatorio, anticoagulante y antitumoral. Con el fin de evaluar las potencialidades terapéuticas de la enzima, obtenida mediante una tecnología cubana (Patente C12N 9/50) se concibió el presente trabajo, donde se presenta la evaluación toxicológica. La administración a dosis única no reveló alteraciones histopatológicas en los órganos de ningún animal, siendo la DL₅₀ de 216.35 mg/Kg, mientras que, a dosis repetidas, provocó degeneraciones hidrópicas, turbias y microhemorragias, principalmente en pulmón, corazón, riñón, bazo e hígado y no mostró citotoxicidad para leucocitos, sino que produjo un incremento de los mismos, fundamentalmente de linfocitos; la DL₅₀ fue 105.91 mg/Kg.

Palabras claves: PIÑA, BROMELINA, TOXICIDAD.

1-Profesor instructor de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. Ciego de Ávila.

2-Profesor Instructor de Histoembriología. Facultad de Ciencias Médicas. Ciego de Ávila.

3-Profesor instructor de Bioquímica. Facultad de Ciencias Médicas. Ciego de Ávila.

4-Invertigador Asistente. Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila.

5-Profesor Titular de Toxicología. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Ciudad de la Habana.

Introducción

La Bromelina (EC 3.4.22.32) es una proteasa, aislada y purificada a partir de diferentes órganos de plantas de la familia Bromeliaceae. Tiene un papel fisiológico importante, al intervenir en reacciones metabólicas y proteger a la planta del ataque de plagas y enfermedades (1, 2).

En la industria biotecnológica se utiliza en la preparación de hidrolizados proteicos y medios de cultivos, mientras en la alimentaria es apreciada como ablandador de carnes, hidrolizante de gelatinas y en la fabricación de cervezas evita la turbidez (3, 4).

En el campo de la Medicina se reconoce su uso como antidiarréico, en la formulación de vacunas contra la gripe (5) y para eliminar tejidos necrosados (6), destacándose por sus potencialidades como antiinflamatorio, anticoagulante y antitumoral (7).

En el Centro de Bioplantas de Ciego de Avila en colaboración con la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana se desarrolló un procedimiento de extracción y purificación de Bromelina, a partir de tallos de plantaciones de piña en demolición. Procesando sólo los desechos de tallos de tres caballerías de piña, se pueden contar con 1.47 toneladas del producto por caballería demolida y 4.5 toneladas por año, lo que equivale a sustituir importaciones valoradas en 130 000 USD anualmente, ya que por nuestra tecnología 66 g de proteína equivalentes a 86 856 USD, se obtienen a un costo de 0.13 USD (8).

Al no conocer las potencialidades terapéuticas de la Bromelina, obtenida mediante la tecnología cubana, se concibe el presente trabajo de evaluación toxicológica, con el objetivo de mostrar los principales efectos tóxicos que se producen al administrarla en animales de experimentación a dosis única y repetidas.

Materiales y Métodos

El material vegetal empleado para las extracciones fueron tallos de plantas adultas de piña (Ananas comosus L. Merr), variedad: Española roja en su tercera cosecha. El procedimiento aplicado fue el descrito por Chávez y colaboradores (8). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico (SIGMA)

Los ensayos toxicológicos del presente estudio llevaron un diseño experimental controlado de fase preclínica y fueron realizados según los Procedimientos Normativos de Trabajo (PNT) establecidos en los laboratorios de Oncofarmacología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

- Estudio de toxicidad.

a) A dosis única.

Antes de iniciar los experimentos, los animales se mantuvieron en un período de adaptación durante siete días, donde fueron controlados todos sus parámetros vitales, para determinar un estado de salud. El peso de los mismos osciló entre los 20 y 25 gramos. Se trabajó con animales de 7 a 8 semanas de edad. Se utilizaron ratones BDF-1, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) alimentados con pellets destinados al consumo de roedores y agua ad libitum. Estuvieron sometidos a un ciclo de luz/ oscuridad de 12 horas y la temperatura del local fue de 25° C con una humedad relativa no mayor del 60 % mientras duró la investigación.

Para el cálculo de la dosis letal media se utilizaron 7 grupos de ratones machos cada uno con 10 animales. A cinco de los referidos grupos, se le administraron por vía intraperitoneal dosis únicas y crecientes del producto liofilizado y disuelto en agua estéril para inyección, un sexto se utilizó como control del solvente, administrándosele según su peso, suero fisiológico y un último grupo escogido como control negativo no recibió ningún tratamiento. La relación volumen/peso (V/P) fue de 0.01 mL/g. El procesamiento de los datos se efectuó según el método de Litchfield I. R. y Wilcoxon F (9).

La observación clínica de los animales se produjo desde la aplicación de la enzima, cada 10 minutos durante la primera hora, registrándose en el diario de observación los síntomas y signos que aparecieron en cada animal, así como fecha y hora de la muerte y consumo de agua y alimentos hasta los 14 días que duró el experimento.

Tanto a los animales agónicos como a los sobrevivientes se les practicó observación macroscópica de los órganos, además de análisis histopatológico de corazón, pulmón, riñones e hígado. Se emplearon hematoxilina y eosina como colorantes generales y como colorante específico se utilizó sudán III.

b) A dosis repetidas.

Se procedió de igual forma que en el experimento anterior, aunque las dosis fueron aplicadas diariamente, durante un mes, por vía intraperitoneal. Se controló el comportamiento clínico, el peso y la supervivencia de los mismos. Se realizó conteo hematológico y leucograma con diferencial a los sobrevivientes 24 horas después de la última administración.

Se practicó la necropsia a todos los animales, tomándose muestras de cerebro, corazón, pulmones, riñones, hígado, estómago, intestino delgado y grueso, bazo y testículos, para análisis histopatológico. Se usó análisis de varianza simple para el procesamiento del comportamiento de los pesos de los animales y de los órganos extraídos, así como para el análisis hematológico e histopatológico.

Resultados y discusión

Como se muestra en la tabla 1, se produjo mortalidad en las dosis superiores empleadas, siendo la DL₅₀ de 216.35 mg/Kg p.v. Los fallecimientos comenzaron a sucederse tras 2 horas de haber sido inyectada la sustancia y hasta las 24 horas en la dosis mayor, no así en el resto de los grupos, donde aparecen animales muertos 8 días después de comenzado el ensayo. La etapa agónica fue similar en todos los animales, la misma se caracterizó por aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca, temblores, ataxia con caída del tren posterior, piloerección y pérdida total del interés por el agua y el alimento. A los 60 min de haber sido administrada la enzima se presentaron sobresaltos asociados al sonido con pérdida posterior de la actividad locomotora. En la dosis superior se observó un estado de inactivación total acompañado de trastornos respiratorios y convulsiones anóxicas que precedieron la muerte.

Tabla 1. Mortalidad observada con Bromelina administrada por vía intraperitoneal en ratones BDF-1 a dosis única.

Dosis (mg/kg)	Nº de animales	Muertos	%
400	10	10	100
300	10	8	80
200	10	3	30
100	10	1	10
50	10	0	-
Total	50	22	44

DL₅₀=216.35 mg/Kg. Límite superior=302.26 mg/Kg. Límite inferior =154.86 mg/Kg.

El examen macro y microscópico de los órganos no reveló alteraciones, ni en los muertos ni en los sobrevivientes. Tampoco resultó significativa la pérdida de peso de los tratados con respecto a los controles.

Una vez establecida la toxicidad aguda de la Bromelina, procedimos a evaluar su toxicidad en administraciones diarias durante 30 días. La muerte ocurrió en el 32 % de los animales incluidos en el ensayo (tabla 2). Ésta se puso de manifiesto luego de 7 administraciones en la dosis superior y en las menores apareció después de 18 días de tratamiento, siendo la DL₅₀ de 105.91 mg/Kg.

El comportamiento anormal de los animales en la dosis superior, se evidenció con disminución de la actividad locomotora, piloerección y enterramiento de los animales en la viruta. A partir de la dosis de 50 mg/Kg no se observa letalidad (1500 mg/Kg de dosis acumulativa). El peso corporal no se alteró en ninguno de los grupos sometidos al estudio

Tabla 2. Mortalidad observada con Bromelina administrada por vía intraperitoneal en ratones BDF-1 a dosis repetidas.

Dosis (mg/kg)	Nº de animales	Muertos	%
200	10	8	80
100	10	5	50
75	10	3	30
50	10	0	-
25	10	0	-
Total	50	16	32

DL₅₀=105.91 mg/Kg. Límite superior =153.3 mg/Kg. Límite inferior = 73.17 mg/Kg.

La etapa agónica fue similar en cuanto a síntomas en todas las dosis. El análisis macroscópico de los órganos no arrojó elementos de toxicidad, sin embargo, el examen histopatológico reflejó alteraciones, siendo los órganos más comprometidos los pulmones, hígado, corazón, riñones y el bazo.

Las microhemorragias fueron los hallazgos más frecuentes, se observaron lesiones degenerativas (hidrópicas y turbias) en órganos importantes como el hígado y los riñones. Es de destacar que en las dosis menores no hubo alteraciones en ninguno de los animales tratados ni en los utilizados como controles, por lo que existió una relación estrecha entre la aparición de los mismos y las dosis aplicadas de la enzima.

Diferentes investigadores han informado que el mecanismo tóxico de la enzima a niveles celulares provoca una desunión en la fosforilación oxidativa de células dianas como las cerebrales y las mitocondrias hepáticas, lo que origina una falta de ATP de manera que no existe energía suficiente para la bomba de sodio y potasio, trayendo consigo trastornos orgánicos de los cuales las degeneraciones son los primeros hallazgos (10).

Las alteraciones hemorrágicas pueden guardar relación con la actividad anticoagulante descrita para esta enzima. Oh-Ishi y colaboradores hacen referencia a ello, al encontrar que la Bromelina, produce una activación del sistema fibrinolítico en ratas, además de inhibir la síntesis de fibrinógeno en sueros de diferentes especies de animales (11).

La administración de Bromelina a los animales por vía intraperitoneal se acompañó de un aumento de la cantidad de leucocitos en las dosis mayores (tabla 3). Dicho aumento se produjo fundamentalmente en el grupo que estuvo expuesto a las dosis más altas, a expensas de los linfocitos. El resto de los parámetros estudiados se encontraron dentro de los límites aceptados para la especie, aunque se observaron diferencias significativas en la cantidad de hemoglobina entre el grupo que recibió la dosis mayor y el control no tratado.

Tabla 3. Resultados del análisis hematológico de los animales tratados con Bromelina durante 30 días.

Dosis/ Diaria (mg/kg)	Hemoglobina (g/L)	Leucocitos x10 ⁹ /L	Segmentados	Linfocitos	Eosinó Filos
200	99.5 ± 12.2*	8.80 ± 1.2*	0.28 ± 0.220	0.70 ± 0.02	0.01 ± 0.002
100	115 ± 6.20	6.38 ± 1.1*	0.29 ± 0.018	0.68 ± 0.24	0.01 ± 0.018
75	117 ± 21.6	9.70 ± 1.6*	0.25 ± 0.030	0.72 ± 0.02	0.01 ± 0.008
50	114 ± 17.3	8.26 ± 1.2*	0.18 ± 0.030	0.78 ± 0.05	0.01 ± 0.008
25	103 ± 14.5	5.66 ± 0.53	0.33 ± 0.010	0.64 ± 0.02	0.01 ± 0.006
Control negativo	116 ± 12.4	5.42 ± 0.46	0.33 ± 0.030	0.65 ± 0.04	0.01 ± 0.007

*p<0.05 con respecto al control negativo.

No sucediendo lo mismo en las subsiguientes, a pesar de que el análisis histopatológico también evidenció microhemorragias en órganos en las dosis 100 mg/Kg.

Las fig. son A,B y C respectivamente.

Figura 1. Alteraciones histopatológicas observadas durante la administración de Bromelina a dosis repetidas. A) Microhemorragia en corazón. B) Microhemorragia y degeneración hidrópica en riñón. C) Microhemorragia y degeneraciones turbia en hígado

En la tabla 4 se puede apreciar que no sólo las cantidades absolutas de linfocitos no se diferencian de los controles sino que son significativamente mayores.

Tabla 4. Variaciones del porcentaje de Polimorfonucleares en ratones tratados con Bromelina.

Dosis (mg/ Kg)	Leucocitos X 10 ⁹ /L	Segmentados	X 10 ⁹ /L	Linfocitos	X 10 ⁹ /L
200	8.80± 1.22	0.28± 0.22	2.460	0.70± 0.02	6.16
100	6.38± 1.11	0.29± 0.018	1.852	0.68± 0.24	4.33
75	9.70± 1.66	0.25± 0.03	2.425	0.72± 0.02	6.98
50	8.26± 1.28	0.18± 0.03	1.480	0.78± 0.05	6.44
25	5.66± 0.53	0.33± 0.01	1.867	0.64± 0.02	3.62
Control	5.42± 0.46	0.33± 0.03	1.788	0.65± 0.04	3.52

Conclusiones

1-En el estudio toxicológico a dosis única se produjo letalidad a partir de la dosis de 100 mg/Kg, sin embargo, no se revelaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas de los órganos en ningún animal tratado con la enzima.

2-La administración durante 30 días, arrojó alteraciones histopatológicas de tipo hemorrágicas y congestivas fundamentalmente en pulmón, corazón, riñón, bazo e hígado y una leucocitosis a predominio de linfocitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Maurer HR, Harrach T, Eckert K. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J Protein Chem*, 1995; 14(1): 41.
2. Claus EP. Enzimas y drogas que contienen enzimas. En: Claus EP. *Farmacognosia*. La Habana: Edición Revolucionaria, 1985:367-71.
3. Arreguín R. Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinases. *Biochem J*, 1994; 300:107-110.
4. Hatano K, Kojima M, Tanokura M, Takahashi K. Primary structure, sequence-specific H-NMR assignments and secondary structure in solution of bromelain inhibitor VI from pineapple Lotz WH. et al. On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose dependent effects. *Nature*, 1991; 56(3): 249-53.
5. Batkin S, Taussig SJ, Szekerezes R. Modulation of pulmonary metastases (Lewis lung carcinoma) by bromelain an extrac of the pineapple stem (*Ananas comosus*). *Cancer Investig*. 1998; 241-42.
6. Vellini M, inventors; European Patent Office, assignee. Substance with antiinflammatory and platelet antiaggregation activity extracted from plants of the family bromeliaceae or derived from bromelain and its extraction procedure. 0089532 A3.1983 Oct 11.
7. Chávez MA, Hernández M, Marquez M, Rodríguez G, Santos R, González J, Carvajal C, inventores; asignada por Oficina cubana de patente industrial. Proceso de obtención de Bromelina a partir de tallos de piña. Patente cubana. C 12N 9/50. 1997 Dic 23.
8. Lichfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose- effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, 1949; 96:99-115.
9. Van Lier RL, Cherry SD. The toxicity and mechanism of action of bromethalin: A new single-feeding rodenticide. *Fund Appl toxicol*, 1988; 11:664-72.
10. Oh-ishi S, Tsuji N, Hayashi I. Experimental approach to a role of the increased T- Kininogen level in carragenin induced pleurisy of rats. *Jpn J Pharmacol*, 1989; 50(1): 11-18.