

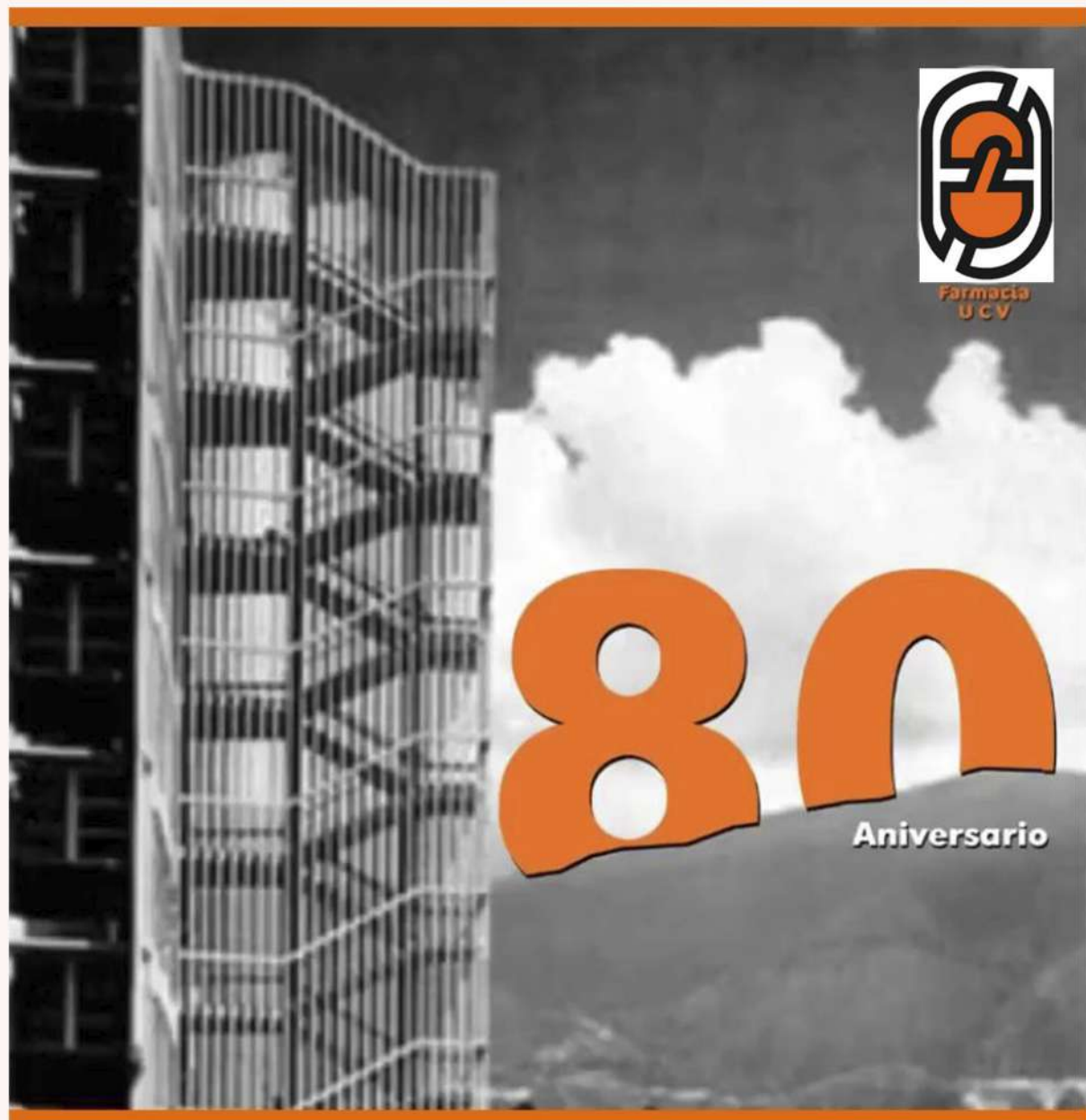
REVISTA FACULTAD DE
FARMACIA

Volumen 84

N^{os} 1 y 2

2021

ISSN: 0041-8307



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 84- Nos 1 y 2 - 2021 - ISSN: 0041-8307
Depósito legal: 195902 DF 224
Caracas/Venezuela
Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

Universidad Central de Venezuela

Rectora

Dra. Cecilia García-Arocha

Vicerrector Académico

Dr. Nicolás Bianco

Vicerrector Administrativo

Dr. Amalio Belmonte (E)

Secretario

Dr. Amalio Belmonte

Facultad de Farmacia

Decana

Dra. Margarita Salazar-Bookaman

Directora

Dra. Enriqueta Rodríguez

Coordinadora Académica

Dra. Beth Díaz

Director del Instituto de Investigaciones

Dra. Isabel Andueza

Directora de Postgrado

Dra. Esdrás Arismendi

Revista Facultad de Farmacia

Editora

Dra. Anita Stern Israel

Editora Asociada

Dra. Giovannina Orsini

Comité Editorial

Dra. María Margarita Salazar-Bookaman

Dra. Alírica Suárez

Dr. Jaime Charris

Dra. Isabel Andueza

Dr. David De Souza

Dra. Miriam Regnault

Diagramación y montaje en línea

Yraiceles Jiménez (yrajimenez@gmail.com)

Dirección

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109
Caracas 1040-A - Venezuela

Portada: Conmemoración de los 80 Años de la reinstalación
de la Facultad de Farmacia de la UCV.

Diseño de la portada: Lic. Marijul Narvaez

Contenido

Editorial	2
MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN	
Aspectos funcionales de las L-aminoácido oxidasas (L-AAOS) de venenos de serpientes en accidentes ofídicos: una mini-revisión	8
ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA	
Importancia de la respuesta inmune celular adaptativa en la infección por SARS-CoV-2	17
JUAN BAUTISTA DE SANCTIS, ALEXIS GARCÍA, DOLORES MORENO	
Chemical Constituents of Two Ecuadorian Medicinal Plants <i>Tagetes terniflora</i> Kunth and <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	30
ALÍRICA I. SUÁREZ, VLADIMIR MOROCHO, VLADIMIR LUNA, KATTY CASTILLO, CHABACO ARMIJOS	
Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la activación de las ERK 1/2 renal de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina	41
CARLOS CIANGHEROTTI, MARIELLA PASTORELLO, GIOVANNINA ORSINI, LOURDES PERDOMO, MARCO ÁLVAREZ Y ANITA ISRAEL	
Efecto del resveratrol sobre el factor de crecimiento transformante β sérico en la aterosclerosis	55
JESSIKA JIMÉNEZ, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ, LETICIA FIGUEIRA	
Educación en Odontología: Del Paleolítico a la Pandemia por Coronavirus	69
MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN	
Psicosis puerperal: Una patología olvidada	77
MILAGROS ROJAS, MARVIN CHÁVEZ-CASTILLO, PAOLA RAMÍREZ, VÍCTOR LAMEDA, ANA VALERIA CASTRO, WHEELER TORRES, VALMORE BERMÚDEZ, JOSELYN ROJAS-QUINTERO	
Actividad de las enzimas antioxidantes en la enfermedad periodontal en ratas espontáneamente hipertensas. Efecto del valsartán	96
MARÍA GABRIELA MATOS, LETICIA FIGUEIRA, LOURDES PERDOMO, MARCO ÁLVAREZ, ANITA ISRAEL, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO	
Notas de los efectos sinérgicos presentes entre varias toxinas de venenos de serpientes y sus posibles mecanismos de interrelación	115
ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA	
Analysis of the acid and neutral fractions present in <i>Carramboa tachirensis</i> (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) by Gas Chromatography-Mass Spectrometry	126
YSBELIA M. OBREGÓN, LUIS B. ROJAS, ROSA L APARICIO, ALFREDO USUBILLAGA	
Efecto de la temperatura y humedad sobre algunas propiedades fisicoquímicas de formulaciones tópicas con nanopartículas de plata y zinc	134
ISABEL ANDUEZA, KARLA CALO, MARÍA RODRÍGUEZ, JIMMY CASTILLO	
Normas de publicación	143



Esta Revista se publica bajo el auspicio del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Universidad Central de Venezuela.



EDITORIAL

MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN

“La historia cuenta lo que sucedió; la poesía lo que debía suceder”

Aristóteles

“La historia es el progreso de la conciencia de la libertad”

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

Un poco de historia.....

La Universidad Central de Venezuela está de plácemes. Se cumplen 80 años de la Reinstalación de la Facultad de Farmacia y 300 años de la creación de la Universidad de Caracas, Universidad Central de Venezuela, de manos del Libertador Simón Bolívar.

¡Honor a quien honor merece! Cuando la historia juzgue a la Universidad Central de Venezuela, ella saldrá cubierta con la corona inmarcesible de la gloria porque ella es calidad, pureza, pluralidad y, por siempre, será autónoma.

Rindámosle homenaje recordando la trayectoria de su vida hasta hoy.

La Universidad Central de Venezuela tiene como misión crear y difundir el conocimiento mediante la docencia y la investigación, y formar los jóvenes profesionales requeridos para el desarrollo del país.

El nacimiento mismo de la Universidad de Caracas, el 22 de diciembre de 1721, representó uno de los acontecimientos de mayor importancia de todo el periodo colonial venezolano, comprendido entre

los siglos XVI y principios del XIX. Se trataba de un proceso que significaba que la sociedad venezolana era suficientemente madura como para aspirar y obtener del Rey Felipe V la aprobación de pasar el Colegio Seminario de Santa Rosa de Lima al estatus de Real Universidad de Caracas (luego Pontificia por Bula del Papa Inocencio XIII, de 1722).

El conflicto independentista ocurrido de 1810 a 1821, comprometió a la Universidad de Caracas como cabeza de un proceso civil que se desarrolló principalmente como un movimiento reivindicador de la soberanía venezolana.

Entre 1725 y 1821 la Universidad de Caracas, hoy Universidad Central de Venezuela, graduó 2756 de sus estudiantes, Bachilleres, Licenciados, Maestros y Doctores, conformándose un grupo profesional que permitió construir el proceso de la independencia y las instituciones republicanas. Desde Andrés Bello y Francisco de Miranda, hasta Juan Germán Roscio y José María Vargas, están muchos próceres que estudiaron en esta Universidad.

Una vez consolidada la independencia de Venezuela en 1821 con la Batalla de Carabobo y separada en 1830 del proyecto de la Gran Colombia, la Universidad Central de Venezuela comienza a adaptarse al modo de vida republicano, iniciado formalmente con la aprobación de los nuevos Estatutos Republicanos de 1827, elaborados por el Claustro y por el Poder Ejecutivo Nacional asumido por Simón Bolívar. Los nuevos Estatutos no permitían la discriminación social y racial en el ingreso a los estudios y la docencia universitaria; igualmente, y por iniciativa del Libertador, la Universidad de Caracas recibió bienes inmuebles, entre ellos las mejores haciendas de cacao del país, que le permitieron disponer de rentas suficientes para su funcionamiento y desarrollo. Este ambiente de progreso universitario no se correspondió con el contexto político nacional en el que no había un clima de libertad ni de democracia. Efectivamente, entre 1870 y 1898 se iniciaba el régimen del Gral. Antonio Guzmán Blanco y seguía el del Gral. Joaquín Crespo, con lo que se estableció un clima tiránico. La Universidad fue despojada de su autonomía y del patrimonio que le había sido concedido.

Los daños causados a la Universidad fueron débilmente compensados por algunas remodelaciones en las edificaciones y escasos recursos presupuestarios. La Universidad respondió con una protesta cívica estudiantil. A principios del siglo XX, con la Revolución Liberal Restauradora de 1899 el poder fue tomado por caudillos tiránicos como los Generales Cipriano Castro y Juan Vicente Gómez. Se clausuró la UCV; las consecuencias fueron cárcel o exilio y la tortura o muerte de aquellos que se oponían a estos regímenes. Esto duró hasta 1935.

Entre 1945 y 1958 hubo avances y retrocesos políticos, pero la dinámica universitaria continuó en todo el ámbito

nacional con representación Ucevista en todas las áreas. El sistema universitario venezolano y principalmente la UCV, cuentan con la historia y el conocimiento acumulados por tres siglos que le permiten aportar soluciones a los problemas nacionales, tanto políticos como para las ingentes amenazas que tenemos en el campo energético, ambiental, alimentario, de salud y vivienda, y de seguridad.

El año 1958 marca un hito importante en la historia de la Universidad Central de Venezuela. Con un civil en la Presidencia de la República, el Doctor Edgar Sanabria, se promulga una Ley de Universidades que permitía a estas instituciones el desarrollo de sus planes académicos, de investigación, extensión y formación de recursos humanos de alto nivel. Se crea el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, el cual ha apoyado la investigación universitaria en todas las áreas. La creación de la Facultad de Ciencias constituye un polo importante en el desarrollo de las Ciencias Básicas con las carreras de Biología, Química, Física, Matemática, Geoquímica y, por supuesto, el desarrollo de los estudios de Computación. En 1970 se aprobó una nueva Ley de Universidades la cual sigue vigente e incluye cambios importantes en las características del funcionamiento de las Universidades, en cuanto a elecciones de autoridades y las pautas para el funcionamiento de la institución.

En el año 2000 ocurre un hecho muy importante para Venezuela y es que la UNESCO reconoce a la Ciudad Universitaria de Caracas como Patrimonio Mundial, Cultural y Natural de la Humanidad, tomando como elementos para ello que **“...la Ciudad Universitaria es una obra maestra de planificación urbanística, de arquitectura y de arte, así como un ejemplo destacado de realización coherente de los ideales artísticos,**

arquitectónicos y urbanísticos de principios del siglo veinte..."

El mantenimiento del patrimonio de la Ciudad Universitaria es parte del compromiso nacional.

Podemos señalar que el principal aporte de la UCV al desarrollo del país radica en los **360.000 egresados de pregrado y postgrado** que han salido del Aula Magna entre 1936 y 2021, cifra asombrosa si la comparamos con los apenas 23.000 que se graduaron en los dos siglos anteriores. Las reformas universitarias que se iniciaron desde 1937 apuntaban hacia la recuperación de la autonomía universitaria, el ceremonial universitario y la modernización científica de los estudios en un ámbito estructural pensado en el contexto material de una Ciudad Universitaria, idea desarrollada excelentemente por el Arquitecto Carlos Raúl Villanueva.

La Universidad Central de Venezuela ha avanzado muchísimo en el campo del conocimiento, sobre todo con el desarrollo de los postgrados de Especialización, Maestría y Doctorado creados y desarrollados en todas las Facultades destacándose por el número de especialidades de la Facultad de Medicina para la prevención, diagnóstico y curación de las enfermedades que afectan a la población.

También ha avanzado la Universidad con el programa de atención médica a través de la telemedicina. Igual podemos decir de las otras Facultades de la Salud, Farmacia y Odontología, como de las Facultades del área humanística y económica. En las carreras de Farmacia y Odontología destaca la formación a los estudiantes de pregrado y postgrado, pero es importante mencionar el servicio que prestan a la comunidad universitaria

y del Distrito Capital con la atención odontológica a todas las personas que allí acudan en busca de sus servicios. En la Facultad de Farmacia se forman los estudiantes en el área de pregrado con 7 opciones relacionadas con medicamentos, alimentos y cosméticos, todos involucrados con la salud y el bienestar de las personas. En el área de postgrado, estas mismas áreas están dirigidas a la formación, no solamente de profesionales Farmacéuticos, sino también egresados de otras disciplinas dentro del área de la salud.

En el área económica y humanística encontramos los estudios de Educación, Psicología, Idiomas Modernos, Geografía e Historia, Economía, Administración y Contaduría, Sociología, Estudios Internacionales, entre otras áreas que convergen en el desarrollo nacional. Es innegable que el manejo de las áreas educativa y económica son vitales para el desarrollo del país. También es muy importante el avance del Cuarto Nivel de educación en el área tecnológica, en el área de Ingeniería, Arquitectura, Ciencias con el desarrollo en el área de Computación.

En los últimos años la Universidad Central de Venezuela ha venido avanzando en el área tecnológica para la adaptación de la educación a los tiempos modernos con la educación a distancia, situación que ha logrado un impulso por la situación de pandemia que se vive a nivel mundial y, por supuesto, el país no escapa a esta situación recurriéndose a la educación virtual como elemento fundamental para la enseñanza aunque el aprendizaje de tipo práctico no puede ser completamente satisfecho mediante la tecnología. A partir de septiembre del año 2020 la Universidad cuenta con un Campus Virtual adaptado a la modernidad, el cual permite la enseñanza a través de las aulas virtuales y

la realización de las evaluaciones requeridas en las diferentes Facultades, entre otras actividades.

La Universidad Central de Venezuela actualmente sigue en la lucha por su autonomía, entendida como el derecho de procurarse sus propias reglas, su propio gobierno y sus propios fines, y con el deber de orientar estos fines a las necesidades fundamentales de la sociedad venezolana y, porque no, de otros países de la región, garantizando así la pertinencia en la creación, difusión y gestión del conocimiento.

La Universidad tiene una población de unas 60.000 personas entre profesores, estudiantes de pre- y postgrado, personal administrativo y obreros. Tiene varias sedes: la Ciudad Universitaria, y otras sedes adicionales en Caracas y otros estados del país. La UCV tiene un impacto importante tanto en la ciudad de Caracas como a nivel nacional. Los estudiantes de pregrado proceden de todo el país. En cuanto al postgrado, particularmente la Facultad de Medicina, tiene impacto a nivel nacional por las características del ejercicio profesional de sus estudiantes y egresados, pero también la calidad y variedad de los programas de postgrado atraen aspirantes extranjeros que vienen a adquirir su formación en nuestra Universidad. Para tener idea del impacto de la formación de profesionales tomemos en consideración que la UCV tiene 11 facultades, 46 escuelas que corresponden a carreras en el ámbito del pregrado. En el postgrado encontramos que se dictan 45 Doctorados, 110 Maestrías y 217 Especializaciones, de las cuales 136 corresponden a programas de Postgrado asociados a la Facultad de Medicina. También, se están desarrollando programas de educación a distancia en muchas áreas, lo cual aumenta la influencia de la institución nacional e internacionalmente.

Otra área de impacto se refiere a los servicios que presta la institución a la comunidad, el Instituto de Inmunología es un instituto de referencia para las personas que sufren de artritis reumatoide. También es muy importante el Hospital Universitario de Caracas con todos sus servicios clínicos y la docencia de pre- y postgrado de la Facultad de Medicina.

Por sus programas de estudio, de investigación, de extensión, culturales, deportivos, entre otros, la Universidad Central de Venezuela se ha convertido en una de las instituciones de mayor impacto a nivel nacional. También, su participación en los rankings académicos coloca a la UCV entre las primeras Universidades de América Latina.

LA FACULTAD DE FARMACIA A LOS 80 AÑOS DE SU REINSTALACIÓN

Los estudios de Farmacia tienen como base el Protomedicato, institución creada por el Imperio Español el 14 de mayo de 1777. En ese momento se menciona la visita a Boticas y cómo se les confería licencia a los practicantes después de un examen de conocimientos. En el año 1827 el Protomedicato es sustituido por la Facultad Médica, creada por el Libertador Simón Bolívar. Llega el Dr. José María Vargas, primer Rector de la Universidad Central de Venezuela.

Esta Facultad revalidaba y otorgaba Títulos a los Boticarios extranjeros, visitaba e inspeccionaba las Boticas y vigilaba todos los aspectos de la práctica farmacéutica. También reconocía a los farmacéuticos que habían obtenido su grado en Europa, no así a los Nacionales. En su plan de estudios aparece la asignatura "Materia Médica y Farmacia". El 1° de julio de 1874, la Universidad Central de Venezuela

inició un programa sobre Historia Natural obligatorio para los aspirantes a ejercer la farmacia. Tal curso se podría considerar como el primer plan de estudios, el cual tenía una duración de tres años.

La Facultad Médica es sustituida por el Consejo de Médicos en el año 1883. No se mencionan los estudios de Farmacia. En el año 1883 se produce un decreto donde se cita por primera vez la asignatura "Legal y Toxicología", la cual se enseñaba en los estudios de Medicina. Hasta finales del siglo XIX no existió en Venezuela enseñanza universitaria de la Farmacia. Con fecha 30 de junio de 1894 (Primera Ley de Farmacia) se crearon las Facultades de Farmacia "dependientes de las de Medicina" y se confiere el Título de Doctor en Farmacia. El plan de estudios constaba de 9 materias y los estudiantes se graduaban en cuatro años.

El 17 de diciembre de 1894, se instala la Facultad de Farmacia en la Universidad Central de Venezuela, siendo su primer Presidente el Farmacéutico Dr. Víctor Ramón Feo. En el año 1904, y de acuerdo con el Código de Instrucción Pública, queda solamente una escuela de Farmacia dependiente de la Facultad de Medicina, y ésta concede el Título de Farmacéutico.

En 1941, el Congreso Nacional eleva de nuevo las Escuelas de Farmacia al rango de Facultades y autoriza a la Escuela a otorgar el Título de Doctor, fecha importante donde se logra la reinstalación de la Facultad. Para obtener el título de Farmacéutico se requerían 4 años y 5 años para obtener el de Doctor en Farmacia. El primer Decano fue el Dr. Félix Lairé. **En conmemoración de este importante hecho estamos celebrando este año los 80 años de la Reinstalación de la Facultad de Farmacia.**

En el año 1946, bajo el Decanato del Dr.

Jesús María Bianco, se crea la Escuela de Química y la Facultad pasó a ser de Farmacia y Química con dos Escuelas, la de Química y la de Farmacia. En el año 1953, la Ley de Universidades incluye entre las Facultades Universitarias a la Facultad de Farmacia, en lugar de Facultad de Farmacia y Química.

En 1960 se establecen las Menciones, de las cuales debe seleccionarse una para cursarla como obligatoria a los fines de la obtención del título de Farmacéutico en la Mención respectiva. Hoy existen siete menciones, a saber: Técnica Industrial Farmacéutica, Tecnología Cosmética, Control de Calidad de los Medicamentos, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Sanitario-Asistencial, Microbiología Aplicada y Toxicología e Higiene Industriales. Desde el año 2000, el pensum de los estudios de Farmacia ha incorporado todo lo referente a la Atención Farmacéutica, tal y como se desarrolla en otros países, destacándose la participación del Farmacéutico en el área de medicamentos e incorporándose a los servicios de salud.

Es importante mencionar los avances de la Facultad en el área de postgrado. Actualmente, en la Facultad de Farmacia se dictan los siguientes postgrados: **Farmacología** (Maestría y Doctorado), **Química de Medicamentos** (Maestría y Doctorado), **Ciencias Farmacéuticas** (Doctorado), **Toxicología** (Maestría), y **Aseguramiento de la Calidad, Ciencia y Tecnología Cosmética, Farmacia Comunitaria, Farmacia Hospitalaria, Gerencia Estratégica de Negocios para la Industria Farmoquímica, Alimentaria y Cosmética, y Mercadeo** (Especialización).

Actualmente se está culminando el presente período lectivo cuya programación fue alterada por la pandemia. Sin embargo, se logró la entrega de títulos a 37 nuevos farmacéuticos, 7 nuevos Especialistas y

una Doctora en Química de Medicamentos. Para el nuevo período lectivo, hay unos 350 aspirantes para el Primer Año de la carrera (en dos grupos) y probablemente unos 40 estudiantes de Quinto Año se graduarán en el próximo Acto de Grado. En estos momentos hay 121 estudiantes de postgrado.

Uno de los logros de la Facultad de Farmacia en los años recientes y, más aun, como una consecuencia positiva de la pandemia, es la incorporación de la Facultad a la tecnología de la información. El proceso enseñanza-aprendizaje está haciendo uso de la tecnología de la información lo cual constituye un avance importante para la institución. El Campus Virtual de la UCV abre un abanico de oportunidades para estos avances.

En el área de investigación se destaca el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, creado en 1980, el cual es una organización relevante para la producción de conocimiento y el avance científico y tecnológico, orientado al área de la salud. Esto es de importancia para el fortalecimiento del desarrollo social y para el establecimiento de políticas que contribuyan al desarrollo de la investigación y la formación de recursos humanos de alta calidad. La actividad del Instituto se fortalece a través de la vinculación con el sector productivo farmacéutico y con otras instituciones por medio de proyectos viables.

Los servicios de Extensión de la Facultad de Farmacia se cumplen a través de cursos y diplomados en el área profesional farmacéutica, el Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), el Servicio de Fórmulas Magistrales "Dr. Ramón Scovino Vargas" y la empresa Biotecfar S.A., empresa de la Fundación Universidad Central de Venezuela, creada

por la Facultad de Farmacia hace 40 años, para la fabricación e investigación de los sueros antiofídicos, incorporándose posteriormente la fabricación e investigación del suero antiescorpiónico. Esta empresa funciona en el edificio de la Facultad de Farmacia. Los sueros son distribuidos a nivel nacional a través de los Ministerios del Poder Popular para la Salud y de Defensa, y la propia empresa, sobre todo para situaciones de emergencia. El suero antiescorpiónico también se distribuye a nivel internacional. Debemos destacar el Herbario "Víctor Manuel Ovalles" un museo de muestras botánicas y plantas medicinales, disponibles para estudio por personal especializado; posee una unidad de documentación bibliográfica que está al servicio de las universidades y público en general.

La Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, en la conmemoración del **octogésimo aniversario de su reinstalación** aspira a seguir contribuyendo con la formación de profesionales de la salud tan importantes como son los farmacéuticos, tanto a nivel de pregrado como de postgrado, con la investigación de medicamentos tanto de origen natural como de síntesis orgánica, investigación de los tóxicos, el control de calidad de los medicamentos, alimentos y cosméticos, el servicio de análisis y asesoramiento toxicológico, y los servicios sanitario-asistenciales a la comunidad.

Recibido: 14/08/2021
Aceptado: 18/08/2021

Aspectos funcionales de las L-aminoácido oxidasas (L-AAOS) de venenos de serpientes en accidentes ofídicos: una mini-revisión

Functional aspects of L-amino acid oxidases (L-AAOs) from snake venoms in ophidic accidents: a mini-review

ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA^{1,2}

Resumen

Las L-aminoácido oxidasas son enzimas ampliamente distribuidas en diversos filos como bacterias, hongos, plantas, mamíferos y muchas serpientes venenosas, y de diferentes especies no venenosas, en estas últimas, no solo en la glándula del veneno, sino que también exhibe la actividad de las L-AAOs, en diferentes órganos, tales como pulmón, hígado, riñón y eritrocitos. Las L-AAOs que se encuentran en los venenos de serpientes son más activas que las producidas en muchos microorganismos. Las L-AAOs tienen intensa actividad sobre el sistema hemostático de los mamíferos. Los SV-LAAOs (de venenos de serpientes) exhiben diversas actividades, como hemorragia, agregación plaquetaria, edema, apoptosis, acción antitumoral; además se han descrito actividades microbicidas y anti-VIH. En esta revisión queremos llamar la atención acerca de este importante sistema enzimático presente en muchos venenos de serpientes de las familias Viperidae y Colubridae.

Palabras clave: L-amino oxidasas, toxinas naturales, accidente ofídico, veneno de serpiente.

Abstract

L-amino acid oxidases are enzymes widely distributed in various phyla such as bacteria, fungi, plants, mammals, and many venomous and non-venomous snakes of different species, in the latter, not only in the venom gland but also exhibiting the activity of L-AAOs, in different organs, such as lung, liver, kidney, and erythrocytes. The L-AAOs found in snake venoms are more active than those produced in many microorganisms. The L-AAOs have intense activity on the haemostatic system of mammals. The SV-LAAO exhibit diverse activities, such as haemorrhages, platelet aggregation, oedema, apoptosis, anti-tumor activity; also, have been described microbial and anti-VIH activities. In this review, we want to draw attention to this important enzyme system present in many venoms of snakes of the Viperidae and Colubridae families.

Keywords: L-amino oxidases, natural toxins, ophidic accident, snake venom.

1. Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico "Dr. José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela.
2. Biotecfar C.A., Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, República Bolivariana de Venezuela. Correspondencia: rodriguezacosta1946@yahoo.es. ORCID: [0000-0003-1234-7522](https://orcid.org/0000-0003-1234-7522)

Introducción

Las serpientes usan su veneno para capturar y digerir a sus presas, además como mecanismo de defensa contra sus depredadores. A medida que el veneno, una vez inyectado por su sistema dental en el cuerpo de la presa, éste invade todos los aspectos de su fisiología y los componentes del veneno comienzan a descomponer las matrices extracelulares (es decir, colágeno, fibronectina, vitronectina, entre otros) que protegen a las células; algunos componentes se unen a los receptores celulares causando cambios fisiopatológicos que resultan en dolor, inflamación, necrosis, alteraciones neurológicas, trastornos de la hemostasia, con otras consecuencias. Muchos componentes hacen la sangre incoagulable, mientras otros causan trombosis, que pueden provocar la muerte. Hay otros componentes que simplemente causan parálisis temporales, que le dan a la serpiente el tiempo suficiente, para tragar la presa entera sin luchar. Hay aproximadamente 375 especies venenosas entre las aproximadamente 2.900 especies de serpientes en el mundo (Rengifo y Rodríguez-Acosta, 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) determina que los accidentes ofídicos son un problema de Salud Colectiva en diversos países tropicales y subtropicales. Cada año se producen 5,4 millones de mordeduras de serpiente, que originan entre 1,8 y 2,7 millones de casos de envenenamientos, con aproximadamente 125.880 fallecimientos, y alrededor del triple de amputaciones y otras discapacidades persistentes. La mayoría de los casos se producen en África, Asia y Latinoamérica. La OMS, incluyó el envenenamiento por serpientes, entre las enfermedades tropicales desatendidas más prioritarias (WHO, 1981).

Venezuela epidemiológicamente está entre los primeros seis países con mayor número per capita de accidentes ofídicos al año, a pesar de existir un sub-registro de acuerdo a los datos de la División de Epidemiología del Ministerio del Poder Popular para la Salud. En los últimos diez años hubo un promedio anual entre 4.000 a 8.000 casos de mordedura de serpientes, con una mayor incidencia en los trimestres de febrero-abril y junio-agosto y una mortalidad del 2% (Rengifo y Rodríguez-Acosta, 2019), siendo su tasa de mortalidad de 12/año, y muchas otras sufren daño permanente que conduce a una discapacidad física (Williams y col., 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que el envenenamiento por serpientes es una enfermedad desatendida que necesita más evaluación (WHO, 1981). Actualmente, el único tratamiento de los pacientes envenenados es el uso de anti-venenos, que consiste en anticuerpos producidos en animales inmunizados, principalmente caballos, ovejas y aves, que se han inyectado con dosis sub-letales de veneno.

Desarrollo

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS L-AMINOÁCIDO OXIDASAS (L-AAOS) PRESENTES EN LOS VENENOS DE SERPIENTES

La L-aminoácido oxidasa fue hallada y reportada por primera vez por Zeller y col. (1946) en Viperidae. Krebs en 1933 (Krebs, 1981) había previamente observado su actividad, en tejidos de hígado de mamíferos. Blanchard y col. (1945) fueron los primeros en aislar las L-AAOs de un riñón de rata. Estas enzimas son ampliamente distribuidas en diversos filos como bacterias, hongos, plantas, mamíferos y muchas serpientes venenosas,

y de diferentes especies no venenosas (Zeller y col., 1946), en estas últimas, no solo en la glándula del veneno, sino que también exhibe la actividad de las L-AAOs, en diferentes órganos, tales como pulmón, hígado, riñón y eritrocitos. Las L-AAOs que se encuentran en los venenos de serpientes son más activas que las producidas en muchos microorganismos (Sarkar y Devi, 1968). Las L-AAOs de microorganismos y especies vegetales están involucrados en la utilización de fuentes de nitrógeno. Por ejemplo, *Neurospora crassa* usa amonio, glutamina y glutamato en todos los ciclos diarios, pero bajo condiciones de carencia de nutrientes, utiliza los péptidos almacenados bajo la acción de las L-AAOs (Xiao y Marzluf, 1993). Esta a su vez es regulada por NIT2, una proteína de unión al ADN (miembro de la familia de las nitrilasas) (Xiao y Marzluf, 1993; Calderón y col., 1997).

Las L-AAOs son homodímeros que tienen un peso entre ~120 a 150kDa, con sub-unidades monoméricas que varían de ~50 a 60 kDa y su pI es de 4,4 a 8,12 (Souza y col., 1999; Du y Clemetson, 2002; Bregge-Silva y col., 2012). Están unidos a los cofactores FAD (Flavina Adenina Dinucleótido) o FMN (Flavina Mononucleótido) (Figura 1), originando un pigmento llamado riboflavina, que les da el color amarillo a algunos venenos. Sin embargo, hay una variación de color en el veneno para algunas especies como *Crotalus viridis helleri* (Johnson y col., 1987).

En el mecanismo de las L-AAOs, el FAD reacciona con los L-aminoácidos y los oxida de aminoácidos a iminoácidos y luego los hidroliza a α -cetoácidos y amoníaco. Toda la reacción es una desaminación oxidativa; liberando amoníaco como producto final,

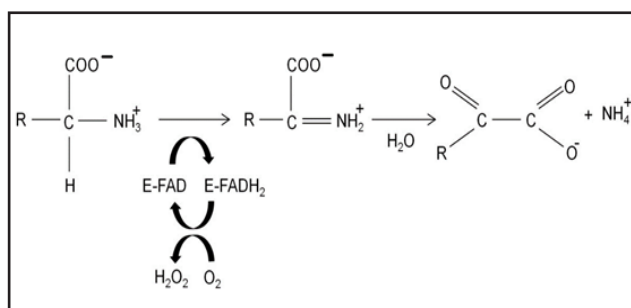


Figura 1. Mecanismo de reacción de la enzima L-aminoácido oxidasa. Son enzimas que catalizan una reacción de oxidación/reducción utilizando oxígeno molecular (O_2) a modo de aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las oxidasas son una subclase de las oxidoreductasas. En el ejemplo, el flavín adenín dinucleótido (FAD) reacciona con los L-aminoácidos y los oxida a iminoácidos, los cuales luego hidrolizan a α -cetoácido y amoníaco. Se produce otra semi-reacción para generar el FAD para prolongar el ciclo, oxidando el $FADH_2$ a FAD, que da peróxido de hidrógeno como residuo intermedio.

que se transporta hacia el ciclo de la urea. También ocurre otra semi-reacción para generar el FAD y prolongar el ciclo oxidando el $FADH_2$ a FAD, que da peróxido de hidrógeno como residuo intermedio (Figuras 1 y 2). El estrés oxidativo del H_2O_2 da como resultado la producción de efectos enzimáticos que contribuyen a la toxicidad del veneno (Li y col., 2008; Guo y col., 2012; Costa y col., 2014).

Los venenos de varias especies de serpientes son particularmente fuentes ricas de SV-L-AAOs (Snake Venom-L-AAOs) (Figura 3), por ejemplo, en *C. rhodostoma* constituye el 30% del contenido proteico del veneno (Ponnudurai y col., 1994).

Durante la década de los 90, se hicieron diversos estudios sobre las actividades fisicoquímicas y enzimáticas de las SV-LAAOs (Massey y Curti, 1967) incluyendo su inactivación por cambios de pH (Porter y Bright, 1980) o congelación (Curti y col.,

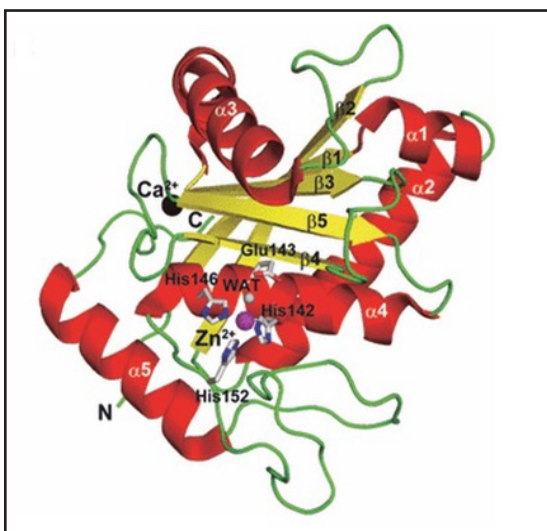


Figura 2. La estructura de la L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente (A) Una representación con cintas que muestran los tres dominios de la estructura: el color rojo representa el dominio de unión del flavín adenín dinucleótido (FAD), el amarillo representa el dominio de unión del sustrato y el verde representa el dominio helicoidal (Kang y col., 2011)

1968; Coles y col., 1977). Mientras que estudios más recientes, se refieren a sus efectos farmacológicos y biológicos.

Los SV-LAAOs exhiben diversas actividades, como hemorragia, agregación plaquetaria, edema, apoptosis, acción antitumoral; además se han descrito actividades microbicidas y anti-VIH (Du y Clemetson, 2002; Guo y col., 2012).

Pawelek y col. (2000) describieron la estructura cristalográfica de rayos X de SV-L-AAOs, del veneno de *C. rhodostoma*, demostrando que las SV-LAAOs son funcionalmente un dímero; cada subunidad consta de tres dominios: un dominio de unión a sustrato, un dominio de unión a FAD y un dominio helicoidal. La estructura de L-AAO muestra cierta similitud con la DAAO porcina (D-aminoácido oxidasa), sin embargo, la entrada de sustrato en los dominios varía.

El FMN resultó ser el cofactor de L-AAOs en el veneno de *C. rhodostoma* (Ponnudurai y col., 1994) detectado a partir de su estructura cristalina. Las proteínas de unión a FAD están presentes en los venenos de las serpientes

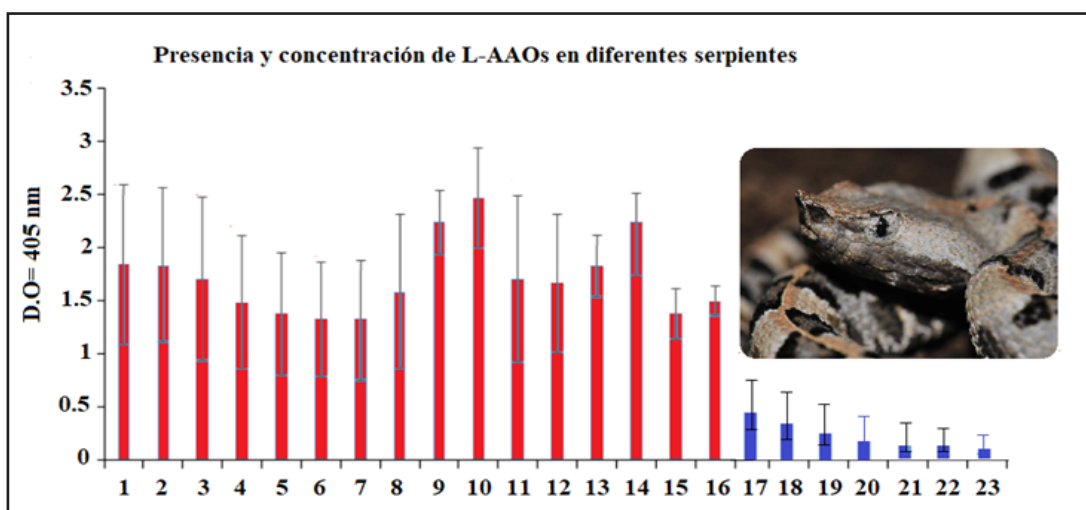


Figura 3. Se presenta la amplia distribución intraespecie e interespecie y concentración de L-AAOs en serpientes del continente americano y Venezuela. (1) *Crotalus scutulatus scutulatus*¹ (2) *C.s.scutulatus*² (3) *C.s.scutulatus*³ (4) *C.s.scutulatus*⁴ (5) *C.s.scutulatus*⁵ (6) *C.s.scutulatus*⁶ (7) *C.s.scutulatus*⁷ (8) *Crotalus adamanteus*¹ (9) *Crotalus adamanteus*² (10) *Crotalus adamanteus*³ (11) *Crotalus adamanteus*⁴ (12) *Crotalus atrox*¹ (13) *Crotalus atrox*² (14) *Crotalus atrox*³ (15) *Agkistrodon piscivorus* (16) *Sistrurus c. edwardsii* (17) PLH3-*Porthidium l. hutmanni* (18) PLH4-*Porthidium l. hutmanni* (19) PLH5-*Porthidium l. hutmanni* (20) PLH7-*Porthidium l. hutmanni* (21) PLH8-*Porthidium l. hutmanni* (22) PLH1-*Porthidium l. hutmanni* (23) PLH2-*Porthidium l. hutmanni* (Pineda y Rodríguez-Acosta, 2020) (Foto: Luis A Rodríguez).

donde FMN también es cofactor.

Las SV-L-AAOs exhiben espectros de absorción típicos con máximos a 465 y 380 nm debido a el FAD. Las SV-L-AAOs de *Crotalus adamanteus* tiene una masa de 58,7 kDa medida por masa espectroscopia. A veces, un solo tipo de veneno contiene más de un tipo de L-AAO (Stiles y col., 1991; Pineda y Rodríguez-Acosta, 2020).

Hay tres tipos diferentes de SV-L-AAOs en relación al pH que se asemejan a fosfolipasas. Las SV-L-AAOs exhiben especificidad catalítica para aminoácidos hidrófobos aromáticos de cadena larga, su configuración, masas moleculares y puntos isoeléctricos son bastante variados.

Las SV-L-AAOs son capaces de inducir cambios en la función plaquetaria e inhibir su agregación también (Guo y col., 2012); son en su mayoría capaces de inducir apoptosis y muchas veces muestran actividades antimicrobianas, como ya vimos, y antiparasitarias, según Ande y col. (2008) la existencia de SV-L-AAOs puede ser un medio de protección contra agentes naturales, parásitos y bacterias.

Para evitar la inactivación, los SV-L-AAOs deben mantenerse a temperaturas de 4°C y pH cercano al punto isoeléctrico (pI).

Hasta ahora se han clonado y analizado al menos cuatro ADNc de SV-L-AAOs, siendo la secuencia de sus aminoácidos en estos cuatro venenos de serpientes muy similar. Estos SV-L-AAOs comparten similitud de su secuencia con la mono-amino-oxidasa humana.

Estas oxidasas, que durante los accidentes ofídicos son dañinas para los humanos y animales, también pudieran

tener algunos beneficios útiles. Quizás, las nuevas actividades descubiertas, de estas enzimas podrán utilizarse para sistemas de reparación de apoptosis, cáncer, VIH y ADN (Francischetti y col., 2004), ya que, al día de hoy, las SV-L-AAOs juegan un papel importante en el tratamiento de algunas enfermedades y se pueden usar como un quimioterapéutico eficaz (cáncer), antimicrobiano (bacteriano, fúngico, viral, parasitario), y otras acciones antitumorales (Ehara y col., 2002; Ciscotto y col., 2009; Rodrigues y col., 2009).

El envenenamiento por serpientes puede provocar hemorragia, necrosis local y edema; si no se trata adecuadamente puede provocar efectos sistémicos adversos como coagulopatía, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y cardiotoxicidad, que puede provocar la muerte. Como tal, las metaloproteasas del veneno de serpiente (SVMP) y las desintegrinas son dos de los más importantes componentes tóxicos que contribuyen a la hemorragia e interfieren con el sistema hemostático (Sánchez y Rodríguez-Acosta, 2008). Por otro lado, con respecto a los efectos biológicos de las SV-L-AAOs, estas también generan daño al endotelio vascular, causando un efecto hemorrágico, ya que las SV-L-AAOs inducen la apoptosis, en las células del endotelio (Souza y col., 1999). Además, intervienen en la aparición del edema, al aumentar la permeabilidad vascular e inducir inflamación y la liberación de histamina, prostaglandina, kininas y serotonina (Ali y col., 2000). Por otro lado, el efecto edematogénico de la actividad de las SV-L-AAOs, no se pierde porque son resistentes a la presencia de antihistamínicos. Estos autores observaron que la actividad edematosa de SV-L-AAOs del veneno de *Ophiophagus hannah* no era inhibido en presencia de dexametasona

(esteroide antiinflamatorio). Otros efectos descritos, tienen que ver con su actividad sobre la agregación plaquetaria, ya que se ha demostrado que las SV-L-AAOs son responsables de la inducción e inhibición de la agregación plaquetaria. Du y Clemetson (2002) propusieron que el peróxido de hidrógeno liberado por un mecanismo enzimático puede interferir con los receptores (GPIIb / IIIa) de las plaquetas y el fibrinógeno, lo que altera el mecanismo de agregación. Zhong y col. (2009) refieren que el H_2O_2 inhibe la función plaquetaria. Mientras que otros (Izidoro y col., 2006; Alves y col., 2008; Rodrigues y col., 2009) demostraron que la capacidad SV-L-AAOs era inducir la agregación plaquetaria. Sin embargo, este efecto siempre fue suprimido por inhibidores como catalasa y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Por tanto, los autores sugirieron que la producción de peróxido de hidrógeno durante la oxidación del sustrato está relacionada con estos cambios de actividad.

Como vemos, las SV-L-AAOs inducen efectos citotóxicos, particularmente sobre las enfermedades tumorales, pero el mecanismo citotóxico real es poco conocido. Sin embargo, hay suficiente evidencia que la producción de H_2O_2 generado durante la actividad catalítica de las SV-L-AAOs conduce a un estrés oxidativo (Samel y col., 2006; Zhang y Wei, 2007). El H_2O_2 liberado se acumula como especies reactivas de oxígeno (ROS) para provocar el deterioro directo de las membranas celulares y la exposición al glutatión (GSH) o catalasa, que inhiben la actividad del H_2O_2 (Naumann y col., 2011), produce una reducción del efecto citotóxico de las SV-L-AAOs.

Este estrés oxidativo también podría conducir a la disipación de la potencia de

la membrana mitocondrial (MMP) e inducir la translocación del citocromo C al citosol (Singh y col., 2007). El citocromo C luego activa la caspasa-9, un iniciador de la presencia de caspasa en el mecanismo mitocondrial intrínseco, que media la apoptosis. Las proteínas apoptóticas p53 se expresan sustancialmente en presencia de las SV-L-AAOs, seguido de la translocación de la proteína Bax citoplasmática hacia las mitocondrias, para activar las vías apoptóticas corriente abajo (descendente) (Zhang y Wei, 2007). Las SV-L-AAOs también pueden activar otro iniciador caspasa-8 en el receptor extrínseco de muerte de apoptosis, antes de la activación descendente de caspasa-3 (la fase ejecutora de la apoptosis) (Suhr y Kim, 1996). Teóricamente, las SV-L-AAOs ejercen su función apoptótica a través de dos vías: la extrínseca e intrínseca.

Muchos ejemplos experimentales hablan de la acción citotóxica de las SV-L-AAOs sobre el ADN de grupos celulares. Por ejemplo: estas enzimas del veneno de *Agkistrodon halys* muestran citotoxicidad en células de leucemia linfoblástica murina (L1210) con características apoptóticas prominentes como la fragmentación del ADN (Suhr y Kim, 1996). También se ha demostrado que el ACL-LAAO aislado del veneno de *Agkistrodon contortrix* causan la fragmentación del ADN en las células HL60 (Souza y col., 1999). Se encontró que SV-L-AAOs alteraba varios genes apoptóticos, autofágicos y relacionados con el ciclo celular, como resultado de la acumulación de H_2O_2 , liberado por la acción de la enzima (Fung y col., 2015). Del mismo modo, la apoxina 1, un tipo de SV-L-AAOs del veneno de *Crotalux atrox* también induce la fragmentación del ADN en células endoteliales umbilicales humanas, HL-60 (leucemia humana) A2780 (carcinoma de

ovario humano) y NK-3 (células endoteliales de rata) debido a altos niveles de H_2O_2 (Torii y col., 1997). BatroxL-AAOs ejerce un retardo en la fase G₀/G₁ con una disminución en las fases S y G₂/M (de Melo y col., 2011). Otro SV-L-AAOs (ACTX-6), del veneno de *Agkistrodon acutus*, también provoca la detención del ciclo celular en las células A549 (Zhang y Wu, 2008). Además de la apoptosis, las SV-L-AAOs exhiben una transición de la apoptosis a la necrosis cuando su concentración aumenta (Samel y col., 2006; de Melo y col., 2011; Costal-Oliveira y col., 2019). Esto presumiblemente está relacionado con los niveles del H_2O_2 producidos por la enzima, ya que el tratamiento con catalasa redujo significativamente el número de células necróticas (Ande y col., 2006).

Pineda y Rodríguez-Acosta (2020) describieron en la serpiente de Margarita (estado Nueva Esparta), ocho péptidos de SV-LAAOs llamados PLH1-LAAO, PLH2-LAAO, PLH3-LAAO, PLH4-LAAO, PLH5-LAAO, PLH6-LAAO, PLH7-LAAO y PLH8-LAAO, luego de su purificación usando MALDI TOF/TOF y "tandem mass spectrometry" (LC-MS/MS), los cuales seguramente están relacionados con las actividades hemostáticas del veneno de esta serpiente.

Finalmente, se ha determinado que las SV-L-AAOs exhiben selectividad hacia las células cancerosas y son relativamente no tóxicas para células normales (Lee y col., 2014; Lu y col., 2018; Abidin y col., 2018).

Referencias bibliográficas

- Abidin SA, Rajadurai P, Hoque-Chowdhury ME, Othman I, Naidu R. 2018. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptosis activity of L-amino acid oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) venom on human colon cancer cells. *Molecules* 23: E1388.
- Ali S A, Stoeva S, Abbasi A, Alam J M, Kayed R, Faigle M, Voelter W. 2000. Isolation structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 384: 216–226.
- Alves RM, Antonucci GA, Paiva HH, Cintra ACO, Franco JJ, Mendonca-Franqueiro E P, Dias-Baruffi M. 2008. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Integ Physiol* 151: 542–550.
- Ande SR, Kommoju PR, Draxl S, Murkovic M, Macheroux P, Ghisla S, Ferrando-May E. 2006. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* 11: 1439–1451.
- Ande SR, Fussi H, Knauer H, Murkovic M, Ghisla S, Fröhlich K U, Macheroux P. 2008. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Yeast* 25: 349–357.
- Blanchard M, Green DE, Ratner S. 1945. Isolation of L-amino acid oxidase. *J Biol Chem* 161:583–97.
- Bregge-Silva C, Nonato MC, de Albuquerque S, Ho PL, de Azevedo ILM, Diniz MR V, Lomonte B, Rucavado A, Díaz C, Gutiérrez JM, Arantes EC. 2012. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. *Toxicon* 60: 1263–1276.
- Calderón J, Olivera L, Martínez L M, Dávila G. 1997. A *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase. *Microbiology* 143(6): 1969–1974.
- Ciscotto P, De Avila R M, Coelho EAF, Oliveira J, Diniz CG, Fariás LM, Chávez-Olórtegui C. 2009. Antigenic microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 53: 330–341.
- Costa T R, Burin, SM, Menaldo DL, de Castro F A, Sampaio S V. 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 20: 23.
- Costal-Oliveira F, Stransky S, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Vivas-Ruiz DE, Yarlequé A, Sanchez EF, Chávez-Olórtegui C, 2019. Braga VMM. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci*

- Rep 9: 781.
- Coles C, Edmondson D, Singer T. 1977. Reversible inactivation of L-amino acid oxidase. *J Biol Chem* 252: 8035–8039.
- Curti B, Massey V, Zmudka M. 1968. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. *J Biol Chem* 243: 2306–2314.
- de Melo Alves Paiva R, de Freitas Figueiredo R, Antonucci GA, Paiva HH, de Lourdes Pires Bianchi M, Rodrigues KC, Lucarini R, Caetano RC, Linhari Rodrigues Pietro RC, Martins CH, de Albuquerque S, Sampaio SV. 2011. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie* 93: 941–947.
- Du XY, Clemetson KJ. 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 40: 659–665.
- Ehara T, Kitajima S, Kanzawa N, Tamiya T, Tsuchiya T. 2002. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett* 531: 509–512.
- Francischetti IM, My-Pham V, Harrison J, Garfield MK, Ribeiro JM. 2004. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalogue for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene* 337: 55–69.
- Fung SY, Lee ML, Tan NH. 2015. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 96: 38–45.
- Guo C, Liu S, Yao Y, Zhang Q, Sun M Z. 2012. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 60: 302–311.
- Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Goulart LR, Belebóni RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorg Med Chem* 14: 7034–7043.
- Johnson E K, Kardong KV, Ownby CL. 1987. Observations on white and yellow venoms from an individual southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* 25: 1169–1180.
- Kang TS, Georgieva D, Genov N, Murakami MT, Sinha M, Kumar RP, Kaur P, Kumar S, Dey S, Sharma S, Vrieling A, Betzel C, Takeda S, Arni RK, Singh TP, Kini RM. 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J* 278: 4544–76.
- Krebs H. 1981. *Reminiscences and Reflections*. Oxford: Clarendon Press.
- Lee ML, Fung SY, Chung I, Pailoor J, Cheah SH, Tan NH. 2014. King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumour growth in a tumour xenograft mouse model. *Int J Med Sci* 11: 593–601.
- Li R, Zhu S, Wu J, Wang W, Lu Q, Clemetson K J. 2008. L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. *Acta Biochim Biophys Sin* 40: 19–26.
- Lu W, Hu L, Yang J, Sun X, Yan H, Liu J, Chen J, Cheng X, Zhou Q, Yu Y, Wei JF, Cao P. 2018. Isolation, and pharmacological characterization of a new cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bungarus multicinctus* snake venom *J Ethnopharmacol* 213: 311–320.
- Massey V, Curti B. 1967. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. *J Biol Chem* 242: 1259–1264.
- Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K, Kohlhoff M, Gontijo CM, Navdaev A, de Rezende FF, Eble JA, Sanchez EF. 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim Biophys Acta* 1810: 683–694.
- Pawelek PD, Cheah J, Coulombe R, Macheroux P, Ghisla S, Vrieling A. 2000. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J* 19: 4204–4215.
- Pineda ME, Rodríguez-Acosta A. 2020. The report of some basic L-amino-acid oxidases peptides isolated from the Neotropical Lansberg's hognose viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) snake venom from Margarita Island (Venezuela). *Saber UDO* 32:213–221.
- Ponnudurai G, Chung M C, Tan N H. 1994. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys* 313: 373–378.
- Porter DJ, Bright H J. 1980. 3-Carbanionic substrate analogs bind very tightly to fumarase and aspartase. *J Biol Chem* 255: 4772–4780.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A. 2019. *Serpientes, Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela*. 2da. Edición, Caracas: Universidad Central de Venezuela. Disponible: <https://www.amazon.com>.

- [com/Serpientes-Venenos-Tratamiento-m%C3%A9dico-Venezuela/dp/B086B8FJZP?asin=B086B8FJZP&revisionId=&format=4&depth=1](https://doi.org/10.1007/s12248-009-9444-4)
- Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FP, Otaviano AR, Henrique Silva F, Hamaguchi A, Magro AJ, Braz AS, dos Santos JI, Homs-Brandeburgo MI, Fontes MR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM. 2009. Structural and functional properties of Bp-LAAO a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* 91: 490–501.
- Samel M, Vija H, Rönholm G, Siigur J, Kalkkinen N, Siigur E. 2006. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim Biophys Acta* 1764: 707–714.
- Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A. 2008. Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 30: 647–678.
- Sarkar NK, Devi AN. 1968. Enzymes in snake venoms. *Venom Anim Ven* 1: 167–216.
- Singh M, Sharma H, Singh N. 2007. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* 7: 367–373.
- Souza DH, Eugenio LM, Fletcher JE, Jiang MS, Garratt RC, Oliva G, Selistre-de-Araujo HS. 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Arch Biochem Biophys* 368: 285–290.
- Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australia king brown or mulga snake) venom. *Toxicon* 29: 1129–1141.
- Suhr SM, Kim DS. 1996. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 134–139.
- Torii S, Naito M, Tsuruo T. 1997. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. *J Biol Chem* 272: 9539–9542.
- WHO. World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO Offset Publication No. 58. Geneva. Disponible: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37282/WHO_OFFSET_58.pdf?sequence=1
- Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R, Warrell DA, White J, Winkel KD, Gopalakrishnakone P. 2010. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet* 375: 89–91.
- Xiao XD, Marzluf G A. 1993. Amino-acid substitutions in the zinc-finger of NIT2, the nitrogen regulatory protein of *Neurospora crassa*, alter promoter element recognition. *Curr Gen* 24: 212–218.
- Zeller EA, Iselin B, Maritz A. 1946. Über das vorkommen der ophiolambda-aminosaure-oxydase. 4. mitteilung über eine neue lambdaaminosaure-oxydase. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 4: 233–248.
- Zhang L, Wei LJ. 2007. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells. *Life Sci* 80: 1189–1197.
- Zhang L, Wu WT. 2008. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Nat Prod Res* 22: 554–563.
- Zhong SR, Jin Y, Wu JB, Jia Y H, Xu G L, Wang G C, Lu Q M. 2009. Purification, and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. *Toxicon* 54: 763–771.

Recibido: 13/05/2021
Aceptado: 18/06/2021

Importancia de la respuesta inmune celular adaptativa en la infección por SARS-CoV-2

Importance of the immune adaptative cell response in Sars-CoV-2 infection

JUAN BAUTISTA DE SANCTIS^{1,2}, ALEXIS GARCÍA², DOLORES MORENO³

Resumen

La infección por el virus SARS-CoV-2 afecta la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador. Si la respuesta inmune innata es exacerbada, se produce la tormenta de citocinas afectando la respuesta inmune adaptativa que redundan en una disfunción del sistema inmune. El reconocimiento y eliminación viral más eficiente es por medio de los anticuerpos neutralizantes y la memoria celular adaptativa contra el virus. La memoria celular de linfocitos citotóxicos, de células NK y NKT es trascendental en la eliminación del virus y las células infectadas por éste. A la par, la memoria de células Th1 y B son críticas para la producción de anticuerpos. Sin embargo, la presencia de anticuerpos no define la respuesta celular de memoria efectiva contra el virus. Las vacunas usadas en la actualidad generan una buena respuesta CD4+ y B de memoria, pero no todas generan CD8+ de memoria. Al disminuir la respuesta de memoria CD8+ la posibilidad de manifestaciones clínicas incrementa. En pacientes con comorbilidades o deficiencias en la respuesta de interferón, su memoria CD8+ es menor y por ello son más propensos a desarrollar cuadros clínicos más complejos. Se concluye que el papel de la memoria inmunológica CD8+ es clave para la eliminación del virus SARS-CoV-2.

Palabras clave: SARS-CoV-2, linfocitos T, células NK, células NKT, citotoxicidad, citocinas.

Abstract

The SARS-CoV-2 infection affects the host's innate and adaptive immune response. If the innate immune response is exacerbated, the cytokine storm occurs, affecting the adaptive immune response and hence an impaired immune response. The most efficient viral recognition and elimination are through neutralizing antibodies and adaptive cellular memory against the virus. The cellular memory of cytotoxic lymphocytes, NK cells, and NKT cells is essential in eliminating the virus and the cells infected by it. At the same time, the memory of Th1 and B cells are critical for the production of antibodies. However, the presence of antibodies does not define an effective memory cell response against the virus. The vaccines currently used generate good CD4+ and B memory responses, but not all generate memory CD8+s. If the CD8+ memory response decreases, the possibility of clinical manifestations increases. In patients with comorbidities or deficiencies of the interferon response, their CD8+ memory is lower, and therefore they are not more likely to develop more complex clinical manifestations. It is concluded that the study of CD8+ immunological memory is critical to eliminate the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: SARS-CoV-2, lymphocytes, NK cells, NKT cells, cytotoxicity, cytokines.

1. Instituto de Medicina Molecular y Traslacional. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Palacky. Correspondencia: juanbautista.desanctis@upol.cz. ORCID: [0000-0002-5480-4608](https://orcid.org/0000-0002-5480-4608).
2. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: [0000-0002-2354-0160](https://orcid.org/0000-0002-2354-0160)
3. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID: [0000-0002-6481-1377](https://orcid.org/0000-0002-6481-1377)

Introducción

ESTRUCTURA BÁSICA DEL VIRUS

Los coronavirus (CoV) son virus de ARN+ monocatenarios con una envoltura caracterizada por estructuras en forma de espícula que asemejan una corona. La familia Coronaviridae está formada por cuatro subfamilias Alfacoronavirus (α CoV), Betacoronavirus (β CoV), Deltacoronavirus (δ CoV) y Gammacoronavirus (γ CoV). Se sabe que un total de 7 CoV infectan a los seres humanos, consisten en dos alfas CoV (HCoV-229E y HKU-NL63) y cinco betas CoV (HCoVOC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV).

Los CoV, HCoV-229E, HKU-NL63, HCoVOC43 y HCoV-HKU1, han estado circulando durante mucho tiempo en la población mundial. Se presume que, a través de los años, las mutaciones en el ARN viral han dado lugar a una disminución significativa de la tasa de infección y en consecuencia de los procesos fisiopatológicos asociados a la infección (Artika y col., 2020). Por ello, la infección por coronavirus se consideraba como una infección viral benigna. Esta definición cambió en 2002-2003 cuando en China hubo brote con una nueva cepa de coronavirus, asociada a animales salvajes. Se demostró que el virus es el factor desencadenante del síndrome respiratorio agudo severo y por ello se denominó SARS-CoV. El virus SARS-CoV-1 es altamente contagioso y su tasa de letalidad es del 9,6% (Gralinski y Baric, 2015). El rápido control epidemiológico evitó la propagación del virus. Posteriormente en países de Medio Oriente, en 2012, y Corea del Sur en 2015 se detectó otra cepa, MERS. Se reportó una letalidad cercana al 35% y pudo controlarse epidemiológicamente

(Gralinski y Baric, 2015; Artika y col., 2020). En el año 2019, se produjo la pandemia por SARS-CoV-2 proveniente de China debido al errático control epidemiológico a nivel mundial (Artika y col., 2020; Zhou y col., 2020). A pesar de que la tasa de letalidad de SARS-CoV-2 es inferior a los dos anteriores, 2-3 % en población total y alrededor de 30 % en población adulta mayor, la presencia de variantes virales con mayor tasa de infección ha generado importantes problemas epidemiológicos a nivel mundial (Zhou y col., 2020).

El genoma del coronavirus está formado por 2 sitios UTR, 5' y 3', la replicasa, la espiga (S), la envoltura E (Envolvente), la M (Membrana), la N (Nucleocápside) y la cola de poli (A) (Figura 1). Hay genes adicionales al final del genoma (Figura 1). La proteína S está altamente glicosilada y es necesaria para la infección (Mousavizadeh y Ghasemi, 2021). Aunque la proteína S es muy similar entre el SARS 1 y 2 (94% de secuencia de nucleótidos), hay un sitio sensible a proteasas en el SARS-CoV-2 que está ausente en el anterior (Mousavizadeh y Ghasemi, 2021). La proteína de membrana y las proteínas accesorias no son esenciales para la replicación; sin embargo, son vitales en el ensamblaje y patogenia viral. Hay otros genes no estructurales, las proteínas del marco abierto de lectura (ORF), ORF1ab, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF10 y ORF8 que también se transcriben (Chen y col., 2020). La función de estas proteínas en la infección, la replicación viral y la respuesta del hospedador aún están en estudio.

Los coronavirus, SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS, infectan, principalmente, las células del tracto respiratorio (Zhou y col., 2020). Todos usan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor primario. El SARS-CoV-2 tiene un período

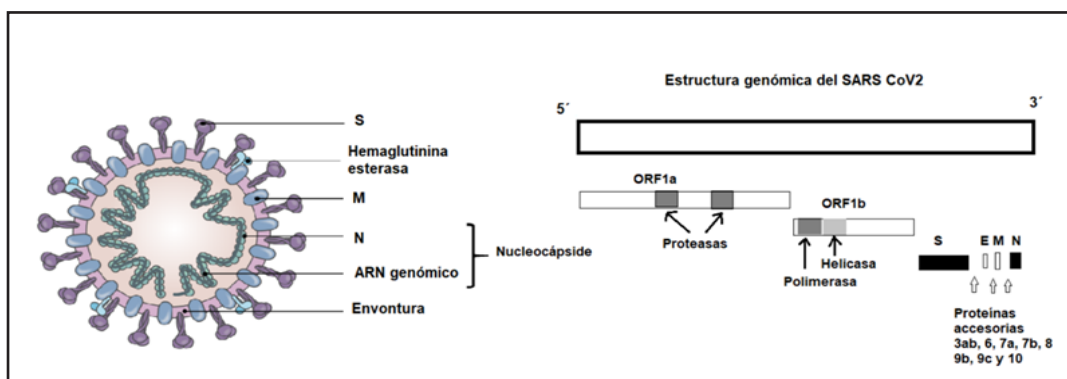


Figura 1. Esquema de la estructura del virus SARS-CoV-2. Los rectángulos en negro, que representan la proteína de la espiga (S) y la nucleocápside (N), son las proteínas más relevantes para generar una respuesta inmune antiviral efectiva. Los rectángulos grises representan otros aspectos importantes de la estructura viral. La proteína N es más conservada que la proteína S.

de incubación de 1 a 14 días, que varía de 3 a 7 días. Los síntomas más comúnmente descritos son fiebre leve y moderada, debilidad, tos seca, dolor de cabeza, congestión nasal, dolor de garganta, dolor muscular, síntomas gastrointestinales y falta de olfato y gusto. La población adulta mayor es más susceptible a desarrollar formas severas de la enfermedad a consecuencia del virus. Se registra una alta mortalidad en pacientes con comorbilidades tales como: obesidad, hipertensión, diabetes y pacientes inmunocomprometidos y en pacientes con inmunodeficiencia primaria.

INFECCIÓN VIRAL

En un análisis general, Mason (2020) describió tres fases de la infección viral por SARS-CoV-2. La primera fase es la fase asintomática ya que la infección se presenta, mayoritariamente, en la nariz y en la cavidad bucal. En la nariz, el sistema inmunológico involucra anticuerpos locales y células inmunes innatas que pueden provocar una respuesta inmunitaria adaptativa vía células T residentes en mucosas. La inducción de la respuesta inmune adaptativa depende de la expresión del antígeno, que es baja

en las primeras etapas de la infección viral.

En la cavidad orofaríngea predomina la respuesta inmune innata, complemento, neutrófilos y macrófagos, y anticuerpos, fundamentalmente IgA, péptidos bactericidas y enzimas que controlan principalmente infecciones bacterianas (Mason, 2020). Allí, el virus provoca una respuesta inmune mínima (Mason, 2020). En la fase sintomática moderada, el virus está presente principalmente en el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias más grandes. En estas áreas hay una excelente respuesta inmune innata contra células y proteínas involucradas en daño celular y obstrucción de las vías respiratorias (Mason, 2020). Sin embargo, las células epiteliales dañadas pueden eliminarse y ser reemplazadas con células basales. En los procesos de gravedad, las células exocrinas bronquiales (denominadas células club), presente en los bronquiolos, se infectan comprometiendo por ello la producción de mucina y otros productos secretores (Mason, 2020). Además, el virus infecta y se replica en las células epiteliales de tipo II que expresan el receptor de la enzima convertidora de

angiotensina 2. La disminución de células club son responsable de la insuficiencia respiratoria. La reabsorción activa típica de líquido alveolar y electrolitos también se ve obstaculizada, lo que puede resultar en hipocalemia (Mason, 2020). Las células endoteliales dañadas conducen a la trasudación de proteínas plasmáticas de origen inflamatorio y a una formación irregular de membranas hialinas (Mason, 2020).

El SARS-CoV-2 utiliza el complejo receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), una proteína transmembrana glicosilada, para infectar e invadir la célula diana (Shang y col., 2020; Yan y col., 2020). La máxima expresión de ACE2 se observa en el epitelio respiratorio, pulmones, riñones, intestinos, testículos (células de Sertoli y Leydig), útero, vagina, endotelio y corazón (Shang y col., 2020; Yan y col., 2020). El sitio sensible a la proteasa de la proteína espiga se escinde mediante una serina proteasa 2 transmembrana específica (TMPRSS2). La unidad S 1 (S1) del virus se une al ACE2 como receptor diana (Shang y col., 2020; Yan y col., 2020; Morelli y col., 2021). Luego, utiliza la serina proteasa del hospedador TMPRSS2 para la escisión de la proteína S, lo que permite la unión de las membranas viral y celular y, en consecuencia, la entrada del virus en la célula (Shang y col., 2020; Yan y col., 2020; Walls y col., 2020; Morelli y col., 2021). La unión del virus y su internalización deja a las células sin una enzima ACE2 activa. La ACE2 soluble que carece de anclaje a la membrana se encuentra en niveles bajos en la sangre (Batlle y col., 2020). El impacto de una pequeña cantidad de ACE2 activo y su papel en la fisiología cardiovascular y la fisiopatología del SARS-CoV-2 es un tema fascinante que está en estudio.

RESPUESTA INMUNE INNATA Y TORMENTA DE CITOCINAS

La respuesta antiviral se desencadena, de manera general, por la activación de la transcripción y secreción de interferón (IFN) de tipo I (Zhao y Zhao, 2020; Krainer y col., 2020; Ye y col., 2020). Sin embargo, en las células de la inmunidad innata dos receptores de reconocimiento de patógenos (PAMP) son capaces de detectar el ARN viral, el receptor de reconocimiento de retinoides RIG-1 y los receptores TOLL (TLR 3, 7 y 8). Una vez reconocido el patógeno, se produce la activación del inflammasoma. El inflammasoma es un sistema multi-protéico citoplasmático involucrado producción de citocinas proinflamatorias, IL-1 β , IL-18 (Zhao y Zhao, 2020; Krainer y col., 2020; Ye y col., 2020). Estas citocinas, a su vez, activan la producción de proteínas de fase aguda, mayoritariamente proteína C reactiva e IL-6. La IL-6 es responsable del incremento de neutrófilos en sangre periférica junto con GM-CSF. Por ello, la activación exacerbada del inflammasoma puede conllevar a muerte celular de las células de inmunidad innata. La muerte celular conlleva a la secreción de alarminas que son detectadas por los receptores de alarma denominados DAMP (Zhao y Zhao, 2020; Krainer y col., 2020; Ye y col., 2020). La activación células vía receptores DAMP amplifica la respuesta inflamatoria y bloquea los mecanismos de control fisiológico. En este proceso de exacerbación, las citocinas antiinflamatorias como IL-10 no son capaces de disminuir el proceso. La inflamación multisistémica afecta diversos órganos. Este proceso de respuesta exacerbada se denomina tormenta de citocinas (Zhao y Zhao, 2020; Krainer y col., 2020; Ye y col., 2020).

En pacientes con comorbilidades la tormenta de citocinas pudiera ser producto de una inflamación subclínica, denominada en inglés inflamaging (Lara y col., 2020; Meftahi y col., 2020). A la par, la tormenta de citocinas puede observarse en varias enfermedades inflamatorias y por ello se analizaron diversos tratamientos antiinflamatorios para la infección viral, muchos de ellos sin éxito. Uno de los puntos a destacar es que la disminución de la respuesta inflamatoria puede afectar la respuesta inmune adaptativa y con ello el control del proceso infeccioso.

Se han descrito dos elementos importantes en la infección por SARS-CoV-2 que son clínicamente relevantes, a saber, el incremento de neutrófilos con disminución de linfocitos circulantes y la hipocomplementemia (De Sanctis y col., 2021). La hipocomplementemia se debe a un proceso de estimulación directa a través de glicanos de las proteínas virales, de los anticuerpos producidos contra el virus, IgM e IgG, y por la activación de neutrófilos. La activación de los neutrófilos en el proceso infeccioso se produce por la detección de nucleótidos virales, restos celulares, por la replicación viral y por citocinas inflamatorias en el tejido blanco de la infección viral (De Sanctis y col., 2021). Ese proceso de hiperactivación redundante en la muerte de las células vía NETosis. La NETosis activa los receptores DAMP que a su vez puede inducir más muerte celular e incrementar la tormenta de citocinas (De Sanctis y col. 2021). El bloqueo de la vía del complemento reduce parcialmente el proceso inflamatorio mas no lo elimina. Es necesario la limpieza del detritus celular vía eferocitosis. Igualmente, es importante entender que los neutrófilos reclutados en la inflamación pulmonar pueden verse afectados por la presencia de virus o pueden ser activados por complejos

antígeno anticuerpo vía receptor Fc de la inmunoglobulina (De Sanctis y col., 2021). En este proceso juegan un papel fundamental los receptores CD32A/B y CD16. Como se detalló anteriormente, en el cuadro inflamatorio en el parénquima pulmonar se observa un número elevado de NETosis aunado a la pérdida de estructuras tisulares que conllevan a la reducción marcada de alvéolos pulmonares y por ende generando insuficiencia respiratoria. El proceso además afecta el transporte de electrolitos, sodio y potasio que repercuten en el intercambio hídrico tisular. La reparación tisular no ocurre y por tanto la capacidad de recuperación alveolar es baja.

La respuesta de anticuerpos con capacidad neutralizante es importante en la protección de la infección viral; sin embargo, este proceso no necesariamente involucra una memoria prolongada o una eficiente eliminación viral (De Sanctis y col., 2021). Para ello es necesario la incorporación de células CD8+, NK, NKT, células T de mucosas (MAIT), linfocitos de respuesta innata (ILC), y células T γ δ . El proceso de activación celular de linfocitos T citotóxicos es independiente de CD4+.

PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA Y ESTIMULACIÓN LINFOCITARIA

La presentación antigénica en el proceso de infección viral se ha estudiado mayoritariamente en el término de secuencias peptídicas de proteínas virales y su contrapartida en las proteínas del sistema mayor de histocompatibilidad (Sánchez-Mazas, 2020; De Sanctis y col., 2021; Tavasolian y col., 2021). Los estudios indican que hay una predisposición genética al reconocimiento viral. El alelo HLA-B * 46: 01 está relacionado a la menor probabilidad de unir proteínas virales

mientras que los alelos HLA-B * 15: 03 y HLA A 02*01 están asociados con una alta probabilidad de unión a la proteína S. Los alelos HLA-B*07:03 (clase I), DRB1*03:01, y DRB1 *12:02 (clase II) se han asociado a susceptibilidad (Sánchez-Mazas, 2020; De Sanctis y col., 2021; Tavasolian y col., 2021). Estos resultados sugieren que varios haplotipos de HLA están asociados con la susceptibilidad de diferentes enfermedades (Sánchez-Mazas, 2020; De Sanctis y col., 2021; Tavasolian y col., 2021). Con base en la incidencia de infecciones y muerte por SARS-CoV-2 en África, Iesa y col. (2020) encontraron regiones inmunodominantes comunes de *Plasmodium falciparum*, lo que explica las tasas de infección más bajas. Aunque las células CD8+ podrían ser responsables de la respuesta inmune protectora postulada, los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada contra epítomos similares de ambos patógenos deben analizarse cuidadosamente.

Leite y col. (2021) en un análisis realizado en 98 países lograron demostrar una asociación de polimorfismos de las citocinas IL-6, IL1-0 e IL-12B con infección y severidad y el alelo HLA B* 13: 01 como un alelo protector. Lo importante de este trabajo es destacar que es poco probable encontrar una asociación directa de HLA con la respuesta directa con SARS-CoV-2. En la población venezolana, esencialmente mestiza con características particulares, distintas a algunas poblaciones latinoamericanas (Del Pilar Fortes y col., 2012), el impacto de estudios es no es significativo.

RESPUESTA LINFOCITARIA

García (2020), en una revisión, describió la diferencia entre la inmunidad protectora y la desregulación inmunitaria en pacientes

infectados SARS-CoV-2. En pacientes graves, la expresión de marcadores de agotamiento o marcadores inhibidores es significativa, lo que sugiere que las células circulantes CD8+ no responden o son anérgicas (García, 2020). Por ello, la activación de células CD8+ específicas contra el virus puede ser esencial para disminuir la carga viral. Vibholm y col. (2021) demostraron que la persistencia del virus SARS-CoV-2 dependía de las respuestas de los linfocitos CD8+. En ausencia de la respuesta antiviral de los linfocitos CD8+, las células de la inmunidad innata de origen linfoide pueden compensar esta deficiencia (Sánchez-Mazas, 2020; Kikkert, 2020; Taefehshokr y col., 2020). Las células NK y NKT también contribuyen a este fenómeno (Maucourant y col., 2020; Björkström y Potenza, 2021).

En pacientes con infección grave, la producción de IFN γ por las células T CD4+ es menor que los controles (Li y col., 2020; Udomsinprasert y col., 2020), y el número de linfocitos B circulantes es deficiente. Wang y col. (2020) lograron demostrar que una disminución significativa de células T CD8+ y células B circulantes está asociado a una menor tasa de recuperación o peor pronóstico. Por otro lado, Liu y col. (2020) detectaron anticuerpos potentes y neutralizantes contra múltiples epítomos en pacientes convalecientes; sin embargo, dichos epítomos no concuerdan con el papel de CD8+ en la eliminación viral. Es evidente, como se demostró en nuestro laboratorio (Mayora y col., 2020), que la disminución de células T de memoria circulante está asociada a una menor respuesta antiviral y por ello a un mayor riesgo de enfermedad severa.

Haciendo un análisis del genoma y proteínas virales, Ferretti y col. (2020) lograron identificar antígenos específicos

reconocidos por los linfocitos CD8+ de memoria contra el virus. Se usaron los 6 alelos HLA clase I más prevalentes en la población. Llamativamente, de los 29 epítopes virales reconocidos, solo 3 se ubicaron en la proteína S. Los otros epítomos se ubicaron en el ORF1ab o en la proteína nucleocápside (Ferretti y col., 2020). Se ha demostrado además que esta respuesta es inferior en sujetos de la tercera edad (Gallerani y col., 2021). Por ello, en muchos estudios realizados al inicio de la pandemia con péptidos únicamente contra proteína S, la respuesta de memoria CD8+ fue considerada erróneamente baja. Como se demuestra en la figura 1 y se describió en el texto, la proteína N está conservada a diferencia de la S. El análisis actual del proceso de memoria CD8+ sugiere que, a pesar de que las vacunas usadas actualmente pueden generar una respuesta CD8+ contra proteína S, los nuevos constructos virales deberán contener proteína N además de algunos epítomos de ORF1 para generar una respuesta antiviral más específica por un mayor tiempo. Adam y col. (2021), analizando células de pacientes recuperados y fallecidos detectaron frecuencias aumentadas de células T de memoria polifuncionales, CD4+ CXCR5 + HLA-DR + y proporciones disminuidas de células T de memoria efectoras (TEM) que expresan Granzima-B y Perforina. La mayor abundancia de células efectoras T CD8 + PD-L1 + CXCR3 + polifuncionales, CXCR5 + HLA-DR + TSCM, así como células T productoras de citocinas antinucleocápside permitió diferenciar la respuesta celular entre pacientes recuperados y fallecidos. La escasez de células CD8+ específicas contra nucleocápside predice con precisión el desenlace de la enfermedad mortal (Adam y col., 2021).

Grifoni y col. (2021) han hecho un mapa de antígenos virales y epítomos de interés que compaginan la importancia de la presentación antigénica con la respuesta de memoria generando una matriz de interés para predecir respuestas en poblaciones y asociación con diferentes productos virales.

Varios estudios han analizado la posibilidad de una respuesta inmunitaria protectora antes de la infección por SARS-CoV-2 (Lee y col., 2020; Reche, 2020; Schulien y col., 2021). Se documentaron respuestas de células T de memoria contra otros coronavirus, que fueron capaces de inhibir la infección por el SARS-CoV-2 in vitro (Lee y col., 2020; Reche, 2020; Schulien y col., 2021). Esta respuesta protectora celular se presume que está presente en niños expuestos a otros coronavirus. Eventualmente, puede ocurrir la generación de células de memoria y anticuerpos protectores por inmunización contra otros virus (Lee y col., 2020; Reche, 2020; Schulien y col., 2021). El mecanismo de protección puede depender de epítomos similares presentados por células de la inmunidad innata. Se ha documentado que la vacuna BCG (Marín-Hernández y col., 2021) podría generar una respuesta antiviral indirecta por la activación de células linfoides innatas (T γ δ , NKT, ILC). Estas células innatas podrían compensar la respuesta CD8+ antiviral.

Cuando se generan anticuerpos neutralizantes contra la proteína S de SARS-CoV-2 éstos pueden inhibir la infección por SARS-CoV-1 y por los beta-coronavirus comunes (Cohen y col., 2021, a,b). Se ha demostrado la persistencia de las células B de memoria IgG + específicas de la espiga, lo que es un buen augurio para una respuesta rápida de anticuerpos tras la reexposición al virus o la vacunación (Cohen y col.,

2021, a,b). Además, se demostró que las células T CD4+ y CD8+ específicas contra el virus son polifuncionales y se mantienen después de 200 días, aunque en bajo dintel (Cohen y col., 2021, a,b). Es importante recordar que las respuestas virales de las células T CD4+ están dirigidas contra varias proteínas del SARS-CoV-2, mientras que las respuestas de las células T CD8+ se dirigen preferentemente a la nucleoproteína, lo que destaca la importancia potencial de incluir la nucleoproteína en futuras vacunas.

ESTUDIOS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y REPERCUSIONES EN LA CLÍNICA

Uno de los criterios que está siendo implementado para analizar la respuesta inmune y el riesgo de severidad en caso de infección es la respuesta *in vitro* ante péptidos virales o virus inactivado. Como se ha expuesto anteriormente, la respuesta inmune contra el virus no solo depende de la proteína S viral sino de la proteína N y algunas de las proteínas ORF como ORF1.

Los estudios celulares *in vitro* son más específicos que la detección de anticuerpos neutralizantes. En un número importante de pacientes post COVID-19 o post vacunación, independientemente de la vacuna usada, los anticuerpos pueden disminuir luego de los tres meses de la exposición (Cohen y col., 2021, a,b; Goletti y col., 2021). La presencia o no de anticuerpos no se relaciona con memoria inmunológica. La memoria inmunológica más importante para analizar es la memoria celular. La suma de la detección de anticuerpos y respuesta de memoria celular debe ser utilizada como base para la conducta terapéutica en todos los pacientes con riesgo.

En la figura 2, se describen los resultados de un modelo matemático realizado en

nuestro laboratorio basado en la suma de trabajos publicados y de nuestra experiencia. Se puede observar claramente, que la respuesta inmune celular adaptativa en individuos vacunados y en aquellos post-infección viral leve o moderada, no severa, varía con el tiempo. De hecho, en los respondedores estudiados en el laboratorio, se ha logrado identificar dos claras poblaciones. Una de ellas que tiene una respuesta CD8+ antiviral como elemento preponderante y otro grupo cuyos niveles de CD8+ antivirales no son muy altos, pero se compensan con un incremento de la respuesta antiviral de células NK y NKT. Ésta respuestas se mantienen a lo largo del tiempo. Actualmente, estamos estudiando la posibilidad de que se genere una memoria de células NK y células NKT contra el virus. Esta posibilidad ha sido parcialmente planteada por diversos autores (Goletti y col., 2021; Zuo y Zhao, 2021; Orumaa y Dunne, 2021). La respuesta CD8+ por vacunas ha sido publicada recientemente (Oberhardt y col., 2021; Sadarangani y col., 2021).

En la figura 2 se describe la respuesta de memoria de linfocitos T, B y la participación de células NK y NKT en el proceso de eliminación viral. En la parte superior se puede observar la respuesta inmune protectora y eficiente contra el virus inducido por la infección viral *per se* o vacunación mientras que la inferior se visualiza la respuesta en individuos post respondedores. En el modelo no se usó la respuesta celular documentada de pacientes con COVID-19 severo y pacientes fallecidos. El punto que destacar en la figura 2 es la diferencia en la cinética de la respuesta. La baja respuesta celular de memoria luego de la fase inicial predice la respuesta ante la infección. En la parte inferior, se representan mayoritariamente personas de la tercera edad, los pacientes

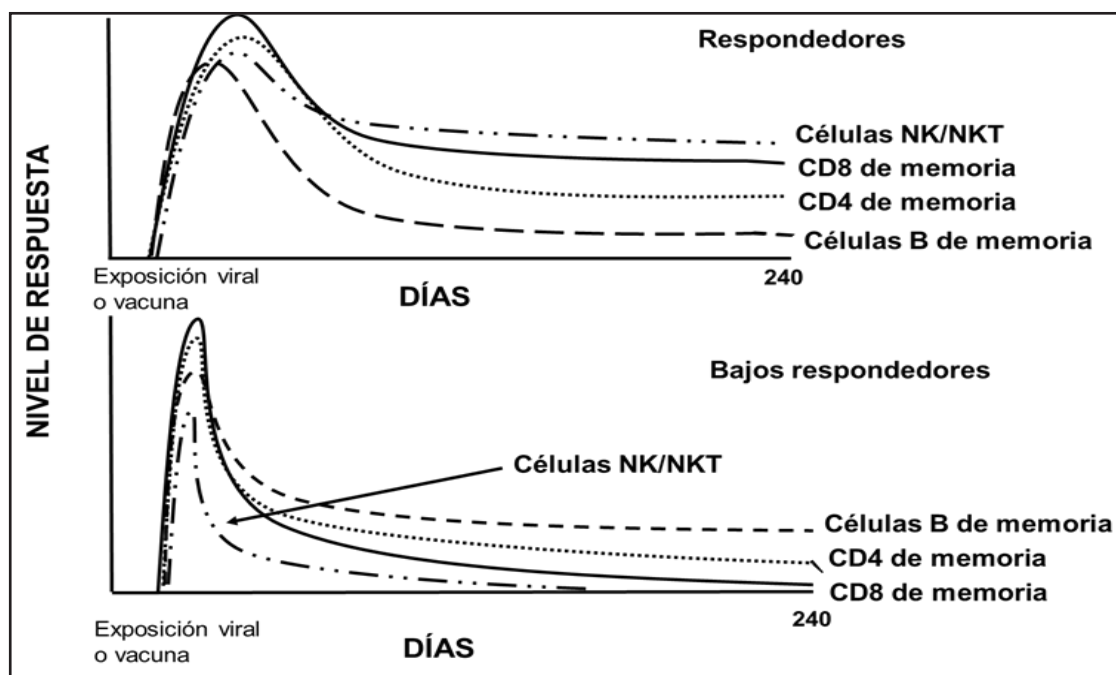


Figura 2. Modelo diferencial de respuesta inmune en respondedores y bajos respondedores. La figura muestra el modelo matemático de los análisis de diferentes resultados de estudios hechos *in vitro* usando proteínas virales o virus inactivado. El modelo ayuda a predecir la respuesta celular contra el virus en el tiempo. El análisis plantea una diferencia de cinética de la respuesta de memoria y de células NK/NKT.

inmunocomprometidos y los pacientes inmunodeficientes. En esos grupos, hay dos elementos a resaltar uno la disminución de anticuerpos antivirales específicos, no ilustrada en la gráfica, aunado con una disminución en la respuesta *in vitro* antiviral de linfocitos T CD4+ y T CD8+. A diferencia de lo expuesto anteriormente, la respuesta de NK y NKT contra el virus se pierde con el tiempo y no es capaz de compensar la baja respuesta de los linfocitos CD8+. Se desconoce con exactitud la importancia de las células NK y NKT en el fenómeno, pero se plantea el paradigma de una baja síntesis y secreción de IFN tipo I y de posibles inmunodeficiencias de proteína de respuesta antiviral vía linfocitos CD8+. En pacientes de la tercera edad y trasplantados o inmunocomprometidos se ha planteado como hipótesis exposición a citomegalovirus (Poloni y col., 2021; Niitsu

y col., 2021). Es importante destacar que pacientes con infección por citomegalovirus tiene baja expresión y respuesta celular ante antígenos comunes y la ausencia de esta respuesta puede facilitar la infección por SARS-CoV-2 (Poloni y col., 2021; Niitsu y col., 2021). Los pacientes que cursan con enfermedad viral severa normalmente están coinfectados con otros patógenos.

La respuesta inmune celular en pacientes pediátricos ha sido objeto de pocos estudios en los cuales se ha observado una variabilidad en la respuesta (Cotugno y col., 2021). Cohen y col. (2021, a,b), encontraron que los niños infectados con el SARS-CoV-2 tenían respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ significativamente más bajas a las proteínas estructurales y ORF1ab en comparación con los adultos infectados. Esto puede

reflejar una compartimentalización diferente de las células T para el procesamiento de antígenos durante la exposición o un menor reclutamiento de poblaciones de memoria. En comparación con los adultos, los niños tenían niveles significativamente más bajos de anticuerpos contra los coronavirus β , lo que indica una inmunidad inicial diferente. Las respuestas foliculares auxiliares T totales aumentaron en los niños durante la infección aguda, lo que indica una rápida coordinación de las respuestas de las células T y B. Sin embargo, las respuestas totales de los monocitos se redujeron en los niños, lo que puede ser un reflejo de los diferentes niveles de inflamación entre niños y adultos. Por lo tanto, la reducción de la inmunidad previa al coronavirus β y la activación y el reclutamiento reducidos de respuestas de novo en los niños pueden conducir a una patogenia más leve de la COVID-19 (Cohen y col., 2021, a,b).

En el caso de mujeres embarazadas la respuesta inmune celular de células NK y de células T de memoria CD8+ son críticas en la generación de la eliminación viral (Chen y col., 2021). El ambiente tolerogénico del embarazo protege a la embarazada de la tormenta de citocinas (Garmendia y De Sanctis, 2021); sin embargo, a nivel placentario se pudieran desencadenar eventos que conlleven a la activación de una respuesta local que sea deletérea para el feto.

Es importante de determinar poblaciones celulares de memoria en los pacientes con alto riesgo, los ensayos celulares son sencillos de realizar en un laboratorio especializado. La interpretación de los resultados puede ser crucial a la hora de una decisión terapéutica, cambio de esquema de vacunación e inclusive predecir la severidad de un paciente con infección activa. Además,

el análisis puede ser beneficioso para los pacientes con el síndrome post COVID-19 en la cual la activación de linfocitos T se mantiene a pesar de la ausencia de pruebas nucleotídicas positivas contra el virus (Steiner y col., 2021).

Conclusiones

La respuesta inmune efectiva contra SARS-CoV-2 requiere una respuesta adaptativa eficiente de memoria. La producción de anticuerpos no es directamente proporcional a una memoria inmunológica. La respuesta CD8+ es más específica y eficiente contra el virus. A la par, las células NK y NKT pueden contribuir en el proceso de eliminación viral. En personas de la tercera edad o inmunodeficientes primarias o secundarias, la respuesta celular puede estar comprometida. Por ello, los estudios de memoria celular *in vitro* son claves para definir el riesgo de respuesta ante la infección viral y pueden ser esenciales en la decisión de esquemas terapéuticos y de vacunación. Las coinfecciones con citomegalovirus, influenza y otros virus debe ser estudiada con detalle en personas de la tercera edad, inmunocomprometidos y con comorbilidades. A pesar de que el fin de la pandemia pudiera estar cerca, es necesario diseñar estrategias más eficientes que nos permitan definir un mejor manejo terapéutico del paciente y nos ayuden generar estrategias de estudio para posibles infecciones contra otros agentes patógenos en el futuro.

Financiamiento

El estudio es financiado por 1) el Proyecto multicéntrico del Ministerio de Innovación de República Checa número FW03010472 titulado Estudio de la eficacia de vacunas experimentales frente a SARS-

COVID-2 en modelos animales (JBDS), 2) por el Programa de Fondos Estructurales y Operativos de Inversión Investigación de la Comunidad Europea titulada: Enfoque molecular, celular y clínico del envejecimiento saludable, subvención ENOCH; Número de registro: CZ.02.1.01 / 0.0 / 0.0 / 16_019 / 0000868 (JBDS), 3) Proyecto Financiado por el FONACIT actas números 20, 21 y 23 de 2020, otorgado al Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela (AG).

Referencias bibliográficas

- Adam L, Rosenbaum P, Quentric P, Parizot C, Bonduelle O, Guillou N, Corneau A, Dorgham K, Miyara M, Luyt CE, Guihot A, Gorochoy G, Combadière C, Combadière B. 2021. Nucleocapsid-specific and PD-L1+CXCR3+ CD8+ polyfunctional T-cell abundances are associated with survival of critical SARS-CoV2-infected patients. *JCI Insight* 20:151571.
- Artika IM, Dewantari AK, Wiyatno A. 2020. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon* 6(8): e04743.
- Battle D, Wysocki J, Satchell K. 2020. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin Sci (Lond)* 134(5):543–545.
- Björkström NK, Ponzetta A. 2021. Natural killer cells and unconventional T cells in COVID-19. *Curr Opin Virol* 49:176–182.
- Chen G, Liao Q, Ai J, Yang B, Bai H, Chen J, Liu F, Cao Y, Liu H, Li K. 2021. Immune Response to COVID-19 During Pregnancy. *Front Immunol* 12:675476.
- Chen Y, Liu Q, Guo D. 2020. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 92(4):418–423.
- Cohen CA, Li APY, Hachim A, Hui DSC, Kwan MYW, Tsang OTY, Chiu SS, Chan WH, Yau YS, Kaviani N, Ma FNL, Lau EHY, Cheng SMS, Poon LLM, Peiris M, Valkenburg SA. 2021a. SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection. *Nat Commun* 12(1):4678.
- Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, Czartoski J, Lai L, Mantus G, Norwood C, Nyhoff LE, Edara VV, Floyd K, De Rosa SC, Ahmed H, Whaley R, Patel SN, Prigmore B, Lemos MP, Davis CW, Furth S, O'Keefe JB, Gharpure MP, Gunisetty S, Stephens K, Antia R, Zarnitsyna VI, Stephens DS, Edupuganti S, Roupheal N, Anderson EJ, Mehta AK, Wrarmert J, Suthar MS, Ahmed R, McElrath MJ. 2021b. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med* 2(7):100354.
- Cotugno N, Ruggiero A, Pascucci GR, Bonfante F, Petrara MR, Pighi C, Cifaldi L, Zangari P, Bernardi S, Cursi L, Santilli V, Manno EC, Amodio D, Linardos G, Piccioni L, Barbieri MA, Perrotta D, Campana A, Donà D, Giaquinto C; CACTUS Study Team, Concato C, Brodin P, Rossi P, De Rossi A, Palma P. 2021. Virological and immunological features of SARS-CoV-2 infected children with distinct symptomatology. *Pediatr Allergy Immunol* 10.1111/pai.13585.
- Del Pilar Fortes M, Gill G, Paredes ME, Gamez LE, Palacios M, Blanca I, Tassinari P. 2012. Allele and haplotype frequencies at human leukocyte antigen class I and II genes in Venezuela's population. *Ann Biol Clin (Paris)* 70(2):175–81.
- De Sanctis JB, García AH, Moreno D, Hajduch M. 2021. Coronavirus infection: An immunologists' perspective. *Scand J Immunol* 93(6): e13043.
- Ferretti AP, Kula T, Wang Y, Nguyen DMV, Weinheimer A, Dunlap GS, Xu Q, Nabils N, Perullo CR, Cristofaro AW, Whitton HJ, Virbasius A, Olivier KJ Jr, Buckner LR, Alistar AT, Whitman ED, Bertino SA, Chattopadhyay S, MacBeath G. 2020. Unbiased screens show CD8+ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity* 53(5):1095–1107.e3.
- Gallerani E, Proietto D, Dallan B, Campagnaro M, Pacifico S, Albanese V, Marzola E, Marconi P, Caputo A, Appay V, Gavioli R, Nicoli F. 2021. Impaired priming of SARS-CoV-2-specific naive CD8+ T cells in older subjects. *Front Immunol* 12:693054.
- García LF. 2020. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front Immunol* 11:1441.
- Garmendia JV, De Sanctis JB. 2021. A Brief Analysis of Tissue-Resident NK Cells in Pregnancy and Endometrial Diseases: The Importance of

- Pharmacologic Modulation. *Immuno* 1:174–193.
- Goletti D, Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, Sette A, Nikolayevskyy V. 2021. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* S1198-743X (21)00378–5.
- Gralinski LE, Baric RS. 2015. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J Pathol* 235:185–195.
- Grifoni A, Sidney J, Vita R, Peters B, Crotty S, Weiskopf D, Sette A. 2021. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe* 29(7):1076–1092.
- Iesa MAM, Osman MEM, Hassan MA, Dirar AI, Abuzeid N, Mancuso JJ, Pandey R, Mohammed AA, Borad MJ, Babiker HM, Konozy EH. 2020. SARS-CoV-2 and Plasmodium falciparum common immunodominant regions may explain low COVID-19 incidence in the malaria-endemic belt. *New Microbes New Infect* 38:100817.
- Kikkert M. 2020. Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. *J Innate Immun* 12(1):4–20.
- Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. 2020. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun* 109:102421.
- Lara PC, Macías-Verde D, Burgos-Burgos J. 2020. Age-induced NLRP3 inflammasome over-activation increases lethality of SARS-CoV-2 pneumonia in elderly patients. *Aging Dis* 11(4):756–762.
- Lee CH, Pinho MP, Buckley PR, Woodhouse IB, Ogg G, Simmons A, Napolitani G, Koohy H. 2020. Potential CD8+ T cell cross-reactivity against SARS-CoV-2 conferred by other coronavirus strains. *Front Immunol* 11:579480.
- Leite MM, Gonzalez-Galarza FF, Silva BCCD, Middleton D, Santos EJMD. 2021. Predictive immunogenetic markers in COVID-19. *Hum Immunol* S0198-8859(21)00015–X.
- Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, Wu Y, Li M, Zhang W, Zhou H, Zhang Z, Lin L, Kang Z, Yu T, Tian C, Qin R, Gui Y, Jiang F, Fan H, Heissmeyer V, Sarapultsev A, Wang L, Luo S, Hu D. 2020. Elevated exhaustion levels of NK and CD8+ T cells as indicators for progression and prognosis of COVID-19 disease. *Front Immunol* 11:580237.
- Liu L, Wang P, Nair MS, Yu J, Rapp M, Wang Q, Luo Y, Chan JF, Sahi V, Figueroa A, Guo XV, Cerutti G, Bimela J, Gorman J, Zhou T, Chen Z, Yuen KY, Kwong PD, Sodroski JG, Yin MT, Sheng Z, Huang Y, Shapiro L, Ho DD. 2020. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584(7821):450–456.
- Marín-Hernández D, Nixon DF, Hupert N. 2021. Anticipated reduction in COVID-19 mortality due to population-wide BCG vaccination: evidence from Germany. *Hum Vaccin Immunother* 5:1–3.
- Mason RJ. 2020. Thoughts on the alveolar phase of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 319(1): L115–L120.
- Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig L, Strunz B, Lentini A, Reinius B, Brownlie D, Cuapio A, Ask EH, Hull RM, Haroun-Izquierdo A, Schaffer M, Klingström J, Folkesson E, Buggert M, Sandberg JK, Eriksson LI, Rooyackers O, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J, Marquardt N, Hammer Q, Strålin K, Björkström NK. Karolinska COVID-19 Study Group. 2020. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol* 5(50): eabd6832.
- Mayora S, Zabaleta-Lanz M, Martínez W, Toro F, De Sanctis JB, García A. 2020. Lymphocyte subpopulations in Venezuelan patients infected with SARS-CoV-2. *Gac Méd Car* 128(Supl 1): S74–S78.
- Meftahi GH, Jangravi Z, Sahraei H, Bahari Z. 2020. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflamm-aging”. *Inflamm Res* 69(9):825–839.
- Morelli F, Meirelles LEF, de Souza MVF, Mari NL, Mesquita CSS, Dartibale CB, Damke GM, Damke E, da Silva VRS, Souza RP, Consolaro ME. 2021. COVID-19 infection in the human reproductive tract of men and nonpregnant women. *Am J Trop Med Hyg* 104(3):814–825.
- Mousavizadeh L, Ghasemi S. 2021. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 54(2):159–163.
- Niitsu T, Shiroyama T, Hirata H, Noda Y, Adachi Y, Enomoto T, Hara R, Amiya S, Uchiyama A, Takeda Y, Kumanogoh A. 2021. Cytomegalovirus infection in critically ill patients with COVID-19. *J Infect* 9: S0163-4453(21)00330–3.
- Oberhardt V, Luxenburger H, Kemming J, Schulien I, Ciminski K, Giese S, Csernalabics B, Lang-Meli J, Janowska I, Staniek J, Wild K, Basho K, Marinescu MS, Fuchs J, Topfstedt F, Janda A, Sogukpinar O, Hilger H, Stete K, Emmerich F,

- Bengsch B, Waller CF, Rieg S, Sagar, Boettler T, Zoldan K, Kochs G, Schwemmle M, Rizzi M, Thimme R, Neumann-Haefelin C, Hofmann M. 2021. Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Nature* 597(7875):268–273.
- Orumaa K, Dunne MR. 2021. The role of unconventional T cells in COVID-19. *Ir J Med Sci* 29:1–10.
- Poloni C, Szyf M, Cheishvili D, Tsoukas CM. 2021. ¿Are the healthy vulnerable? Cytomegalovirus seropositivity in healthy adults is associated with accelerated epigenetic age and immune-dysregulation. *J Infect Dis* 13: jiab365.
- Reche PA. 2020. Potential cross-reactive immunity to SARS-CoV-2 from common human pathogens and vaccines. *Front Immunol* 11:586984.
- Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. 2021. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol* 21(8):475–484.
- Sánchez-Mazas A. 2020- HLA studies in the context of coronavirus outbreaks. *Swiss Med Wkly* 150: w20248.
- Schulien I, Kemming J, Oberhardt V, Wild K, Seidel LM, Killmer S, Sagar, Daul F, Salvat Lago M, Decker A, Luxenburger H, Binder B, Bettinger D, Sogukpinar O, Rieg S, Panning M, Huzly D, Schwemmle M, Kochs G, Waller CF, Nieters A, Duerschmied D, Emmerich F, Mei HE, Schulz AR, Llewellyn-Lacey S, Price DA, Boettler T, Bengsch B, Thimme R, Hofmann M, Neumann-Haefelin C. 2021. Characterisation of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. *Nat Med* 27(1):78–85.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. 2020. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581(7807):221–224.
- Steiner S, Schwarz T, Corman VM, Sotzny F, Bauer S, Drosten C, Volk HD, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. 2021. Reactive T cells in convalescent COVID-19 patients with negative SARS-CoV-2 antibody serology. *Front Immunol* 12:687449.
- Taefehshokr N, Taefehshokr S, Hemmat N, Heit B. 2020. COVID-19: Perspectives on innate immune evasion. *Front Immunol* 11:580641.
- Tavasolian F, Rashidi M, Hatam GR, Jeddi M, Hosseini AZ, Mosawi SH, Abdollahi E, Inman RD. 2021. HLA, Immune response, and susceptibility to COVID-19. *Front Immunol* 11:601886.
- Udomsinprasert W, Jittikoon J, Sangroongruangsi S, Chaikledkaew U. 2020. Circulating levels of Interleukin-6 and Interleukin-10, but not Tumor Necrosis Factor-alpha, as potential biomarkers of severity and mortality for COVID-19: Systematic review with meta-analysis. *J Clin Immunol* 31:1–12.
- Vibholm LK, Nielsen SS, Pahus MH, Frattari GS, Olesen R, Andersen R, Monrad I, Andersen AH, Thomsen MM, Konrad CV, AndersenSD, Højten JF, Gunst JD, Østergaard L, Sjøgaard OS, Schleimann MH, Tolstrup M. 2021. SARS-CoV-2 persistence is associated with antigen-specific CD8+ T-cell responses. *EBioMedicine* 64:103230.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. 2020. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein. *Cell* 181(2):281–292.
- Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, Song S, Ma Z, Mo P, Zhang Y. 2020. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis* 221(11):1762–1769.
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367(6485):1444–1448.
- Ye Q, Wang B, Mao J. 2020. The pathogenesis and treatment of the Cytokine Storm in COVID-19. *J Infect* 80(6):607–613.
- Zhao C, Zhao W. 2020. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol* 11:211.
- Zhou M, Zhang X, Qu J. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A clinical update. *Front Med* 14(2):126–135.
- Zuo W, Zhao X. 2021. Natural killer cells play an important role in virus infection control: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application. *Clin Immunol* 227:108727.

Recibido: 01/08/2021
Aceptado: 03/08/2021

Chemical constituents of two Ecuadorian medicinal plants, *Tagetes terniflora* Kunth and *Croton rivinifolius* Kunth

Constituyentes químicos de dos plantas medicinales Ecuatorianas, *Tagetes terniflora* Kunth y *Croton rivinifolius* Kunth

ALÍRICA I SUÁREZ^{1,2}, VLADIMIR MOROCHO^{2*}, VLADIMIR LUNA², KATTY CASTILLO², CHABACO ARMIJOS^{2**}

Abstract

Phytochemical study of two medicinal plants from Ecuador, *Tagetes terniflora* Kunth, and *Croton rivinifolius* Kunth, led to the isolation and characterization of the major constituents present in the organic extracts obtained from these plants: 5-(4-acetoxy-1-butynil)-2,2'-bi-thiophene (1), 5-methyl-2,2':5',2''-terthiophene (2), patuletin (3) from *Tagetes terniflora*, and isocorydine (4), sweroside (5), tiliroside (6) from *Croton rivinifolius*. The structures of these compounds were established by spectroscopic analysis including two-dimensional NMR methods, MS, and comparison with published spectral data. They are recognized as secondary metabolites that represent the chemotaxonomy of *Tagetes* and *Croton* genera and could be responsible for the recognized medicinal properties attributed to these species. This paper deals with the first report that shows the presence of these compounds in these plants.

Keywords: Ecuador, *Croton rivinifolius*, *Tagetes terniflora*, metabolites, alkaloids

Resumen

El estudio fitoquímico de dos plantas medicinales de Ecuador, *Tagetes terniflora* Kunth y *Croton rivinifolius* Kunth, permitió aislar y caracterizar los principales componentes presentes en los extractos orgánicos obtenidos de estas plantas: 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2, 2'-bitienil (1), 5-metil-2,2', 5', 2'''- tertiofeno (2), patuletina (3) de *Tagetes terniflora* e isocoridina (4), swerosido (5), tilirosido (6) de *Croton rivinifolius*. Las estructuras de estos compuestos se establecieron mediante análisis espectroscópico incluyendo métodos de RMN bidimensional, EM y comparación con datos espectrales publicados. Los mismos son reconocidos como metabolitos secundarios que representan la quimiotaxonomía de los géneros *Tagetes* y *Croton* y podrían ser los responsables de las reconocidas propiedades atribuidas a estas especies. Este artículo trata del primer informe fotoquímico que señala la presencia de estos compuestos en estas plantas.

Palabras clave: Ecuador, *Croton rivinifolius*, *Tagetes terniflora*, metabolitos, alcaloides

1. Unidad de Productos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondence: alirica1@yahoo.es. ORCID: [0000-0002-3317-5179](https://orcid.org/0000-0002-3317-5179)
2. Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. ORCID: [*0000-0001-5156-0700](https://orcid.org/0000-0001-5156-0700) ORCID: [**0000-0002-3252-9932](https://orcid.org/0000-0002-3252-9932);

Introduction

Ecuador is recognized as one of the most biodiverse countries in the world, additionally, this is accompanied by a great wealth that includes ancestral customs in medicine. Traditional medicine comprises a historical, cultural, and social rootedness in the roots of a people. It is an anonymous heritage that is transmitted from generation to generation by oral communications, contributing to the continuation of their beliefs and practices, based on empirical knowledge about the environment. According to the World Health Organization (WHO), traditional medicine is the group of diverse knowledge, practices, approaches, and health beliefs that integrate medicines based on plants, animals or minerals, manual techniques and exercises applied individually or in combination to maintain well-being, as well as to treat, diagnose and prevent diseases (WHO, 2021).

In traditional medicine, several remedies used are made from wild plants whose chemical content may vary due to genetic or environmental reasons, giving rise to the term "medicinal plant". The WHO defines a medicinal plant as any plant species that contain substances that can be used for therapeutic purposes or whose active principles can serve as precursors for the synthesis of new drugs.

In Ecuador, plants have been a primordial resource for indigenous and peasant communities; it is estimated that 80% of the population depends on traditional medicine for primary health care and wellbeing. At present, peasant communities still depend directly or indirectly on plants to meet their food, medicine, and housing needs. The direct use of medicinal plants is lower in the cities; however, in the markets of the cities

and particularly in the Andean region, the use and commercialization of medicinal plants is still an active practice where around 273 species of medicinal herbs are sold (Ansaloni et al., 2010).

The genus *Tagetes* belonging to the big family Asteraceae, have species widespread around the world, many species endowed with pharmacological actions (Pryanka et al., 2013). Some authors mention that it originates from South America but has expanded from the southern United States to Argentina, and worldwide (Stefanazzi et al., 2006). This genus includes annual or perennial, erect and aromatic herbs with striated stems and pinnate leaves, and some shrubs; it is of great economic importance and includes species of edible and ornamental plants. Extracts of these species are characterized by their insecticidal and nematocidal (chemical pesticide) activity, in addition to their various pharmaceutical applications (Faizi et al., 2011; Lizarraga et al., 2017). The uses, biological activities as the major constituents present in their species are well documented (Tereschuk et al., 2003; Gupta and Vasuveda, 2012; Burlec et al., 2021). Four of the species in this genus are the most recognized and documented by researchers in different countries, *Tagetes erecta* (Gopi et al., 2012; Shetty et al., 2015; Singh et al., 2020), *Tagetes patula* (Riaz et al., 2020), *Tagetes minuta* (Schiavon et al., 2015), and *Tagetes lucida* (Lim, 2014).

Regarding the phytochemistry of these species, the nature of compounds regularly found in *Tagetes* is usually phenolic that include flavonoids, coumarins, acetylenic thiophenes, terpenes, and aromatic compounds. Many of these reported metabolites show important pharmacological actions (Takahashi et al., 2013).

Croton genus, belonging to the Euphorbiaceae family is a large genus distributed in tropical and subtropical areas of the world. Many species of *Croton* are used for medicinal purposes and proven pharmacological actions of extracts and pure compounds obtained from its species are well documented in the literature (Abega et al., 2014; Langat et al., 2020; Bezerra et al., 2020). The genus *Croton* comprises around 1200 species, being the second largest of the Euphorbiaceae family (Govaerts et al., 2000; Berry et al., 2005), and one of the most diverse, with many species endowed with medicinal properties (Salatino et al., 2007). America is considered, the continent with the major number of species, where only in Brazil more than 350 species have been documented (Van Ee et al., 2011). Regarding the number of *Croton* species in Ecuador, 39 species are recognized (Jørgensen and León-Yáñez 1999), and 13 of them are classified as native (León-Yáñez et al., 2011); however, several species have been documented in the last years (Smith, 2006; Riina et al., 2007, 2010, 2014, 2015). Many species under the *Croton* genus have been used in the traditional medicine of Ecuador (Bussman and Sharon, 2006; Bailon-Moscoso, et al., 2015). Studies on the biological activities, of species belonging to this genus from America, Asia, and Africa, have been proved as antimicrobial (Obey et al., 2016), antioxidant (Nath et al., 2013), anti-inflammatory (Suárez et al., 2006), anticancer (Suárez et al., 2009; Savietto et al., 2013), wound healing (Ximenes et al., 2013; Nascimento et al., 2017). Considering all the reports of new structures and proven pharmacological actions of species belonging to the genus *Croton*, this study of *Croton rivinifolius* has been considered as an opportunity for new findings.

The chemistry of *Croton* genus shows a high diversity of structures: diterpenes of different skeletons including crotofolanes (Chávez et al., 2013; Kawakami et al., 2015), clerodanes (Pizzolatti et al., 2013; Aldhaher et al., 2017; Qiu et al., 2018), kaurenes (Mora et al., 2011; Mateu et al., 2012; Pereira et al., 2012), labdanes (Bernardino et al., 2017), the more important structures in many species (Xu et al., 2018; Shi et al., 2018). Terpenes (Palmeira Júnior et al., 2006); alkaloids and flavonoids are also common in the genus (de Araújo-Júnior et al., 2004; Suárez et al., 2004; Cerqueira-Coelho et al., 2016).

Croton rivinifolius Kunth, is a native shrub widely disseminated in diverse provinces in Ecuador, the plant is used in traditional medicine to alleviate pains (Cerón Martínez, 2006). No studies with isolated compounds had been reported for this species; only one phytochemical screening indicates the presence of flavonoids as the major metabolites (Rondón et al., 2015). This is the first phytochemical study with isolation and characterization of their secondary metabolites.

Experimental

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Optical rotations were measured with an Automatic Polarimeter (Jinan Hanon Instruments Co. Ltd., Jinan, China) MRC P810. ^1H and ^{13}C , 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Varian Premium Shielded-400 spectrometer (400 MHz to ^1H and 100 MHz to ^{13}C). Chemical shifts were reported in δ (ppm), relative to the signal of tetramethylsilane (TMS) and coupling constants (J) in Hz. Thin Layer Chromatography (TLC) was performed

with aluminum pre-coated Si plates with fluorescence indicator in the range of 254 nm (F254) (Merck, Darmstadt, Germany). The MS data were acquired in an equipment GC/MS Agilent Technologies 6890N. The substances were revealed by spraying with a vanillin/H₂SO₄ solution, followed by heating with a hairdryer. Column chromatography normal phase was performed using Silica gel 60 (63–200 μm) from (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany), and RP-18 (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany, 40–63 μm) used as stationary phase for column chromatography in reverse phase. All organic solvents were bought in Brenntag (Brenntag, Guayaquil, Ecuador), and re-distilled before use.

PLANT MATERIAL

The aerial parts of *C. rivinifolius* were collected in the flowering stage in Celica Canton, province of Loja, Ecuador, in April 2016, at 2255 m.a.s.l. (Meters above sea level). The plant material was identified by Dr. Nixon Cumbicus and, voucher specimens (HUTPL8027) were deposited at the Herbarium HUTPL at Universidad Técnica Particular de Loja.

The *T. terniflora* species were collected in the province of Loja; Saraguro canton at the following coordinates 3°37'11.6 "S 79°14'23.3 "W. It was identified by Bolivar Merino of the Loja Herbarium (HUNL) and, voucher specimens (PPN-as-006) were deposited at the Herbarium HUTPL at Universidad Técnica Particular de Loja.

EXTRACTION AND ISOLATION

Tagetes terniflora

Air-dried and powdered leaves of *T. terniflora*, (526 g) were macerated with

methanol at room temperature for 72h. The solvent was filtered and evaporated under reduced pressure to obtain 13.36 g of crude methanol extract. This crude extract was re-dissolved in methanol: H₂O (1:1) and submitted to a partition extraction with solvents of increasing polarity to obtain the following amounts of different fractions: hexane (TTH) (2.02 g), dichloromethane (TTD) (0.67g), ethyl acetate (TTEt) (2.45g), and methanol/H₂O (TTM) (6.05g). The TLC analyses of the fractions showed that the hexane and the dichloromethane were the richest and interesting metabolites, and there were chosen to separate by column chromatography.

From TTH partition fraction 1.039g was taken and submitted to column chromatography using silica gel (100g), eluted with hexane increasing the polarity gradient with dichloromethane to 100% of this solvent to give 25 subfractions which were joined according to the similarity of their chromatographic profile, resulting in 7 fractions (TTH-1 to TTH-7). The fractions (TTH-1) and (TTH-3) considered pure were analyzed by GC/MS and NMR to offer the compounds: 5-methyl-2,2',5',2'''-terthiophene (4) (Takahashi et al., 2011) and 5-(4-acetoxy-1-butynil)-2,2'-bitienil (5) (Takahashi et al., 2011) which structures are shown Figure 1.

The (TTD) fraction was submitted to column chromatography on silica gel (50 g) eluted with dichloromethane increasing the polarity with ethyl acetate until reaching CH₂Cl₂/EtOAc (9:1). Three subfractions were obtained after TLC analysis and the subfraction (TTD2) by NMR analysis showed to be the methoxylated flavonoid patuletin (6) (Abdel-Wahhab et al., 2005).

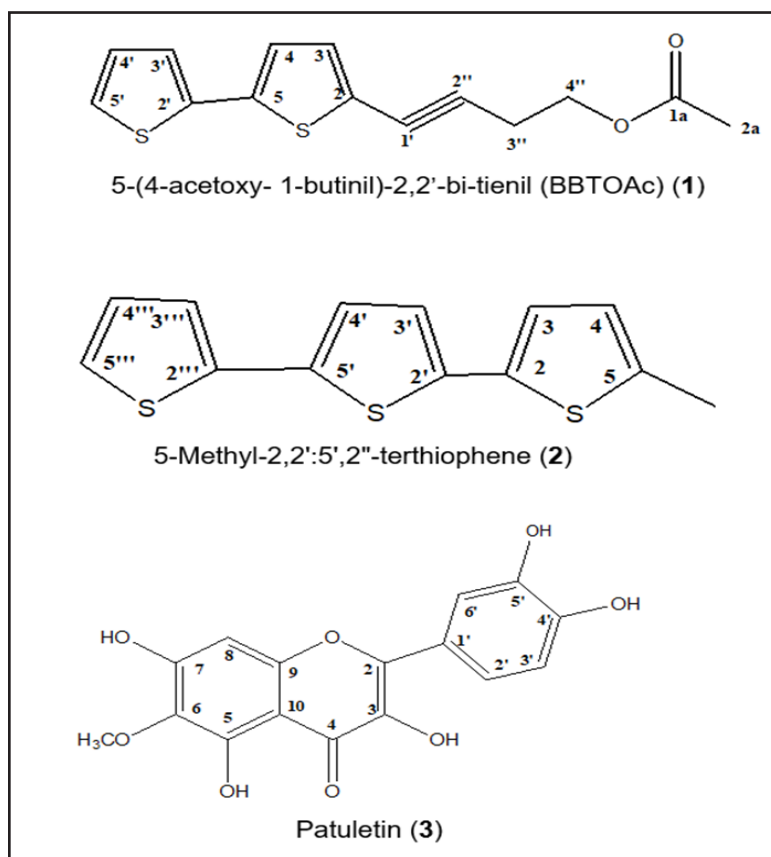


Figure 1. Isolated compounds from *Tagetes terniflora*

Croton rivinifolius

A similar procedure to the one previously described was carried out with *C. rivinifolius* using (923.38 g) of leaves. The solvent was evaporated under reduced pressure in rotary evaporator equipment; to finally obtain 101.34g of extract. From that crude (44.58g) were re-dissolved in a 1:1 water/methanol mixture and then partitioned with hexane, dichloromethane, and ethyl acetate successively, to give fractions of each solvent, hexane (CRH) (9.98 g), dichloromethane (CRD) (1.76 g) ethyl acetate (CREt) (7.54 g), and methanol/H₂O (CRM) (21.36 g). After TLC analyses of the different fractions, the CH₂Cl₂ and EtOAc fractions were considered the richer and more interesting to separate in the first place, but both, showed to have many compounds with similar R_f, making

difficult the separation. For this reason, these fractions were saved for GC analysis before deciding the separation. Ethyl acetate extract (2 g) was subjected to a first gross separation in a CC with silica gel and increasing polarity of elution from (99:1) EtOAc: MeOH to finish with (90:10 EtOAc/MeOH), 77 fractions (CREtI-01/CREtI-77) were collected. After TLC analysis the fractions were pooled according to the same behavior on the TLC plate, to give 10 subfractions (CREtII-1/CREtII-10). The two subfractions with a big amount were further purified by chromatography. The less polar subfraction (CREtII-1) (235 mg) after purification with silica gel eluted by the isocratic way with EtOAc/MeOH 99:1, gave the compound sweroside (5) (65.6 mg) (Joshi, 2013). The fraction CREtII-3 (324 mg) gave after evaporation a yellow solid which was recrystallized in MeOH to give the pure tiliroside (6) (82.5 mg) (Luhata et al., 2016; Devi and Kumar, 2018).

Finally, the alkaloid isocorydine (4), was obtained from the methanolic fraction, part of the methanol extract (CRM) (0.5g), was subjected to CC over reverse phase RP-18, using H₂O/CH₃OH (6:4), to obtain as a major compound (50.3 mg) a colorless solid identified by spectroscopy analysis as the aporphine alkaloid isocorydine (Zhong et al., 2014) (Figure 2).

SPECTROSCOPIC DATA

5-(4-acetoxy-1-butynil)-2,2'-bi-tienil (BBTOAc) (1). Brown oil; C₁₅H₁₄S₂O₂. EIMS m/z 276 [M]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.22 (1H, dd, *J* = 4.0, 1.2 Hz, H-5'), 7.15

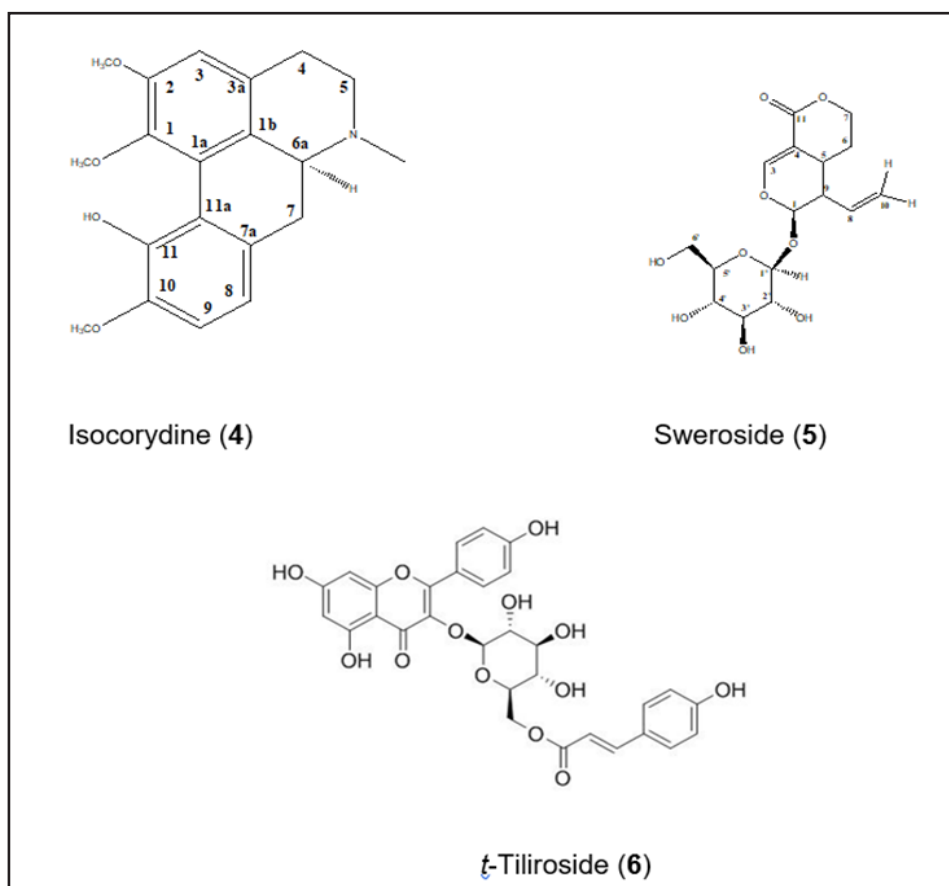


Figure 2. Isolated compounds from *Croton rivinifolius*

(1H, dd, $J = 4.0, 1.2$ Hz, H-4'), 7.05 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-3'), 7.01 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 6.95 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4), 4.24 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-4''), 2.78 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-4''), 2.10 (3H, s, H-2a); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 171.0 (C-1a), 138.2 (C-2), 136.9 (C-2'), 132.6 (C-4), 128.0 (C-4'), 125.0 (C-3'), 124.3 (C-5'), 123.4 (C-3), 122.2 (C-5), 90.7 (C-1''), 75.3 (C-2''), 62.2 (C-4''), 21.0 (C-2a), 20.4 (C-3'').

5-Methyl-2,2':5',2''-terthiophene (2). Brown oil; $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{S}_3$, EIMS m/z 262 [M]⁺, ^1H -NMR δ : 7.20 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, H-5''), 7.18 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4''), 7.17 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-4), 7.15 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4'), 7.05 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3''), 6.95 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3'), 6.65 (1H, dd, $J = 3.6, 1.2$ Hz, H-4), 2.49 (3H, s, CH_3). ^{13}C -NMR δ : 139.5 (C-5), 137.4 (C-5'), 137.2 (C-2''),

136.4 (C-2'), 135.7 (C-2), 128.0 (C-3), 127.9 (C-4''), 126.2 (C-3''), 124.6 (C-4'), 124.5 (C-4), 123.8 (C-3'), 123.7 (C-5''), 15.6 (5-Me).

Patuletin (3), ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ : 12.3 (1H, brs, 5-OH), 7.74 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-6'), 7.63 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 3.91 (3H, s, OCH_3). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ : 177.7 (C-4), 158.5 (C-9), 153.6 (C-5), 148.9 (C-2), 146.5 (C-3'), 137.1 (C-3), 132.2 (C-6), 123.9 (C-1'), 115.9 (C-2'), 115.8 (C-5'), 105.1 (C-10), 94.7 (C-8), 61.3 (OCH_3).

Isocorydine (4). Colorless crystals, mp: 184–186 °C; $[\alpha]^{24} + 215.0$ (c 0.1, MeOH); $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$, EIMS: m/z [M + H]⁺ + 342. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.70 (1H, s, H-3), 3.21 (1H, brs, H-4a), 2.72 (2H, 2d,

$J = 3.6$ Hz, H-4b), 3.02 (1H, 2d, $J = 3.6$ Hz, H-5b), 2.49 (1H, brs, H-5b), 2.89 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-6a), 3.03 (1H, m, H-7a), 2.45 (1H, m, H-7b), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 3.70 (3H, s, 1-OCH₃), 3.91 (3H, s, 2-OCH₃), 2.54 (3H, s, NCH₃), 3.91 (3H, s, 10-OCH₃), 9.0 (1H, s, 11-OH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 151.3 (C-2), 146.4 (C-10), 146.4 (C-11), 142.0 (C-1), 130.5 (C-3b), 130.5 (C-7a), 129.1 (C-3a), 125.9 (C-1a), 120.2 (C-1b), 120.0 (C-8), 111.4 (C-9), 111.3 (C-3), 63.0 (C-6a), 63.0 (1-OCH₃), 52.9 (C-5), 56.1 (2-OCH₃), 56.0 (10-OCH₃), 44.0 (N-CH₃), 35.7 (C-7), 29.4 (C-4).

3-O- β -D-glucopyranosyl sweroside (5)
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ : 7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 5.56 (2H, d, $J = 1.6$, H-8), 5.55 (2H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1), 5.32 (1H, dd, $J = 2.0, 16.8$ Hz, H-10a), 5.26 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-10b), 4.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.89 (1H, dd, $J = 10.0, 7.2$ Hz, H6'a), 3.67 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.65 (1H, dd, $J = 10.0, 7.2$ Hz, H-6'b), 3.43 (1H, m, H-5'), 1.71 (2H, m, H-6), 4.41 (2H, m, H-7), 3.22 (1H, dd, $J = 8.0, 8.8$ Hz, H-2'), 3.31 (1H, m, H-4'), 2.72 (1H, m, H-9), 1.71 (1H, m, H-6). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ : 168.5 (C-11), 153.9 (C-3), 133.3 (C-8), 106.0 (C-4), 120.8 (C-10), 97.9 (C-1), 99.7 (C-1'), 78.6 (C-5'), 77.8 (C-3'), 74.7 (C-2'), 71.5 (C-4'), 69.7 (C-7), 62.6 (C-6'), 43.8 (C-9), 28.4 (C-5), 25.9 (C-6).

t-Tiliroside (6): C₃₀H₂₆O₁₃; amorphous yellow solid; mp 268-270 °C; MS m/z 594 [M⁺]; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 7.98 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 7.39 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-7'''), 7.30 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2''' and H-6'''), 6.81 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5'), 6.79 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3''' and H-5'''), 6.30 (1H, brs, H-8), 6.13 (1H, brs, H-6), 6.03 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-8'''), 5.23 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''),

4.30 (1H, dd, $J = 11.8, 1.9$ Hz, H-6 β '), 4.18 (1H, dd, $J = 11.6, 6.6$ Hz, H-6 α '), 3.55 (1H, m, H-5''), 3.46 (1H, m, H-3''), 3.45 (1H, m, H-2''), 3.44 (1H, m, H-4''); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 159.4 (C-2), 135.2 (C-3), 179.4 (C-4), 168.8 (C-9'''), 165.9 (C-7), 162.9 (C-9), 158.5 (C-5), 146.6 (C-7'''), 133.7 (C-6'''), 133.2 (C-2'''), 132.2 (C-2', C-6'), 131.2 (C-4'''), 127.2 (C-1'''), 122.7 (C-1'), 116.2 (C-3', 6'), 116.8 (C-8'''), 116.0 (C-5'''), 116.0 (C-3', C-5'), 114.7 (C-3'''), 105.6 (C-10), 103.9 (C-1''), 99.9 (C-6), 94.8 (C-8), 77.9 (C-5''), 75.8 (C-4''), 75.7 (C-2''), 71.7 (C-3''), 63.9 (C-6'').

Results and discussion

The 5-(4-acetoxy-1-butynyl)-2,2'-bithienil (BBTOAc) (1), 5-methyl-2,2':5',2''-terthiophene (2), patuletin (3), Isocorydine (4), 3-O- β -D-glucopyranosyl sweroside (5), and tiliroside (6), are known compounds previously described in plant species, but exposed for the first time for *Tagetes terniflora* and *Croton rivinifolius*.

These preliminary results constitute these first phytochemical studies of *Tagetes terniflora* and *Croton rivinifolius*, showing that in both cases, the secondary metabolites isolated and characterized are under the family of compounds regularly found in species of *Tagetes* and *Croton* genus. The thiophenes such as the compounds (1) and (2) are characteristic compounds found in *Tagetes* species, and they have been reported with pharmacological actions (Muzzoli et al., 2001; Takahashi et al., 2013; Vázquez-Atanacio et al., 2021). The flavonoids are a kind of compound with many biological actions and some of them, especially the methoxylated flavonoids are common in *Tagetes*, and in this case,

patuletin (**3**) represents one of these (Jabeen et al., 2016; Alvarado-Sansininea, 2018; Zarei et al., 2018).

Croton is one of the biggest genera under the Euphorbiaceae, and the richness in the chemistry of their secondary metabolites had been exposed in many reports of the phytochemistry related to it. Alkaloids of different classes are common (Suárez et al., 2004; Xu et al., 2018) and the wide spectra of pharmacological activities of these compounds are undeniable. In this case, the isocorydine (**4**) has been reported with cytotoxic (Sun et al., 2014; Zhong et al., 2014) and anti-arrhythmia effects (Wang et al., 2016). The tiliroside (**6**) is a ubiquitous flavonoid under this genus, and it is a compound with probed actions in different biological research (Luhata and Luhata, 2017; Grochowski et al., 2018). Regarding the sweroside (**5**) belonging to the iridoids, they are not common in the genus but are also metabolites with interesting results in investigations that trying to deal with biological activities (Hussain et al., 2019; Arraché-Gonçalves et al., 2021). The results here exposed shown that all the metabolites found in these two Ecuadorian medicinal plants, are considered under the chemotaxonomy of both genus, and they could be responsible for the medicinal properties attributed by the people to these species. The characterization of other compounds present in these species is undergoing in our lab, as well research that deal with the toxicity and biological actions of the compounds here reported.

References

- Abega DF, Kapche DWFG, Ango PY, Mapitse R, Yeboah SO, Ngadjui NT. 2014. Chemical's constituents of *Croton oligandrum* (Euphorbiaceae). *Z Naturforsch C* 69: 181–185.
- Abdel-Wahhab M, Said A, Huefner A. 2005. NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from *Urtica urens* Against Aflatoxin B1. *Pharm Biol* 43(6): 515–525.
- Aldhafer A, Langat M, Ndunda B, Chirchir D, Midiwo JO, Njue A, Schwikkard S, Carew M, Mulholland D. 2017. Diterpenoids from the roots of *Croton dichogamus* Pax. *J Phytochem* 144:1–8.
- Alvarado-Sansininea JJ, Sánchez-Sánchez L, López-Muñoz H, Escobar ML, Flores-Guzmán F, Tavera-Hernández R, Manuel Jiménez-Estrada M. 2018. Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules* 23: 2579.
- Ansaloni R, Wilches I, León F, Orellana A, Peñaherrera E, Tobar V, De Witte P. 2010. Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañary Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Rev Tecnológica ESPOL* 23:89–97.
- Arraché-Gonçalves G, Eifler-Lima VL, von Poser GL. 2021. Revisiting nature: a review of iridoids as a potential antileishmanial class. *Phytochem Rev* 1–26.
- Bailon-Moscoso N, Romero-Benavides JC, Tinitana-Imaicela F, Ostrosky-Wegman O. 2015. Medicinal plants of Ecuador: a review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Med Chem Res* 24 (6): 2283–2296.
- Bernardino ACSS, Teixeira AMR, Menezes JESA, Pinto CCC, Santos HS, Freire PTC, Coutinho HDM, Sena-Junior DM, Bandeira PN, Braz-Filho R. 2007. Spectroscopic and microbiological characterization of labdane diterpene 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione isolated from the stems of *Croton jacobinensis*. *J Mol Struc* 1147: 335–344.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. 2005. Molecular Phylogenetics of the Giant Genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-trnF DNA Sequence Data. *Ame J Botany* 92(9): 1520–1534.
- Bezerra FWF, Bezerra PdN, de Oliveira MS, da Costa WA, Ferreira GC, de Carvalho LN. 2020. Bioactive Compounds and Biological Activity of *Croton* Species (Euphorbiaceae): An Overview. *Current Bioactive Compounds* 16(4):383–393.
- Burlec AF, Pecio L, Kozachok S, Mircea C, Corciová A,

- Verestiuc L, Cioancă O, Oleszek W, Hăncianu M. 2021. Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Tagetes erecta* L. Flowers. *Molecules* 26: 1201.
- Bussmann RW, Sharon D. 2006. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *J Ethnobot Ethnomedicine* 2:44.
- Cerón Martínez CE. 2006. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Editores: M Moraes, RB Øllgaard, LP Kvist, F Borchsenius, H. Balslev Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 285–293.
- Cerqueira-Coelho PL, Villas-Boas de Freitas SR, Pitanga BPS, et al. 2016. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Rev Bras Farmacog* 26;34–43.
- Chávez K, Riina R, Compagnone RS, Suárez AI, Briceño A, Gonzalez T, Landaeta C, Squitieri E. 2013. Crotofolanes diterpenes from *Croton caracasana*, *Nat Prod Comm* 8(12):1679–1682.
- Devi S, Kumar V. 2018. Comprehensive structural analysis of cis- and trans-tiliroside and quercetin from *Malvastrum coromandelianum* and their antioxidant activities. *Arabian J Chem* 13: 1720–1730.
- Faizi S, Fayyaz S, Bano S, Iqbal EY, Lubna, Siddiqi H, Naz A. 2011. Isolation of Nematicidal Compounds from *Tagetes patula* L. Yellow Flowers: Structure Activity Relationship Studies against Cyst Nematode *Heterodera zaeae* Infective Stage Larvae *J Agric Food Chem* 59:9080–9093.
- Gopi G. 2012. A concise review on *Tagetes erecta* (L). *Int J Phytopharm Res* 3(1):16–9.
- Govaerts R, Frodin DG, Radcliffe-Smith A. 2000. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae), Vol.1–4. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Grochowski DM, Locatelli M, Granica S, Cacciagrano F, Tomczyk M. 2018. A Review on the Dietary Flavonoid Tiliroside. *1416 Comp Rev in Food Sci Food Saf* 17:1395–1421.
- Gupta P, Vasudeva N. 2012. Marigold A Potential Ornamental Plant Drug. *Hamdard Medicus* 55(1): 45-59. *Pharm Biol* 48(11): 1218–1223.
- Hussain H, Green IR, Saleem M, Raza ML, Nazir M. 2019. Therapeutic Potential of Iridoid Derivatives: Patent Review. *Inventions* 4:29:4020029.
- Jabeen A, Mesaik MH, Simjee SU, Lubna, Bano S, Faizi S. 2016. Anti-TNF- α and anti-arthritic effect of patuletin: A rare flavonoid from *Tagetes patula*. *Intern Immunopharmacol* 36:232–240.
- Jørgensen PM, León-Yáñez S. 1999. Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 75: 1–1181.
- Joshi RK. 2013. New Iridoid glycosides from *Wendlandia puberula*. *J Applic Chem* 2 (3):567–572.
- Kawakami S, Inagaki M, Matsunami K, Otsuka H, Kawahata M, Yamaguchi K. 2015. Crotofolane-type diterpenoids, crotoascarins L–Q, and a rearranged crotofolane-type diterpenoid, neocrotoascarin, from the stems of *Croton cascarilloides*. *Chem Pharm Bull* 64: 1492–1498.
- Langat M K, Djuidjed EFK, Ndundae BM, Isyaka SM, Dolan et al. 2020. The phytochemical investigation of five African *Croton* species: *Croton oligandrus*, *Croton megalocarpus*, *Croton menyharthii*, *Croton rivularis* and *Croton megalobotrys*. *Phytoch Letters* 40:148–155.
- León-Yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa Ulloa C, Navarrete H. (eds.). 2011. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2ª edición. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. pp. 317–325.
- Lim TK. 2014. *Tagetes lucida*. In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Springer, Dordrecht.
- Lizarraga E, Mercado MI, Galvez C, Ruiz AI, Ponessa GI, Catalan CAN. 2017. Morpho anatomical characterization and essential oils of *Tagetes terniflora* and *Tagetes minuta* (asteraceae) growing in Tucumán (Argentina). *Bol Soc Argent Bot* 52 (1): 55–68.
- Luhata L, Munkombwe N, Hatwiko H. 2016. Isolation and 1H-NMR identification of a tiliroside from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *J Pharmacog Phytochem* 5(1): 206–210.
- Luhata LP, Luhata WG. 2017. Tiliroside: Biosynthesis, Bioactivity and Structure-Activity Relationship (SAR) - A Review. *J Phytopharmacol* 6(6): 343–348.
- Mateu E, Chávez K, Riina R, Compagnone RS, Delle Monache F, Suárez AI. 2012. New 3,4-Seco-ent-kaurene Dimers from *Croton micans*, *Natural Product Communications* 7 (1):5–8.
- Mora S, Castro V, Poveda L, Chavarría M, Murillo R. 2011. Two New 3,4-Seco-ent-kaurenes and Other Constituents from the Costa Rican

- Endemic Species *Croton megistocarpus*. Helvetica Chimica Acta 94:1888–1892.
- Muzzoli M, Sacchetti G. 2001. Biological activity of four thiophene compounds in resting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Pharm Biol 39(1): 40–42.
- Nascimento AM, Maria-Ferreira D, Dal-Lin FT, Kimura A, Werner MF, Lacomini M Sasaki, GL, Cipriani TR, de Souza LM. 2017. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. J Pharm Biomed Anal 145: 821–830.
- Nath R, Roy S, Biplad DE, Choudhury MD. 2013. Anticancer and antioxidant activity of *Croton*: A review. Intern J Pharm Pharma Sci 5:63–70.
- Obey JK, Wright A, Orjala J, Kauhanen J, Tikkanen-Kaukanen C. 2016. Antimicrobial Activity of *Croton macrostachyus* Stem Bark Extracts against Several Human Pathogenic Bacteria. J Pathogens Article ID 1453428.
- Palmeira Júnior SF, Alves VL, Moura FS, Vieira L, Conserva LM, Lemos RPL. 2006. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). Rev Bras Farmacogn 16(3): 397–402.
- Pereira S, Taleb-Contini, Coppede J, Pereira P, Bertoni B, Suzelei França S, Pereira AM. 2012. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. Molecules 17: 8851–8858.
- Pizzolatti MG, Bortoluzzi AJ, Brighente IMC, Zuchinalli A, Carvalho FK, Candido ACS, Peres MTL. 2013. Clerodane Diterpenos de la corteza de *Croton urucurana* Baillon. J Braz Chem Soc 24 (4): 609–614.
- Pryanka D, Shalini T, Navneet VK. 2013. A Brief Study of Marigold (*Tagetes* Species) A Review. IRJP 4(1): 43–48.
- Qiu M, Jin J, Zhou L, Zhou W, Liu Y, Tan Q, Cao D, Zhao Z. 2018. Diterpenoids from *Croton crassifolius* include a novel skeleton possibly generated via an intramolecular [2+2] photocycloaddition reaction. Phytochemistry 145:103–110.
- Riaz M, Ahmad R, Rahman NU, Khan Z, Dou D, Sechel G, Manea R. 2020. Traditional uses, Phytochemistry and pharmacological activities of *Tagetes patula* L. J Ethnopharmacol 12 (255):112718.
- Riina R, Berry PE, Cornejo X. 2007. A new species of “sangre de drago” (*Croton* section *Cyclostigma*, Euphorbiaceae) from coastal Ecuador. Brittonia 59: 97–101.
- Riina R, Berry PE. 2010. Two new South American species of *Croton* (Euphorbiaceae) and their phylogenetic affinities. Anal Jardín Bot Madrid 67: 23–27.
- Riina R, Vigo MA, Cerón CE. 2014. *Croton condorensis*: an enigmatic new species of Euphorbiaceae from southern Ecuador. Phytotaxa 164 (2): 154–158.
- Riina R, Cumbicus N, Feio AC, Cerón CE, Meira RMSA, Berry PE. 2015. A new species of dragon’s blood *Croton* (Euphorbiaceae) from South America with singular inflorescences. Webbia 70:187–192.
- Rondón M, García I, Cornejo X, Rojas J, Terán W. 2015. Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. Pharm Online 3:19–28.
- Salatino A, Faria M, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry, and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). J Brazi Chem Soc 18:11–33
- Savietto JP, Furlan CM, Motta LB, Salatino MLF, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Salatino A, Santos DYAC. 2013. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. Braz J Pharmacogn 23(4): 662–66.
- Schiavon DBA, Schuch LFD, Faccin Â, Gonçalves CL, Vieira VSC, Gonçalves HP. 2015. Revisão sistemática de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae): Uso popular, composição química e atividade biológica. Sci Animal Health 3(2): 192–208.
- Shetty LJ, Sakr FM, Al-Obaidy K, Patel MJ, Shareef H. 2015. A brief review on medicinal plant *Tagetes erecta* Linn. J App Phar Sci 5 (Suppl 3): 91–95.
- Shi S, Zhang H, Li S, Liu, Q, Song S. 2018. Review: diterpenoids from *Croton* genus (Euphorbiaceae) and their biological activity. Asian J Tradl Medi 13(6): 242–262.
- Singh Y, Gupta A, Kannoja P. 2020. *Tagetes erecta* (Marigold) - A review on its phytochemical and medicinal properties. Curr Med Drug Res 4(1):1–6.
- Smith BA. 2006. A New Species of *Croton* (Euphorbiaceae) from Ecuador. Novon: J Botan Nomencl 16(2): 272–275.
- Stefanazzi N, Gutiérrez MM, Stadler T, Bonini NA, Ferrero AA. 2006. Actividad Biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteracea) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). Bol San Veg (Plagas) 32:439–447.
- Suárez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone

- RS. 2004. Three New Glutarimide Alkaloids isolated From *Croton cuneatus*. *Nat Prod Res* 18: 421–426.
- Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 105: 99–101.
- Suárez AI, Chávez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis JB. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Comm* 4: 1547–1550.
- Sun R, Jiang H, Zhang W, Yang K, Wang C, Fan L, Geng Z. 2014. Cytotoxicity of aporphine, protoberberine, and protopine alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Med* 2014:1–6.
- Takahashi HT, Britta EA, Longhini R, Ueda-Nakamura T, Palazzo de Mello JC, Nakamura CV. 2013. Antileishmanial activity of 5-methyl-2,2':5',2''-terthiophene isolated from *Porophyllum ruderale* is related to mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. *Planta Med* 79(5):330–333.
- Takahashi HT, Novello CR, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Palazzo-de Mello JC, Vataru Nakamura CV. 2011. Thiophene Derivatives with Antileishmanial Activity Isolated from Aerial Parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules* 16:3469–3478.
- Tereschuk ML, Baigori MD, Abdala LR. 2003. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 404–406.
- de Araújo-Júnior VT, da Silva MS, da-Cunha EVL, Fátima Agra MF, Silva-Filho RN, Barbosa-Filho JM, Raimundo Braz-Filho R. 2004. Alkaloids and Diterpenes From *Croton moritibensis*. *Pharm Biol* 42(1): 62–67.
- Van Ee BW, Riina R, Berry PEA. 2011. revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60 (3): 791– 823.
- Vázquez-Atanacio MJ, Bautista-Ávila M, Velázquez-González C, Araceli Castañeda-Ovando A, González-Cortazar M, Carolina Guadalupe Sosa-Gutiérrez CG, Ojeda-Ramírez D. 2021. *Porophyllum* Genus Compounds and Pharmacological Activities: A Review. *Sci Pharm* 89(7): 1–14.
- Wang H, Ma Y, Huang Q, Kong S, Wang H, Lin D. 2016. Effect of isocorydine on arrhythmia in rats induced by myocardial ischemia/reperfusion injury *Chin Pharmacol Bull* 32(9):1268–1271.
- WHO (www.WHO.int/health-topic. Rev 07/05/2021)
- Ximenes RM, de Moraes Nogueira L, Cassundé NM, Jorge RJ, dos Santos SM, Magalhães LP, Silva MR, de Barros Viana GS, Araújo RM, de Sena KX, de Albuquerque JF, Martins RD. 2013. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. *J Nat Med* 67(4):758–64.
- Xu WH, Liu WY, Liang Q. 2018. Chemical Constituents from *Croton* Species and Their Biological Activities. *Molecules* 23:2333.
- Zarei M, Mohammadi S, Komaki A. 2018. Antinociceptive Activity of *Inula britannica* L. and Patuletin: In vivo and Possible Mechanisms Studies. *J Ethnopharmacol* 219 (12): 351–358.
- Zhong M, Liu Y, Liu J, Di D, Xu M, Yang Y, Li W, Chen Y, Liu J. 2014. Isocorydine Derivatives and Their Anticancer Activities. *Molecules* 19: 12099–12115.

Recibido: 28/04/2021

Aceptado: 21/05/2021

Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la activación de las ERK 1/2 renal de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina

Effects of the aqueous extract of *Ruellia tuberosa* L. root on renal ERK 1/2 activation in streptozotocin-induced diabetic rats

CARLOS CIANGHEROTTI^{1*}, MARIELLA PASTORELLO^{1**}, GIOVANNINA ORSINI^{2***}, LOURDES PERDOMO⁵, MARCO ÁLVAREZ⁵ Y ANITA ISRAEL^{1****}

Resumen

La nefropatía es una de las complicaciones más importantes de la diabetes, la cual puede conducir a la muerte. Las kinasas activadas por mitógenos (MAPK) son conocidos mediadores del daño renal en la diabetes, cuya activación (fosforilación) se encuentra asociada al aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, entre otras) y a la fibrosis renal. Recientemente, se ha establecido a la planta *Ruellia tuberosa* L. como antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética y nefroprotectora en varios modelos experimentales. En este trabajo se evaluó el efecto del tratamiento con 10 mg/kg/día, p.o. del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) durante cuatro semanas, sobre la fosforilación de la ERK 1/2 en la corteza renal de ratas control y con diabetes tipo I inducida por la estreptozotocina y se vinculó con los marcadores de la fibrosis renal tales como el aumento del peso del riñón, contenido de proteínas totales y de colágeno I. Los resultados demuestran que el tratamiento con RT previno el aumento de la fosforilación de las ERK 1/2, del peso del riñón, y del contenido de proteínas y de colágeno I renal por en la diabetes inducida por ETZ. Los hallazgos contribuyen a la elucidación de los mecanismos por los cuales *R. tuberosa* protege al riñón frente a la diabetes, estableciéndose así la actividad antifibrótica de esta especie utilizada en la medicina popular venezolana.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., kinasas activadas por mitógenos, fibrosis renal.

Abstract

Nephropathy is one of the most important complications of diabetes, which can lead to death. Mitogen-activated kinases (MAPK) are known mediators of kidney damage in diabetes, whose activation (phosphorylation) is associated with increased synthesis of extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin, among others) and kidney fibrosis. Recently, the *Ruellia tuberosa* L. plant has been characterized as antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and nephroprotective in several experimental models. In this work, we assessed the effect of treatment with 10 mg/kg/day, p.o., of the aqueous extract of *R. tuberosa* (RT) root for four weeks, on ERK 1/2 phosphorylation in the renal cortex of control rats and with type I diabetes induced by streptozotocin and was linked to markers of renal fibrosis such as increased kidney weight, total protein content, and collagen I. Results demonstrate that RT treatment prevented ETZ-induced diabetes increases of ERK 1/2 phosphorylation, kidney weight, protein content, and renal collagen I. Our findings contribute to the elucidation of the mechanisms by which *R. tuberosa* protects the kidney against diabetes, thus establishing the antifibrotic activity of this species used in Venezuelan folk medicine.

Keywords: *Ruellia tuberosa* L., Mitogen-activated kinases, renal fibrosis

1. Unidad de Neuropéptidos. 2. Herbario "Víctor Manuel Ovalles", Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 3. Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela

Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com, astern88@gmail.com.

ORCID: *0000-0003-3760-8645 ; **0000-0002-2805-3783 ; ***0000-0001-8932-9942 ; ****0000-0003-1812-0759

Introducción

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes, que afecta alrededor del 30% de los pacientes con diabetes tipo 1 y el 20% de los pacientes con diabetes tipo 2 (Molitch y col., 2004). También es la principal causa de insuficiencia renal terminal en todo el mundo, y representa más del 50% de los pacientes en terapia de reemplazo renal a nivel mundial (Eboh y Chowdhury, 2015). Se han identificado varios mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de ND. Efectivamente, en el riñón de los pacientes con ND se producen una variedad de alteraciones, bioquímicas, como el incremento de producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs), el incremento intracelular de los productos finales de glicación avanzada (AGE), el incremento de la expresión de los receptores AGE, la autooxidación de la glucosa, la activación de la vía del poliol (sorbitol aldosa reductasa) y la hiperactividad de la vía de la hexosamina (Wolff y col., 1991; Chung y col., 2003; Sifuentes-Franco y col., 2018). Igualmente, debido a la alteración metabólica inducida por hiperglicemia, se reduce la actividad de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD). Como consecuencia de la respuesta descontrolada frente al estrés oxidativo se produce, de forma directa o indirecta, daño e insuficiencia renal (Ha y Kim, 1999). Aún más, como respuesta continua frente al estrés oxidativo, se reduce la degradación de la matriz extracelular (MEC), lo que promueve que las células epiteliales tubulares se diferencien a miofibroblastos, lo que conduce a la fibrosis renal (Turgut y Bolton, 2010). Todos estos cambios inducidos por la hiperglicemia están relacionados a la activación de vías de

señalización selectas, entre las que destacan la del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Ej.: las ERK), la angiotensina II (ANG II), la proteína kinasa C (PKC), el diacilglicerol (DAG), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la janus kinasa (JAK) (Schrijvers y col., 2004; Kanwar y col., 2005; Jha y col., 2016). En las células mesangiales, se ha relacionado a la hiperglicemia y la producción no controlada de EROs con la activación de una variedad de vías de señalización, que incluyen la vía del NF- κ B, las MAPK y la activación de isoformas de PKC. La activación de estas vías resulta en la prolífica secreción de factores inflamatorios, que también pueden promover la progresión de ND (Ha y Kim, 1999; Evans y col., 2002; Cheng y col., 2013).

Ahora bien, la proliferación de los fibroblastos, la expresión alterada y la sobre deposición de la matriz extracelular contribuyen a la fibrosis renal progresiva durante la diabetes. La sobreproducción de colágeno, como el principal contribuyente de la fibrosis renal, es regulada por varios factores fibrogénicos como TGF- β y las metaloproteinasas de la matriz (MMP). El TGF- β es la principal citoquina que impulsa fibrosis en el riñón y otros órganos susceptibles a lesiones fibróticas, como el pulmón y el hígado. El TGF- β es una citoquina clave que participa en la patogenia de la fibrosis tubulointersticial, que media la síntesis de proteínas de la matriz extracelulares (MEC), como el colágeno de los tipos I, II y IV, y la fibronectina (FN). Los mecanismos involucrados en la señalización de TGF- β , proporcionan un vínculo entre TGF- β activado en la superficie celular y sus efectos aguas abajo, como la

producción de MEC en presencia de alta glucosa. Al respecto, Nerlich y Schleicher (1991) demostraron un incremento de la inmunoreactividad del colágeno IV y la fibronectina en la matriz mesangial de riñones de pacientes diabéticos en comparación con riñones de individuos sanos. Asimismo, Wahab y col. (1996) reportaron este mismo incremento, en células mesangiales humanas cultivadas bajo un ambiente de alta glucosa. El aumento de la expresión del colágeno IV inducido por glucosa ha sido también observado en los podocitos renales (Iglesias-de la Cruz y col., 2002), en células de epitelio tubular (Skill y col., 2004) y en células mesangiales (Baccora y col., 2007) a partir de modelos animales; así como también en riñones de ratas con diabetes inducida por ETZ (Kamalakkannan y col., 2006). Por otra parte, las células del epitelio tubular sufren inhibición de la proliferación y apoptosis bajo un ambiente prolongado de altas concentraciones de glucosa, esto acompañado de un incremento del estrés oxidativo (Park y col., 2001; Allen y col., 2003; Verzola y col., 2004).

Se ha demostrado que en la señalización de TGF- β participan la vía de la MAPK, la cual consta de varias cascadas de fosforilación (Serger y Krebs, 1995). La familia MAPK está integrada por quinasas serina/treonina de tres subfamilias distintas, a saber, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y MAPK p38 (Serger y Krebs, 1995; Borkemeyer y col., 1996). Al regular la activación del factor de transcripción, las MAPK juegan un papel central en diversas respuestas celulares, incluida la supervivencia, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Geilen y col., 1996). Al respecto, se demostró que la ERK es crucial para

la proliferación y diferenciación celular, mientras que se cree que p38 MAPK y JNK median el estrés celular y la apoptosis. La inhibición de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 mejora la fibrosis renal en pacientes con nefropatía obstructiva (Nishida y col., 2008). Estas quinasas pueden ser activadas por diversos estímulos extracelulares, incluidos factores de crecimiento y estresores ambientales, y desempeñan un papel esencial en la cascada de transducción de señales que conducen a alteraciones del crecimiento celular y otras funciones clave de la célula (Serger y Krebs, 1995; Borkemeyer y col., 1996). Los estudios han demostrado que, en condiciones de alta glucosa, las ERK se activan en los glomérulos y las células mesangiales (Haneda y col., 1997; Awazu y col., 1999), y se ha establecido una asociación entre esta activación de las ERK y la fibrosis renal (Feliars y Kasinath, 2011).

En la ruta de la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividad antidiabética o capaces de proteger o contrarrestar el daño renal inducido por las altas concentraciones de glucosa, se ha desarrollado el estudio etnofarmacológico de plantas con potencial uso en la diabetes y sus complicaciones, así como también el aislamiento, purificación y elucidación de la estructura de los compuestos responsables de la actividad de estas especies, ha sido de gran importancia para la terapéutica actual (Baynes, 2006; Jung y col., 2006; Makheswari y Sudarsanam, 2011; Khan y col., 2012; Hung y col., 2012).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante es *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae), conocida en Venezuela como escopetera, escopetilla o yuquilla (Ciangherotti y col., 2007). Esta especie

es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes, las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Gil y col., 2003; Ciangherotti y col., 2007; Giraldo y col., 2009). Asimismo, sus partes aéreas han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora en varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Arokia, 2010a,b; Chothani y col., 2011; Rajan y col., 2012). Sin embargo, la raíz ha sido menos estudiada, a pesar de que esta parte de la planta es utilizada en la medicina tradicional venezolana. Se ha demostrado que extractos orgánicos de las hojas o partes aéreas de *R. tuberosa* L. producen un efecto hipoglicemiante en conejos y en ratas con diabetes inducida por el aloxano (Ullah y col., 2012; Rajan y col., 2012) y en ratas con diabetes tipo II inducida por la estreptozotocina (ETZ) combinada con la nicotinamida (Chothani y col., 2011, 2012). Igualmente, el extracto hidroalcohólico de las hojas frescas fue capaz de revertir, de manera crónica, el daño renal en las ratas con diabetes inducida por el aloxano, evaluado desde el punto de vista de sólo dos marcadores de la función renal: el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina plasmática (Manikandan y Arokia, 2010a).

La evaluación farmacológica del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT), permitió validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, se ha demostrado que este extracto produce un importante efecto protector sobre el daño renal inducido por la diabetes tanto *in vivo* como *in vitro* y con interesante efecto antihiper glucémico

crónico en ratas con diabetes inducida por la ETZ (Ciangherotti y col., 2013). Igualmente, al evaluar los efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas, se demostró que el RT produjo un efecto hipoglicemiante tanto en los animales controles como en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, comparables con el hipoglicemiante oral de referencia, la glibenclamida (Ciangherotti y col., 2016). En forma similar investigadores de Sri Lanka, lograron validar el uso popular de RT para el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol (Arambewela y col., 2003). Entre los productos naturales aislados de las partes aéreas de *R. tuberosa* L. se encuentran: la apigenina y la apigenina-7- β -D-glucurónido (Behari y col., 1981; Singh y col., 2002), los cuales han sido señalados como los responsables de la actividad antidiabética en otras especies vegetales (Esmaeili y col., 2009; Bansal y col., 2011). Igualmente, se ha descrito de manera preliminar la presencia de flavonoides, fenoles y saponinas en los extractos de todas las partes de la planta, incluyendo la raíz (Arirudran y col., 2011a; Chothani y col., 2011, 2012). Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera de *R. tuberosa*, han revelado un potencial efecto atrapador de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs), tales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el óxido nítrico (ON^{\cdot}) (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012 a,b); sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando extractos orgánicos lo cual dista de contribuir de manera robusta con la validación de los usos etnomédicos de la especie; en este sentido, Ciangherotti y col. (2013) demostraron que el extracto acuoso

de la raíz de *R. tuberosa* es antioxidante por su capacidad de atrapar el O_2^- . Todas estas especies reactivas son mediadores muy importantes del daño renal en la diabetes (Stanton, 2011).

En vista de la evidencia, en el presente estudio se evaluó la posibilidad que extracto acuoso de *R. tuberosa* L. es capaz de proteger al riñón del daño fibrótico inducido por una condición diabética, así como también establecer el papel de la vía de señalización de las MAPK en dichos efectos. Para ello, se empleó un modelo experimental de diabetes inducido por la estreptozotocina.

Los resultados permitirán consolidar un nuevo y potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía. Además, contribuirán a la caracterización farmacológica de esta especie perteneciente a la gran biodiversidad nacional, así como incentivar el aislamiento y síntesis de nuevas moléculas capaces de prevenir o disminuir el daño renal en la diabetes.

Materiales y métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La planta fue recolectada en los jardines de la Facultad de Ingeniería, entre el edificio de Ingeniería Mecánica y entrada de Las Tres Gracias, de la Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela. Fue identificada por la Lic. Giovannina Orsini del Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Unos ejemplares vouchers fueron depositados en el herbario bajo el código MYF 26390.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

La raíz de la planta fue separada y secada en una estufa a 50°C durante siete (7) días. Luego fue cortada en pequeños trozos y sometida a decocción a 60°C durante una (1) hora. Una vez filtrado, el extracto fue liofilizado y mantenido bajo protección de la humedad.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* con peso corporal comprendido entre 200 y 300 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas-Venezuela. Los animales se mantuvieron en jaulas con libre acceso a agua y alimento. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

INDUCCIÓN DE LA DIABETES

La diabetes tipo 1 fue inducida por la inyección intraperitoneal (i.p.) de 70 mg/kg de ETZ a las ratas. La glucosa sanguínea de los animales fue monitoreada durante 7 días o hasta que los niveles de glicemia eran ≥ 250 mg/dL. Para ello se utilizó un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). En este momento los animales fueron considerados diabéticos (Verspohl, 2002).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en cuatro (4) grupos (n=4-5): 1) Grupo Control, ratas tratadas con agua destilada p.o. (0,1 mL/100g de peso corporal/día), 2) Grupo ETZ, ratas diabéticas tratadas con agua

destilada p.o.; 3) Grupo RT, ratas tratadas con 10 mg/kg/día p.o. de RT y 4) Grupo ETZ + RT, ratas diabéticas tratadas con 10 mg/kg/día p.o. de RT. Al término de la cuarta semana, los animales fueron sacrificados por decapitación y los riñones fueron extraídos y pesados.

DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES EN LA CORTEZA RENAL

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. La absorbancia de las muestras se interpoló en una curva estándar de albúmina (0-100 μ g). Los resultados se expresaron como mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE LAS ERK 1/2

La corteza renal fue homogenizada mediante sonicación, en solución amortiguadora de lisis pH 7,4 que contenía: Tris Base, EDTA, NaF, Na_3VO_4 , Tritón X-100 al 1%, pepstatina A, aprotinina, leupeptina y PMSF). El homogeneizado fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue procesado para la determinación de la ERK total y fosforilada por Western blot, en alícuotas de 100 μ g proteínas, diluidas en Buffer Laemmli. Las muestras en fueron separadas en geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo con leche descremada al 10%, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti-fosfo-ERK y anti-ERK de conejos (Cell Signaling Technology), diluido en solución de albúmina sérica bovina al 3% en TBS-Tween (1:1000). Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cell Signaling

Technology) (1:10000), durante una hora. Las proteínas fueron visualizadas con un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate) y posteriormente cuantificadas mediante el análisis densitométrico (Quantity One 1-D[®]-BioRad Software).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COLÁGENO I EN CORTES DE RIÑÓN

Uno de los riñones de los animales se rebanó y se fijó en 1 mL de formaldehído al 10 % en PBS. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol, para luego embeberlo en parafina líquida. Utilizando un microtomo se obtuvo cortes de 4 μ m de grosor y fueron teñidos con tricrómico de Masson. La cuantificación del contenido de colágeno I se realizó a través de un analizador de imágenes. Los resultados se reportaron como incremento sobre el control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm E.E.M.$). Los datos se analizaron con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni o una prueba de Dunnett. Los resultados con valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

EFFECTO DE RT SOBRE EL DAÑO TITULAR INDUCIDO POR LA ETZ

En los animales diabéticos, se produce daño tisular fibrótico, el cual se expresa como aumento del peso del riñón, de la síntesis

de proteínas y del contenido de colágeno I de la corteza renal. El tratamiento con el RT durante 28 días fue capaz de prevenir totalmente el incremento del peso del riñón y del contenido de colágeno I inducido por la diabetes experimental, y parcialmente el incremento del contenido de proteínas totales de la corteza renal (Tabla I y Figura 1).

EFFECTO DE LA RT SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA ERK

Como se observa en la Figura 2, la diabetes inducida con ETZ activó significativamente las ERK en la corteza renal de ratas, manifestada con un aumento de la fosforilación (relación p-ERK/ERK) y expresada en % sobre el control, luego del análisis por Western blot. El tratamiento por 28 días con el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. previno el efecto de la diabetes experimental sobre la fosforilación de las ERK.

Discusión

La evidencia sugiere que el RT ejerce un efecto protector del daño renal inducido por la hiperglicemia, que se acompañan de eventos fibróticos asociados al incremento del peso del riñón, aumento

de la síntesis de proteínas totales y en particular de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, tales como: colágeno I, IV, fibronectina y laminina, todo lo cual conducen al ensanchamiento de la membrana basal glomerular, a la glomérulo esclerosis, a la hiperfiltración, a la proteinuria, entre otros, estableciéndose así la nefropatía diabética (Steffes y col., 1992; Craven y col., 1997; Iglesias-de la Cruz y col., 2002; Mason y Wahab, 2003; Skill y col., 2004; Kamalakkannan y col., 2006; Shah y col., 2007). Seyer-Hansen (1976) evaluó los cambios en el peso, el contenido de proteínas, de ARN y de ADN en riñones de ratas con diabetes inducida por la ETZ, reportando que el riñón aumenta de peso en un 15 % y 90% a los 3 y 42 días de inducida la diabetes, respectivamente. Asimismo, el contenido de proteínas y de ARN mostró un aumento de similar magnitud. Estos cambios fueron revertidos por el tratamiento con la insulina, lo que sugiere que estas alteraciones fibróticas son responsabilidad de la hiperglicemia. Al respecto, en el presente trabajo se demostró que el tratamiento con RT disminuye significativamente, tanto el peso del riñón como el contenido de proteínas totales en rata con diabetes inducida por la ETZ, lo que apoya aún más el papel renoprotector de la

Tabla I

Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) (10 mg/kg/día) sobre el peso (g) de los riñones y la síntesis de proteínas en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento.

	CONTROL	ETZ	RT	ETZ+RT
Peso de los riñones (g)	0,329 ± 0,02	0,424 ± 0,02*	0,310 ± 0,01	0,35 ± 0,01#
Proteínas Totales (mg/g corteza renal)	1,22 ± 0,12	2,26 ± 0,25**	1,19 ± 0,12**	1,61 ± 0,08#

Los valores se muestran como la media ± E.E.M. *p<0,05 y**p<0,01 con respecto al control. #p<0,05 con respecto al grupo ETZ. n=5.

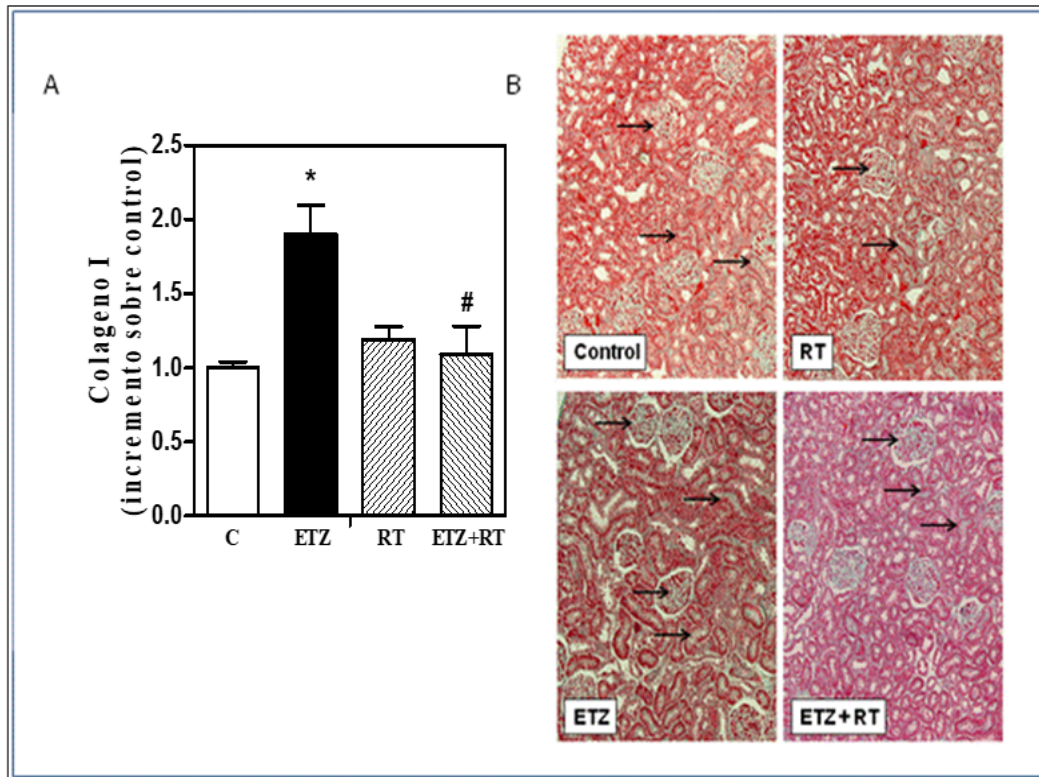


Figura 1. A. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) (10 mg/kg/día) sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al control. # $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=4 por grupo. B. Foto representativa de microscopía óptica del colágeno I. Las flechas indican la tinción del colágeno I por el tricrómico de Masson (en verde) a160x (Con permiso de Ciangherotti y col., 2013).

RT. Por lo tanto, en el modelo de diabetes en ratas, se demuestra los efectos terapéuticos de RT en la protección de la función renal y la prevención de la fibrosis renal. Hay que destacar que el extracto de la *R. tuberosa* mostró no solamente que es capaz de disminuir los altos niveles de glucosa, sino también abolir o disminuir otros signos clínicos de la diabetes tales como, la pérdida de peso corporal, la proteinuria, el incremento de la diuresis, entre otros; un aspecto importante que relaciona a esta especie con otras con actividad antidiabéticas, capacidad antioxidante, lo cual está vinculado con sus actividades hipoglicemiantes y antihiperlipemiantes (Okyar y col., 2001; Chaturvedi y col., 2010;

Okoli y col., 2011; Ciangherotti y col., 2013, 2016), guardando relación de esta manera con las observaciones de Seyer-Hansen (1976) con respecto a la proporcionalidad de la hiperglicemia con el daño renal.

La respuesta al estrés oxidativo ha sido considerada como uno de los mecanismos subyacentes más importantes en el desarrollo y progresión de ND (Evans y col., 2002). Al respecto, Ciangherotti y col. (2013) demostraron en estudios previos en tejido renal de ratas con ND, que RT presenta actividad antioxidante, ya que fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT

contrarrestó la disminución de la actividad de la CAT, la SOD, la GPx y la GR inducida por la glucosa *in vivo*. La restauración de la actividad de las enzimas antioxidantes es considerada actualmente como una estrategia en la prevención o tratamiento de la ND, de manera interesante. Kuo y col. (2015) demostraron que el tratamiento con SOD recombinante humana de ratas con diabetes inducida por la ETZ fue capaz de disminuir la ND a través de la inhibición de la vía EROs/ERK1/2. Por lo tanto, el perfil como antioxidante de RT, incluyendo el mejoramiento del estatus de las enzimas antioxidantes, también podría estar relacionado con la inhibición de la fibrosis y la nefropatía, tal como ha sido descrito para otros importantes antioxidantes tales como: el tempol y el tiron (Xia y col., 2006), cuyo

efecto nefroprotector es atribuido, en gran parte, a la disminución de la expresión del TGF- β 1 en las ratas con diabetes inducida por la ETZ (Luan y col., 2012).

Existe evidencia que indica que la activación de la vía de señalización TGF- β / SMAD y MAPK ocurre en ratas con diabetes y estrés oxidativo renal (Xu y col., 2017). La activación de estas vías específicas resulta clave para la expresión y secreción de diversos factores inflamatorios y factores de crecimiento, que promueven aún más la deposición de la MEC, proliferación del miofibroblasto y secreción de MEC, reacciones que eventualmente producen fibrosis renal en las ratas con ND (Ding y col., 2011; LV y col., 2011). Nuestros hallazgos previos

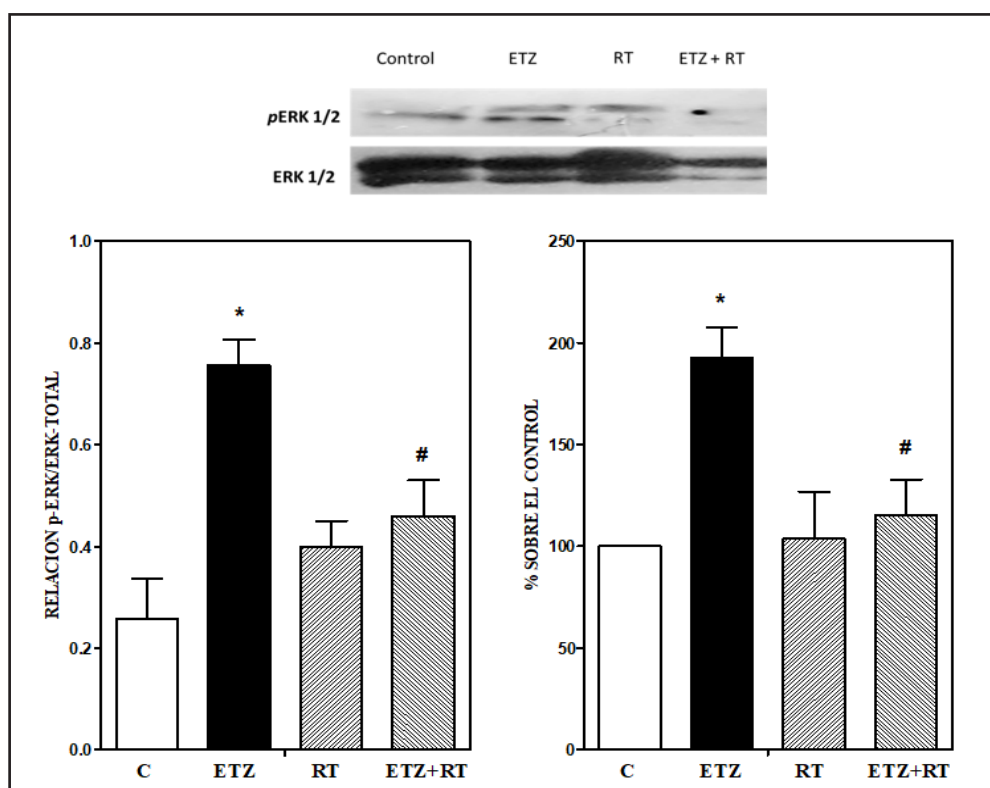


Figura 2. El panel superior muestra los resultados de los inmunoblot analizados e incubados con anticuerpos contra p-ERK y ERK. Los gráficos de barras muestran la activación de las ERK expresadas como relación fosfo-ERK/ERK (izquierda) y % sobre control (derecha), en la corteza renal de ratas control y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* (RT). * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (C). # $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=4.

(Ciangherotti y col., 2018 y el presente trabajo demuestran que la administración de RT reduce drásticamente la expresión de TGF- β , la fosforilación de las ERK y la vía de señalización de NF- κ B, en tejidos renales. Lo que indica que mecanismos multicomponente y multidireccional suprimen la vía de señalización TGF- β /MAPK/NF- κ B y posiblemente a través del control de la generación de EROs.

La hiperglicemia o el estrés oxidativo activa la cascada MAPK a través de la estimulación de ANG II (Tsiani y col., 2002). Se ha demostrado que las ERK1/2 se activan por estrés oxidativo en una variedad de tipos de células que incluyen células mesangiales (Wilmer y col., 1997). La activación de las ERK1/2 es parcialmente responsable de la síntesis de proteínas mediada por ANG II, que es un paso crucial en hipertrofia renal. Además, las ERK1/2 están involucradas en la sobre-expresión de la fibronectina y la fibrosis en las células mesangiales del peritoneo humano y (Kiribayashi y col., 2004). Así, Suzuki y col. (2004) en fibroblastos NRK en cultivo expuestos a alta glucosa, demostraron que se produce la activación de la MAPK p38 inducida por TGF- β . Aún más, Chen y col. (2013) indican que la exposición *in vivo* a fluctuaciones de glucosa sanguínea en ratones diabéticos acelera la fibrosis renal incrementando la producción de colágeno e inhibiendo su degradación, en ambos casos tanto la ERK/MAPK como la vía de señalización TGF- β /SMAD parecen jugar un papel importante. Estos hallazgos se apoyan en los experimentos de Polhill y col. (2005), quienes demostraron que la exposición a concentraciones fluctuantes de glucosa incrementa la fibrogénesis intersticial renal. Los autores sugieren que el aumento de la activación de la MAPK p38

podría contribuir a la alteración del fenotipo del fibroblasto que lleve a la ND progresiva.

El RT podría estar ejerciendo sus efectos protectores a través del decremento de la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- κ B. Esto se apoya en los presentes hallazgos en los que se muestra al extracto RT como inhibidor de la fosforilación de las ERK de la corteza renal (presente resultados), así como la expresión del NF- κ B inducida por el PMA, un activador de la PKC, en células HeLa en cultivo (Cianguerotti y col., 2018). Yang y col. (2008) demostraron que las altas concentraciones de glucosa inducen la expresión y la activación del NF- κ B en las células del endotelio glomerular en cultivo, lo cual fue asociado a la fosforilación del I κ -B α (proteína inhibidora específica del NF- κ B) inducida por la activación de la PKC y la subsiguiente formación de las EROs.

Recientemente, Roosdiana y col. (2020) dejaron establecido un blanco de acción del extracto hidroalcohólico de *R. tuberosa* en cuanto a la nefroprotección en ratas con diabetes inducida por la ETZ, en donde no solo hubo una disminución del estrés oxidativo, lo cual apoya nuestros estudios, sino también una disminución de la expresión de TNF- α luego de 21 días de tratamiento con este extracto. Cabe destacar que el incremento de TNF- α y su señalización ha sido bien establecido como un evento mediador de la ND (Navarro-González y col., 2009). Cabe destacar que ambos tipo de extractos de raíz, el acuoso y el hidroalcohólico, tienen varios constituyentes químicos en común.

En conjunto, es probable que el RT, a través de su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, proteja al riñón del daño glucotóxico al inhibir el aumento de la

expresión del NF- κ B y la fosforilación de las MAPKs en la diabetes. Esta idea es consistente con la evidencia que señala al RT como un potente antiinflamatorio en el modelo del edema de la pata de la rata inducido por la carragenina (Pastorello y col., 2012), modelo de inflamación ligado al aumento de la señalización del NF- κ B (Huang y col., 2012).

En conclusión, los hallazgos permiten establecer al RT como un extracto con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vivo*, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, y de la vía de señalización de la PKC-NF- κ B y la fosforilación de las ERK1/2. Estos resultados, contribuyen al conocimiento acerca de las bases de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., así como a la validación de su uso tradicional,

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el CDCH-UCV proyectos PG-06-7349-2008-1/2 y AIA-06.8402.2012.

Referencias bibliográficas

- Allen D, Harwood S, Varagunam M, Raftery M, Yaqoob M. 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases FASEB J 17:908–910.
- Arambewela L, Thambugala S, Ratnasooriya W. 2003. Gastroprotective activity of *Ruellia tuberosa* root extract in rats. Trop Med Plants 4(2):191–199.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). Pharmacognosy J 3(22):29–34.
- Ashraful A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. Pharmaceutic Biol 47(3):209–214.
- Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M. 1999. Mechanisms of mitogen activated protein kinase activation in experimental diabetes. J Am Soc Nephrol 10:738–745.
- Baccora MH, Cortes P, Hassett C, Taube DW, Yee J. 2007. Effects of long-term elevated glucose on collagen formation by mesangial cells. Kidney Int 72(10):1216–1225.
- Bansal P, Paul P, Mudgal J, G Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. Exp Toxicol Pathol 64 (6): 651–658.
- Baynes K. 2006. Introduction to Diabetes Mellitus. En Traditional Herbal Medicine for Modern Times, Antidiabetic Plants. CRC Press Taylor & Francis Group. The United State of America. p. 2–99.
- Behari M, Goyal M, Streibl M. 1981. Natural products from *Ruellia tuberosa* L. J Indian Chem Soc LVIII:176–177.
- Borkemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. 1996. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. Kidney Int 49:1187–98.
- Chaturvedi P, George S. 2010. Momordica charantia maintains normal glucose levels and lipid profiles and prevents oxidative stress in diabetic rats subjected to chronic sucrose load. J Med Food 13(3): 520–527.
- Cheng X, Gao W, Dang Y, Liu X, Li Y, Xu X, Ye X. 2013. Both ERK/MAPK and TGF-Beta/Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation. J Diabetes Res 2013 : 463740.
- Chothani D, Patel M, Mishra S, Vaghasiya HU. 2011. Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker plant). Pharmacog J 2(12):506–51.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2012. HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of *Ruellia tuberosa*. Chromatography Res Inter 2012:1–6.
- Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol 14(suppl 3): S233–S2336.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Varela M, López-

- Gramcko JT, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2007. Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Acta Cien Ven* 58(Sup 1):252.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Salazar-Bookaman MM, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Arch Ven Farmacol Ter* 32(4): 57–66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas normales y con diabetes experimental. *Rev Fac Farm* 79 (1-2): 36–44.
- Ciangherotti C, Pimentel A, Benaim G, Orsini G, Salazar M, Israel A. 2018. Papel de la vía de señalización proteína quinasa C - NF-κB en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2): 99–116.
- Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer R K. 1997. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 8(9): 1405–1414.
- Ding Z, Chen Z, Chen X, Cai M, Guo H, Chen X, Gong N. 2011. Adenovirus-mediated anti-sense ERK2 gene therapy inhibits tubular epithelial-mesenchymal transition and ameliorates renal allograft fibrosis. *Transpl Immunol* 25:34–41.
- Eboh C, Chowdhury TA. 2015. Management of diabetic renal disease. *Ann Transl Med* 3:154.
- Esmaili MA, Zohari F, Sadeghi H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. *Planta Med* 75(13):1418–20.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599–622.
- Feliers D, Kasinath B 2011. Erk in kidney diseases. *J Signal Transduction* 2011 :768512.
- Geilen CC, Wieprecht M, Orfanos CE. 1996. The mitogen-activated protein kinases system (MAP kinase cascade): its role in skin signal transduction. *J Dermatol Sci* 12:255–262.
- Gil R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Rodríguez M. 2003. Estudio etnobotánico de algunas plantas expendidas en los herbolarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). *Rev Fac Far* 45(1):69–76.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2):267–301.
- Ha H, Kim KH. 1999. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 45:147–51.
- Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. 1997. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 46: 847–853.
- Huang C, Akaishi S, Ogawa R. 2012. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Arch Dermatol Res* 304(8):589–597.
- Hung HY, Qian K, Morris-Natschke SL, Hsu CS, Lee KH. 2012. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat Prod Rep* 29(5):580–606.
- Iglesias-De La Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. 2002. Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV. *Kidney Int* 62(3):901–13.
- Jha JC, Banal C, Chow B, Cooper M, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 25(12):657–684.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 13(10):1203–1218.
- Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P. 2006. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *J Pharm Pharmacol* 58(8):1091–1098.
- Kanwar Y, Akagi S, Sun L, Nayak B, Xie P, Wada J, Chugh S, Danesh F. 2005. Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* 101:100–110.
- Kensa M, Neelamegam A. 2012a. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 12(1): 69–74.

- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 12(1): 125–128.
- Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK A. 2012. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci* 4(1):27–42.
- Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, Ogawa T, Ito T, Yorioka N, Kohno N. 2005. Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK. *Kidney Int* 67:1126–1135.
- Kuo C, Shen C, Tung Y, Chen H, Chen Y, Chang W, Cheng KYang SH, Chen C. 2015. Extracellular superoxide dismutase ameliorates streptozotocin-induced rat diabetic nephropathy via inhibiting the ROS/ERK1/2 signaling. *Life Sci* 135:77–86.
- Lowry, O, Rosebrough N, Farr A, Arosorough A, Farr L, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Luan J, Li W, Han J, Zhang W, Gong H, Ma R. 2012. Renal protection of *in vivo* administration of tempol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 119(2):167–76.
- Lv ZM, Wang Q, Wan Q, Lin JG, Hu MS, Liu YX, Wang R. 2011. The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One* 6:e22806.
- Makheswari U, Sudarsanam D. 2001. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Res Pharm* 1(4):28–37.
- Manikandan A, Arokia V. 2010a. Effect of 50% Hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on non-enzymic antioxidants and other biochemical parameters in liver, kidney, serum of alloxan-induced diabetic Swiss albino rats. *J Biomed Sci Res* 2(3):190–201.
- Manikandan A, Arokia V. 2010b. Effect of 50% hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on AST, ALT, ACP and ALP levels in serum, liver, and kidney of alloxan-induced diabetic rats. *Annals Pharm Pharm Sci* 1(2):142–146.
- Mason RM, Wahab NA. 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Am Soc Nephrol* 14:1358–1373.
- Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving H-H, Steffes MW. 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 27(Suppl 1):S79–S83.
- National Institutes of Health (NIH). 2006. Guide for the care and use of laboratory animals. 8^o ED. The National Academies Press. Studies. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>.
- Navarro-González J, Jarque A, Muros M, Mora C, García J. (2009). Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(2):165–73.
- Nerlich A, Schleichert E. 1991. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Patbol* 139(4): 891–899.
- Nishida M, Okumura Y, Sato H, Hamaoka K. 2008. Delayed inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephrol Dialysis Transplant* 23(8): 2520–2524.
- Okoli CO, Obidike IC, Ezike AC, Akah PA, Salawu OA. 2011. Studies on the possible mechanisms of an - tidiabetic activity of extract of aerial parts of *Phyllanthus niruri*. *Pharm Biol* 49(3):248–255.
- Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. 2001. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytother Res* 15(2):157–61.
- Park SH, Choi HJ, Lee JH, Woo CH, Kim JH, Han HJ. 2001, High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-beta 1. *Kidney Int* 59(5):1695–1705.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Far* 75(2):1–16.
- Polhill TS, Saad S, Poronnik P, Fulcher GR, Pollock CA. 2004. Short-term peaks in glucose promote renal fibrogenesis independent of total glucose exposure. *Am J Physiol* 65:1647–53.
- Rajan M, Kishor V, Satheesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa* Linn leaves in normal and alloxan-induced diabetic rats *J Chem Pharmaceut Res* 4(6):2860–2868.
- Roosdiana A, Permata F, Fitriani R, Umam K, Safitri A. 2020. *Ruellia tuberosa* L. extract improves histopathology and lowers malondialdehyde

- levels and tnf alpha expression in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Med Int* 2020:8812758
- Schrijvers B, De Vriese A, Flayvbjerg A. 2004. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocrin Rev* 25:971–1010.
- Serger R, Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726–35.
- Seyer-Hansen K. 1976. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 51(6):551–555.
- Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. 2007. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:16–28.
- Sifuentes-Franco S, Padilla-Tejeda D, Carrillo-Ibarra S, Miranda-Díaz A. 2018. Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy. *Int J Endocrinol* 2018:1875870.
- Singh R, Pandey H, Pandey R y Singh B. 2002. A Triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem* 41B:1754–1756.
- Skill NJ, Johnson TS, Coutts IGC, Saint RE, Fisher M, Huang LEI, Nahas AM, Collighan RJ, Griffin M. 2004. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* 279(46): 47754–47762.
- Stanton RC. 2011. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep* 11(4):330–336.
- Steffes M, Osterby R, Chavers B, Mauer M. 1984. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 38: 1077–1081.
- Suzuki H, Uchida K, Nitta K, Nihei H. 2004. Role of mitogen-activated protein kinase in the regulation of transforming growth factor- β -induced fibronectin accumulation in cultured renal interstitial fibroblasts. *Clin Exp Nephrol* 8:188–195.
- Tsiani E, Lekas P, Fantus G, Whiteside C. 2002. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E161–E169.
- Turgut F, Bolton WK. 2010. Potential new therapeutic agents for diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 55:928–40.
- Ullah S, Shahwar D, Ullah S, Ahmad M. 2012. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. *J Chem Soc Pak* 34(2):436–441.
- Verspohl E. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68:581–590.
- Verzola D, Bertolotto M, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, and Deferrari G. 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 15:S85–S87.
- Wahab NA, Harper K, Mason RM. 1996. Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. *Biochem J* 316:985–992.
- Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH. 1997. Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem* 272(16):10877–81.
- Wolf G, Ziyadeh F. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 106:26–31.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10:339–352.
- Xia L, Wang H, Goldberg H, Munk S, Fantus G, Whiteside C. 2006. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F345–F356.
- Xu ZJ, Shu S, Li ZJ, Liu YM, Zhang RY, Zhang Y. 2017. Liuwei Dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- β /SMADS, MAPK, and NF- κ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues. *Medicine* 96:3(e5879).
- Yang WS, Seo JW, Han NJ, Choi J, Lee KU, Ahn H, Lee SK, Park SK. 2008. High glucose-induced NF- κ B activation occurs via tyrosine phosphorylation of I κ B α in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(5): F1065–F1075.

Recibido: 05/06/2021
Aceptado: 27/07/2021

Efecto del resveratrol sobre el factor de crecimiento transformante β sérico en la aterosclerosis

Effect of resveratrol on serum transforming growth factor- β in atherosclerosis

JESSIKA JIMÉNEZ^{1*}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{1,2**}, LETICIA FIGUEIRA^{1***}

Resumen

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) está involucrado en la fisiopatología de la aterosclerosis. El resveratrol es un polifenol que ha mostrado tener propiedades antiaterogénicas gracias a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. En el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF- β , la formación y evolución de la placa de ateroma en conejos machos de la raza Nueva Zelanda sometidos a una dieta enriquecida con colesterol. Para ello 48 conejos fueron divididos en 4 grupos. Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol. Grupo 3 (control resveratrol): Conejarina y resveratrol (2mg/Kg/día). Grupo 4: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol y resveratrol, durante 12 semanas. Se realizaron determinaciones de lípidos séricos y del TGF- β en la 0, 6ta y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y el resto a la 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento significativo de la concentración de TGF- β y del perfil lipídico en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3 desde la 6ta semana de experimentación. En la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución de los niveles de TGF- β en el grupo 4 con respecto al grupo 2. El tratamiento con resveratrol disminuyó la formación de ateromas. En conclusión, el TGF- β constituye un marcador temprano no invasivo de aterosclerosis. Asimismo, la suplementación oral con resveratrol ejerció efectos antiinflamatorios y antiateroscleróticos.

Palabras clave: Factor de crecimiento transformante β , resveratrol, aterosclerosis, inflamación

Abstract

The transforming growth factor- β (TGF- β) is involved in atherosclerosis. Resveratrol is a polyphenol and has anti-inflammatory and antiatherogenic actions. We evaluated the effect of resveratrol on serum concentrations of TGF- β during the progression and evolution of atherosclerosis in rabbits fed with a cholesterol diet. 48 New Zealand white male rabbits were randomly divided into four groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Group 3 (control resveratrol): Standard diet (commercial rabbit food) and resveratrol (2mg/Kg). Group 4: Cholesterol diet (0.5% cholesterol) and resveratrol (2mg/Kg). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on basal, sixth, and twelfth weeks, and the concentration of lipid profile and TGF- β were determined. Half of the animals were sacrificed on the sixth or twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the TGF- β levels were significantly higher in Groups 2 and 4 than groups 1 and 3, respectively since the 6th week. Resveratrol treatment reversed the increased levels of TGF- β induced by the cholesterol diet since the 6th week. Supplementation of resveratrol diminished the formation of atherosclerotic lesions. These results support that serum TGF- β levels are early markers of atherosclerosis. Likewise, oral supplementation of resveratrol may induce anti-atherosclerotic effects depending on its anti-inflammatory properties.

Keywords: Transforming growth factor- β , resveratrol, atherosclerosis, inflammation

1. Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo – Venezuela. 2. Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela.

Correspondencia: : figueiraleticia@gmail.com

ORCID: *0000-0001-8966-4951; **0000-0003-1980-5848 ; ***0000-0003-3865-5355

DOI: 10.54305/RFFUCV.2021.84.1-2.6

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica, de etiología multifactorial y progresiva, que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima arterial con pérdida de la elasticidad de las arterias de mediano y gran calibre, y en cuya génesis están involucrados factores genéticos y hábitos de vida (Didac y col., 2020; Shafi, 2020).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina de 25 KDa que regula una gran cantidad de actividades biológicas como la proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares (Suenaga y col., 2008); entre sus funciones destaca su papel en el mantenimiento de la estructura normal de la pared de los vasos sanguíneos; por lo que se le ha relacionado con síndromes cardiovasculares; sin embargo, el papel del TGF- β en el desarrollo de la aterosclerosis es complejo y no está completamente esclarecido (Grainger, 2007); pues por un lado, existe evidencia que apoyan la hipótesis de su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero por otro lado, se ha señalado que el TGF- β ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos (Dabek y col., 2006; Yu y col., 2019).

De igual manera, hallazgos experimentales han permitido conocer que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis (Figueira y col., 2008A; 2008B; 2010; Dubois-Deruy y col., 2020); sin embargo no se conoce si el estrés oxidativo es un evento primario que ocurre temprano en la enfermedad o si representa un fenómeno secundario que refleja daño en el tejido; en este sentido, actualmente

las terapias inmunomoduladoras y antioxidantes están emergiendo como una alternativa atractiva y con resultados alentadores para el tratamiento de la aterosclerosis (Mathew y Pennathur, 2014).

El resveratrol es un polifenol presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana, principalmente en la piel de las uvas y en el vino tinto (Figueira, 2010). Diferentes evidencias indican que el resveratrol podría ser beneficioso para prevenir el inicio y progresión de la aterosclerosis, pues disminuye el estrés oxidativo inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), disminuyendo la peroxidación lipídica; protege al sistema cardiovascular inhibiendo varios procesos fisiológicos como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la agregación plaquetaria y la proliferación celular (Labinsky y col., 2006; Figueira, 2010; Zhou y col., 2019). No obstante, se desconoce su efecto sobre el TGF- β y su evolución a lo largo del proceso aterogénico; sin embargo, se ha planteado que el resveratrol podría modular la producción y expresión del TGF- β (Suenaga y col., 2008). En vista de ello, en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF- β y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 48 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene "Rafael Rangel"

(Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos de 12 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (Control-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial y suplementados con resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral). Grupo 4 (Colesterol-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol y resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral).

La dosis de resveratrol se seleccionó con base en estudios *in vivo* en conejos (Matos y col., 2012; González y col., 2018; Figueira y González, 2018; 2019; 2020), en los cuales el resveratrol posee efectos biológicos a dosis de 2 mg/Kg por vía oral. El resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) administrado a los conejos fue de origen natural (Sigma Aldrich). Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del Consejo Nacional de Investigación del manejo de animales de Laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela): Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

Dieta hipercolesterolémica: La administración de colesterol mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmusen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil-éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

Procedimiento experimental

Determinaciones bioquímicas: Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en las semanas 0, 6ta y 12ma, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío se centrifugaron a 3.000 rpm

durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de TGF- β fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA).

Sacrificio de los animales. Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas: A la 6ta semana y al final del estudio la mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical; posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo con la clasificación de la American Heart Association (Sary y col., 1995).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la

correlación de Spearman para relacionar la TGF- β con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

En la Tabla I se resume las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de CT, c-HDL, c-LDL y TG basales entre los grupos de conejos en estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 2 y en el grupo 4 con respecto a sus respectivos controles (grupo 1 y 3, respectivamente) ($p < 0,0001$). Para los grupos 2 y 4 las concentraciones de los lípidos séricos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TGF- β

Como se puede apreciar en la Figura 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de TGF- β entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El TGF- β en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, en los grupos 2 y 4 variaron a lo largo del estudio ($p < 0,0001$). Por otra parte, en la sexta semana y al final del experimento las concentraciones séricas de TGF- β aumentaron en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ($p < 0,005$). Sin embargo, en la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución significativa de la concentración de TGF- β en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p < 0,005$).

Tabla I
Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

Grupos	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Basal				
Grupo 1	73 ± 12	37 ± 8	34 ± 8	74 ± 14
Grupo 2	69 ± 10	42 ± 7	31 ± 7	79 ± 15
Grupo 3	68 ± 11	38 ± 8	35 ± 7	81 ± 17
Grupo 4	75 ± 13	44 ± 7	37 ± 9	84 ± 12
6ta semana				
Grupo 1	84 ± 15	45 ± 10	32 ± 9	84 ± 13
Grupo 2	597 ± 110*	520 ± 81*	67 ± 14*	181 ± 58*
Grupo 3	87 ± 19	41 ± 9	38 ± 12	88 ± 17
Grupo 4	616 ± 157#	501 ± 98#	61 ± 10#	207 ± 73#
12ma semana				
Grupo 1	79 ± 13	47 ± 9	39 ± 8	82 ± 10
Grupo 2	1010 ± 221*	810 ± 91*	95 ± 42*	308 ± 95*
Grupo 3	84 ± 17	48 ± 10	40 ± 11	74 ± 18
Grupo 4	1158 ± 217#	871 ± 86#	89 ± 61#	344 ± 72#
Valores p				
Grupo 1	0,9641	0,9481	0,9715	0,8468
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 3	0,3630	0,6174	0,4182	0,2485
Grupo 4	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media.

Significativo $p < 0,05$

*= Comparación con respecto al grupo 1.

#= Comparación con respecto al grupo 3.

p= Comparación con respecto al basal.

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de TGF- β con el perfil lipídico, evidenciando correlación positiva significativa entre las variables ($p < 0,0001$).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Ningún conejo de los grupos 1 y 3 presentaron lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, todos los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado variable a lo largo del estudio. En

el grupo 4, algunos conejos no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable (Figura 2).

Discusión

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmunológico y al estrés oxidativo, que está caracterizada por la acumulación de lípidos oxidados en la pared arterial y la infiltración de células inmunológicas y células musculares lisas (CML) (Frutkin y col., 2009; Didac y col., 2020); las cuales son moduladas por citocinas y factores de crecimiento. En este sentido, el TGF- β

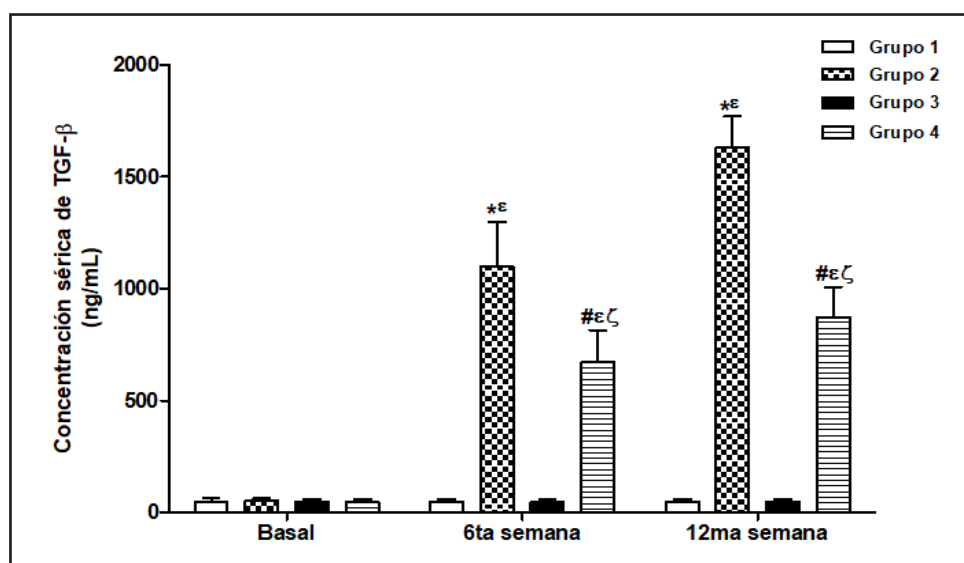


Figura 1. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones sérica de TGF- β en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6^{ta} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media ($n=12$ basal y 6^{ta} semana; $n=6$ en la 12^{ma} semana). * $p<0,0050$ vs. grupo control (Grupo 1), [#] $p<0,0050$ vs. control resveratrol (Grupo 3), ^ζ $p<0,005$ vs. Grupo 2. ^ε $p<0,0001$ vs. su respectivo valor basal.

ha demostrado estar involucrado en la patogénesis de esta enfermedad; ya que es una citocina pleiotrópica cuyo efecto sobre el sistema cardiovascular es ambiguo; por un lado, existe evidencias que apoyan su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero, por otro lado, se ha señalado que ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos (Dabek y col., 2006).

Tabla II

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de TGF- β y el perfil lipídico

	r	p
TGF- β & CT	0,6351	0,0001
TGF- β & c-LDL	0,5738	0,0001
TGF- β & c-HDL	0,6482	0,0001
TGF- β & TG	0,7380	0,0001

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, TG: Triglicéridos. TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

Diferentes estudios asocian las variaciones en la expresión o señalización del TGF- β con la aterosclerosis; sin embargo, las relaciones precisas entre el TGF- β y la aterosclerosis no están completamente comprendidas (Frutkin y col., 2009). En este sentido, el TGF- β se ha considerado como una citocina antiaterogénica y protectora, debido

a que inhibe la proliferación y migración de las CML, leucocitos y la expresión de moléculas de adhesión endotelial vascular (Uluçay y col., 2015). En relación con esto, varios estudios en ratones hiperlipidémicos describen al TGF- β como una citocina antiaterogénica que limita la aterosclerosis, principalmente a través de efectos inmunosupresores (Mallat y col., 2001; Lutgens y col., 2002; Gojova y col., 2003; Robertson y col., 2003; Frutkin y col., 2009). Por otra parte, estudios en animales sugieren que el TGF- β podría acelerar la aterosclerosis, aumentando la acumulación de la matriz extracelular vascular y estimulando la producción de proteoglicanos, con el consecuente incremento en la retención de lipoproteínas en la pared vascular (O'Brien y col., 1998; Schlick y col., 1998; Mallat y col., 2001; Little y col., 2002; Uluçay y col., 2015; Agarwal y col., 2015; Cheng y col., 2019).

Tabla 3
Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Datos presentados como n (%).

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Sexta semana						
1	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	2 (33%)	4 (67%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)
3	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	2 (33%)	2 (33%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)

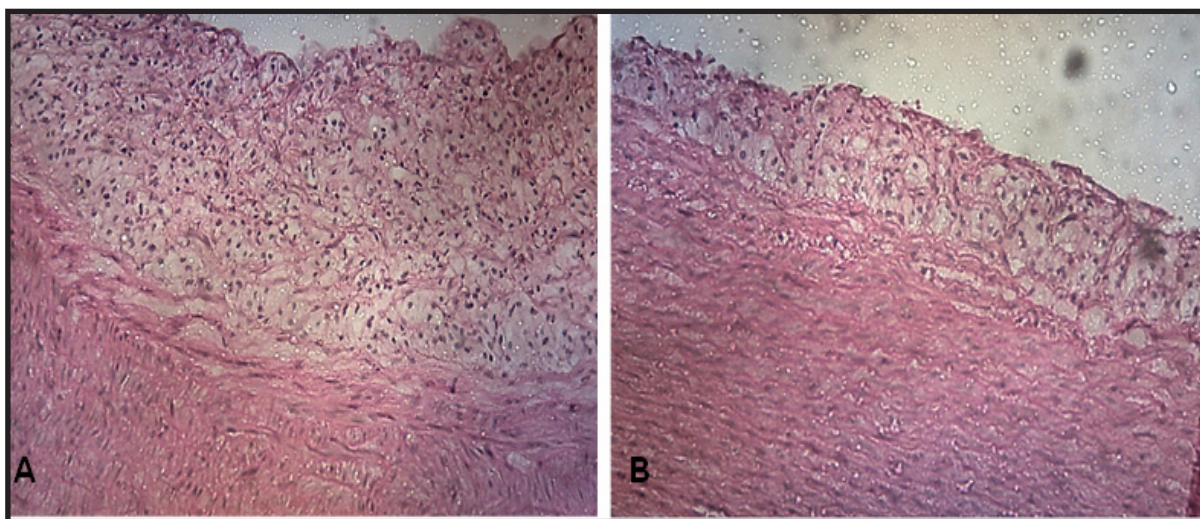


Figura 2. Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio. Lesión tipo IV (Panel A). Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión de un conejo perteneciente al grupo 2. Lesión tipo III (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 4. Se observa por un cúmulo de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares. Tinción hematoxilina – eosina. 50X.

En el presente estudio se evidenció que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado y un incremento progresivo y significativo en las concentraciones séricas de TGF- β a partir de la sexta semana de estudio, sugiriendo el papel de esta molécula desde las primeras fases de la aterosclerosis, pudiendo constituir un marcador temprano no invasivo de la enfermedad. Diferentes estudios apoyan el papel pro-aterogénico del TGF- β ; en efecto, la evidencia ha descrito que el TGF- β se asocia con un mayor riesgo de incidencia de enfermedad arterial periférica (Kanzaki y col., 1995; Agarwal y col., 2015). Asimismo, experimentos *in vivo* en conejos han mostrado que el TGF- β 1 estimula el engrosamiento de la íntima de las arterias después de la denudación vascular con catéter de balón, lo cual sugiere la importancia del TGF- β 1 en las primeras fases de la aterogénesis, pues esta citocina es capaz de aumentar la producción de la matriz extracelular por parte de las CML en la íntima arterial, e induce la formación de una cicatriz fibrosa, participando en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Kanzaki y col., 1995). De hecho, Chen y col. (2019) describieron que la señalización de la TGF- β endotelial es una pieza fundamental en el crecimiento de la placa aterosclerótica, y su bloqueo incrementa la expresión de genes involucrados en la regulación de la permeabilidad vascular, conllevando una reducción de esta.

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de este marcador de aterosclerosis se observó desde la sexta semana de experimentación, lo cual sugiere que el TGF- β es un marcador temprano de aterosclerosis, pues interviene en el inicio y

progresión de esta enfermedad; ya que esta citocina posee propiedades proinflamatorias y proaterogénicas bien descritas, actuando desde las etapas iniciales de la aterogénesis; pues desempeña un importante papel en la retención de lípidos y en el consecuente desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Little y col., 2002); ya que es capaz de aumentar la síntesis de proteoglicanos por las CML que se acumulan en las regiones ricas en lípidos de las placas ateroscleróticas, promoviendo la retención de lipoproteínas. Consecuentemente, la agregación de proteoglicanos puede conducir a reducciones en el movimiento transmural de las lipoproteínas, su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química (Bobik y col., 1999).

De igual manera, los hallazgos encontrados en el presente estudio muestran una asociación positiva del TGF- β con el perfil lipídico en el grupo que consumió una dieta hipercolesterolémica (Grupo 2), tal y como ha sido reportado en otros estudios (Zhou y col., 2009; Buday y col., 2010). De hecho, Buday y col. (2010) demostraron que el TGF- β causa disfunción endotelial a través del estrés oxidativo inducido por la activación de la NAD(P)H oxidasa y la consecuente sobreproducción de superóxido vascular en un modelo murino de aterosclerosis; dicho hallazgo se asoció con el engrosamiento de la pared aórtica y con la formación de placa aterosclerótica agravada. Estos resultados pueden proporcionar un mecanismo que explica la aterosclerosis acelerada en pacientes con TGF- β 1 elevado en suero. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el incremento del TGF- β , acompañado del aumento de la concentración de los lípidos séricos favorece el proceso aterosclerótico

y apuntan a que el TGF- β sérico puede constituir un marcador de riesgo y de aterosclerosis. Asimismo, se sugiere que el incremento de la concentración de los lípidos séricos puede contribuir a la instauración del proceso inflamatorio sistémico, lo cual se ve acompañado del aumento del TGF- β , favoreciendo el proceso aterosclerótico.

Asimismo, en la presente investigación se observó que, bajo nuestras condiciones experimentales, la administración de una dieta enriquecida con colesterol durante 12 semanas fue capaz de ocasionar un incremento en los lípidos séricos desde la 6ta semana de experimentación, e indujo lesiones de grado leve en las aortas de los conejos; por su parte, la administración de la dieta hipercolesterolémica durante las doce semanas, indujo la evolución de las lesiones a un grado intermedio y avanzado. En este sentido, diferentes estudios han indicado que el colesterol (0,5-2%) añadido a la dieta ha demostrado que provoca hipercolesterolemia y posteriormente el desarrollo de lesiones ateromatosas (Roth y col., 1983). En cuanto a los niveles de triglicéridos, diversos estudios han reportado que los mismos incrementan o permanecen iguales tras la administración de una dieta hipercolesterolémica (Camejo y col., 1973; Stange y col., 1975; Kushwaha y col., 1978; Roth y col., 1983; Zhang y col., 2002; De Castro y col., 2009; Sun y col., 2013; Tanko y col., 2016). En este sentido, la hipertriglicéridemia resultante tras la administración de una dieta enriquecida en colesterol, puede ser debida al incremento de su síntesis o a la disminución del catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos, lo cual influye directamente en la composición y metabolismo de las LDL y HDL (Adekunle y col., 2013). Asimismo, la

lipidemia observada tras la administración del colesterol puede ser el resultado del incremento de la masa adiposa visceral, lo cual causa una alteración en el metabolismo de los lípidos y consecuentemente resulta en un incremento en los ácidos grasos circulantes, los cuales son potentes inductores de estrés oxidativo (Tanko y col., 2016).

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural con propiedades antioxidantes potentes, el cual está presente en frutos como las moras y los arándanos, pero principalmente, en la uva y en el vino tinto. Sus propiedades *in vitro* han sido ampliamente estudiadas, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio (Dobrydneva y col., 1999; Tseng y col., 2011). En cuanto a sus propiedades *in vivo*, su actividad no está del todo esclarecida; sin embargo, existen evidencias que encuentran beneficios sobre el sistema cardiovascular (Baur y col., 2006; Agarwal y Baur, 2011; Timmers y col., 2011; Gambini y col., 2013).

En el presente estudio se demostró, por primera vez, que la suplementación de resveratrol disminuyó las concentraciones séricas del TGF- β durante la aterosclerosis y ocasionó una disminución en la formación de lesiones ateroscleróticas en los conejos suplementados con este polifenol a los que se les administró una dieta hipercolesterolémica; sugiriendo que, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo a la dosis empleada, el resveratrol tiene efectos antiinflamatorios durante la aterosclerosis desde la sexta semana de experimentación. En relación a ello, diferentes estudios han demostrado que el resveratrol puede modular las

concentraciones y expresión del TGF- β ; en este sentido, Suenaga y col., (2008), refieren que algunos de los efectos beneficiosos del resveratrol podrían estar mediados en parte por sus efectos sobre la expresión y señalización del TGF- β ; ya que este polifenol fue capaz de incrementar la transcripción del gen TGF- β 2, incrementar su producción y activar la señalización TGF- β /Smad en la línea de células epiteliales de pulmón humano, A549. Asimismo, diversos estudios señalan que el resveratrol es capaz de disminuir la expresión del TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro* (Chávez y col., 2008; He y col., 2017; Qiao y col., 2017; Ashrafizadeh y col., 2020), inhibiendo la diferenciación y activación de los miofibroblastos a través de la supresión de la vía ERO/ERK/TGF- β /periostina (Wu y col., 2016); e inhibiendo la fibrosis y la expresión de TGF- β inducida por la angiotensina II y alta glucosa (Liu y col., 2015).

De igual manera se ha descrito que la administración oral de resveratrol (10 mg/Kg/día) fue capaz de disminuir la expresión del TGF- β y la fibrosis en ratas a las que se indujo cirrosis con tetracloruro de carbono; sugiriendo que el resveratrol posee efectos antifibróticos (Chávez y col., 2008). Asimismo, He y col. (2017), indicaron que el resveratrol fue capaz de disminuir la expresión de TGF- β en un modelo de prostatitis crónica en ratas, mejorando la fibrosis y suprimiendo la vía de señalización TGF- β /Wnt/b-catenina. Por su parte, Arablou y col. (2021) demostraron que el resveratrol mejora la progresión de la endometriosis mediante la disminución de la expresión del TGF- β y del factor de crecimiento derivado del endotelio en células de estroma endometrial. Asimismo, Qiao y col. (2017), demostraron una disminución en la expresión de TGF- β 1, p38, fibronectina

y mejoría sobre los cambios histológicos renales en ratas diabéticas tratadas con resveratrol (20 mg/Kg/día durante 4 semanas), y una disminución en la expresión de esta proteína y de la fibronectina en una línea de células mesangiales tratadas con resveratrol, sugiriendo que este polifenol tiene propiedades renoprotectoras durante la diabetes, pues fue capaz de disminuir el daño al tejido posiblemente mediante una inhibición de la vía de señalización p38/MAPK/TGF- β 1.

Por lo tanto, considerando que el resveratrol fue capaz de disminuir las concentraciones séricas del TGF- β , el cual ha demostrado estimular la síntesis de proteoglicanos por las CML, promoviendo la retención de lipoproteínas y su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química (Bobik y col., 1999), eventos claves en la aterosclerosis; se puede inferir que uno de los efectos antiaterogénicos del resveratrol se deba a la disminución en la secreción de esta citocina *in vivo* durante la aterosclerosis; lo cual podría contribuir a disminuir la acumulación de lipoproteínas en la íntima arterial, pues dicho efecto estuvo acompañado en una disminución en la formación y severidad de las lesiones ateroscleróticas, tal y como se ha demostrado previamente (González y col., 2018; Figueira y González, 2018; 2019; 2020). Es relevante señalar que el efecto del resveratrol sobre los niveles del TGF- β se observó en los conejos a los que se le indujo la aterosclerosis con una dieta hipercolesterolémica, lo cual indica la necesidad de un ambiente "estimulado" o inflamado, tal y como se ha apreciado *in vitro* (Buttari y col., 2014).

Hasta ahora, algunos estudios han indicado que el resveratrol mejora el

perfil lipídico y el metabolismo de las lipoproteínas en ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica (Ramprasath y Jones, 2010; Göçmen y col., 2011; Xie y col., 2014). Sin embargo, otros estudios experimentales y clínicos no han demostrado un efecto favorecedor del resveratrol sobre el perfil lipídico (Matos y col., 2012; Faghihzadeh y col., 2015; González y col., 2018; Figueira y col., 2018; 2019; 2020); dichos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio. Por lo tanto, la ausencia del efecto hipolipemiante encontrado en la presente investigación podría obedecer a la acumulación de lípidos exógenos provenientes de la dieta, ya que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides (Kolodgie y col., 1996). Sin embargo, a pesar de que la suplementación del resveratrol no tuvo efecto sobre los lípidos séricos, fue capaz de reducir la formación y progresión de la aterosclerosis, inducida por la dieta hipercolesterolémica desde la sexta semana de estudio; dicho efecto del resveratrol ha sido señalado previamente, pues Matos y col. (2012) demostraron que la suplementación con resveratrol (2 mg/Kg/día) en conejos expuestos a una dieta hipercolesterolémica durante 56 días, inhibió la progresión de la lesión aterosclerótica hacia un fenotipo más grave y disminuyó el área de la íntima y la relación íntima/media. Igualmente, otros estudios como el de Meng y col. (2014) han evidenciado que la suplementación con resveratrol en ratas que recibieron dieta aterogénica, inhibió el avance de la lesión aterosclerótica. Por lo tanto, el efecto antiaterogénico del resveratrol encontrado en el presente estudio, pudo ser dependiente de sus propiedades antiinflamatorias; pues su suplementación fue capaz de disminuir las concentraciones séricas del TGF- β .

En conclusión, de acuerdo con los resultados obtenidos y bajo nuestras condiciones experimentales, se sugiere que el TGF- β es un marcador sérico, temprano, no invasivo de aterosclerosis; reafirmando su importante papel en la fisiopatología de la aterosclerosis, por lo que su cuantificación en sangre podría proporcionar información útil dentro del protocolo diagnóstico de la aterosclerosis. Por otra parte, se observó que la suplementación oral con resveratrol ejerció efectos antiinflamatorios y antiateroscleróticos, pues disminuyó los niveles séricos del TGF- β , y redujo la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas, sugiriendo que la administración de este polifenol podría ser beneficioso para prevenir la aterosclerosis.

Referencias bibliográficas

- Adekunle A, Adelusi T, Fatoki J. 2013. Diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in white rabbits. *Asian J Pharm Clin Res* 6 (2): 105–108.
- Agarwal B, Baur J. 2011. Resveratrol and life extension. *Ann NY Acad Sci* 1215(1): 138–143.
- Agarwal I, Arnold A, Glazer N, Barasch E, Djousse L, Fitzpatrick A, Rimm E. 2015. Fibrosis-related biomarkers and large and small vessel disease: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 239(2): 539–546.
- Arablou T, Aryaeian N, Khodaverdi S, Kolahdouz-Mohammadi R, Moradi Z, Rashidi N, Delbandi A. 2021. The effects of resveratrol on the expression of VEGF, TGF- β , and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis. *Sci Rep* 11(1):6054.
- Ashrafizadeh M, Najafi M, Orouei S, Zabolian A, Saleki H, Azami N, Sharifi N, Hushmandi K, Zarrabi A, Seok K. 2020. Resveratrol modulates transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway for disease therapy: A new insight into its pharmacological activities. *Biomedicine* 8:261.
- Baur J, Sinclair D. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature reviews. Drug Discov* 5(6): 493–506.
- Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky

- A, Smirnov V, Kostolias G. 1999. Distinct patterns of transforming growth factor- β isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99(22): 2883–2891.
- Buday A, Órsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Hamar P. 2010. Elevated systemic TGF- β impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE $^{-/-}$ mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(2): H386–H395.
- Buttari B, Profumo E, Segoni L, D’Arcangelo D, Rossi S, Facchiano F, Saso L, Businaro R, Iuliano L, Riganò R. 2014. Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 257543.
- Camejo G, Bosch V, Arreaza C, Mendez H. 1973. Early changes in plasma lipoprotein structure and biosynthesis in cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res* 14:61–68.
- Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno M, Muriel P. 2008. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF- β increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats. *J Appl Toxicol* 28(1): 35–43.
- Chen P, Qin L, Li G, Zheng W, Dahlman J, Malagon-Lopez J, Gujja S, Cilfone N, Kauffman K, Sun L, Sun H, Zhang X, Aryal B, Canfran-Duque A, Liu R, Kusters P, Sehgal A, Jiao Y, Anderson DG, Gulcher J, Fernandez-Hernando C, Lutgens E, Schwartz MA, Pober JS, Chittenden TW, Tellides G, Simons M. 2019. Endothelial TGF- β signaling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat Metab* 1(9): 912–926.
- Cheng Y, Zhou M, Zhou W. 2019. MicroRNA-30e regulates TGF- β -mediated NADPH oxidase 4-dependent oxidative stress by Snai1 in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 43: 1806–1816.
- Dabek J, Kulach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. 2006. Transforming growth factor b and cardiovascular diseases: The other facet of the ‘protective cytokine’. *Pharmacol Rep* 58(6): 799–805.
- De Castro M, Veiga A, Pacheco M. 2009. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. *J Applied Res* 9(1,2): 18–22.
- Didac M, Esmeralda C, Nuria A. 2020. Cholesterol and Inflammation in atherosclerosis: An Immune-Metabolic Hypothesis. *Nutrients* 12(8): 2444.
- Dobrydneva Y, Williams R, Blackmore P. 1999. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br J Pharmacol* 128(1): 149–157.
- Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. 2020. Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants (Basel)* 9(9):864.
- Faghihzadeh F, Adibi P, Hekmatdoost A. 2015. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 114(5): 796–803.
- Figueira L. El Resveratrol. 2010. Papel en enfermedades cardiovasculares y cáncer. *INFORMED* 12(2): 73–84.
- Figueira L, González J. 2008A. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 10 (10): 593–607.
- Figueira L, González J. 2008B. Efecto de la Vitamina C, sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 11 (1): 30–36.
- Figueira L, González J, Arias M, Reigosa A. 2010. Efectos del Pycnogenol y vitamina E, sobre la actividad de la glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Salus* 14 (3):33–42.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209–216.
- Figueira L, González J. 2019. Efecto del resveratrol sobre la pentraxina 3 sérica en la aterosclerosis. Pentraxina 3 como marcador de aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 82 (1y2): 97–109.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 83 (1y2): 7–23.
- Frutkin A, Otsuka, G, Stempien-Otero A, Sesti C, Du L, Jaffe M, Minter D. 2009. TGF- β 1 limits plaque growth stabilizes plaque structure and prevents aortic dilation in apolipoprotein E-null mice.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(9): 1251–1257.
- Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, Viña J. 2013. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 48(2): 79–88.
- Göçmen A, Burgucu D, Gümüslü S. 2011. Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40–CD40L system as a potential target. *Appl Physiol Nutr Metab* 36(3): 323–330.
- Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Groux H. 2003. Specific abrogation of transforming growth factor- β signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood* 102(12): 4052–4058.
- González J, El Basset A, Pascuas R, Severino S, Perdomo M, Bayone J, Navarro M, Figueira L. 2018. Efecto del resveratrol sobre marcadores séricos de inflamación durante la aterosclerosis. Papel de la interleucina-17 e interleucina-33. *Rev Fac Farm* 81 (1y2): 25–40.
- Grainger D. 2007. TGF- β and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74(2): 213–222.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- He Y, Zeng H, Yu Y, Zhang J, Duan X, Zeng X, Gong F, Liu Q, Yang B. 2017. Resveratrol improves prostate fibrosis during progression of urinary dysfunction in chronic prostatitis. *Environ Toxicol Pharmacol* 54:120–124.
- Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Morisaki N. 1995. *In vivo* effect of TGF- β 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(11): 1951–1957.
- Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, Virmani R. 1996. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(12): 1454–1464.
- Kushwaha R, Hazzard W. 1978. Catabolism of very-low-density lipoproteins in the rabbit. Effect of changing composition and pool size. *Biochim Biophys Acta* 528:176–189.
- Labinsky N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. 2006. Vascular dysfunction in aging: Potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 13(9): 989–996.
- Little P, Tannock L, Olin K, Chait A, Wight T. 2002. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor- β 1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1): 55–60.
- Liu J, Zhuo X, Liu W, Wan Z, Liang X, Gao S, Yuan Z, Wu Y. 2015. Resveratrol inhibits high glucose-induced collagen upregulation in cardiac fibroblasts through regulating TGF- β 1-Smad3 signaling pathway. *Chem Biol Interact* 227: 45–52.
- Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliensky V, Daemen M. 2002. Transforming growth factor- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(6): 975–982.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Tedgui A. 2001. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89(10): 930–934.
- Mathew A, Pennathur S. 2014. Macrophages, Oxidative Stress, and Atherosclerosis. *Encyclopedia Med Immunol* 693–703.
- Matos RS, Baroncini LA, Précoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, Kaiber F, Précoma DB. 2012. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 98(2):136–142.
- Meng C, Liu J, Du A. 2014. Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *Int J Clin Exp Pathol* 7(11): 7899–7906.
- O'Brien K, Olin K, Alpers C, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Chait A. 1998. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 98(6): 519–527.
- Qiao Y, Gao K, Wang Y, Wang X, Cui B. 2017. Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF- β 1 pathway. *Exp Ther Med* 13(6): 3223–3230.
- Ramprasath V, Jones P. 2010. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr* 64(7): 660–668.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L-arginine

- plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083–1089.
- Robertson A, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell R, Hansson G. 2003. Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112(9): 1342–1350.
- Roth R, Gaubatz J, Gotto A, Pad J. 1983. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoprotein E in the rabbit. *J Lipid Res* 44: 1–1.
- Schulick A, Taylor A, Zuo W, Qiu C, Dong G, Woodward R, Dichek D. 1998. Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci* 95(12): 6983–6988.
- Shafi O. 2020. Switching of vascular cells towards atherogenesis, and other factors contributing to atherosclerosis: a systematic review. *Thrombosis J* 18:28.
- Stange E, Agostini B, Papenberg J. 1975. Changes in rabbit lipoprotein properties by dietary cholesterol, and saturated and polyunsaturated fats. *Atherosclerosis* 22:125–148.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Am Heart Assoc. Circulation* 15:1512–1531.
- Suenaga F, Hatsushika K, Takano S, Ando T, Ohnuma Y, Ogawa H, Nakao A. 2008. A possible link between resveratrol and TGF- β : Resveratrol induction of TGF- β expression and signaling. *FEBS Letters* 582(5): 586–590.
- Sun J, Byungrok M, Ki C, Eun J, Dong U. 2013. Effect of dietary cholesterol and cholesterol oxides on blood cholesterol, lipids, and the development of atherosclerosis in rabbits. *Int J Mol Sci* 14: 12593–12606.
- Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, Mohammed A, Ayo J. 2016. Resveratrol Protects Rabbits Against Cholesterol Diet-Induced Hyperlipidaemia. *Niger J Physiol Sci* 31(1):71–75.
- Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper R, van de Weijer T, Goossens G, Moonen-Kornips E. 2011. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism* 14(5): 612–622.
- Tseng P, Hou S, Chen R, Peng H, Hsieh C, Kuo M, Yen M. 2011. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* 26(10): 2552–2563.
- Uluçay S, Çam F, Batır M, Sütçü R, Bayturan Ö, Demircan K. 2015. A novel association between TGF β 1 and ADAMTS4 in coronary artery disease: A new potential mechanism in the progression of atherosclerosis and diabetes. *Anatol J Cardiol/ Anadolu Kardiyol Derg* 15(10).
- Wu H, Li G, Xie J, Li R, Chen Q, Chen J, Wei Z, Kang L, Xu B. 2016. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- β /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord* 16(1): 5.
- Xie H, Han H, Chen Z, He J. 2014. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11(1): 209–212.
- Yu H, Ma S, Sun L, Gao J, Zhao C. 2019. TGF β 1 upregulates the expression of lncRNA ATB to promote atherosclerosis. *Mol Med Rep* 19: 4222–4228.
- Zhang Z, Ho W, Huang Y, James A, Lam L, Chen Z. 2002. Hawthorn Fruit Is Hypolipidemic in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet. *J Nutr* 132: 5–10.
- Zhou X, Johnston T, Johansson D, Parini P, Funari K, Svensson J, Hansson G. 2009. Hypercholesterolemia leads to elevated TGF- β 1 activity and T helper 3-dependent autoimmune responses in atherosclerotic mice. *Atherosclerosis* 204(2): 381–387.
- Zhou X, Yang J, Zhou M, Zhang Y, Liu Y, Hou P, Zeng X, Yi L, Mi M. 2019. Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB. *Nutr Metab (Lond)* 16: 42.

Educación en Odontología: Del paleolítico a la pandemia por coronavirus

Education in dentistry:
From the paleolithic to the coronavirus pandemic

MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN

La educación en odontología no es fácil. Requiere instalaciones especializadas, laboratorios preclínicos y centros de simulación, práctica de clínica intramural, y literatura especializada, entre otros elementos. La duración de los estudios varía según el país. En América Latina puede ir de 4 años a 7 años. En Venezuela son 5 y en República Dominicana son 7 años. La evolución de esta disciplina no obedece a un *continuum*, a su desarrollo han contribuido varios ramales que resultan en la enseñanza de la odontología moderna.

Sin querer ser un historiador de la odontología, para hablar de la evolución es necesario mencionar que esta historia se remonta a la época Paleolítica cuando el llamado dentista práctico aprendía por ensayo y error. Las intervenciones dentales iniciales parten de 13000 años de la Era Paleolítica Superior Tardía en lo que es hoy la Toscana, donde los arqueólogos han descubierto varios dientes con signos de manipulación humana para aumentar el tamaño de la pulpa, y presencia de fibras y bitumen. También hay evidencia de la Era Neolítica Temprana de hace 7500 a 9000 años de tumbas en Pakistán que

indican el uso de alguna forma de taladro para remover tejido dental con caries.

Hasta el siglo XVI no había ningún texto dedicado exclusivamente a la cavidad oral o a los dientes. Los textos renombrados de Medicina antiguos y los de la época medieval de autores como Galeno de Pérgamo (también conocido como el "Príncipe de los Médicos") (año 129 D.C.) o Avicena, médico y filósofo islámico del siglo X, solamente hacían una referencia muy ligera al tratamiento de los problemas de la boca y de los dientes. Sin embargo, en la época de Avicena el libro que se refería más precisamente a la odontología fue la *Guía a la Medicina* de Abu Bakr Rabee Ibn Ahmad Al-Akhawyni Bokhari (Al-Akhawyni Bokhari), un médico persa y autor del Hidayat al-Muta`allemin Fi al-Tibb, el documento más antiguo en la historia de la medicina tradicional iraní, el cual contenía dos capítulos relacionados con enfermedades bucales y dentales, un capítulo sobre el dolor dental y otro sobre el dolor bucal y su tratamiento (Matini, 1965).

En 1563, Bartolomeo Eustachio (1520-1574), un importante anatomista y médico del Renacimiento italiano, hizo contribuciones muy significativas al

conocimiento de la anatomía y fisiología de la dentición, incluidas las primeras descripciones de la estructura de la pulpa dental y de la membrana periodontal. Su tratado sobre los dientes *Libellus de Dentibus*, fue traducido al inglés, e incluye notables descripciones de la pulpa dental, la membrana periodontal, el desarrollo de ambos conjuntos de dientes a partir de folículos dentales, el nervio trigémino y otras estructuras orales. Este libro fue publicado de nuevo como parte de Opúscula Anatómica (un pequeño estudio anatómico), lo cual sentó las bases para la aparición del primer texto referido a los dientes (Shklar y Chernin, 2000).

Los diferentes países tomaron diferentes rutas para la profesionalización de la odontología. En Prusia, por ejemplo, el Duque Frederick William, publicó un edicto en 1685 que ordenaba a todos los dentistas presentar un examen con una comisión para demostrar sus conocimientos. Algo similar se produjo en Francia bajo el reinado de Luis XIV en 1699, con tres maestros de la cirugía en París, antes de poder llamarles "expertos". Luego, hubo más restricciones y en 1766 se exigía un período de 2-3 años de aprendizaje y los que participaban en esto no podían ejercer otro tipo de actividades.

El término *chirurgien-dentiste*, o cirujano dentista, fue acuñado por primera vez por Pierre Fauchard, un famoso dentista francés, autor del *Le chirurgien dentiste*, una visión exhaustiva de la odontología. Este libro fue publicado en 1728 y constituye un hito en la historia de la educación odontológica y marca el comienzo de la odontología como una profesión especializada. Fauchard es considerado el padre de la odontología moderna.

Dentro de los dos volúmenes del Cirujano dentista se cubría todo lo del arte de la odontología para la época. Una "descripción

de las relaciones y la mecánica de los dientes, (...) la enfermedad de los dientes y su conservación", junto con instrumentos, opciones de tratamiento, y descripciones de las patologías bucales y dentales típicas. Además, el libro contenía sus observaciones profesionales de años de práctica en la Marina Francesa y en otras ciudades con el apoyo de famosos científicos, médicos, cirujanos y odontólogos de la época. Esto generó unas 40 publicaciones francesas en los siguientes 50 años.

Mientras que el entrenamiento era necesario para la práctica en esa época, aun no se requería una licencia. Esto ocurrió en 1771, cuando Benjamín Frische recibió permiso de la Facultad de Medicina en la Universidad Christian Albrecht para practicar la odontología. Sucedió con varios dentistas y de allí surgió la contratación de dentistas certificados para enseñar a los estudiantes de medicina. En 1844, Samuel Cartwright fue contratado como cirujano dentista para el Hospital King's College. Único entre los hospitales londinenses, fue fundado en 1829 específicamente para entrenar estudiantes de medicina. En 1860, Cartwright se convirtió en el primer profesor de cirugía dental del Reino Unido. Hasta ahora siempre está la dependencia de la Facultad de Medicina. Igual destino tenía la Facultad de Farmacia.

Las primeras clases formales sobre odontología en Inglaterra fueron dadas a estudiantes de medicina en 1799 en el Guy's Hospital en Londres. El profesor era un dentista llamado Joseph Fox quien en 1803 había producido el tratado *La Historia Natural de los Dientes Humanos*. Por ese tiempo, en Alemania, el dentista Karl Joseph Ringelmann se convirtió en el primer profesor a quien se le permitió enseñar odontología en la Universidad de Wurzburg, comenzando en 1825. De nuevo, estas enseñanzas se dirigían

exclusivamente a estudiantes de medicina, quienes generalmente realizaban trabajo dental en el contexto de la práctica médica.

Todos estos hechos ensombrecían la posibilidad de tener lo que hoy llamamos Escuela de Odontología. Entonces, ¿qué había que hacer como próximo paso? organizar las escuelas de odontología para suministrar la educación necesaria para entrar a la profesión.

Durante el siglo XVIII y principios del XIX, Francia e Inglaterra eran los países más avanzados en la odontología y con la revolución industrial comenzó a surgir un mercado para un cuidado dental más sofisticado. En este tiempo, los Estados Unidos tomaron un lugar preponderante en la educación en odontología. Surgió primero en los años 1800s a partir de dos elementos: a) la falta de oportunidad para un entrenamiento formal para los que querían ser odontólogos y b) esta falta de entrenamiento llevaba a que se incorporaran a la práctica individuos que traían desprestigio a la profesión odontológica. Esa situación se convertía en un círculo vicioso, no había suficientes dentistas entrenados y no había suficientes profesores para resolverlo. Algunos de estos dentistas iniciaron cursos de entrenamiento formales para alumnos privados. Otros abrieron escuelas privadas para varios alumnos.

Horace Hayden y Chapin Harris, junto a Eleazar Parmly, visualizaron cuatro pasos para impulsar la profesión odontológica: a) crear departamentos de odontología en las escuelas de medicina, con base en un curriculum que proveería entrenamiento formal a los médicos, siendo así la odontología una subespecialidad de la medicina; b) la necesidad de publicaciones profesionales que permitieran el conocimiento de los avances y la

comunicación de las experiencias clínicas vividas; c) el establecimiento de sociedades profesionales para compartir experiencias y, d) establecer los elementos legales de la profesión. De esta manera, quedarían fuera todos esos elementos que en el lenguaje de hoy diríamos que ejercían ilegalmente la odontología.

Hayden y Harris, fíjense la visión de estos profesores, originalmente buscaron desarrollar la educación odontológica en una Universidad ya existente. La escogida fue la Universidad de Maryland y en 1837 plantearon a las autoridades la formación de un Departamento Dental con un curso completo como parte de la escuela de medicina. La solicitud fue negada en virtud "que ya los estudiantes tenían suficiente para estudiar y que con ese único curso no iban a ser expertos en odontología".

Entonces, plantearon a la Legislatura de Maryland la creación de una escuela de odontología independiente. A pesar de la oposición de la escuela de medicina, su solicitud fue aprobada el 1° de febrero de 1840. Ese mismo año se creó la Escuela de Cirugía Dental de Baltimore, con cuatro profesores. Chapin Harris dictó la clase inaugural de su escuela para cinco alumnos. En los primeros 10 años, esta escuela graduó 84 estudiantes y otorgó 151 grados honorarios. Para graduarse había que completar dos sesiones o dos años de aprendizaje (entrenamiento). Cada sesión duraba no menos de cuatro meses. Fue en 1846 que se añadió al curriculum la primera instrucción práctica en una clínica dental. Horace Hayden fue el primer presidente (Decano) de esa escuela y permaneció en el cargo en forma vitalicia hasta 1844 y Harris le sucedió en el mismo.

En Europa las cosas se desarrollaron en forma diferente. Aun cuando la odontología estaba más avanzada en Francia e Inglaterra

en los años 1700s, el desarrollo formal de la enseñanza odontológica fue más lento que en los Estados Unidos. En Inglaterra, el entrenamiento era prolongado y se hacía bajo la dirección de médicos y cirujanos que, además, ejercían como dentistas.

La compañía de médicos de Londres se convirtió en el Colegio Real de Médicos en 1843 y su jurisdicción cubría toda Inglaterra. La combinación de las sociedades científicas con la escuela de odontología para el establecimiento de la cirugía dental en Gran Bretaña fundó la Sociedad Odontológica de Londres en 1856. Se vio la necesidad de reconocer a los dentistas que habían estudiado más que un curso en la Facultad de Medicina. Para ello se le pidió al Colegio Real de Médicos que expidiera un diploma. Dos años después, la Sociedad Odontológica creó lo que se convertiría en el Hospital Real Dental en la Plaza Soho, y en 1859 la primera escuela de odontología en el Reino Unido, la Escuela de Cirugía Dental de Londres. Lo que sigue después es historia odontológica.

En 1834, el notable médico francés y autor del Tratado sobre los Dientes (1820), Joseph Jean-Francois Lemaire, ofreció un curso teórico práctico en odontología en la Universidad de París. La primera escuela de odontología formal en París (L'Ecole Dentaire) abrió en 1879 mientras que la primera escuela alemana abrió en 1884 en Berlín. En Canadá, similar a las escuelas de odontología británicas, en la Universidad de Toronto fue establecida en 1858.

Algunas Facultades de Odontología inglesas son de creación más reciente, inclusive, algunas son contemporáneas con la nuestra, a saber: La Facultad Inglesa comenzó en 1947, con Robert Vivian Bradlaw como Decano. Esta asumió la responsabilidad por las Licencias en Cirugía Dental y estableció una Facultad de Cirugía

Dental y programas de entrenamiento. La Facultad de Cirugía Dental de Edimburgo comenzó en 1949; y la de Glasgow 1967. La Facultad de Edimburgo se formó en 1982 bajo el Decanato de Stephen Denis Hatt. En 1963, el Colegio Real de Cirujanos en Irlanda estableció una Facultad de Odontología.

En general, de 1840 a 1880, en los Estados Unidos se abrió un total de 24 escuelas de odontología, pero todas menos cinco eran independientes. Un grupo de escuelas estableció departamentos de odontología como parte de las escuelas de medicina, comenzando con Harvard en 1867, la Universidad de Michigan en 1875 y la Universidad de Pensilvania en 1878. Luego, la duración de los estudios de odontología fue aumentando de 2 a 3 y a 4 sesiones.

Una coyuntura crítica en la educación odontológica ocurrió cuando a William J. Gies, un bioquímico de la Universidad de Columbia, la Fundación Carnegie le pidió que revisara la situación de la educación odontológica. El estudio de 5 años llevado a cabo por un Comité coordinado por Gies, examinó la falta crítica de ciencia y de estandarización en la educación odontológica. El Informe cambió la profesión, estableció patrones y preparó el escenario para los exámenes nacionales formales que comenzaron en 1934. El informe de Gies se publicó en 1926 y se constituyó en otro hito en la educación odontológica. El informe pedía mayor cooperación entre Odontología y Medicina, la inclusión de los hallazgos de las investigaciones odontológicas en el curriculum de la escuela, y la necesidad de cursos de ciencias básicas para, para cubrir las demandas de la salud bucal en el futuro.

En los 95 años desde el informe de Gies, la educación odontológica se ha

expandido en cuanto a los requerimientos, el contenido y el alcance. Hay alrededor de 2000 escuelas de odontología en todo el mundo, sin hablar de los programas de terapia, enfermería e higiene dentales. Los avances tecnológicos en el suministro de la información (en línea, virtual, simulación), los avances científicos y los procedimientos menos invasivos tendrán un impacto importante en el formato, el contenido, la temporalidad y la ubicación de la educación. Obviamente, todo esto alterará la forma de interactuar con los estudiantes y con los pacientes, como se está viendo hoy a propósito de la pandemia COVID-19.

Antes de hacer algunos comentarios sobre la necesidad de incorporar la tecnología a la educación odontológica a la luz de la pandemia, hagamos un breve recuento de la evolución de nuestra Facultad de Odontología, la cual es muy joven y tiene sus inicios, inclusive, posterior al informe de Gies. En 1897, el Código de Instrucción Pública dispone la creación de la primera escuela dental adscrita a la Facultad de Ciencias Médicas. El 28 de julio de 1922 se instala la primera escuela dental, teniendo al viejo Claustro de San Francisco como sede y al Dr. Augusto Adolfo Nouel como director.

Para aquella época el concepto científico de la profesión estaba aún muy bajo. Había necesidad de fortalecer la odontología con profesionales decididos a sumar esfuerzos por el progreso y la dignificación de la odontología venezolana. Fue así como en octubre de 1923 fue inaugurada la Escuela de Dentistería de la UCV. Los docentes Luis María Cottón, José Izquierdo, César Anzola, Jacinto Nouel, Julio Vivas López, asumieron ad honorem la tarea, hasta que en 1924 le fue asignada a la escuela un presupuesto. Aquella escuela de dentistería fue el cimiento sobre el cual se afianzaron los estudios odontológicos en Venezuela. Fue al

abrigo de ella que cumplieron sus estudios los alumnos de la primera promoción de 1925.

La promulgación de una nueva ley de educación da origen a la creación de la Facultad de Odontología, el 24 de julio de 1940, iniciándose así "una nueva etapa forjada en el estudio, la eficiencia profesional y el interés social". La profesión alcanza la jerarquía e independencia que le corresponde.

Los años subsiguientes representan una serie de cambios: es aprobada la Ley de Ejercicio de la Odontología, que crea el Colegio de Odontólogos de Venezuela y se consagran los derechos y deberes profesionales. En 1946 la Facultad es reorganizada totalmente, progresos que se perfeccionan al ser promulgado el estatuto orgánico de las universidades nacionales.

Entre los logros de la Facultad de Odontología se destacan: la fundación de la Asociación de Facultades y Escuelas de Odontología (Avefo); creación del Centro Nacional de Materiales Dentales; se redefine conceptual y doctrinariamente la enseñanza profesional; se inician los programas de postgrado; se adquiere el microscopio electrónico; se crea el Departamento de Odontología Preventiva y Social, cuya creación marca el inicio formal de la enseñanza de la Odontología Social en Venezuela; se crea el Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vincentelli"; se realizan las primeras experiencias extramurales, hoy docencia servicio, precursoras del actual servicio comunitario; ingresa la nueva tecnología representada en la instalación de turbinas de alta velocidad que sustituyen los elementos rotatorios tradicionales; se edita Acta Odontológica Venezolana; el plan de estudios es objeto de secuenciales modificaciones a la luz de nuevas realidades.

En los últimos años se destaca una política de estímulo y apoyo a la formación y mejoramiento docente, ampliación de la oferta de programas de postgrado, reactivación del diseño curricular e inicio del curso de formación para técnicos protésicos. Transformación del departamento de triaje en centro de investigación y diagnóstico clínico, creación del centro de atención a pacientes con enfermedades infectocontagiosas "Dra. Elsa la Corte". Con el apoyo del Vicerrectorado Académico, se crea la oficina de Educación Continua, la que descolla por sus logros en la capacitación de estudiantes y profesionales. A nivel nacional se crean dos nuevas cátedras: psicología y anestesiología. Se afianza el servicio de atención a pacientes con discapacidad. Se inaugura la sala de simuladores para la práctica preclínica y para el ejercicio de nuevas técnicas en los cursos de educación continua. Se crea la Unidad de Informática. Se proyecta la facultad en su actividad cultural y deportiva al crear una coordinación para ello. Se crea el Centro de Bioseguridad, muy importante en el área de la salud ocupacional, sobre todo hoy en día.

La Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela constituye un ejemplo de calidad, actualidad y constancia que le permite estar en los primeros lugares tanto nacionales como internacionales.

COVID-19 ha traído, dentro del campo de la odontología clínica y la educación, una gran dificultad. Sin embargo, los profesores de odontología ahora tienen la capacidad y la tecnología para modernizar su enseñanza adaptando conceptos digitales para proveer una formación adecuada para posibles hechos similares potenciales en el futuro. Esta crisis también ha demostrado que hay una subestimación del papel de las instalaciones y las tecnologías

innovadoras para la educación y servicios de salud digitales, así como también para la tele-odontología.

Las herramientas y aplicaciones digitales ahora son rutinarias en el cuidado dental, lo cual debe ser considerado en los planes de estudio para preparar a los estudiantes para ese mundo de la tecnología. Las posibilidades de aprendizaje digital, más interactivo e intuitivo, motivará más a los estudiantes y les suministrará experiencias estimulantes y significativas, sobre todo que estos elementos estarán disponibles cuando lo consideren conveniente en su tiempo.

En este momento, la educación odontológica digital comprende varias áreas de interés docente incluyendo la transferencia de información con base en Internet y tecnologías específicas tales como el mapeo superficial digital, las destrezas motoras con el simulador dental, la radiografía digital. Además, se supone que la tecnología AR/VR (realidad aumentada/realidad virtual) jugará un papel dominante en el desarrollo futuro de la educación odontológica.

En medio del confinamiento debido a la pandemia, las actividades docentes presenciales con estudiantes de pre- y postgrado fueron interrumpidas a nivel mundial. Los profesores están tratando de adaptarse al distanciamiento social, la duración de la cuarentena es impredecible y los profesores han recurrido a herramientas virtuales para continuar las actividades docentes. Hay nuevas percepciones en estos escenarios; por ejemplo, en una encuesta reciente sobre el manejo europeo de la crisis, el 90% de las escuelas de odontología reportó el uso de herramientas de software en línea, 72% usaba transmisión de videos, 48% daba enlaces para búsquedas bibliográficas posteriores, 65% organizaba

reuniones virtuales y otras personas organizaban reuniones de pequeños grupos. Aún en los Estados Unidos se hicieron pocas recomendaciones sobre el distanciamiento social para proteger a toda la comunidad, profesores, estudiantes, empleados y pacientes, y como continuar la docencia. De Brasil, por ejemplo, donde hay un elevado número de personas afectadas, no se sabe nada de las escuelas de odontología.

Todas las plataformas bien conocidas son usadas intensamente a nivel mundial para los contenidos teóricos y estas se están adaptando a las nuevas circunstancias. Hay instituciones que sugieren el uso de plataformas personales para dar clase y para mejorar la comunicación entre estudiantes y profesores.

Uno de los elementos que destacan en la forma como la pandemia puede afectar la enseñanza de la odontología es que, en los Estados Unidos, y probablemente en cualquier país del mundo, el Departamento de Higiene y Salud Ocupacional calificó a los odontólogos como personal de muy alto riesgo debido al potencial de exposición al virus por los procedimientos que generan aerosoles (AGP, PGA). Hay información sobre Wuhan y los odontólogos, pero sin seguimiento de la enseñanza de la odontología. Se han identificado retos como la protección de la salud de los estudiantes, de los profesores y de los empleados. El reto final es asegurar que los estudiantes adquieran la formación adecuada, la experiencia necesaria y tengan evaluaciones que pueden asegurar el éxito de su ejercicio profesional.

En el proceso enseñanza-aprendizaje, la tecnología ofrece muchas oportunidades. El desarrollo de programas a la medida lleva mucho tiempo, pero puede promover el compartir los materiales. Aunque aún con estos elementos se requiere el

distanciamiento social, los maniqués ofrecen algunas oportunidades para obtener destrezas. Las escuelas deben reevaluar sus políticas y su curriculum e incorporar métodos apropiados de educación a distancia permanentemente en sus clases. Indudablemente, hay fallas porque no estábamos preparados para esta pandemia.

En estos momentos no hay evidencia del impacto real de la docencia virtual en la formación del estudiante y en la solidez de la formación por estos medios. Es muy pronto para opinar al respecto. Esta pandemia dejará una transformación duradera en la educación odontológica, y también en otras áreas de la salud, con la evolución y avances de los protocolos de investigación, la tele-odontología y los ensayos clínicos. Los efectos de la pandemia son profundos y pueden cambiar para siempre la enseñanza de la odontología.

Referencias bibliográficas

- Alfonso Tejada FI, Díaz Acosta Y, Martínez Ramos AT, Rivas Corría B, Benítez Pérez C. 2016. Avicena y la trascendencia de la medicina y la cultura islámicas en el mundo occidental. EDUMECENTRO 8(suppl 2): 32–47.
- Alzahrani SB, Alrusayes AA, Aldossary MS. 2020. Impact of COVID-19 pandemic on dental education, research, and students. Int J Health Sci Res 10(6): 207–212.
- Campohermoso Rodríguez OF, Soliz Soliz RE, Campohermoso Rodríguez O, Zúñiga Cuno W. 2016. Galeno de Pérgamo "Príncipe de los Médicos". Cuad Hosp Clín 57(2): 84–93.
- Deery C. 2020. The COVID-19 pandemic: implications for dental education. 21: 46–47.
- García-Arocha C. 2010. Discurso pronunciado en el Acto de Conmemoración de los 70 años de la Facultad de Odontología. Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. <http://portal.ucv.ve/organizacion/rectorado/discursos-pronunciados-por-la-rectora/julio-2010/70-anos-de-la-creacion-de-la-facultad-de->

[odontologia.html](#)

- Gelbier S. 2005. 125 years of developments in dentistry, 1880–2005. Part 5: Dental education, training and qualifications. *Br Dent J* 199 (10): 685–689.
- Machado RA, Bonan PRF, Pérez DEDC, Martelli Junior H. 2020. COVID-19 pandemic and the impact on dental education: discussing current and future perspectives. *Braz Oral Res* 34: e83.
- Matini J. 1965. *Hedayat al-Motaallemin fi Tebb*. University Press, Mashhad.
- Shklar G, Chernin D. 2000. Eustachio and “*Libellus de dentibus*” the first book devoted to the structure and function of the teeth. *J Hist Dent* 48(1): 25–30.
- Spielman AI. 2020. *A Brief History of Dental Education in Clinical Education for the Health Professions: Theory and Practice*. Nestel D, Reedy G, McKenna L, Gough S. Eds., Springer-Nature Publishers, London.
- Zitzmann NU, Matthisson L, Ohla H, Joda T. 2020. Digital undergraduate education in dentistry: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health* 17(9): 3269.

Recibido: 17/12/2020
Aceptado: 15/02/2021

Psicosis puerperal: una patología olvidada

Puerperal psychosis: a forgotten pathology

MILAGROS ROJAS^{1,*}, MERVIN CHÁVEZ-CASTILLO^{1,2**}, PAOLA RAMÍREZ^{1***}, VÍCTOR LAMEDA^{1****}, ANA VALERIA CASTRO^{1*****}, WHEELER TORRES^{1*****}, VALMORE BERMÚDEZ^{1*****}, JOSELYN ROJAS-QUINTERO^{3*****}

Resumen

La psicosis puerperal (PP) es el trastorno más grave que se puede presentar durante el puerperio, con consecuencias en ocasiones fatales. Antecedentes de PP en embarazos anteriores o padecer de trastorno afectivo bipolar o esquizofrenia aumentan considerablemente el riesgo de padecer este trastorno. Durante el embarazo ocurren numerosos cambios fisiológicos en el cuerpo de la mujer, los cuales son necesarios para el desarrollo sano del producto. En la presente revisión, se exponen mecanismos que permiten determinar la fisiopatología de la PP en los cuales están involucrados la acción de hormonas tanto esteroideas como tiroideas, mecanismos inmunitarios y la disrupción del ciclo circadiano. La PP se caracteriza por ser de inicio brusco, con sintomatología altamente variable que puede modificar el cuadro clínico que se presenta. Una vez diagnosticada, existen herramientas terapéuticas tanto farmacológicas como no farmacológicas que considerar. A pesar de ello, no existe un consenso establecido para el tratamiento de este cuadro y se requieren estudios a mayor escala para identificar dianas terapéuticas.

Palabras clave: Psicosis puerperal, puerperio, trastorno bipolar, trastorno esquizo-afectivo, fármacos psicotrópicos.

Abstract

Postpartum psychosis (PP) is the most serious psychiatric disorder with occasionally lethal consequences occurring during the puerperium. A medical history of previous episodes reported on prior pregnancies and/or suffering from bipolar disorder or schizoaffective disorder considerably increases the risk of experiencing PP. There are various required changes the body of a woman endures during pregnancy to properly maintain the correct development of the fetus. Likewise, some of the mechanisms seemingly related to the development of PP, which attempt to clear its etiology, are expounded. These mechanisms involve steroid and thyroid hormones, immunological mechanisms, and the disruption of the circadian rhythm. PP is of abrupt onset, altering the clinical overview depending on the intensity of the symptomatology, setting the trend for the pharmacological and non-pharmacological treatment most fitting for the situation. However, there is no set consensus regarding the management of this clinical scenario. Therefore, larger-scale studies are needed to determine possible therapeutic targets.

Keywords: Postpartum psychosis, puerperium, bipolar disorder, schizoaffective disorder, depression, mania, psychotropic medication.

1. Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas. Escuela de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 2. Hospital Psiquiátrico de Maracaibo. Maracaibo, Venezuela. 3. Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA.

Correspondencia: milagrosrojascaldera@gmail.com

ORCID: *0000-0003-2764-8846; **0000-0001-8511-0230; ***0000-0002-5986-0246; ****0000-0003-4769-1497; *****0000-0003-0417-0210; *****0000-0002-7068-0190; *****0000-0003-1880-8887; *****_0000-0003-4994-075X

Introducción

La psicosis puerperal o psicosis postparto (PP) es un trastorno psiquiátrico que se presenta repentinamente en los primeros días del puerperio extendiéndose hasta cuatro semanas después del parto (Gelfand, 2015). Comúnmente, la PP se presenta en mujeres con antecedentes de trastorno bipolar (TB) o esquizofrenia y se manifiesta como manía, depresión severa o una mezcla de los anteriores; conjuntamente, se presenta con psicosis, expresándose en delirios y/o alucinaciones y marcada confusión (Florio y col., 2013).

La PP es uno de los trastornos psiquiátricos con menor prevalencia, ubicándose entre el 0,1% a 0,2% de las mujeres puérperas, a diferencia de lo observado en los casos de depresión postparto (DPP) y tristeza postparto, con porcentajes que varían de 10-20% y 30-80%, respectivamente (Rukh y col., 2013; Munive-Beltrán y col., 2019). A pesar de presentarse en menor medida, la PP puede exhibir un crecimiento exponencial de acuerdo con los antecedentes personales maternos como la presencia de TB o trastorno esquizo-afectivo, reportándose que estos antecedentes se encuentran presentes en 72% a 88% de los casos (Sit y col., 2006). Su aparición abrupta y su clínica florida le otorgan un papel importante en el manejo terapéutico, así como en la implementación de intervenciones preventivas, buscando evitar consecuencias fatales como lo son el suicidio y el infanticidio, lo cual se estima ocurren 19% y 8% de los casos, respectivamente (Larios y col., 2017).

Sin embargo, la etiología y fisiopatología exacta de la PP sigue siendo desconocida; no obstante, se han llegado a identificar distintos posibles procesos que involucran

mecanismos hormonales e inmunes, así como alteraciones en el correcto funcionamiento de neurotransmisores (Glover y col., 2004). Es por ello por lo que el objetivo de esta revisión es presentar las distintas teorías formuladas sobre la etiología y fisiopatología de la PP, así como el tratamiento farmacológico propuesto.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda exhaustiva en plataformas que incluyeron, pero no estuvieron limitadas a PubMed, Google Scholar y BioMed Central, utilizando términos tales como "psicosis puerperal", "psicosis postparto", "manía postparto", "delirio postparto", "depresión postparto", entre otros. Se incluyeron resultados de revisiones, revisiones sistemáticas, meta-análisis, reportes de casos y ensayos clínicos. La investigación, redacción y revisión del contenido se realizó entre diciembre de 2019 y octubre de 2020.

PSICOSIS PUERPERAL: CLÍNICA Y FACTORES DE RIESGO

La PP suele presentarse en el período inmediatamente seguido al parto, manejándose como límite las primeras cuatro semanas según lo establecido por el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) (O'Hara y col., 2014; Brockington y col., 2017; Núñez-Ariza y col., 2020). La PP es de inicio brusco, y puede desaparecer como episodio psicótico tan súbitamente como aparece. En un estudio prospectivo describieron la clínica de la PP como una afección determinada por labilidad emocional y fluctuaciones anímicas, con un marcado impedimento cognitivo que sugiere estados de delirio,

comportamiento inusual, insomnio, alucinaciones visuales y auditivas presentes en el 39%, 33%, 52%, 34% y 39% de las mujeres, respectivamente, lo cual suele ser puntuado por ideas altruistas e impulsos homicidas hacia su infante (Kamperman y col., 2017). Igualmente, estas pacientes pueden presentar comportamientos maníacos típicos, incluyendo euforia, sobreactividad, disminución de horas de sueño, desinhibición, fuga de ideas y aumento de sociabilidad contrastada por irritabilidad (Essali y col., 2013).

Debido a esta gran variabilidad clínica es necesario identificar a las mujeres gestantes en riesgo de padecer PP, para lo cual se deben tomar en cuenta los antecedentes personales y familiares de trastornos psiquiátricos desde el inicio de sus consultas prenatales (Doyle y col., 2015). Dentro de los factores de riesgo más documentados, se ha determinado que antecedentes familiares como el TB y esquizofrenia aumentan la probabilidad de aparición de PP, especialmente dentro del espectro bipolar, donde el riesgo de padecer este trastorno es de un 50% (Vesga-López, 2008). Se agrega dentro de la historia personal de la mujer haber sido diagnosticada con PP en otras oportunidades, estando entre un 25 y 57% de posibilidades de recurrencia (Pérez-Rey, 2019).

Asimismo, existen otros factores de riesgo de gran relevancia como el ser madre primeriza en ausencia absoluta o falta de soporte de pareja o familiar, bajo estatus socioeconómico y complicaciones obstétricas perinatales (Mannion y col., 2014). De este modo, un estudio transversal demostró que factores perinatales como complicaciones maternas ($P=0,01$), primiparidad ($P=0,02$) y bajo ingreso socioeconómico ($P=0,018$)

estaban significativamente asociados con el desarrollo de PP (Upadhyaya y col., 2014). Asimismo, durante un estudio transversal con 129 pacientes con diagnóstico de TB tipo I o trastorno esquizo-afectivo expresaron mayor riesgo de presentar PP en aquellas mujeres primíparas (OR: 3,75; IC95%: 1,94-7,27; $p<0,05$) y complicaciones en el parto (OR: 2,68; IC95%: 1,16-6,25; $p<0,05$) (Blackmore y col., 2006). Aunque la relación de dichos factores con la PP no esté completamente elucidada, se le atribuye un papel significativo a los eventos estresantes psicosociales y el aumento del cortisol causados por el estrés presente con el nacimiento del primogénito.

En cuanto a la edad en la cual la PP se presenta más frecuentemente, algunos estudios describen como factor de riesgo el inicio temprano de la maternidad, mientras que otros estudios presentan evidencia contradictoria (Blackmore y col., 2006; Jones y col., 2009; Mannion y col., 2014; Upadhyaya y col., 2014; Cranford y col., 2018). En este sentido, se observó mayor probabilidad de desarrollar desórdenes psiquiátricos postparto en menores de 25 años (OR: 1,34 IC: 95%; 0,89-2,03) (Vesga-López y col., 2008) mientras que Valdimarsdóttir y col. (2009) encontraron que las mujeres de 35 años o más (HR 6,9; IC 95%; 4,2-11) tienen mayor riesgo de desarrollar PP que las jóvenes (HR 2,4; IC 95%, 1,5-3,8), estimándose el papel de las posibles diferencias hormonales durante el embarazo en las edades maternas más extremas (Valdimarsdóttir y col., 2009). Se requieren más estudios que evalúen la asociación entre edad materna y desarrollo del PP para la evaluación de factores de riesgo al momento de la evaluación prenatal.

BALANCE HORMONAL PRENATAL Y POSTNATAL

Existen numerosos cambios neuroendocrinos durante el embarazo, requiriéndose la conservación del equilibrio entre estos sistemas para proveer al producto un ambiente adecuado que permita su correcto crecimiento (Kota y col., 2013). Todos los ejes endocrinos se ven afectados de distintas maneras, siendo la hipófisis una de las estructuras que presenta severos cambios en su conformación; aumentado su masa y tamaño en aproximadamente un tercio del original, de 9,6-10 mm pre-embarazo a 10-12 mm inmediatamente al inicio del período postparto, regresando a su tamaño original alrededor de seis meses después (Laway y col., 2013).

Otro cambio generado durante el embarazo es el aumento de volumen de la glándula tiroidea, observándose un crecimiento de un 20-40% en áreas con deficiencia de suplementación de yodo en la dieta, y en un 10% en áreas en las cuales existe suficiente suplementación de yodo. Además, la producción de T4 y T3 se duplica, al igual que los requerimientos diarios de yodo. Una vez finalizado el período de gestación e iniciado el puerperio, los niveles de hormonas tiroideas de la madre tienden a regresar a la normalidad (Stenzel y col., 2013).

En el caso de las hormonas sexuales femeninas, la curva de fluctuación de estrógeno alcanza niveles tan altos como 22-35 ng/mL (Leuner y Sabihi, 2016). De igual manera, la progesterona aumenta sus niveles paulatinamente, reportándose valores diez veces por encima de los medidos en la etapa lútea del ciclo ovulatorio (Kumar y col., 2012). Una vez culminado el embarazo, el cuerpo de la mujer se ve

repentinamente privado del productor de gran parte de dichas hormonas, la placenta (Workman y col., 2012).

Con respecto al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), los niveles de cortisol aumentan a lo largo del embarazo, consiguiendo un pico de producción durante el tercer trimestre, dos o tres veces por encima de lo visto en no embarazadas (Caparros-González y col., 2017). Tal situación es producto de dos estímulos: la producción placentaria de hormona liberadora de corticotropina (CRH) que tendrá la capacidad de estimular la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) en la hipófisis; y la estimulación producto del aumento de estrógeno de la síntesis de transcortina (Evans y col., 1987). A su vez, la CRH hipotalámica es inhibida por los altos niveles de cortisol circulantes, por lo que, una vez finalizado el período de embarazo, le tomará al HHA de dos a doce semanas para regresar a la normalidad (Workman y col., 2012).

Otras hormonas a resaltar son la oxitocina y la prolactina, la primera alcanza el tope de producción en el tercer trimestre de embarazo y con el parto para luego declinar o sostenerse en el período postparto según circunstancias tales como el período de lactancia (Yolken y Torrey, 2008); la segunda aumenta sus niveles como resultado de la estimulación por parte de los estrógenos en la última fase del embarazo, su concentración sérica igualmente depende principalmente de la lactancia materna (Laway y col., 2013).

HIPÓTESIS MULTIFACTORIALES DE LA ETIOLOGÍA DE LA PSICOSIS PUERPERAL

Distintas hipótesis etiológicas han sido propuestas, tomando en cuenta que

la PP, como muchas otras afecciones, es de carácter multifactorial. Dentro de los procesos fisiopatológicos, el sistema endocrino se encuentra involucrado, con afectación de las hormonas gonadales femeninas y hormonas tiroideas. Asimismo, se ha establecido la hipótesis según la cual los neurotransmisores y el sistema inmune pueden estar involucrados.

Mecanismo endocrino: ¿Siempre son hormonas?

Hormonas Gonadales Femeninas

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) se altera durante el embarazo y el puerperio, períodos en los cuales los esteroides gonadales modulan las funciones del sistema nervioso central a través de los receptores intracelulares de esteroides, los cuales pueden tener un papel en la etiología de la enfermedad mental postparto (González-Castro y col., 2016).

Summers y Onate (2014) describieron el reporte de un caso donde una transexual femenina de 38 años que recibía terapia hormonal con estrógenos conjugados desde la adolescencia fue atendida por la aparición de psicosis luego de suspender su uso abruptamente. Del mismo modo, Hopker y col. (1991) reportaron el caso de una paciente con antecedentes de PP, quien, tras la terminación de un embarazo molar de 14 semanas, presentó PP cuatro semanas después del procedimiento. En ambos casos se evidencia la aparición de psicosis posterior al descenso dramático de niveles hormonales.

El estrógeno tiene tanto efectos directos como indirectos sobre la actividad dopaminérgica mesolímbica y mesostriatal,

modulando la transcripción del gen para la tirosina hidroxilasa y por ende la síntesis de L-DOPA, precursor de la dopamina (Van Hartesveldt y Joyce, 1986; Sánchez y col., 2010). Durante el embarazo, los niveles elevados de estrógenos inhiben la síntesis de dopamina, aumentando la sensibilidad de receptores dopaminérgicos D2 de manera compensatoria. Una vez que los niveles de estrógenos bajan drásticamente luego del embarazo, el aumento en la síntesis de dopamina se vería acompañado de receptores D2 hipersensibles, lo cual podría desencadenar un episodio psicótico en mujeres vulnerables (Huber y col., 2004; Czoty y col., 2009).

Por otra parte, en un estudio realizado por Brockington y col. (1990) se describe el caso de 4 mujeres con antecedentes de PP que presentaron episodios recurrentes iniciados a partir de las 36 semanas de gestación, semana que marca el inicio del descenso de los niveles de progesterona en gestantes en preparación para el momento del trabajo de parto (Kota y col., 2013), con una posterior reaparición de episodios después del parto, sugiriendo que el descenso de progesterona también podría ser un catalizador que lleva a la aparición de la PP (Munive-Beltrán y col., 2019).

De igual manera, la alopregnanolona (ALLO), metabolito de la progesterona que actúa positivamente sobre los receptores GABA en el cerebro de manera directa e indirecta, desempeñándose como modulador alostérico positivo en bajas concentraciones y como ligando en altas concentraciones (Schiller y col., 2014), se ve implicada en los desbalances hormonales propios del puerperio, período en el que sus niveles disminuyen en comparación con mujeres sanas en período folicular (Epperson y col., 2006).

Los niveles de ALLO se elevan a lo largo del embarazo, ocasionando hiposensibilidad y regulación a la baja de receptores GABA-A post-sinápticos, de tal forma que el descenso abrupto de ALLO durante el puerperio inhibiría de manera drástica la actividad GABAérgica de la mujer (Turkmen y col., 2011), situación comparable con los bajos niveles de GABA observados en pacientes que presentan un primer episodio psicótico, relacionándose el bajo nivel de GABA con la severidad de los síntomas psicóticos (Orhan y col., 2018). Se ha descrito que la disminución de la actividad GABAérgica en ciertas zonas del cerebro, como la corteza orbitofrontal y el giro temporal superior, puede conllevar a la alteración del funcionamiento cognitivo y afectivo, así como contribuir a la aparición de alucinaciones auditivas (Gur y col., 2000). Mientras es normal que los niveles de ALLO disminuyan en el puerperio, se postula una teoría que señala a las mujeres susceptibles a estos cambios abruptos, caracterizadas por respuestas neuronales anormales, como individuos más vulnerables a padecer de síntomas psiquiátricos en dicho período (Maguire y col., 2008; Moses-Kolko y col., 2011).

Es así como los estudios realizados hasta ahora señalan la presencia de una asociación importante entre el abrupto desbalance o interrupción hormonal en el período peripuerperal de mujeres vulnerables y la aparición de PP, necesitándose más estudios al respecto para poder obtener resultados concluyentes.

Hormonas Tiroideas

Durante el embarazo, el sistema inmune de la madre presenta cambios que permiten la tolerancia hacia el tejido fetal, observándose frecuentemente

disminuciones de las concentraciones relevantes de autoanticuerpos séricos (Pop y col., 2006). La activación inmune postparto puede producir manifestaciones clínicas de disfunción tiroidea; así, la tiroiditis postparto puede servir como factor etiológico de la enfermedad psiquiátrica que conduce a la depresión o manía (Bokhari y col., 1998).

En un estudio realizado por Harris y col. (1992), se tomaron muestras sanguíneas de mujeres sin antecedentes de disfunción tiroidea un día después del parto, obteniendo 145 sujetos con autoanticuerpos tiroideos (TPOAb) positivos y tomando 229 mujeres sanas como grupo control, ambos grupos siendo posteriormente reducidos a 110 mujeres con TPOAb positivos y 132 de control, similares en edad. Luego de seis semanas postparto y seguidamente en las semanas 12, 20 y 28, se aplicaron cuestionarios psiquiátricos que demostraron que el 47% del grupo con TPOAb positivo presentó depresión independientemente de la función tiroidea, en comparación con el 32% obtenido del grupo control. De esta forma, se postula una relación entre la presencia de TPOAb o niveles más altos de TSH durante el período postparto con síntomas depresivos o estado de ánimo disfórico (Groer y col., 2015). A razón de esto, se presume que los efectos endocrinos e inmunológicos van de la mano en cuanto a la patogénesis de esta enfermedad (Figura 1).

Mecanismo inmune: Entre las citocinas y la microglía

La microglía, ubicada en el sistema nervioso central (SNC), es la encargada de cumplir funciones de neurodesarrollo, funcionamiento sináptico y respuesta inmunitaria con la correspondiente producción de citocinas inflamatorias y

antiinflamatorias (Kumar y col., 2017). Durante el puerperio se observa elevación de citocinas y quimiocinas séricas, activación de monocitos circulantes a través de la expresión de genes inflamatorios y la activación del sistema de células T (Yolken y col., 2008) (Figura 1).

En las mujeres con PP, a diferencia de un período puerperal fisiológico, existe una monocitosis en contraste con la activación de células T (Bergink y col., 2016). Numerosos estudios han reportado niveles anormales de citocinas como la elevación de las IL-12, INF- γ , TNF- α , y sIL-

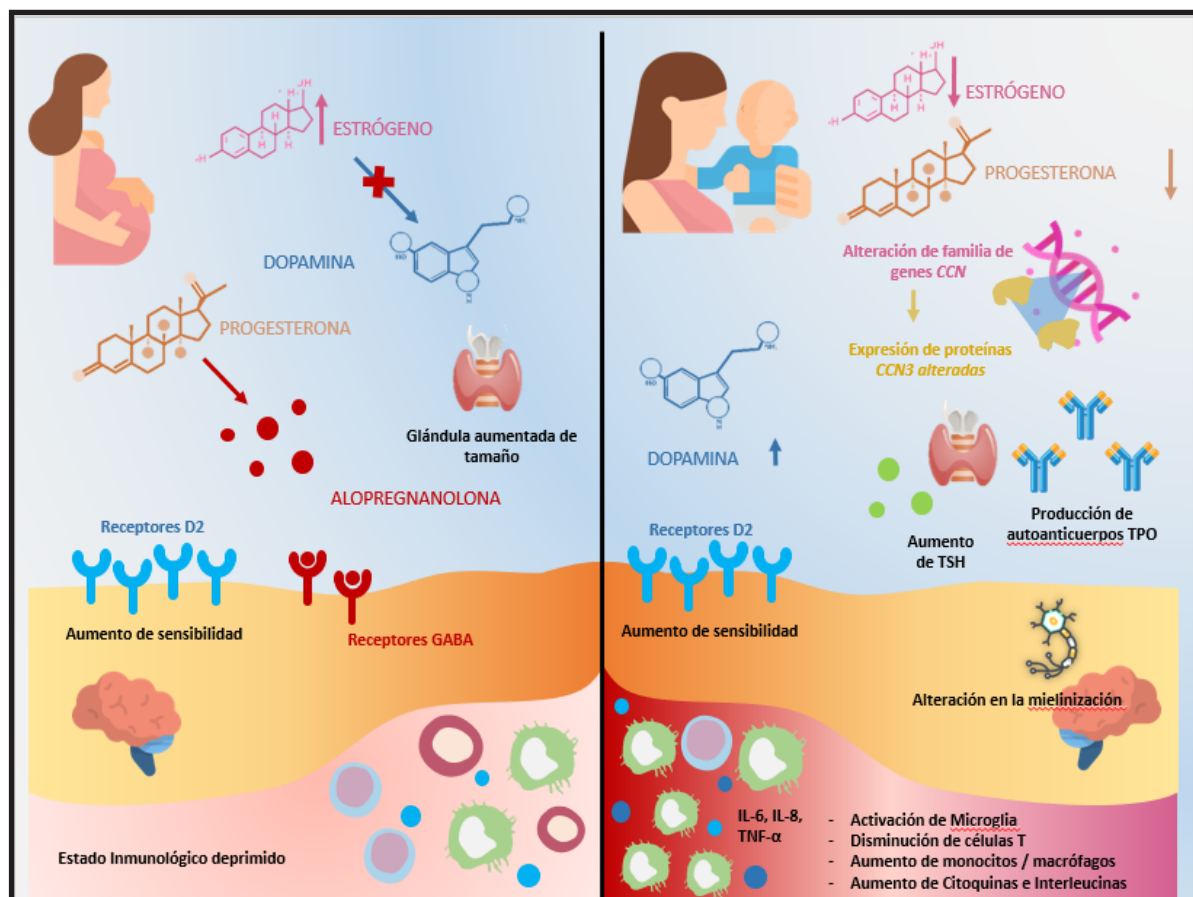


Figura 1. Mecanismos endocrinos e inmunes: Puerperio Fisiológico vs. Puerperio con PP

A. Durante el embarazo los niveles de estrógeno y progesterona aumentan exponencialmente, los altos niveles de estrógeno inhiben directa e indirectamente la síntesis de dopamina produciendo una hipersensibilidad en los receptores dopaminérgicos 2 (D2) post sinápticos. La Alopregnanolona, metabolito del catabolismo de la progesterona actúa positivamente sobre los receptores GABA, el cual regula circuitos que incluyen al sistema límbico. El sistema inmunológico se encuentra deprimido y controlado bajo el efecto de células T, NK y B. Y la glándula tiroidea se encuentra aumentada de tamaño en un 20-40% para satisfacer las necesidades gravídicas.

B. En el puerperio anormal, el descenso abrupto de progesterona y estrógenos aumenta la síntesis de dopamina ante receptores D2 hipersensibles produciendo síntomas de manía y psicosis, y disminución de alopregnanolona con exacerbación de síntomas ansiosos, y excitatorios. Por la parte inmunológica, se produce un estado proinflamatorio inducido por la elevación de citocinas y quimiocinas séricas tales como IL-12, INF- γ , TNF- α , sIL-2R, de IL-6, IL-8 TNF- α , antagonistas del receptor de IL-1, IL-10, y sTNF-1R y aumento de monocitos circulantes a través de la expresión de genes inflamatorios y la disminución del sistema de células T, que producen inflamación en la corteza cerebral y alteraciones neuronales por. En mujeres que manifiestan psicosis puerperal se presume la existencia de una alteración de la familia de genes CCN, que podrían expresar anormalmente la proteína CCN3 y reducir la mielinización de oligodendrocitos. Además, la respuesta ante el estado proinflamatorio puede conllevar a la producción de autoanticuerpos TPO y elevación de TSH lo cual se relaciona a síntomas depresivos postparto.

Abreviaciones: IL-12, Interleucina 12; INF- γ , interferón gamma; TNF- α , Factor de Necrosis Tumoral Alfa; sIL-2R, Receptor soluble de Interleucina 2; IL-6, Interleucina 6; IL-1, Interleucina 1; IL-10; Interleucina 10; sTNF-1R, Receptor soluble de Factor de Necrosis Tumoral 1; TPO, Yoduro Peroxidasa; TSH, Hormona Estimulante de Tiroidea.

2R a nivel sérico, plasmático y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con desórdenes psicóticos, además de IL-6, TNF- α , antagonistas del receptor de IL-1, IL-10, y receptores solubles de TNF-1 en episodios de manía, mostrando una fuerte estimulación inflamatoria (Modabbernia y col., 2013).

De esta manera, se ha reportado la elevación de las citocinas IL-6 e IL-8 en pacientes con PP que podrían tener una acción sinérgica en la patogénesis de esta enfermedad (Sathyanarayanan y col., 2019). Por otro lado, Dazzan y col. (2018) proponen una hipótesis en la cual podría existir una anomalía en el eje de re-mielinización, sistema inmune y familia de genes CCN, importantes en la reproducción femenina y desarrollo neuronal, estableciéndose que la disminución de las células T reguladoras se podría asociar con una expresión alterada de la proteína CCN3 en el cerebro y que puede existir una reducción en los niveles de mielinización mediada por los oligodendrocitos (Dazzan y col., 2018).

De igual manera, Bayer y col. (1999), proponen a su vez un modelo de doble golpe; el primer golpe con la activación inmune materna caracterizada por alterar el desarrollo cerebral fetal a través de citocinas proinflamatorias encontradas en la placenta, líquido amniótico, cerebro y circulación fetal, lo cual ocurre posterior a infecciones maternas durante el periodo de gestación; seguido de un segundo golpe que podría ser: estrés elevado actuando por el eje HPA, una señal de daño microbiano a través de la vía de los receptores similares a Toll (Toll like receptors, TLR), o una alteración endógena hormonal y/o cambios inmunes característicos en la adolescencia, o como es este caso, el período postparto que active la microglía y conlleve a anomalías severas

del circuito neuronal en el cerebro (Bergink y col., 2014).

NEUROBIOLOGÍA DE LA PSICOSIS PUERPERAL

Las alteraciones fisiopatológicas previamente descritas tienen consecuencias en la neurotransmisión, acarreado el desencadenamiento de trastornos psiquiátricos como la PP. En un estudio prospectivo realizado por Wieck y col. (1991), se demostró que la ausencia de estrógenos luego del parto se asocia con el aumento de sensibilidad de los receptores de dopamina en el hipotálamo, la cual se trata de compensar a través de apomorfina estimulada por las hormonas de crecimiento que actúan como ligandos de receptores D2 post-sinápticos, mecanismo que falla en pacientes con PP (Wieck y col., 2003). Sin embargo, estas hormonas que se encuentran exacerbadas tienden a normalizarse durante el período de lactancia, en el cual la liberación de la oxitocina durante la succión se asocia con sentimientos de bienestar y relajación (Snellen y col., 2016).

De igual forma, existe evidencia que indica que la disrupción en el funcionamiento de la oxitocina se encuentra ligada con impedimentos en el comportamiento filial, dificultando así el nexo materno con el infante, relacionándose los bajos niveles de oxitocina en el puerperio como un factor de riesgo en el desencadenamiento de patologías psiquiátricas (Insel y col., 2001). En un estudio prospectivo realizado por Skrundz y col. (2011), se pudo evidenciar mediante un análisis de regresión logística binaria que los niveles bajos de oxitocina se asocian a un mayor riesgo para el desarrollo de DPP (Exp (b)=0,290; $p<0,05$), ya que es conocido que la oxitocina es capaz de reducir las respuestas fisiológicas y psicológicas al estrés.

Asimismo, se ha involucrado la serotonina y su precursor, el triptófano, en potenciales mecanismos fisiopatológicos observados en psiquiatría donde su regulación se ve afectada en el período postparto por el estado pro-inflamatorio que lo caracteriza (Insel y col., 2001). De esta manera, parte de las citocinas liberadas durante el puerperio, o más específicamente, INF- γ , se encarga de estimular la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), así como la quinurenina 3-monooxigenasa en células inmunitarias, enzimas desencadenantes de la ruta metabólica que desvía el catabolismo del triptófano en su vía de la quinurenina hacia metabolitos catalogados como neurotóxicos y de carácter excitatorio (Bell y col., 2014). La activación aumentada de las enzimas principales de la vía de la quinurenina por la inflamación disminuye la fracción de triptófano destinada a la síntesis de serotonina, contribuyendo a su depleción y por lo tanto a un aumento de metabolitos tóxicos (Myint y col., 2014).

A pesar de esto, en un estudio clínico realizado por Veen y col. (2016), no se obtuvo evidencia que marcara una diferencia significativa entre los niveles de triptófano de un grupo control de mujeres postparto y aquellas con PP, e incluso se observó una reducción significativa en la tasa catabólica del triptófano a quinurenina en las mujeres con PP en comparación con el grupo control, lo cual indica un desbalance certero en los procesos fisiológicos típicos del puerperio, pero no en la dirección que se esperaba.

Aunado al papel de la quinurenina y sus metabolitos como el ácido quinolónico, algunos de ellos son agonistas de receptores de glutamato y promotores de su liberación pre-sináptica, por lo cual se ha postulado que el balance entre glutamato y GABA

podría tener un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos postulados (Modinos y col., 2018). Se ha reportado que un mal funcionamiento del sistema GABAérgico puede contribuir a alteraciones de la perfusión en la región del hipocampo como se ha descrito en la psicosis, o un aumento de los niveles de glutamato puede contribuir a la inflamación producida en la depresión (Müller y Schwarz, 2007), al igual que en el TB (Prisciandaro y col., 2017). En un estudio preclínico realizado por Zhao y Gammie (2014), se observó en ratas un aumento significativo de los niveles de glutamato y GABA en el grupo postparto en comparación con el grupo control, demostrándose un incremento de alrededor del 25% en la actividad de dichos neurotransmisores, a su vez manteniendo la misma proporción entre ambos. Tal situación indica un período de vulnerabilidad en aquellas mujeres propensas a padecer de trastornos psiquiátricos en el puerperio, ya que una fluctuación de tal magnitud puede conllevar a la descoordinación de dicho sistema (Figura 2).

Por otro lado, Fusté y col. (2017) realizaron un estudio basado en imágenes de resonancia magnética, en el cual evaluaron la estructura cerebral de mujeres con riesgo de padecer PP, observando que aquellas que presentaron un episodio poseían una menor densidad de: 1) la corteza cingular anterior, la cual está relacionada a funciones cognitivas, de memoria y ejecución de trabajos; 2) giro temporal superior izquierdo, relacionado al lóbulo temporal encargado de descifrar la información principalmente auditiva y visual además de contribuir al equilibrio y regulación de emociones como ira, ansiedad y placer; 3) giro parahipocampal izquierdo, situado sobre la superficie

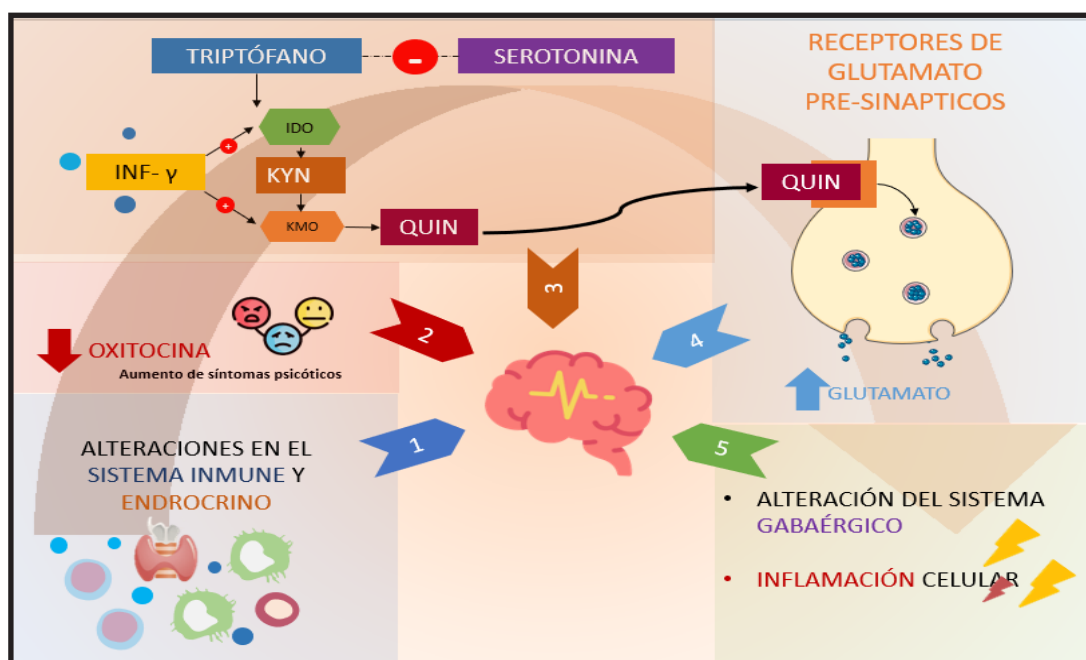


Figura 2. Neurobiología de la Psicosis Puerperal

Debido a su componente multifactorial el conjunto de alteraciones fisiopatológicas que pueden ocurrir a nivel hormonal e inmunitario en la mujer gestante tienen como consecuencias irregularidades en la neurotransmisión, para empezar, los niveles bajos de oxitocina en el puerperio pueden desencadenar el aumento de síntomas psicóticos e infantiles impidiendo el nexo materno, por otro lado el aumento de citocinas liberadas como $\text{INF-}\gamma$, puede estimular positivamente la actividad de la IDO y la KMO desviando la síntesis de serotonina a partir de triptófano hacia metabolitos neurotóxicos hacia a agonistas de receptores de glutamato pre-sinápticos como QUIN, aumentando los niveles de glutamato y alterando el balance del sistema GABAérgico contribuyendo a la inflamación celular que predispone a los episodios de Psicosis Puerperal.

Abreviaciones: $\text{INF-}\gamma$, interferón gamma; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; KMO, quinurenina 3-monooxigenasa; KYN, quinurenina; QUIN, ácido quinolinico; GABA, Ácido γ -aminobutírico.

inferior del hemisferio formando parte del sistema límbico; en comparación con aquellas en riesgo que no presentaron episodios, quienes poseían regiones de los giros superiores e inferiores más grandes. Las anomalías de estas áreas corresponden con el desarrollo de alucinaciones auditivas y visuales en pacientes con esquizofrenia, sin embargo su relación con la manifestación clínica es aún desconocida (Zhu y col., 2016).

Es así como se postula la hipótesis de multifactorialidad y complementariedad, en donde cada mecanismo explicado de manera particular va de la mano como un todo

con los factores expuestos anteriormente, acotando que la vulnerabilidad no es referente tan sólo al individuo, sino al período crítico que atraviesa en el momento del embarazo y puerperio.

TRATAMIENTO Y CONSIDERACIONES A FUTURO

Las opciones terapéuticas más estudiadas para el manejo de la PP son la farmacoterapia y la psicoeducación para el correcto manejo biopsicosocial de la paciente, siendo esto último implementado con la nueva madre y la familia (Evans y col., 1987; Frey y Dias, 2014; Meltzer-Brody y Jones, 2015).

De esta manera, a lo largo de los años se han planteado guías tentativas para el tratamiento farmacológico de las pacientes con PP (ACOG, 2008). Entre los grupos de fármacos más utilizados se encuentran los estabilizadores de ánimo, hipnóticos benzodiacepínicos, antipsicóticos atípicos y anticonvulsivantes (Doucet y col., 2011; Klinger y col., 2013). Sin embargo, el tratamiento de elección en situaciones de PP es el carbonato de litio, debido a sus propiedades para manejar la psicosis, promover el sueño y estabilizar el humor, efectivo en monoterapia y junto a otros fármacos (Viguera y col., 2007).

En un estudio realizado por Silbermann y col. (1975), se estudiaron los efectos del tratamiento combinado de litio y perfenazina en un grupo de 13 mujeres diagnosticadas con PP, y los resultados obtenidos fueron comparados con un grupo similar de un estudio anterior en el cual 6 mujeres con PP fueron tratadas con uno o más antipsicóticos. El grupo tratado con litio obtuvo la remisión de los síntomas en una media de 9,4 semanas, mientras que el grupo tratado con antipsicóticos se recuperó en una media de 14,3 semanas. De igual manera, se observó un número significativamente menor de recaídas en el grupo tratado con litio (Gelfand, 2015) que en el tratado con antipsicóticos (Essali y col., 2013), sugiriendo las ventajas del litio como tratamiento para la PP.

Por otro lado, el litio puede ser utilizado como monoterapia luego del episodio principal de PP, demostrando una mayor efectividad en la prevención de recaídas comparado con monoterapia con antipsicóticos (Silbermann y col., 1975; Bergink y col., 2012). Incluso, se ha demostrado que el uso de litio durante el embarazo en mujeres que padecen de trastorno bipolar disminuye

significativamente el riesgo de recaídas durante el período postparto (Epstein y col., 2015).

De igual forma Bergink y col. (2015) llevaron a cabo un estudio para establecer guías terapéuticas en casos de PP, diseñando un algoritmo terapéutico de cuatro pasos. El estudio estuvo conformado por 64 pacientes diagnosticadas con psicosis o manía limitada al período postparto, a las cuales se les fue administrado como primer tratamiento lorazepam, diario cada noche por tres días. Las benzodiacepinas por sí solas fueron utilizadas en primera instancia con el fin de evaluar si la restauración del sueño resulta en la remisión de los síntomas, siendo que la interrupción de los ciclos del sueño ha sido implicada como desencadenante de PP. De no remitir, se le sumaron antipsicóticos como el haloperidol u olanzapina, en casos de reacción adversa al tratamiento. Luego de dos semanas, se le añadió como tercer fármaco el litio a aquellos casos en los que no se observaba mejoría clínica. Los resultados obtenidos demostraron que el cuadro clínico de 4 (6,3%) de las pacientes remitió con el primer paso, 12 (18,8%) con el segundo paso y 47 (73,4%) con el tercer paso (Bergink y col., 2016).

En cuanto a los anticonvulsivantes, se conoce la seguridad sobre el uso de ácido valproico y la carbamazepina en el período de lactancia, el primero aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del TB, y la segunda como tratamiento para episodios de manía (Owen, 2006; Uguz y Sharma, 2016). Cabe mencionar que la lamotrigina no es recomendada justo después del parto por sus efectos adversos y necesidad de continuo control de dosis, siendo mayormente utilizada para el manejo de episodios depresivos del TB (Nordmo y col., 2009; Madadi e Ito,

2010). A pesar de esto, no existen estudios concluyentes dirigidos a la identificación de anticonvulsivantes como terapia efectiva en casos de PP.

Algunos estudios han buscado demostrar el efecto de un tratamiento hormonal como terapia factible para la PP, aunque predominan aquellos estudios enfocados en la DPP muy por encima de la PP. De este modo, Bower y Altschule (1956) observaron los efectos de la progesterona como tratamiento en 39 casos de PP, en el cual 16 pacientes recibieron 100 mg de progesterona inicialmente de manera intramuscular por diez días, y posteriormente 150 mg por vía oral. La progesterona fue administrada en algunos casos en conjunto con otras alternativas terapéuticas, como terapia electroconvulsiva (TEC) y psicoterapia. Los resultados mostraron que aquellas pacientes tratadas con progesterona lograron una remisión completa de la sintomatología en casi la totalidad de los casos, a diferencia de aquellas que no fueron tratadas con progesterona.

Por otro lado, Ahokas y col. (2000), realizaron estudios en mujeres diagnosticadas con PP cuya sintomatología no remitía con el uso de medicación psiquiátrica, midiendo sus niveles de estradiol sérico antes y durante el tratamiento, en el cual se les administró 17- β estradiol sublingual. Se observó un declive en la sintomatología en paralelo al aumento de las concentraciones de estradiol sérico, y la discontinuación del tratamiento resultó en la reincidencia de síntomas psicóticos. Como estudio secundario al grupo anterior, Bendix y col. (2019) analizaron los niveles de ALLO y progesterona antes del inicio con tratamiento de estradiol sublingual y cuatro semanas después en 14 mujeres, 10 de ellas diagnosticadas con DPP y 4 con PP. Los resultados obtenidos indican que los niveles

de ALLO disminuyeron significativamente durante el tratamiento con estradiol, a la vez que existía una tendencia a niveles basales más bajos de ALLO en comparación con el grupo control saludable, sugiriendo que la mejoría en los casos de PP tratados con estradiol no dependían del aumento de los niveles de ALLO. Estos estudios sugieren una nueva línea de tratamiento a estudiar, afianzando la existencia de la relación entre el estradiol y la PP.

Otra de las alternativas terapéuticas existentes basada en experiencia clínica y pequeños estudios observacionales es la TEC. Rundgren y col. (2018) reportaron una respuesta positiva a la TEC por parte de pacientes con DPP y/o PP en un estudio con 185 casos diagnosticados durante el puerperio comparado con 185 casos control diagnosticados con depresión y/o psicosis no puerperal, donde se aplicó TEC por una semana y se observó que el 87% de los casos postparto respondió al tratamiento, en comparación con el 73,5% del grupo control. La evidencia señala que la TEC podría representar un tratamiento no farmacológico que evitaría las complicaciones del consumo de psicofármacos durante el período de lactancia.

Actualmente, un ensayo clínico se está llevando a cabo con el objetivo de determinar la influencia genética en el desarrollo de trastornos del humor y psicosis puerperal en mujeres embarazadas y en período puerperal (NCT03615794) (National Library of Medicine US, 2018). Por otra parte, otros factores a considerar incluyen la decisión de la madre sobre dar lactancia materna, para así estipular la mejor elección con respecto al tratamiento con psicofármacos (Chaudron y Jefferson, 2000; Schroeder y col., 2010). En la Tabla I se presentan los posibles efectos adversos reportados

Tabla I. Efectos adversos posibles reportados en infantes alimentados con lactancia materna de mujeres en tratamiento con psicofármacos

FÁRMACO	DOSIS	TIPO DE ESTUDIO	EFFECTOS SOBRE INFANTES	REFERENCIAS
Estabilizador de ánimo				
Carbonato de Litio	400-1200 mg/día	Revisión sistemática	Intoxicación por litio, hipotonía, disfunción tiroidea.	Imaz y col. (2019).
Antipsicóticos atípicos				
Olanzapina	2-10 mg/día	Observacional prospectivo	Sedación, dificultad para succión, distrés respiratorio.	Gilad y col. (2011).
Quetiapina	2,5-20 mg/día	Retrospectivo	Somnolencia, irritabilidad, temores, insomnio.	Brunner y col. (2013).
Ácido Valproico	25-400 mg/día	Serie de casos	Ligero retraso motriz y mental.	Misri y col. (2006).
	300-1050 mg/día	Retrospectivo	No se observaron efectos adversos.	Kacirova y col. (2019).
	1200 mg/día	Reporte de un caso	Trombocitopenia, anemia, petequias.	Stahl y col. (1997).
Anticonvulsivantes				
Carbamazepina	1200 mg/día	Reporte de un caso	Pobre ganancia de peso, dificultad para la succión, vómito.	Antonucci y col. (2018).
	400 mg/día	Reporte de un caso	Disfunción hepática, colestasis.	Frey y col. (2002).
	311-362 mg/día	Observacional prospectivo	Ligera trombocitosis.	Newport y col. (2008).
Lamotrigina	850 mg/día	Reporte de un caso	Apnea severa.	Nordimo y col. (2009).
	No reportado	Descriptivo	Depresión de sistema nervioso central, daño hepático.	Soussan y col. (2014).
Benzodiazepinas				
Lorazepam	No reportado	Retrospectivo, auto-reporte	Sin evidencia de efectos adversos	Kelly y col. (2012).
Estrógenos				
17-β estradiol	50 mcg/día	Reporte de un caso	Ictericia, pobre ganancia de peso.	Ball y Morrison (1999).

en lactantes con el uso de los fármacos mencionados por parte de madres en su período de lactancia.

Conclusiones

La PP sigue caracterizándose por ser una de las patologías puerperales más elusivas, tendiendo a ser relegada más allá de un segundo plano por su relativa baja frecuencia de aparición en comparación con la DPP o melancolía. Su etiología exacta permanece aún desconocida; sin embargo, se describen nuevas hipótesis en cuanto a su proceso fisiopatológico que involucran mecanismos endocrinos representados por hormonas esteroideas y tiroideas; mecanismos inmunes liderados por el modelo de doble golpe; y mecanismos relacionados a neurotransmisores y el modelamiento nervioso materno pertinente al período perinatal.

Recomendaciones

A pesar de los abordajes terapéuticos aparentemente contrastantes, es de suma importancia resaltar la relevancia del TB y los trastornos esquizo-afectivos en los antecedentes psiquiátricos de las pacientes con PP (Frey y Dias, 2014), dando pie a la búsqueda de conexiones comunes entre ellos. Asimismo, a la hora de valorar una paciente que presente PP, los antecedentes patológicos personales y familiares deben ser tomados en cuenta.

Por último, se propone hacer hincapié en el esclarecimiento de la fisiopatología para poder llegar a medidas terapéuticas más dirigidas, recalcando la importancia del abordaje preconcepcional de las mujeres cuya vulnerabilidad y riesgo de padecer PP sea mayor, con el fin de evitar en lo posible los brotes psicóticos en el puerperio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales o financieras que podrían interpretarse como un posible conflicto de intereses.

Contribuciones del autor

MC, WT, PR y AC, concibieron la idea y el enfoque general del estudio. MC, WT, MR, PR, VL, AC investigaron en la literatura, escribieron y revisaron el manuscrito. MC, WT, MR, VB y JR contribuyeron a la revisión y corrección del manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del trabajo.

Referencias bibliográficas

- ACOG Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. ACOG Practice Bulletin: Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists number 92, April 2008 (replaces practice bulletin number 87, November 2007). Use of psychiatric medications during pregnancy and lactation. *Obstet Gynecol* 111(4):1001–1020.
- Ahokas A, Aito M, Turiainen S. 2000. Association between oestradiol and puerperal psychosis. *Acta Psychiatr Scand* 101(2):167–9; discussion 169–170.
- Antonucci R, Cuzzolin L, Manconi A, Cherchi C, Oggiano AM, Locci C. 2018. Maternal Carbamazepine Therapy and Unusual Adverse Effects in a Breastfed Infant. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med* 13(2):155–157.
- Ball DE, Morrison P. 1999. Oestrogen transdermal patches for postpartum depression in lactating mothers—a case report. *Cent Afr J Med* 45(3):68–70.
- Bayer TA, Falkai P, Maier W. 1999. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the “two-hit hypothesis”. *J Psychiatr Res* 33(6):543–548.
- Bell AF, Erickson EN, Carter CS. 2014. Beyond labor: the role of natural and synthetic oxytocin in the

- transition to motherhood. *J Midwifery Women's Health* 59(1):35–42: quiz 108.
- Bendix M, Bixo M, Wihlbäck A-C, Ahokas A, Jokinen J. 2019. Allopregnanolone and progesterone in estradiol treated severe postpartum depression and psychosis – Preliminary findings. *Neurol Psychiatry Brain Res* 34:50–57.
- Bergink V, Bouvy PF, Vervoort JSP, Koorengevel KM, Steegers EAP, Kushner SA. 2012. Prevention of postpartum psychosis and mania in women at high risk. *Am J Psychiatry* 169(6):609–615.
- Bergink V, Gibney SM, Drexhage HA. 2014. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry* 75(4):324–331.
- Bergink V, Burgerhout KM, Koorengevel KM, Kamperman AM, Hoogendijk WJ, Lambregtsevan den Berg MP, Kushner SA. 2015. Treatment of psychosis and mania in the postpartum period. *Am J Psychiatry* 172(2):115–123.
- Bergink V, Rasgon N, Wisner KL. 2016. Postpartum Psychosis: Madness, Mania, and Melancholia in Motherhood. *Am J Psychiatry* 173(12):1179–1188.
- Blackmore ER, Jones I, Doshi M, Haque S, Holder R, Brockington I, Craddock N. 2006. Obstetric variables associated with bipolar affective puerperal psychosis. *Br J Psychiatry J Ment Sci* 188:32–36.
- Bokhari R, Bhatara VS, Bandettini F, McMillin JM. 1998. Postpartum psychosis and postpartum thyroiditis. *Psychoneuroendocrinol* 23(6):643–650.
- Bower WH, Altschuler MD. 1956. Use of progesterone in the treatment of postpartum psychosis. *N Engl J Med* 254(4):157–60.
- Brockington I. 2017. Recurrent episodes associated with childbearing: a matrix of associations. *Arch Womens Ment Health* 20(1):93–99.
- Brockington IF, Oates M, Rose G. 1990. Prepartum psychosis. *J Affect Disord* 19(1):31–35.
- Brunner E, Falk DM, Jones M, Dey DK, Shatapathy CC. 2013. Olanzapine in pregnancy and breastfeeding: a review of data from global safety surveillance. *BMC Pharmacol Toxicol* 14:38.
- Caparros-Gonzalez RA, Romero-Gonzalez B, Strivens-Vilchez H, Gonzalez-Perez R, Martinez-Augustin O, Peralta-Ramirez MI. 2017. Hair cortisol levels, psychological stress and psychopathological symptoms as predictors of postpartum depression. *PloS One* 12(8): e0182817.
- Chaudron LH, Jefferson JW. 2000. Mood stabilizers during breastfeeding: a review. *J Clin Psychiatry* 61(2):79–90.
- Cranford K, Gedzior J, Su V. 2018. Postpartum Psychosis in a Young VA Patient: Diagnosis, Implications, and Treatment Recommendations. *Fed Pract Health Care Prof VA DoD PHS* 35(2):28–33.
- Czoty PW, Riddick NV, Gage HD, Sandridge M, Nader SH, Garg S, Bounds SM, Garg PK, Nader M A. 2009. Effect of menstrual cycle phase on dopamine D2 receptor availability in female cynomolgus monkeys. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 34(3):548–554.
- Dazzan P, Fusté M, Davies W. 2018. Do Defective Immune System-Mediated Myelination Processes Increase Postpartum Psychosis Risk? *Trends Mol Med* 24(11):942–949.
- Doucet S, Jones I, Letourneau N, Dennis C-L, Blackmore ER. 2011. Interventions for the prevention and treatment of postpartum psychosis: a systematic review. *Arch Women's Ment Health* 14(2):89–98.
- Doyle M, Carballedo A, O'Keane V. 2015. Perinatal depression and psychosis: an update. *B J Psych Adv* 21(1):5–14.
- Epperson CN, Gueorguieva R, Czarkowski KA, Stiklus S, Sellers E, Krystal JH, Douglas L, Rothman DL, Graeme F, Mason GF. 2006. Preliminary evidence of reduced occipital GABA concentrations in puerperal women: a 1H-MRS study. *Psychopharmacology (Berl)* 186(3):425–433.
- Epstein RA, Moore KM, Bobo WV. 2015. Treatment of bipolar disorders during pregnancy: maternal and fetal safety and challenges. *Drug Health Patient Saf* 7:7–29.
- Essali A, Alabed S, Guul A, Essali N. 2013 Preventive interventions for postnatal psychosis. *Cochrane Database Syst Rev* 6 (6): CD009991.
- Evans JJ, Sin IL, Duff GB, Frampton CM. 1987. Estrogen-induced transcortin increase and progesterone and cortisol interactions: implications from pregnancy studies. *Ann Clin Lab Sci* 17(2):101–5.
- Florio AD, Smith S, Jones I. 2013. Postpartum psychosis. *Obstet Gynaecol* 15(3):145–150.
- Frey B, Braegger CP, Ghelfi D. 2002. Neonatal cholestatic hepatitis from carbamazepine exposure during pregnancy and breastfeeding.

- Ann Pharmacother 36(4):644–647.
- Frey BN, Dias RS. 2014. Sex hormones and biomarkers of neuroprotection and neurodegeneration: implications for female reproductive events in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 16(1):48–57.
- Fusté M, Pauls A, Worker A, Reinders AATS, Simmons A, Williams SCR, Haro JM, Hazelgrove K, Pawlby S, Conroy S, Vecchio C, Seneviratne G, Pariante CM, Mehta MA, Dazzan P. 2017. Brain structure in women at risk of postpartum psychosis: an MRI study. *Transl Psychiatry* 7(12):1286.
- Gelfand JM. 2015. One brain, two specialties, converging mechanisms: Neuronal autoantibodies as a rare cause of Postpartum Psychosis. *Am J Psychiatry* 172(9):824–826.
- Gilad O, Merlob P, Stahl B, Klinger G. 2011. Outcome of infants exposed to olanzapine during breastfeeding. *Breastfeed Med* 6(2):55–58.
- Glover V, Kammerer M. 2004. The Biology and Pathophysiology of Peripartum Psychiatric Disorders. *Prim Psychiatry* 11(3):37–41.
- González-Castro PJ, Hulak F, Sigales-Ruiz SR, Orozco-Guzmán M. 2016. Psicosis puerperal. Panorama general sobre su diagnóstico, etiología e interpretación. *Perinatol Reprod Humana* 30(1):24–30.
- Groer MW, Vaughan JH. 2013. Positive thyroid peroxidase antibody titer is associated with dysphoric moods during pregnancy and postpartum. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* JOGNN 42(1): E26–E32.
- Gur RE, Cowell PE, Latshaw A, Turetsky BI, Grossman RI, Arnold SE, Bilker WB, Gur RC. 2000. Reduced dorsal and orbital prefrontal gray matter volumes in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57(8):761–768.
- Harris B, Othman S, Davies JA, Weppner GJ, Richards CJ, Newcombe RG, Lazarus JH, Parkes AB, Hall R, Phillips DI. 1992. Association between postpartum thyroid dysfunction and thyroid antibodies and depression. *BMJ* 305(6846):152–156.
- Hopker SW, Brockington IF. 1991. Psychosis following hydatidiform mole in a patient with recurrent puerperal psychosis. *Br J Psychiatry J Ment Sci* 158:122–123.
- Huber TJ, Borsutzky M, Schneider U, Emrich HM. 2004. Psychotic disorders and gonadal function: evidence supporting the oestrogen hypothesis. *Acta Psychiatr Scand* 109(4):269–274.
- Imaz ML, Torra M, Soy D, García-Esteve L, Martín-Santos R. 2019. Clinical Lactation Studies of Lithium: A Systematic Review. *Front Pharmacol* 10:1005.
- Insel TR, Young LJ. 2001. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci* 2(2):129–136.
- Jones I, Smith S. 2009. Puerperal psychosis: identifying and caring for women at risk. *Adv Psychiatr Treat* 15(6):411–8.
- Kacirova I, Grundmann M, Brozmanova H. 2019. Valproic acid concentrations in nursing mothers, mature milk, and breastfed infants in monotherapy and combination therapy. *Epilepsy Behav* EB95:112–6.
- Kamperman AM, Veldman-Hoek MJ, Wesseloo R, Robertson Blackmore E, Bergink V. 2017. Phenotypical characteristics of postpartum psychosis: A clinical cohort study. *Bipolar Disord* 19(6):450–457.
- Kelly LE, Poon S, Madadi P, Koren G. 2012. Neonatal benzodiazepines exposure during breastfeeding. *J Pediatr* 161(3):448–451.
- Klinger G, Stahl B, Fusar-Poli P, Merlob P. 2013. Antipsychotic drugs and breastfeeding. *Pediatr Endocrinol Rev* PER 10(3):308–317.
- Kota SK, Gayatri K, Jammula S, Kota SK, Krishna SVS, Meher LK, Modi KD. 2013. Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab* 17(1):50–59.
- Kumar P, Magon N. 2012. Hormones in pregnancy. *Niger Med J Niger Med Assoc* 53(4):179–183.
- Kumar MM, Venkataswamy MM, Sathyanarayanan G, Thippeswamy H, Chandra PS, Mani RS. 2017. Immune system aberrations in postpartum psychosis: An immunophenotyping study from a tertiary care neuropsychiatric hospital in India. *J Neuroimmunol* 310:8–13.
- Larios J, Laborde C, Sánchez M, Gaviria G, Lastre G. 2017. Caracterización de factores de riesgo psicosociales que inciden en Trastorno depresivo mayor en adolescentes. *Cienc Innov Salud* 4(2):1–8.
- Laway BA, Mir SA. 2013. Pregnancy and pituitary disorders: Challenges in diagnosis and management. *Indian J Endocrinol Metab* 17(6):996–1004.
- Leuner B, Sabihi S. 2016. The birth of new neurons in the maternal brain: Hormonal regulation and functional implications. *Front Neuroendocrinol* 41:99–113.

- Madadi P, Ito S. 2010. Perinatal exposure to maternal lamotrigine: clinical considerations for the mother and child. *Can Fam Physician Med Fam Can* 56(11):1132–1134.
- Maguire J, Mody I. 2008. GABA(A)R plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression. *Neuron* 59(2):207–213.
- Mannion A, Slade P. 2014. Psychotic-like experiences in pregnant and postpartum women without a history of psychosis. *Schizophr Res* 160(1–3):118–123.
- Meltzer-Brody S, Jones I. 2015. Optimizing the treatment of mood disorders in the perinatal period. *Dialogues Clin Neurosci* 17(2):207–218.
- Misri S, Corral M, Wardrop AA, Kendrick K. 2006. Quetiapine augmentation in lactation: a series of case reports. *J Clin Psychopharmacol* 26(5):508–511.
- Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. 2013. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry* 74(1):15–25.
- Modinos G, Simsek F, Horder J, Bossong M, Bonoldi I, Azis M, Perez J, Broome M, Lythgoe DJ, Stone JM, Howes OD, Murphy DG, Grace AA, Allen P, McGuire P. 2018. Cortical GABA in Subjects at Ultra-High Risk of Psychosis: Relationship to Negative Prodromal Symptoms. *Int J Neuropsychopharmacol* 21(2):114–119.
- Moses-Kolko EL, Fraser D, Wisner KL, James JA, Saul AT, Fiez JA, Phillips ML. 2011. Rapid habituation of ventral striatal response to reward receipt in postpartum depression. *Biol Psychiatry* 70(4):395–399.
- Müller N, Schwarz MJ. 2007. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12(11):988–1000.
- Munive-Beltrán AF, Ardila-Sáenz A, Muñoz-Báez K, Ramos-Villegas Y, Corrales-Santander H, Moscote-Salazar LR, Quintana Pájaro LJ. 2019. Trastornos neurológicos en el embarazo: revisión de la literatura. *Cienc Innov Salud* e64:1–12
- Myint A-M, Kim Y-K. 2014. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48:304–313.
- National Library of Medicine (U.S.). (2018, August). A study of pregnant and postpartum women with and without mood disorders. Identifier NCT03615794. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615794?cond=%22Puerperal+Psychosis%22&draw=2&rank=3>
- Newport DJ, Pennell PB, Calamaras MR, Ritchie JC, Newman M, Knight B, Viguera AC, Liporace J, Stowe ZN. 2008. Lamotrigine in breast milk and nursing infants: determination of exposure. *Pediatrics* 122(1): e223–231.
- Nordmo E, Aronsen L, Wasland K, Småbrekke L, Vorren S. 2009. Severe apnea in an infant exposed to lamotrigine in breast milk. *Ann Pharmacother* 43(11):1893–1897.
- Núñez-Ariza A. 2020. Ideación suicida y funcionalidad familiar en adolescentes del caribe colombiano. *Arch Ven Farmacol Ter* 39(1):80–87.
- O'Hara MW, Wisner KL. 2014. Perinatal mental illness: definition, description and aetiology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 28(1):3–12.
- Orhan F, Fatouros-Bergman H, Goiny M, Malmqvist A, Piehl F. 2018. Karolinska Schizophrenia Project (KaSP) Consortium, et al. CSF GABA is reduced in first-episode psychosis and associates to symptom severity. *Mol Psychiatry* 23(5):1244–1250.
- Owen RT. 2006. Extended-release carbamazepine for acute bipolar mania: a review. *Drugs Today (Barc)* 42(5):283–289.
- Pérez-Rey EJ. 2019. Factores predisponentes en la intervención sistémica de la violencia de género y su incidencia en salud mental. *Arch Ven Farmacol Terap* 38 (5): 547–552.
- Pop VJ, Wijnen HA, Lapkienne L, Bunivicius R, Vader HL, Essed GG. 2006. The relation between gestational thyroid parameters and depression: a reflection of the downregulation of the immune system during pregnancy? *Thyroid* 16(5):485–492.
- Prisciandaro JJ, Tolliver BK, Prescott AP, Brenner HM, Renshaw PF, Brown TR, Anton RF. 2017. Unique prefrontal GABA and glutamate disturbances in co-occurring bipolar disorder and alcohol dependence. *Transl Psychiatry* 7(7): e1163.
- Rukh R, Kafeel H, Naveed S, Sarwar G. 2013. Prevalence of Postpartum depression in primigravida and multigravida with normal physiological status. *RADS J Pharm Pharm Sci* 1(1):16–20.
- Rundgren S, Brus O, Båve U, Landén M, Lundberg J, Nordanskog P, Nordenskjöld A. 2018. Improvement of postpartum depression and psychosis after electroconvulsive therapy:

- A population-based study with a matched comparison group. *J Affect Disord* 235 :258–264.
- Sánchez MG, Bourque M, Morissette M, Di Paolo T. 2010. Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16(3): e43–71.
- Sathyanarayanan G, Thippeswamy H, Mani R, Venkataswamy M, Kumar M, Philip M, Chandra PS. 2019. Cytokine alterations in first-onset postpartum psychosis-clues for underlying immune dysregulation. *Asian J Psychiatry* 42:74–78.
- Schiller CE, Schmidt PJ, Rubinow DR. 2014. Allopregnanolone as a mediator of affective switching in reproductive mood disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 231(17):3557–3567.
- Schroeder M, Pérez E, Lares M, Brito S, Cira L. 2010. A review: Association of Preventable Medical Conditions, Healthy Nutrition, the Ingestion of Psychotropic Medication and People who suffer from Severe Mental Illnesses. *Arch Ven Farmacol Terap* 29(2):20–24.
- Silbermann RM, Beenen F, de Jong H. 1975. Clinical treatment of postpartum delirium with perphenazine and lithium carbonate. *Psychiatr Clin (Basel)* 8(6):314–326.
- Sit D, Rothschild AJ, Wisner KL. 2006. A review of postpartum psychosis. *J Womens Health (Larchmt)* 15(4):352–368.
- Skrundz M, Bolten M, Nast I, Hellhammer DH, Meinschmidt G. 2011. Plasma oxytocin concentration during pregnancy is associated with development of postpartum depression. *Neuropsychopharmacol* 36(9):1886–1893.
- Snellen M, Power J, Blankley G, Galbally M. 2016. Pharmacological lactation suppression with D2 receptor agonists and risk of postpartum psychosis: A systematic review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 56(4):336–340.
- Soussan C, Gouraud A, Portolan G, Jean-Pastor M-J, Pecriaux C, Montastruc J-L, Damase-Michel C, Lacroix I. 2014. Drug-induced adverse reactions via breastfeeding: a descriptive study in the French Pharmacovigilance Database. *Eur J Clin Pharmacol* 70(11):1361–1366.
- Stahl MM, Neiderud J, Vinge E. 1997. Thrombocytopenic purpura and anemia in a breast-fed infant whose mother was treated with valproic acid. *J Pediatr* 130(6):1001–1003.
- Stenzel D, Huttner WB. 2013. Role of maternal thyroid hormones in the developing neocortex and during human evolution. *Front Neuroanat* 7:19.
- Summers SM, Onate J. 2014. New-Onset Psychosis Following Abrupt Discontinuation of Hormone Replacement Therapy in a Trans Woman. *J Gay Lesbian Ment Health* 18(3):312–319.
- Turkmen S, Backstrom T, Wahlstrom G, Andreen L, Johansson I-M. 2011. Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *Br J Pharmacol* 162(2):311–327.
- Uguz F, Sharma V. 2016. Mood stabilizers during breastfeeding: a systematic review of the recent literature. *Bipolar Disord* 18(4):325–333.
- Upadhyaya SK, Sharma A, Raval CM. 2014. Postpartum psychosis: risk factors identification. *North Am J Med Sci* 6(6):274–277.
- Valdimarsdóttir U, Hultman CM, Harlow B, Cnattingius S, Sparén P. 2009. Psychotic illness in first-time mothers with no previous psychiatric hospitalizations: a population-based study. *PLoS Med* 6(2): e1000013.
- Van Hartesveldt C, Joyce JN. 1986. Effects of estrogen on the basal ganglia. *Neurosci Biobehav Rev* 10(1):1–14.
- Veen C, Myint AM, Burgerhout KM, Schwarz MJ, Schütze G, Kushner SA, Hoogendijk WJ, Drexhage HA, Bergink V. 2016. Tryptophan pathway alterations in the postpartum period and in acute postpartum psychosis and depression. *J Affect Disord* 189:298–305.
- Vesga-López O, Blanco C, Keyes K, Olfson M, Grant BF, Hasin DS. 2008. Psychiatric disorders in pregnant and postpartum women in the United States. *Arch Gen Psychiatry* 65(7):805–815.
- Viguera AC, Newport DJ, Ritchie J, Stowe Z, Whitfield T, Mogielnicki J, Baldessarini RJ, Zurick A, Cohen LS. 2007. Lithium in breast milk and nursing infants: clinical implications. *Am J Psychiatry* 164(2):342–345.
- Wieck A, Davies RA, Hirst AD, Brown N, Papadopoulos A, Marks MN, Checkley SA, Kumar RC, Campbell IC. 2003. Menstrual cycle effects on hypothalamic dopamine receptor function in women with a history of puerperal bipolar disorder. *J Psychopharmacol* 17(2):204–209.
- Wieck A, Kumar R, Hirst AD, Marks MN, Campbell IC, Checkley SA. 1991. Increased sensitivity of dopamine receptors and recurrence of affective psychosis after childbirth. *BMJ* 303(6803):613–616.

- Workman JL, Barha CK, Galea LAM. 2012. Endocrine substrates of cognitive and affective changes during pregnancy and postpartum. *Behav Neurosci* 126(1):54–72.
- Yolken RH, Torrey EF. 2008. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. *Mol Psychiatry* 13(5):470–479.
- Zhao C, Gammie SC. 2014. Glutamate, GABA, and glutamine are synchronously upregulated in the mouse lateral septum during the postpartum period. *Brain Res* 1591:53–62.
- Zhu J, Zhuo C, Liu F, Xu L, Yu C. 2016. Neural substrates underlying delusions in schizophrenia. *Sci Rep* 6(1):33857.

Recibido: 07/01/2021
Aceptado: 04/02/2021

Actividad de las enzimas antioxidantes en la enfermedad periodontal en ratas espontáneamente hipertensas. Efecto del Valsartán

Antioxidant enzymes activity in periodontal disease in spontaneously hypertensive rats. Effect of Valsartan

MARÍA GABRIELA MATOS^{1,*}, LETICIA FIGUEIRA^{1,**}, MARCO ÁLVAREZ², LOURDES PERDOMO², ANITA ISRAEL^{1,***}, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO^{1,****}

Resumen

Diversas enfermedades sistémicas como la diabetes, el hipertiroidismo, la osteoporosis y la dislipidemia pueden influir en la enfermedad periodontal (EP). Poco se conoce acerca de la relación entre la hipertensión arterial (HTA) y la periodontitis. La EP es una condición inflamatoria que destruye las fibras de los ligamentos periodontales y el hueso alveolar. La respuesta del hospedero incluye la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). Si las EROs se producen en exceso inducen reacciones en cadena, capaces de dañar a moléculas de importancia biológica. Se sabe que la angiotensina II (ANGII) puede actuar como un agente pro-inflamatorio y pro-oxidante, pero su participación en la EP inducida durante la hipertensión es elusiva. Por ello, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes y el papel de la ANGI/RAT₁ en la EP experimental en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas *Wistar Kyoto* (WKY). Se emplearon ratas macho WKY y SHR con EP-inducida mediante la inyección de lipopolisacárido (LPS), y se determinó el efecto del antagonista del receptor AT₁ sobre la presión arterial, el recuento de leucocitos y la actividad de tres enzimas antioxidantes de la mucosa bucal: la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Los animales fueron divididos en cuatro grupos: 1: WKY+LPS sin tratamiento; 2: SHR+LPS sin tratamiento; 3: WKY + LPS+VAL (11 días); 4: SHR + LPS+ VAL (11 días). Se determinó la presión arterial al comienzo y al final del tratamiento. Los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se tomaron muestras de sangre para el recuento de leucocitos. La actividad de la CAT, la SOD y la GPx fue determinada por espectrofotometría. Los maxilares inferiores fueron disecados, fijados, desmineralizados y deshidratados para el estudio histológico. Nuestros resultados demuestran la presencia de EP más marcada en las ratas SHR que se manifestó por la pérdida ósea. La EP se acompañó de un aumento en el número total de leucocitos y de la actividad de la CAT y SOD, lo que sugiere un incremento del estrés oxidativo. Igualmente se observó una disminución de la actividad de la GPx, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas. Todos estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con VAL, indicando un papel de la ANGI/RAT₁ en la patogénesis de la EP asociada a la hipertensión.

Palabras clave: Enfermedad periodontal, enzimas antioxidantes, hipertensión arterial, valsartán, receptores AT₁ de angiotensina.

Abstract

Various systemic diseases such as diabetes, hyperthyroidism, osteoporosis, and dyslipidemia can influence periodontal disease (PD). Few is known about the relationship between arterial hypertension (AH) and periodontitis. PD is an inflammatory condition that destroys the fibers of the periodontal ligaments and the alveolar bone. The host response includes the production of reactive oxygen species (ROS). If ROS are produced in excess, they induce chain reactions, capable of damaging molecules of biological importance. It is known that angiotensin II (ANGII) can act as a pro-inflammatory and pro-oxidant agent, but little is known about its role in PD induced during hypertension. Therefore, the activity of antioxidant enzymes and the role of ANGI / RAT₁ in experimental PD were evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) and *Wistar Kyoto* rats (WKY). For this, in male WKY and SHR rats with EP-induced by injection of lipopolysaccharide (LPS), the effect of the AT₁ receptor antagonist was determined, on blood pressure, leukocyte count, and the activity of three oral mucosa antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The animals were divided into four groups: 1: WKY + LPS without treatment; 2: SHR + LPS without treatment; 3. WKY + LPS + VAL (11 days); 4. SHR + LPS + VAL (11 days). Blood pressure was determined at the beginning and the end of the treatment. The animals were sacrificed by decapitation and blood samples were taken for the leukocyte count. The activity of CAT, SOD, and GPx was determined by spectrophotometry. The lower jaws were dissected, fixed, demineralized, and dehydrated for histological study. Our results demonstrate the presence of a more marked PD in SHR rats manifested by bone loss. PD was accompanied by an increase in the total number of leukocytes and CAT and SOD activity, suggesting an increase in oxidative stress. Likewise, a decrease in GPx activity was observed, possibly due to the reduction in glutathione concentration in hypertensive rats. All these effects were reversed by VAL treatment, indicating a role for ANGI / RAT₁ in the pathogenesis of PD associated with hypertension.

Keywords: Periodontal disease, antioxidant enzymes, arterial hypertension, valsartan, angiotensin AT₁ receptors.

1. Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 2. Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: gbrielamatos@hotmail.com

ORCID: *0000-0001-7290-5237; **0000-0003-3865-5355 ; ***0000-0003-1812-0759; ****0000-0001-9662-4405

Introducción

La enfermedad periodontal (EP) es un término general utilizado para describir de forma integral a un grupo de alteraciones complejas de carácter inflamatorio e infeccioso que afectan a la encía, tejido conectivo de soporte, cemento y hueso alveolar. Es una enfermedad destructiva, indolora, de progresión lenta, caracterizada por la colonización bacteriana de la superficie dental adyacente a la encía, por organismos Gram-negativos y Gram-positivos, los cuales tienen un papel importante en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis, al participar en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico, que se refleja en inflamación y destrucción de hueso, movilidad y pérdida de dientes. Una vez establecida la periodontitis, se forma un infiltrado inflamatorio constituido por diferentes tipos celulares como macrófagos y linfocitos, que producirán distintos subtipos de citocinas, mediadores biológicos responsables de la inmunopatología de diversas enfermedades (Bascones Martínez y Figuero Ruiz, 2005; Gaurilcikaite y col., 2017).

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica común que se manifiesta como un incremento anormal y persistente de la presión arterial sistémica (PA), y constituye el factor de riesgo modificable más importante de morbilidad y mortalidad que se asocia con un mayor riesgo de otras enfermedades, fundamentalmente cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular (Oparil y col., 2018). La hipertensión es una enfermedad multifactorial sin un mecanismo simple que explique por completo el aumento de la PA (Czopek y col., 2019). En su desarrollo se ha

involucrado al estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial, que se manifiesta por cambios de los niveles de endotelina y óxido nítrico. A pesar del prominente papel que se le atribuye al sistema inmunológico en modelos experimentales (Guzik y col., 2007) y en estudios clínicos (Itani y col., 2016), los mecanismos exactos que inician estas respuestas siguen sin estar claros (Drummond y col., 2019).

Cada día se acepta más que la EP se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV), como los accidentes cerebrovasculares (ACV), enfermedad coronaria (CHD) y posiblemente enfermedad arterial periférica e hipertensión, independientemente de los factores de riesgo tradicionales como el tabaquismo y la obesidad (DeStefano y col., 1993; Demmer y Papapanou, 2000; Hujoel y col., 2000; Beck y Offenbacher, 2001; Bahekar y col., 2007; Chen y col., 2008; Humphrey y col., 2008; Bouchard y col., 2010; Tsioufis y col., 2011; Tonetti y Dyke, 2013).

La interacción entre la carga bacteriana y la respuesta del huésped es el mecanismo biológico más plausible que vincula la periodontitis con una serie de factores de enfermedades crónicas sistémicas, como la diabetes mellitus, ECV y enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Southerland, 2013; Tonetti y Dyke, 2013; Dominy y col., 2019). Estos pacientes a menudo presentan inflamación sistémica y disfunción endotelial (Tonetti y col., 2007) que mejora después de un tratamiento periodontal adecuado. No obstante, la alta prevalencia de la HTA y de su importancia, la mayoría de los estudios que evalúan su relación con la EP son estudios transversales, a menudo subanálisis de grandes cohortes y con grandes variaciones de diseño y

número de participantes (Papapanou y col., 2018; Konkel y col., 2019; Pietropaoli y col., 2020).

Varios estudios parecen apoyar una relación entre la periodontitis severa y la HTA; y dado que la periodontitis es la principal causa por la que ocurre extracción y pérdida de dientes en adultos, se ha sugerido la existencia de posibles mecanismos fisiopatológicos que relacionan la periodontitis y la HTA (Inoue y col., 2005; Holmlund y col., 2006; Desvarieux y col., 2010; Tsakos y col., 2010; Tsioufis y col., 2011; Zeigler y col., 2015; Martin-Cabezas y col., 2016; Aguilera y col., 2020). En este sentido, se ha demostrado que la presión sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se encuentran más elevada en los pacientes con EP que entre los individuos sin periodontitis (Desvarieux y col., 2010; Tsakos y col., 2010); demostrándose asociación positiva entre la PAS y periodontitis severa en personas de mediana edad (Tsakos y col., 2010), hallándose valores de PA más altos en aquellos individuos que han perdido dientes (Taguchi y col., 2004; Völzke y col., 2006).

Se ha postulado que esta relación causal es tanto indirecta, ya que es bien conocido que la periodontitis y la hipertensión comparten factores de riesgo comunes tales como la edad, el tabaquismo, el estrés y factores socioeconómicos; como directa a través de efectos sistémicos entre los cuales se incluye un proceso inflamatorio generalizado (Beck y Offenbacher, 2001; De Nardin y col., 2001). A su vez, la hipertensión puede afectar de modo significativo la severidad de la EP, incrementando la carga inflamatoria del huésped, induciendo alteraciones tales como un incremento del estrés oxidativo y de la activación del sistema renina-angiotensina (SRA) (Macedo Paizan y Vilela-Martin, 2014).

Los mecanismos por los cuales la EP puede ejercer efectos sistémicos se deben tanto a la invasión bacteriana de tejidos remotos (acción directa), como a una acción indirecta mediante la producción de mediadores de inflamación en la cavidad oral que luego son liberados a la circulación (El Kholly y col., 2015). Diferentes estudios poblacionales y la data experimental implican a diversos mediadores inflamatorios en el desarrollo de la hipertensión (Sesso y col., 2003; Chrysohoou y col., 2004), y a su vez la respuesta inflamatoria sistémica que acompaña a la EP ha sido propuesta como la conexión entre periodontitis, aterosclerosis y otras ECV (Nakajima y col., 2009; Sanz y col., 2010). Marcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (PCR) se encuentran elevados en la periodontitis moderada a severa. Asimismo, el incremento de los niveles de este marcador es pronóstico de desarrollo de hipertensión, independientemente de otros factores de riesgo (Sesso y col., 2003; Gani y col., 2009). También se ha reportado incrementos de otros marcadores de inflamación tales como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en la periodontitis cuando se comparan con controles sanos (Gani y col., 2009). Los mecanismos que subyacen en la asociación entre la EP y la hipertensión son hasta el momento especulativos. La proximidad anatómica del periodonto con el flujo sanguíneo puede facilitar la bacteriemia y la diseminación sistémica de productos bacterianos, reactantes de fase aguda, complementos e inmunocomplejos que pueden llevar a lesión vascular y aterosclerosis. A su vez, el proceso aterosclerótico induce un incremento de la resistencia al flujo sanguíneo y consecuentemente, al incremento de la PA (Macedo Paizan y Vilela-Martin, 2014).

El estrés oxidativo juega un papel vital en la etiopatogénesis de todas las enfermedades sistémicas. La periodontitis, como cualquier enfermedad inflamatoria crónica, está indisolublemente ligada al desequilibrio oxidativo-reductor (Kimura y col., 1993). De hecho, durante el proceso inflamatorio inducido por los patógenos periodontales la estimulación de los neutrófilos y macrófagos durante el proceso de fagocitosis, conduce a un "estallido respiratorio" resultando en un incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs); y su producción excesiva conduce a estrés oxidativo con un incremento en la formación de radicales libres, así como una disminución de los niveles de antioxidantes (Kimura y col., 1993; Toczewska y col., 2020). Muchos estudios han demostrado que el estrés oxidativo es directamente responsable de la degradación de los componentes de la matriz extracelular del tejido periodontal, incluyendo colágeno, elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (como el ácido hialurónico) (Kimura y col., 1993), lo que lleva a la destrucción del tejido de soporte del periodonto (Knaś y col., 2013; Tóthová y Celec, 2017; Wang y col., 2017). Sin embargo, el estrés oxidativo también inicia y promueve la respuesta inflamatoria en la periodontitis. Bajo la influencia de EROs, se genera un aumento en la producción de citocinas y factores de crecimiento como las IL-6, IL-8, TNF- α y el factor nuclear κ B (NF κ B) (Tóthová y Celec, 2017). De hecho, en pacientes con EP, la actividad de NAD(P)H oxidasa aumenta, lo que no sólo incrementa la producción de radicales libres, pero también es una fuente importante de citocinas pro-inflamatorias (Giannopoulou y col., 2008). El estrés oxidativo también conduce a la liberación de enzimas lisosomales responsables de la destrucción local de tejidos. Estudios recientes indican que, en pacientes con periodontitis con

comorbilidades, el desbalance óxido-redox salivales se encuentran exacerbados. En casos de EP y enfermedad coronaria, se ha demostrado incrementos de los niveles de malondialdehído salival y sérico (marcador de peroxidación de lipídica), así como de la dimetilarginina asimétrica (ADMA, un inhibidor endógeno del óxido nítrico) en comparación con sujetos sanos y casos de cardiopatía coronaria. Esto se acompañó de una disminución de la vitamina C, un importante antioxidante (Isola y col., 2019 a,b; 2020).

Las EROs producidas por la infiltración local de neutrófilos participan en la destrucción del tejido periodontal. El desequilibrio en la actividad oxidante / antioxidante dentro de la cavidad oral influye de manera adversa en el estado oxidativo sistémico, como se refleja en el aumento de los niveles séricos de EROs y la reducción de los antioxidantes (Brock y col., 2004; D'Aiuto y col., 2010). El estrés oxidativo, a su vez, está implicado en el desarrollo de la hipertensión, ya que las EROs pueden considerarse mediadoras de la vasoconstricción y la inflamación vascular; y la biodisponibilidad del óxido nítrico está estrechamente relacionada con el estado redox (Touyz, 2004a; Androulakis y col., 2009). En la hipertensión, tanto las pequeñas como las grandes arterias presentan una vasorelajación dependiente del endotelio y una distensibilidad disminuidas, una vasoconstricción incrementada, mayor remodelaje e inflamación (Touyz, 2004b).

Entre los muchos factores vasoactivos involucrados en la fisiopatología de la hipertensión, está la angiotensina II (ANG II), que es considerada actualmente como un agente pro-inflamatorio (Labandeira-García y col., 2017). Así, la administración

de bloqueantes del receptor AT_1 de la ANG II ha demostrado efectos anti-inflamatorios en procesos tales como la inflamación vascular subyacente a la artritis reumatoide (Price y col., 2007), la aterosclerosis (Phillips y Kagiya, 2002), en procesos de inflamación vascular subyacentes a hipertensión y otras patologías (Marchesi y col., 2008). Se ha demostrado que la ANG II, a través de su receptor AT_1 , es capaz de iniciar una cascada inflamatoria mediada por la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa, la generación de EROs y la activación del $NF\kappa B$ (Mollnau y col., 2002; Matos y col., 2013). Las células poseen varios mecanismos de defensa capaces de prevenir o contener los efectos deletéreos de las EROs (Förstermann, 2008); sin embargo, cuando se excede la capacidad del sistema de defensa antioxidante [superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), heme oxigenasa (HO), paraoxonasa (PON)], se desemboca en estrés oxidativo. Por lo tanto, las manipulaciones farmacológicas dirigidas a la prevención del estrés oxidativo son de gran interés terapéutico. Estas incluyen a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y a los bloqueantes del receptor AT_1 de la ANG II (Li y col., 2011).

La evidencia indica la presencia de los componentes de un SRA local en la encía de la rata, capaz de generar ANG II *in vitro*, siendo este sistema completamente funcional tanto en ratas como en humanos (Santos y col., 2009, 2015). Así, Matos y col. (2013, 2014), demostraron que el bloqueo de los receptores AT_1 , previene la progresión de la EP en etapas tempranas de la patología ya que previene significativamente la pérdida de hueso, revierte el aumento en el conteo de leucocitos y de la actividad enzimática de la CAT, la SOD, la GPx y la NOS inducido

por lipopolisacárido (LPS). Igualmente, el valsartán fue capaz de prevenir el incremento inducido por el LPS de los niveles salivales de la PCR, de citocinas pro-inflamatorias como las IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, el TNF- α ; las quimiocinas RANTES y MIP-3 α , y de prevenir la reducción de la citocina anti-inflamatoria IL-4 (Matos y col., 2014, 2016, 2019). Todos estos hallazgos permiten establecer la existencia de una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y de marcadores inflamatorios y la EP; y sugiere un papel de la ANGI/RAT $_1$ en la patogénesis de la EP inducida con LPS en ratas (Matos y col., 2014; Santos y col., 2015; Dionisio y col., 2019).

Dada la gran prevalencia tanto de la EP como de la hipertensión, la morbimortalidad asociada a ambas, y tomando en cuenta la alta incidencia de una asociación entre ambas patologías; se acrecienta la necesidad de investigar sobre el reconocimiento del periodonto como un foco de infección con efectos sistémicos potenciales y de amplio alcance. Por ello, empleando modelos experimentales de hipertensión arterial y a fin de examinar la asociación entre hipertensión y la EP, en el presente trabajo se evaluó la influencia de la HTA sobre cambios morfológicos e inflamatorios en el periodonto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) comparándolas con su control *Wistar Kyoto* (WKY) a las que se le indujo EP experimentalmente con LPS. Asimismo, se evaluaron las posibles alteraciones de la actividad de las enzimas antioxidantes y el papel de la ANGI/RAT $_1$ en la EP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas *Wistar Kyoto* (WKY) (Control). Para ello se determinó el efecto del antagonista del receptor AT_1 , el valsartán (VAL), sobre la HTA, el recuento de leucocitos, la actividad

de tres enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPx.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas macho de 16 semanas de las cepas espontáneamente hipertensas (SHR) y *Wistar Kyoto* (WKY), de 280-300 g de peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mantenidas bajo libre acceso al agua y comida (Ratarina®) hasta el momento del experimento. Los cuales fueron realizados bajo la supervisión de la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV y de acuerdo con el Código de bioética y bioseguridad sobre el manejo de animales de experimentación del Ministerio de Ciencias y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.

INDUCCIÓN DE LA PERIODONTITIS

La periodontitis se indujo mediante inyecciones repetidas de la endotoxina en el tejido gingival, de acuerdo con el método de Ramamurthy y col. (1985). La inflamación periodontal fue inducida 24 horas antes del inicio del tratamiento con el antagonista de los receptores AT_1 (valsartán) (VAL). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% (60 mg/Kg) e inyectadas directamente en la encía vestibular entre el primer y segundo molar con 10 μ L (1 mg/mL) de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*), purificado cromatográficamente (Sigma, St. Louis, MO), cada dos días, para un total de 5 inyecciones en un período de 11 días de tratamiento. EL VAL fue administrado por vía oral (10mg/Kg) mediante el uso de una sonda intragástrica. Las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos: 1. WKY+LPS tratadas con vehículo; 2. SHR+LPS tratadas con vehículo; 3. WKY+LPS+VAL (11 días); 4. SHR+LPS+VAL (11 días).

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Se midió la PA al comienzo y al final del tratamiento. El registro de los parámetros cardiovasculares, PA y frecuencia cardíaca se realizó en las ratas conscientes por un método no invasivo mediante el uso de un plestismógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5002 LETICA®, Panlab, S.L. Barcelona-España), registrándose la PAS, PAD y la presión arterial media (PAM). La semana previa al experimento, se determinó diariamente la PA y frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo y al movimiento de la cola (período de adaptación a la toma de la PA y de la frecuencia cardíaca).

RECUESTO DE LEUCOCITOS

Al final de los 11 días, se sacrificaron los animales por decapitación se tomaron muestras de sangre periférica (2 mL aproximadamente) y se colocaron en tubos estériles para extracción de sangre al vacío, con EDTA- K_2 (1,2 a 2,0 mg/mL de sangre). Posteriormente se colocaron en un tubo Eppendorf, 20 μ L de sangre y 380 μ L de reactivo de Turk para un volumen total de 400 μ L, se mezcló cuidadosamente, se dejaron en reposo, y se procedió a llenar la cámara de Neubauer, llevándola al microscopio con un objetivo de 10X y realizándose el conteo de los 5 cuadrados de 1 mm de lado cada uno. El número de leucocitos fue calculado tomando la suma de las células contadas multiplicado por 40 y el recuento de leucocitos fue expresado como células/ mm^3 .

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUCOSA BUCAL

Después de que las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se aisló la

encia del maxilar inferior. La mucosa bucal fue colocada en una solución amortiguadora fría de fosfatos (NaCl al 0,9% en buffer de fosfatos 0,01 M; pH 7,0). Para la medición de las enzimas antioxidantes los trozos de mucosa fueron colocados en 2 volúmenes de una solución fría (PBS 0,01 M, EDTA 1mM, aprotinina al 0,05% y ortovanadato de sodio (Na_3VO_4 100 mM), sonicados y centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a -20°C hasta el procesamiento de la muestra.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Determinación de la actividad de la SOD total

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT) por los O_2^- generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición: xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6 μM , albúmina 0,006% y bicarbonato de sodio 4 mM. Se añadió 33 μL del tejido de interés homogenizado y diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7), al cual se le añadió 166 μL de la mezcla de incubación (xantina 0,03 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y NaHCO_3 400 mM), manteniéndose a 27°C . La reacción se inició con la adición de 10 μL de la enzima xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos, pero sin xantina oxidasa; asimismo, se preparó un tubo de 100% de reducción, el cual contenía xantina oxidasa sin muestra. Los tubos se incubaron por 30 minutos, seguidamente se adicionó 1 mL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM y se midió

la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1982), la cual cuantifica la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debido a su degradación por la CAT presente en la muestra. Para ello, se añadió 25 μL de homogenizado del tejido gingival a 725 μL de la mezcla de incubación conteniendo 10 mM H_2O_2 en un buffer fosfato 10 mM a pH 7, monitoreando el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A_1 y A_2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa

La actividad de la GPx fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado y NAD(P)H, y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados se expresan promediando los cambios de

absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0,16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H a 340 nm es de 6,22 L mmol⁻¹ cm⁻¹) y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada y los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

Determinación de las proteínas tisulares

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm E.E.M.$) y fueron graficados y analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 4.1. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el análisis post hoc de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

RESORCIÓN ÓSEA

En la Figura 1 se observa el registro fotográfico de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas WKY y SHR tratadas con LPS, donde se muestra el aspecto macroscópico de los maxilares de ambos grupos. Las flechas representan el área donde se produjo la pérdida ósea con las inyecciones inter diarias de LPS, la cual fue

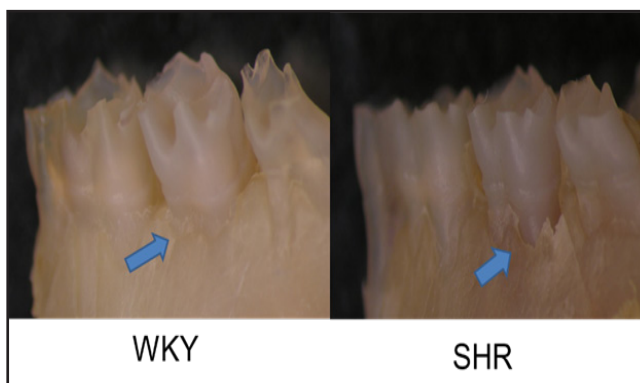


Figura 1. Registros fotográficos de la pérdida ósea en el maxilar de las ratas. Aspectos macroscópicos de un maxilar de ratas WKY y SHR. Las flechas representan el área de pérdida ósea (Matos y col., 2015)

más marcada en el grupo de ratas SHR al compararlas con las ratas WKY tratadas con LPS.

RECUESTO DE LEUCOCITOS

Como se observa en la Figura 2, aún cuando las ratas no mostraron signos aparentes de enfermedad sistémica a lo largo de los 11 días de tratamiento, las inyecciones con LPS produjeron leucocitosis, la cual fue mucho más pronunciada y significativa en el grupo de ratas SHR (+113%, $p < 0,001$). El bloqueo del receptor AT₁ con valsartán redujo parcial y significativamente el incremento del número de leucocitos contados en sangre periférica inducido por LPS en las ratas SHR.

PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

En las ratas SHR tratadas con LPS se observan valores de PAM significativamente mayores ($p < 0,05$) que, en su contrapartida, las ratas WKY. El bloqueo del receptor AT₁ con valsartán revertió los valores incrementados de la PAM en las ratas SHR tratadas con LPS (Figura 3).

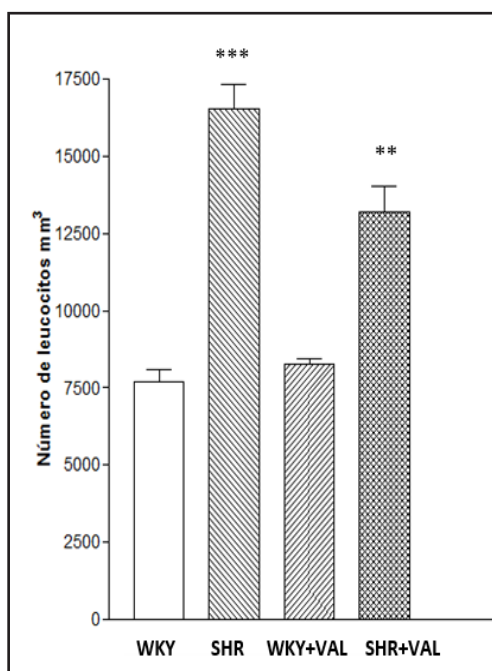


Figura 2. Contaje de leucocitos en los grupos sometidos a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media \pm E.E.M. N= 6-10. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, respecto al grupo WKY

Actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal en ratas WKY y SHR con EP inducida por inyecciones locales de LPS

Como se observa en la Figura 4, la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD mostró un incremento significativo y más pronunciado y en el grupo de las ratas SHR con EP inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo de ratas WKY con EP (CAT: 190% y SOD: 51%). El tratamiento con el antagonista del receptor AT_1 (VAL) fue capaz de revertir dicho incremento.

Con relación a la actividad de la GPx, se observa que en las ratas SHR con EP, la actividad de la misma estuvo significativamente reducida al compararla con las WKY (-65%). El tratamiento con el VAL revirtió parcialmente la reducción de la actividad enzimática (Figura 4).

Discusión

En el presente estudio se evaluó la posible asociación entre la EP y la hipertensión y sus efectos sobre el estado redox, reflejado en la actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal. Los hallazgos indicaron que, en las ratas SHR con EP inducida experimentalmente se observa un incremento exacerbado en el conteo de leucocitos, un aumento significativamente mayor en el área de pérdida ósea maxilar en comparación con ratas normotensas con EP y alteraciones del estado oxidativo asociado a la actividad de las enzimas antioxidantes de la mucosa bucal.

La presencia de infiltrado inflamatorio es una característica constante en la EP, donde estas células ejercen un papel en la contención de las bacterias gingivales y sus productos, que debe balancearse con la

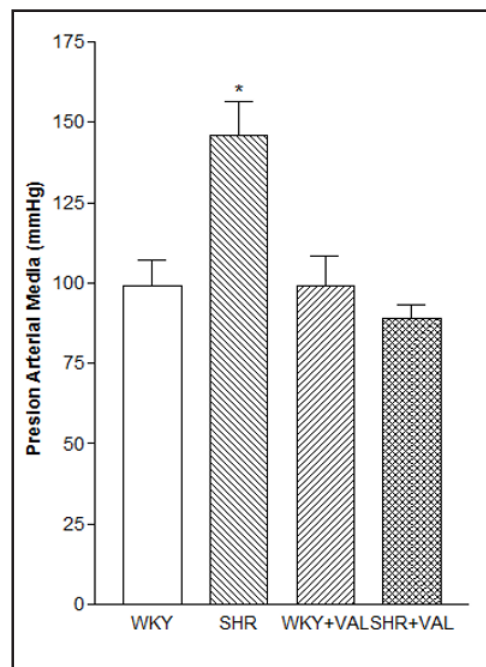


Figura 3. Determinación de la presión arterial media en los grupos sometidos a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media \pm E.E.M. N= 2-5. * $p < 0,01$ comparado con WKY

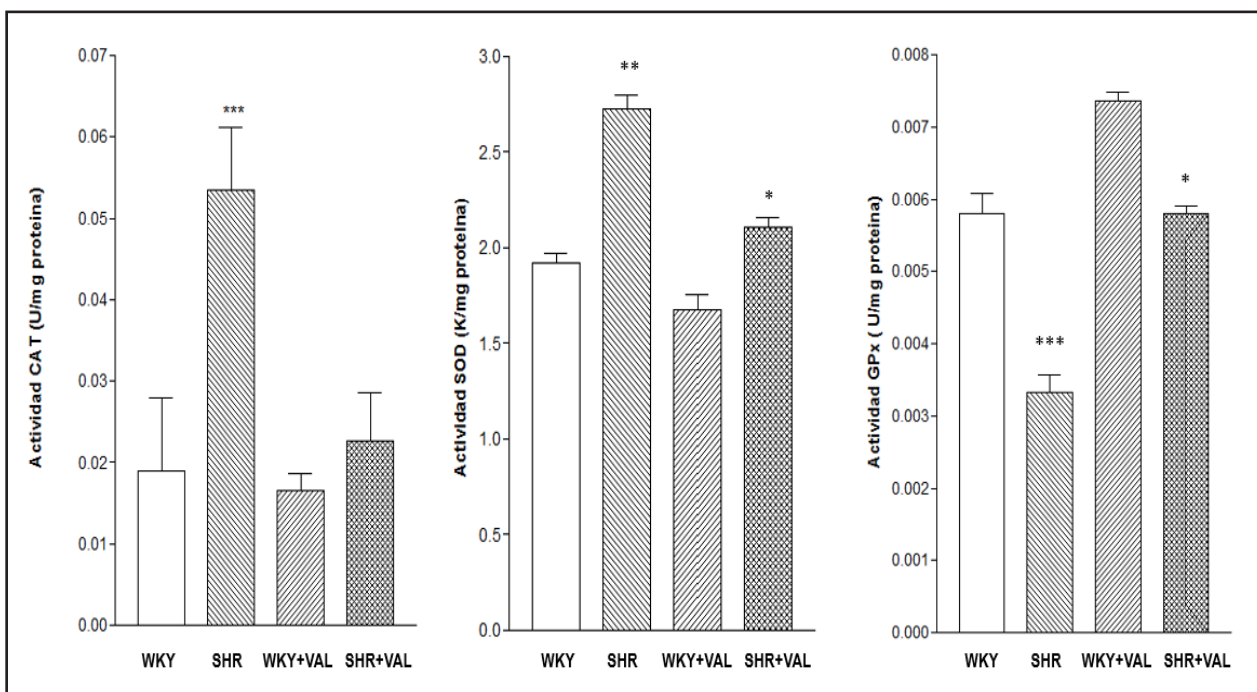


Figura 4. Actividad de la CAT, SOD y GPx de la encía de las ratas sometidas a 11 días de tratamiento. Cada barra representa la media \pm E.E.M. N= 6-10. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, respecto a su propio control del grupo WKY

destrucción hística debida a la liberación de radicales libres y proteasas. De esta forma, un mecanismo defensivo se convierte en lesivo para los tejidos periodontales, y por lo tanto están involucrados en la etiopatogenia de la EP (García-Triana y col., 1998). Los leucocitos migran a través de las estructuras de unión del epitelio hacia el surco gingival y luego migran al torrente circulatorio sistémico, tal y como lo demuestra Matos y col. (2015) en un modelo de periodontitis en rata en el que el tratamiento durante 7 días con LPS produjo un aumento de la leucocitosis con neutrofilia evidente, lo que sugiere una repercusión sistémica de la periodontitis debido a las bacterias Gram-negativas viables en la biopelícula, a los LPS y citocinas proinflamatorias que pueden ingresar al torrente sanguíneo e influir en la salud general y en la susceptibilidad a ciertas enfermedades.

Numerosos informes basados en estudios epidemiológicos, indican que las infecciones buco-dentales están asociadas y pueden desempeñar un papel coadyuvante en el desarrollo de enfermedades sistémicas, reportándose una relación estadísticamente significativa entre la EP y un riesgo aumentado de padecer aterosclerosis y ECV (Bullon y col., 2011), accidentes vasculares cerebrales y artritis reumatoide (Esen y col., 2012), lo cual está en concordancia con resultados relativos a los recuentos elevados de leucocitos en la sangre venosa de los pacientes con EP que confirma la presunción que la EP causa inflamación sistémica de bajo grado inducida por la respuesta del hospedero a las bacterias periodontales (Žilinskas y col., 2011).

Ahora bien, los efectos sobre los leucocitos parecen estar exacerbados

durante la hipertensión, tal y como apuntan nuestros resultados presentes donde el incremento representa un 113% sobre el basal en comparación con el incremento reportado por Matos y col. (2013) en ratas *Sprague-Dawley* de apenas un 63 % de incremento en la leucocitosis. Igualmente, Bonato y col. (2012) demostraron que las ratas SHR con periodontitis presentan un marcado aumento de la infiltración de neutrófilos en comparación con ratas WKY. Aún más, se ha demostrado que los niveles de las enzimas de los neutrófilos como la metaloproteínasa de matriz-8 y 9, la mieloperoxidasa (MPO) y el elastómero de neutrófilos (NE) en la circulación aumentaron en pacientes con hipertensión y periodontitis crónica (Türkoglu y col., 2014). Estos hallazgos indican una relación bidireccional entre la EP y la hipertensión, lo que demuestra que la enfermedad sistémica puede influir en la patogenia de la EP, y la misma también puede traer consecuencias sistémicas (Prieto y col., 2017; Conti y col., 2020).

Con relación a la resorción ósea, nuestros hallazgos coinciden con diversos estudios que demuestran que las ratas con periodontitis tuvieron resorción del hueso alveolar, siendo que las SHR con periodontitis mostraron una pérdida ósea más marcada, en comparación con ratas WKY con EP. Las ratas SHR sufren una inflamación periodontal más severa, cuando son comparadas con su control WKY, con mayor pérdida de hueso alveolar (Bonato y col., 2012), lo que indica que en las ratas SHR, la condición hipertensiva *per se* parece favorecer los procesos inflamatorios que se potencian cuando se combinan con la periodontitis, comparado con ratas normotensas WKY. Samanovic y col. (2021) apoyan estos hallazgos ya que demuestran

que el área radiográfica de la periodontitis apical fue significativamente mayor en el grupo de ratas SHR + periodontitis apical que en el grupo periodontitis apical sólo o control.

El aumento de la PA y la EP, a pesar de ser diferentes en etiología y patogenia, tienen algunas similitudes, como una microbiota común (Bacterias anaeróbicas Gram-negativas) acompañadas por niveles elevados de citocinas sistémicas, que pueden conducir a los efectos vasculares deletéreos posteriores (Cotti y col., 2011). Sobre la base de este conocimiento, estudios clínicos confirmaron que la EP afecta el aumento del nivel de PAS, PAD y masa ventricular izquierda en sujetos con hipertensión, lo que coincide con los resultados del estudio de Angeli y col. (2003), quienes demostraron una asociación directa entre la severidad de la periodontitis y la masa ventricular izquierda, esta última como predictor independiente de ECV. Por su parte, Lockhart y col. (2012) encontraron un vínculo entre la EP y la enfermedad vascular aterosclerótica, pero sin una relación causal. Además, no pudieron demostrar que las intervenciones terapéuticas periodontales pudieran modificar el curso clínico de la enfermedad aterosclerótica, la enfermedad vascular o prevenir enfermedades del corazón.

El mecanismo biológico que podría ser importante en la asociación entre las EP y las sistémicas como la hipertensión, es sin lugar a duda el estrés oxidativo. La actividad del sistema antioxidante presente en la saliva o en la mucosa bucal, como la CAT, GPx y SOD, han resultado en biomarcadores efectivos para evaluar la severidad de la EP y la efectividad de los tratamientos (Matos y col., 2013; Lee y

col., 2019; Toczewska y Konopka, 2019). Por ello, en el presente estudio evaluamos si la EP está mediada por un cambio en la capacidad antioxidante en condiciones hipertensivas. Así, nuestros resultados muestran un incremento significativo de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD de la mucosa bucal en el grupo de las ratas hipertensas con EP inducida con el tratamiento con LPS comparada con el grupo de ratas WKY con EP, mostrándose una actividad enzimática de CAT exacerbada de un aumento de 190%, mientras que en ratas *Sprague-Dawley* con EP experimental el incremento de la actividad de la catalasa fue de apenas un 54 % (Matos y col., 2013).

La literatura muestra resultados diversos cuando se mide la actividad antioxidante del sistema de defensa enzimático, dependiendo del tejido o fluido donde se midan. Algunos estudios sugieren una disminución de las actividades antioxidantes de la SOD y CAT asociadas con la periodontitis (Trivedi y col., 2015). En estudios realizados en animales, Sobaniec y Sobaniec-Lotowska (2000) mostraron, en el suero de ratas sometidas a un modelo de ligadura para inducir la periodontitis, una reducción de la actividad de la SOD, CAT y GPx, así como un incremento del malondialdehído (MDA). A su vez, Petelin y col. (2000), estudiaron el efecto de la aplicación subgingival de liposomas de SOD en perros beagles a los cuales se había inducido la periodontitis, encontrando una mejoría en los procesos de inflamación e incremento del hueso alveolar, no así con la CAT. Estos niveles bajos de SOD y CAT observados en pacientes con periodontitis crónica, podría ser el resultado del agotamiento antioxidante debido a la generación constante de radicales libres y la destrucción de antioxidante protectores.

Contrariamente a lo reportado, nuestros resultados de un incremento en la actividad de la SOD y la CAT en la mucosa bucal de las ratas SHR sometidas a inyecciones de LPS, cuando son comparados con su control WKY con EP, puede deberse a un efecto inmediato local y no sistémico, que requiere una acción inmediata del sistema antioxidante, de ahí el incremento compensatorio en la actividad de estas enzimas. Asimismo, puede reflejar una mayor sensibilidad del sistema antioxidante en ratas SHR, con un nivel de radicales libres exacerbado por la hipertensión con una sobreexpresión de estas enzimas. En apoyo a nuestros resultados se encuentran los de Panjamurthy y col. (2005) quienes reportan un incremento en el estado oxidativo total y en los valores de SOD en suero, saliva y fluido gingival crevicular (FGC) de pacientes con periodontitis crónica y niveles incrementados de MDA sólo en el FGC, que retornaron a niveles basales con terapia.

Estos resultados sugieren que la hipertensión asociada a la EP se acompaña con una situación de estrés oxidativo, con adaptaciones de mecanismos antioxidantes, con el fin de contrarrestar los efectos negativos de la oxidación. Probablemente, el sistema antioxidante celular defensivo posee capacidad de adaptación al efecto del estrés oxidativo que acompaña a la hipertensión. Así pues, en esta patología observamos un aumento de estrés oxidativo, que no puede ser atribuido a un defecto del sistema antioxidante. Puede especularse que cuando el estrés oxidativo es mayor, la célula genera una mayor actividad antioxidante (Labiós y col., 2011).

Entre los principales mecanismos que

poseen las células para prevenir o reparar los efectos deletéreos del estrés oxidativo, está el glutatión (Giustarini y col., 2017; Yang y col., 2020;). La forma reducida del glutatión (GSH) es un péptido de tres aminoácidos que experimenta ciclos de oxidación y reducción en el grupo sulfidrilo de la cisteína terminal. Durante la oxidación, dos moléculas de GSH donan sus electrones para reducir el producto blanco y se forma una unión sulfidrilo entre ellos, generando el glutatión oxidado (GSSG). El estrés oxidativo puede disminuir tanto el glutatión total como es GSH. Efectivamente, Tsai y col. (2015) encontraron que la concentración de glutatión salival estaba reducida en pacientes con periodontitis crónica comparados con sujetos sanos, sugiriendo que este antioxidante se consume durante la producción de las EROs que llevó a su deficiencia. En apoyo a esto, nuestros hallazgos muestran que la actividad del GPx sufrió una disminución de la actividad de la enzima en el grupo de ratas SHR a las que se les indujo la EP con relación al grupo de ratas WKY con EP, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas.

Existe evidencia que indica que la ANG II desempeña un papel decisivo en la inducción de la producción de EROs en diferentes tejidos durante la EP asociada a la HTA, ambas frecuentemente asociadas con aumento de los niveles de ANGII (Romero y Reckelhoff, 1999). Efectivamente, nuestros hallazgos apoyan el papel de la ANG II y su receptor AT_1 en las alteraciones producidas en las ratas hipertensas con EP, ya que el pre-tratamiento con valsartán, además de reducir la PA en las ratas SHR, fue capaz de revertir el incremento exacerbado de la

leucocitosis, de la mayor pérdida ósea y de la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes.

La participación del receptor AT_1 y la NAD(P)H oxidasa en la acción de la ANG II en la producción de EROs durante la EP fue demostrada por Matos y col. (2013), quienes mostraron que la apocinina, un inhibidor del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa, fue capaz de revertir el incremento de la actividad de la SOD y CAT inducidos por la inyección de LPS. Del mismo modo, el tempol, un atrapador del anión superóxido que mimetiza la acción de la SOD, fue capaz de prevenir el efecto de la administración del LPS sobre las enzimas antioxidantes. Estos resultados sugieren que durante la periodontitis experimental inducida con inyecciones de LPS ocurre la activación secuencial que implica a la ANG II, el receptor AT_1 , la NAD(P)H oxidasa y el anión superóxido. Efectivamente, los hallazgos de Matos y col. (2013), nos permiten inferir que en la EP inducida con inyecciones con LPS en ratas hipertensas, las EROs participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor AT_1 y su acople a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa.

Santos y col. (2015) demostraron la expresión de los componentes del SRA en el tejido gingival de la rata, el cual es capaz de generar los péptidos de angiotensina, indicando la presencia de un SRA funcional. Efectivamente, estos autores encontraron expresión de renina, enzima convertidora de angiotensina, receptores AT_1 y AT_2 , en diferentes regiones del microambiente oral; por ejemplo, en la porción apical de la raíz, la papila interdental, y el epitelio oral, lo que sugiere la distribución pleiotrópica de los componentes SRA en el tejido periodontal. En particular, demostraron

que el inhibidor de la renina, aliskiren y el inhibidor de receptor AT_1 , losartán, fueron capaces de prevenir la pérdida ósea en ratas después de la inducción de periodontitis experimental. Del mismo modo, Suda y col. (2013), utilizando un modelo de ratón, encontraron que el bloqueante del receptor AT_1 , telmisartán, previno la pérdida de hueso alveolar en ratones heterocigotos para síndrome de Marfan infectados con *P. gingivalis* en comparación con los ratones de control. Además, Araújo y col. (2013), en un modelo de periodontitis inducida por ligadura en rata demostraron que el telmisartán fue capaz de atenuar la formación de EROs, íntimamente asociadas a la activación de genes proinflamatorios, la inflamación, y a la expresión de metaloproteinasas de la matriz y la pérdida ósea. Toda esta evidencia está en línea con nuestros resultados presentes, en los que se demuestra que el valsartán fue capaz de revertir la resorción ósea gingival en ratas SHR con EP, y apoya el papel del receptor AT_1 en la progresión de la EP durante la hipertensión.

El SRA participa en la regulación de la PA y la homeostasis del volumen y en la fisiopatología de la hipertensión y otras afecciones como la EP (Yim and Too, 2008; Santos y col., 2015). Efectivamente, el aumento de la actividad del SRA es un determinante importante para numerosas afecciones patológicas porque la ANG II aumenta la liberación de aldosterona, la PA y el estrés oxidativo y contribuye al desarrollo de daño en los órganos terminales a través de efectos directos sobre el tejido cardíaco, vascular y renal (Yim and Too, 2008). En vista del importante papel del SRA en la hipertensión y la EP, es lógico pensar que su inhibición debería corregir el incremento de la PA y la progresión de la EP. En apoyo a esta

aseveración, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con el bloqueante de los receptores AT_1 , el valsartán, previene de modo significativo la progresión de la EP exacerbada en la rata hipertensa en etapas tempranas de la patología, ya que fue capaz de revertir el aumento la PA y la alteración de la actividad enzimática de la SOD, la CAT y la GPx en tejido gingival de rata, lo que indica una relación entre los marcadores de estrés oxidativo y la hipertensión asociada a EP. El hecho que estos efectos hayan sido revertidos por el tratamiento con VAL, sugiere un papel de la ANGII/RAT₁ en la patogénesis de la EP inducida con LPS en la hipertensión. Similarmente, Labiós y col. (2011) señalan que el tratamiento durante dos meses con el telmisartán, otro bloqueante del receptor AT_1 de la ANG II, indujo en pacientes, una reducción de las cifras tensionales junto al estrés oxidativo medido en los leucocitos, observando en paralelo, una disminución del sistema de antioxidante. Dicho descenso parecería indicar que la célula no necesita tanta actividad antioxidante cuando la hipertensión se normaliza. Adicionalmente, Li y col. (2019) demostraron que la HTA empeora la resorción ósea y la destrucción del ligamento periodontal en la periodontitis y estos efectos fueron revertidos mediante el tratamiento con losartán.

Nuestros estudios muestran un papel central de la ANG II como mediador del estrés oxidativo en la patogénesis de la periodontitis exacerbada por hipertensión, lo que indica que la ANG II puede ser un blanco terapéutico en pacientes con hipertensión y comorbilidad de periodontitis.

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran la presencia de EP en las ratas SHR con

EP inducida experimentalmente se manifiesta por la pérdida ósea marcada. En las ratas hipertensas con EP inducida experimentalmente, la EP se acompañó de un aumento más pronunciado en el número total de leucocitos y de la actividad de la CAT y SOD comparada con las ratas normotensas con EP inducida experimentalmente, lo que se asocia a la presencia de estrés oxidativo exacerbado. Igualmente, se observó una disminución de la actividad de la GPx, posiblemente debido a la reducción de la concentración de glutatión en las ratas hipertensas. Todos estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con VAL, sugiriéndose un papel de la ANGII/RAT₁ en la patogénesis de la EP asociada a la hipertensión. Estos hallazgos abren nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de la EP y su comorbilidad la hipertensión.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) No. 2007001585 y CDCH PI- 06-7368-2008-1 y CDCH PG007349-2001 etapas 1 y 2.

Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. In *Methods Enzymol* 105:121–126.
- Aguilera E, Suvan J, Buti J, Czesnikiewicz-Guzik M, Ribeiro A, Orlandi M, Guzik TJ, Hingorani A, Nart J, D'Aiuto F. 2020. Periodontitis is associated with hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Res* 116(1):28–39.
- Androulakis ES, Tousoulis D, Papageorgiou N, Tsioufis C, Kallikazaros I, Stefanadis C. 2009. Essential hypertension: ¿is there a role for inflammatory mechanisms? *Cardiol Rev* 17:216–21.
- Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, Pellegrino R, Pellegrino G, Prosciutti L, Giannoni C, Cianetti S, Bentivoglio M. 2003. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. *Hypertension* 41:488–492.
- Araújo A, Souza T, Moura L, Brito G, Aragao K, Araújo L, Medeiros C, Alves M, Araújo Jr R. 2013. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol* 40: 1104–1111.
- Bahekar A, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. 2007. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J* 154: 830–837.
- Bascones Martínez A, Figuero Ruiz E. 2005. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Av Periodon Implantol* 17(3): 147–156.
- Beck J, Offenbacher S. 2001. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. *Ann Periodontol* 6: 9–15.
- Bonato CF, do-Amaral C, Belini L, Salzedas L, Oliveira S. 2012. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *J Periodontal Res* 47(6):783–792.
- Bouchard P, Boutouyrie P, D'Aiuto F, Deanfieldm J, Deliargyris E, Fernandez-Avilés F, Hughes F, Madianos P, Renvert S, Sanz M. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *Eur Heart J Suppl* 12(suppl B): B13–22.
- Brock G, Butterworth C, Matthews J, Chapple I. 2004. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 31:515–521.
- Bullon P, Cordero M, Quiles J, Morillo J, Ramírez M, Battino M. 2011. Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med* 50(10): 1336–1343.
- Chen Y, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, Iwai T, Izumi Y, Ishikawa I. 2008. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35: 153–158.
- Chrysohoou C, Pitsavos C, Panagiotakos D, Skoumas J, Stefanadis C. 2004. Association between prehypertension status and inflammatory markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Am J Hypertens* 17:568–573.
- Conti L, Segura-Egea J, Cardoso C, Benetti F, Azuma M, Oliveira P, Bomfim S, Cintra L. 2020. Relationship between apical periodontitis

- and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. *International Endodontic J* 53:1387–1397.
- Czopek A, Moorhouse R, Guyonnet L, Farrah T, Lenoir O, Owen E, van Bragt J, Costello HM, Menolascina F, Baudrie V, Webb DJ, Kluth DC, Bailey MA, Tharaux PL, Dhaun N. 2019. A novel role for myeloid endothelin-B receptors in hypertension. *Eur Heart J* 40:768.
- Cotti E, Dessì C, Piras A, Mercurio G. 2011. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *Int J Cardiol* 148(1):4–10.
- D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. 2010. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 89:1241–1246.
- De Nardin E. 2001. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann Periodont* 6: 30–40.
- Demmer R, Papapanou P. 2010. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53:28–44.
- DeStefano F, Anda R, Kahn H, Williamson D, Russell C. 1993. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 306: 688–691.
- Desvarieux M, Demmer R, Jacobs Jr D, Rundek T, Boden-Albala B, Sacco R, Papapanou P. 2010. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *J Hypertens* 28: 1413–1421.
- Dionisio T, Souza G, Colombini-Ishikiriama B, Garbieri T, Parisi V, Oliveira G, Cano I, Rodini CO, Oliveira SH, Greene AS, Santos C. 2019. AT1 receptor antagonism promotes bone loss attenuation in experimental periodontitis, block inflammatory mediators, upregulate antioxidant enzymes and bone formation markers. *J Periodontol* 91 (4): 533–544.
- Dominy S, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder M, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker G, Reynolds E, Faull R, Curtis M, Dragunow M, Potempa J. 2019. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5: eaau3333.
- Drummond G, Vinh A, Guzik T, Sobey C. 2019. Immune mechanisms of hypertension. *Nat Rev Immunol* 19:517–532.
- El Kholy K, Genco R, VanDyke T. 2015. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinol Metab* 26(6):315–321.
- Esen C, Alkan B, Kırnap M, Akgül O, Işıkoğlu S, Erel O. 2012. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol* 83(6): 773–779.
- Flohé L, Günzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. In *Methods Enzymol Display Settings* 105:114–121.
- Förstermann U. 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5: 338–349.
- Gani D, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P. 2009. Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 13(2): 69–74.
- García-Triana B, García-Piñeiro J, Saldaña-Bernabeu A. 1998. la peroxidación lipídica en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cub Estomatol* 35(1): 25–29.
- Gaurilcikaite E, Renton T, Grant AD. 2017. The paradox of painless periodontal disease. *Oral Dis* 23 (4): 451–463.
- Giannopoulou C, Krause KH, Müller F. 2008. The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. *Semin Immunopathol* 30:273–278.
- Giustarini D, Colombo G, Garavaglia M, Astori E, Portinaro N, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi A, Santucci A, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. 2017. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med* 112: 360–375.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204:2449–2460.
- Holmlund A, Holm G, Lind L. 2006. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and hypertension in a study based on 4254 subjects. *J Periodontol* 77: 1173–1178.
- Hujoel P, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen T. 2000. Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA* 284: 1406–1410.
- Humphrey L, Fu R, Buckley D, Freeman M, Helfand M. 2008. Periodontal Disease and Coronary Heart

- Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Gen Intern Med* 23: 2079–2086.
- Inoue K, Kobayashi Y, Hanamura H, Toyokawa S. 2005. Association of periodontitis with increased white blood cell count and blood pressure. *Blood Press* 14: 53–58.
- Isola G, Polizzi A, Muraglie S, Leonardi R, Lo Giudice A. 2019a. Assessment of vitamin C and antioxidant profiles in saliva and serum in patients with periodontitis and ischemic heart disease. *Nutrients* 11(12):2956.
- Isola G, Polizzi A, Santonocito S, Alibrandi A, Ferlito S. 2019b. Expression of salivary and serum malondialdehyde and lipid profile of patients with periodontitis and coronary heart disease. *Int J Mol Sci* 20(23):6061.
- Isola G, Alibrandi A, Currò M, Matarese M, Ricca S, Matarese G, Lentile R, Kocher T. 2020. Evaluation of salivary and serum ADMA levels in patients with periodontal and cardiovascular disease as subclinical markers of cardiovascular risk. *J Periodontol* doi: 10.1002/JPER.19-0446. Online ahead of print.
- Itani HA, McMaster WG, Saleh MA, Nazarewicz RR, Mikolajczyk TP, Kaszuba AM, Konior A, Prejbisz A, Januszewicz A, Norlander AE, Chen W, Bonami RH, Marshall AF, Poffenberger G, Weyand CM, Madhur MS, Moore DJ, Harrison DG, Guzik TJ. 2016. Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans. *Hypertension* 68(1): 123–132.
- Kimura S, Yonemura T, Kaya H. 1993. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodontol* 28:197–203.
- Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiel D, Zalewska A. 2013. Oxidative stress and salivary antioxidants. *Dent Med Probl* 50:461–466.
- Konkel JE, O'Boyle C, Krishnan S. 2019. Distal consequences of oral Inflammation. *Front Immunol* 10:1403.
- Labandeira-García J, Rodríguez A, Garrido P, Rodríguez J, Lanciego J, Guerra M. 2017. Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Frontier Aging Neurosci* 9: 129.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Navarro B. 2011 Efecto del telmisartán en el estrés oxidativo y actividad antioxidante en leucocitos de sangre periférica de pacientes hipertensos. *Hipertensión y Riesgo Vascular* 28(2):48–54.
- Lee C-Y, Chang C-H, Teng N-C, Chang H-M, Huang W-T, Huang Y-K. 2019. Associations between the phenotype and genotype of MnSOD and catalase in periodontal disease. *BMC Oral Health* 19(1):201.
- Li M, Liu J, Han C, Wang B, Pang X, Mao J. 2011. Angiotensin II induces the expression of C-reactive protein via MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages. *Cell Physiol Biochem* 27(1): 63–70.
- Li J, Xiao X, Wei W, Ding H, Yuan Yue Y, Ye Tian Y, Nabar N, Zhaohui L, ZYang Z, Wang M. 2019. Inhibition of Angiotensin II Receptor I Prevents Inflammation and Bone Loss in Periodontitis. *J Periodon* 90(2): 208–216.
- Lockhart P, Bolger A, Papapanou P, Osinbowale O, Trevisan M, Levison M, Taubert K, Newburger J, Gornik H, Gewitz M, Wilson W, Smith S Jr, Baddour L. 2012. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: ¿does the evidence support an independent association?: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 125:2520–2544.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 193: 265–275.
- Macedo Paizan ML, Vilela-Martin JF. 2014. Is There an Association between Periodontitis and Hypertension? *Curr Cardiol Rev* 10:355–361.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin E. 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29:367–374.
- Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, Agossa K, Gaertner S, Tenenbaum H, Davideau J-L, Huck O. 2016. Association between periodontitis and arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 180:98–112.
- Matos M, Billet E, Mathison Y, Israel A, Garrido M. 2013. Generación de especies reactivas de oxígeno en la periodontitis experimental en la rata. Papel del receptor AT₁ y la NAD(P)H oxidasa. *Rev Fac Farm* 76(1 y 2): 58–66.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido M. 2014. El valsartán previene la resorción ósea en la periodontitis experimental. *Rev Periodoncia Osteointegración* 4(4): 289–295.
- Matos M, Perdomo L, Álvarez M, Israel A, Garrido MR. 2015. Papel del receptor AT₁ de la angiotensina II en la remodelación ósea que ocurre durante la enfermedad periodontal experimental en la rata. *Rev Fac Farm* 78 (1-2): 84–93.

- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2016. Las citoquinas proinflamatorias en la enfermedad periodontal experimental. Efecto del valsartán. *Rev Fac Farm* 79(1 y 2): 17–27.
- Matos M, Israel A, Billet E, Garrido M. 2019. Efecto del valsartán sobre los niveles de citocinas y quimiocinas salivales en la enfermedad periodontal experimental. *Rev Fac Farm* 80(1y2):27–45.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. 2002. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58–E6.
- Nakajima T, Yamazaki K. 2009. Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. *Odontology* 97:84–91.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. In *Meth Enzymol* 105:457–464.
- Oparil S, Acelajado M, Bakris G, Berlowitz D, Cífková R, Dominiczak A, Grassi G, Jordan J, Poulter N, Rodgers A, Whelton P. 2018. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 4:18014.
- Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran C. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Letters* 10: 255–264.
- Papapanou P, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine D, Flemming T, Garcia R, Giannobile W, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao R, Kebschull M, Kinane D, Kirkwood K, Kocher T, Kornman K, Kumar P, Loos B, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour G, Teles R, Tonetti M. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Proc J Clin Periodontol* 89 (Suppl 1): S173–S182.
- Petelin M, Pavlica Z, Ivanus AT, Entjunc MS, Skaleric U. 2000. Local delivery of liposome encapsulated superoxide dismutase and catalase suppress periodontal inflammation in beagles. *J Clin Periodontol* 27:918–925.
- Phillips M, Kagiya S. 2002. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Current Opinion in Investigational Drugs* 4: 569–577.
- Pietropaoli D, Del Pinto R, Ferri C, Marzo G, Giannoni M, Ortu E, Monaco A. 2020. Association between periodontal inflammation and hypertension using periodontal inflamed surface area and bleeding on probing. *J Clin Periodontol* 47(2):160–172.
- Price A, Lockhart J, Ferrell W, Gsell W, McLean S, Sturrock R. 2007. Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56:441–447.
- Prieto A, Gomes-Filho J, Azuma M, Sivieri-Araújo G, Narciso L, Souza J, Ciarlini P, Tavares L, Cintra A. 2017. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. *J Endodontics* 43:1651–1656.
- Ramamurthy N, Greenwald R, Schneir M, Golub L. 1985. The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl hydroxylase activity in uninflamed and inflamed rat gingiva. *Arch Oral Biol* 30(9): 679–683.
- Romero J, Reckelhoff J. 1999. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 34: 943–934.
- Samanovic A, Jakovljevic V, Vasovic M, Mitrovic S, Rankovic M, Mihajlovic K, Bolevich S, Zivkovic V. 2021. Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis. *Int Endod J* 00:1–16.
- Santos C, Akashi E, Dionisio T, Sipert C, Didier D, Greene A, Oliveira S, Pereira H, Becari C, Oliveira E, Salgado M. 2009. Characterization of a local renin angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* 80: 130–139.
- Santos C, Morandini A, Dionisio T, Faria F, Lima M, Figueiredo C, Colombini-Ishikiriama B, Sipert C, Maciel R, Akashi A, Souza G, Garlet G, Rodini C, Amaral S, Becari C, Salgado M, Oliveira E, Matus I, Didier D, Greene A. 2015. Functional local renin-angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One* 10(8): e0134601.
- Sanz M, D’Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease-scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Heart J Supplements* 12 (Suppl B):3-12.
- Sesso H, Buring J, Rafai N, Blake G, Gaziano M, Ridker P. 2003. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 290:2945–51.
- Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. 2000. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected

- processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 6:875–881.
- Southerland J. 2013. Periodontitis may contribute to poor control of hypertension in older adults. *J Evid Based Dent Pract* 13:125–127.
- Suda N, Moriyama K, Ganburged G. 2013. Effect of angiotensin II receptor blocker on experimental periodontitis in a mouse model of Marfan syndrome. *Infect Immun* 81: 182–188.
- Taguchi A, Sanada M, Sueti Y, Ohtsuka M, Lee K, Tanimoto K, Tsuda M, Ohama K, Yoshizumi M, Higashi Y. 2004. Tooth loss is associated with an increased risk of hypertension in postmenopausal women. *Hypertension* 43: 1297–1300.
- Toczewska J, Konopka T. 2019. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literatura. *Dent Med Probl* 56(4):419–426.
- Toczewska J, Maciejczyk M, Konopka T, Zalewska A. 2020. Total Oxidant and Antioxidant Capacity of Gingival Crevicular Fluid and Saliva in Patients with Periodontitis: Review and Clinical Study. *Antioxidants* 9:450.
- Tonetti MS, D’Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani A, Vallance P, Deanfield J. 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 356:911–920.
- Tonetti MS, Dyke TE. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Clin Periodontol* 40: S24.
- Tóthová L, Celec P. 2017. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Front Physiol* 8:1055.
- Touyz R. 2004a. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells-implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37:1263–1273.
- Touyz R. 2004b. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248–52.
- Trivedi S, Lal N, Ali Mahdi A, Singh B, Pandey S. 2015. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 35(2): e14–19.
- Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. 2005. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontol* 40:378–384.
- Tsakos G, Sabbah W, Hingorani A, Netuveli G, Donos N, Watt RG, D’Aiuto F. 2010. Is periodontal inflammation associated with raised blood pressure? Evidence from a National US survey. *J Hypertens* 28: 2386–2393.
- Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefanadis C. 2011. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 219: 1–9.
- Türkoglu Ö, Barış N, Taina Tervahartiala T, Mer Sxenarslan Ö, Sorsa T, Atilla G. 2014. Evaluation of systemic levels of neutrophilic enzymes in patients with hypertension and chronic periodontitis. *J Periodontol* 85:908–916.
- Völzke H, Schwahn C, Dörr M, Schwarz S, Robinson D, Dören M, Rettig R, Felix SB, John U, Kocher T. 2006. Gender differences in the relation between number of teeth and systolic blood pressure. *J Hypertens* 24: 1257–63.
- Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. 2017. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol* 8:910.
- Yang N, Gonzalez-Vicente A, Garvin J. 2020. Angiotensin II-induced superoxide and decreased glutathione in proximal tubules: effect of dietary fructose. *Am J Physiol Renal Physiol* 318(1): F183–F192.
- Yim HE, Yoo KH. 2008. Renin angiotensin System. Considerations for hypertension and kidney. *Electrolyte & Blood Pressure* 6:42–50.
- Zeigler C, Wondimu B, Marcus C, Mode´er T. 2015. Pathological periodontal pockets are associated with raised diastolic blood pressure in obese adolescents. *BMC Oral Health* 15:1.
- Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. 2011. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina (Kaunas)* 47(4): 193–199.

Recibido: 23/03/2021
Aceptado: 24/08/2021

Notas de los efectos sinérgicos presentes entre varias toxinas de venenos de serpientes y sus posibles mecanismos de inter-relación

Notes of the synergic effects present amid various snake venom toxins and their possible mechanisms of inter-relationship

ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA

Resumen

Sinergismo entre toxinas es un importante hallazgo que existe en los venenos de serpiente. El sinergismo ocurre entre muchas de estas toxinas, donde las fosfolipasas A_2 (PLA₂s) (toxinas enteras o sus sub-unidades) son los activadores más importantes. Entre los representantes principales de las toxinas del veneno ofídico están: las metaloproteasas (SVMPs), las fosfolipasas A_2 (PLA₂s), las serina proteasas (SVSPs), las toxinas de tres dedos (3FTxs) y las L-amino oxidasas (L-AAOs), las cuales toman parte en la mayoría de los desarrollos sinérgicos. Estos eventos se expanden por los efectos de amplificación y acompañamiento.

Palabras clave: Mecanismos sinérgicos, sinergismo, serpientes, toxinas, venenos.

Abstract

Synergism is an important occurrence existing in snake venoms. Synergism occurs amid several toxins in most snake venoms, where phospholipase A_2 (PLA₂s) (toxins or subunits) are the most important activators. The principal representatives of snake venom toxins are the PLA₂s, the metalloproteases (SVMPs), the serine proteases (SVSPs), three-finger toxins (3FTxs), and L-AAOs toxins, which take part in the main synergistic developments. These events are widespread by the effects of amplification and escorting

Keywords: Snakes, synergic mechanism, synergism, toxins, venoms.

Introducción

Los venenos de serpiente son mezclas adquiridas durante los procesos evolutivos, que cambian de acuerdo con sus relaciones intergenéticas, alimentación y variables climáticas y geográficas (Pifano y Rodríguez-Acosta, 1996; Aird, 2002; Barlow y col., 2009), las cuales consisten en moléculas bioactivas que inmovilizan y digieren presas, actuando además como defensa contra competidores y

depredadores naturales.

Los venenos de serpiente son sistemas integrados, con variedad de componentes que presentan *per se* funcionalidades relevantes. La existencia de una combinación de toxinas en estos venenos forja un desafío para el estudio del sinergismo y de otras interacciones entre ellas. La evolución de los venenos de serpientes resultado de los mecanismos de adaptación al ambiente

1. Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico "Dr. José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela.
2. Biotecfar C.A., Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, República Bolivariana de Venezuela. Correspondencia: rodriguezacosta1946@yahoo.es ORCID: [0000-0003-1234-7522](https://orcid.org/0000-0003-1234-7522)

y a sus diferentes presas, ha demostrado que existen diferentes toxinas actuando separadamente o más probablemente con mecanismos sinérgicos, para llevar a cabo sus funciones digestivas y/o de defensa.

Los efectos sinérgicos, entre diferentes toxinas, son un espacio para discutir al delinear los anti-venenos de diferentes géneros y especies. Debemos seleccionar la probable subunidad o toxina del veneno, que no posea toxicidad, pero que pueda potenciar la toxicidad de una que, sí lo sea; induciendo el efecto sinérgico, bien como transporte o como anclaje para efectuar su acción (Laustsen, 2016).

El sinergismo es un fenómeno significativo presente en los venenos de serpientes que puede ser una adaptación estratégica para potenciar la acción de unas toxinas con otras. Como primer ejemplo, tenemos las fosfolipasas A_2 (PLA_2) (toxinas o subunidades) como principales facilitadores. Siguiendo con las metaloproteasas (SVMP), las serina proteasas (SVSP) y las toxinas de los tres dedos (3FTxs), las cuales juegan un papel esencial en los procesos sinérgicos.

Esta descripción general de los efectos sinérgicos ya descubiertos en varios venenos de serpiente y sus posibles mecanismos, junto con los métodos apropiados para evaluar el sinergismo, es importante para discernir los variados efectos fisiopatológicos y además como herramienta cognitiva en el desarrollo de anti-venenos o inhibidores más eficientes.

SINERGISMO ENTRE COMPONENTES TÓXICOS DE VENENOS OFÍDICOS

Los venenos de serpientes son sistemas multicomponentes integrados (Groten y col., 2001). El aislamiento y la caracterización de

toxinas individuales ha sido la conducta de investigación, sin embargo, la caracterización de los perfiles de toxicidad del veneno mediante la evaluación de sinergismos potenciales, que puedan existir entre sus diversos componentes, debería ser la norma, ya que el efecto conjunto es mayor que la suma de sus potencias individuales, originando el concepto que se describe como sinergia (Berenbaum, 1989; Groten y col., 2001), lo cual hace que los venenos alcancen una eficiencia significativa con solo una pequeña cantidad de ellos.

Se ha demostrado también, que cuando se purifican fracciones de algunos venenos y se inyectan separadamente, éstas, a las dosis inyectadas, no son fatales para los animales experimentales, mientras que una concentración correspondiente de veneno crudo entero fue suficiente para matarlos en pocos minutos. Esto sugiere que las diferentes fracciones actuaron sinérgicamente (Strydom, 1976). Los efectos sinérgicos, también se describen en venenos arácnidos y escorpiónicos (Lazarovici y col., 1984; Wullschleger y col., 2005).

El mayor peso en la actividad de los venenos ofídicos descansa en un grupo de proteínas con actividad enzimática, pero con componentes muy activos sin dicha actividad, que actúan por activación de desarrollos fisiológicos, como proteínas nodrizas y a modo de inhibidores de otros procesos (Devi, 1968).

Dentro de fracciones con actividad enzimática, se circunscriben las fosfolipasas A_2 , metaloproteasas, serina proteasas, L-aminoácidos oxidasas, fosfodiesterasas, hialuronidasas, nucleasas y acetilcolinesterasas. Del grupo sin actividad enzimática, se incluyen toxinas de tres dedos, desintegrinas, inhibidores de serina

proteasa, proteínas secretoras ricas en cisteína y lectinas de tipo C (Brahma y col., 2015).

Durante los últimos años, ha habido un rápido aumento en el aislamiento y análisis molecular de las toxinas presentes en el veneno de serpientes. Esto ha contribuido a la comprensión y caracterización de los diversos componentes bioquímicos, actividades farmacológicas y toxicológicas de estas toxinas, así como la posible interacción entre ellas (Nawarak y col., 2003).

Las fosfolipasas A_2 (SVPLA₂), las metaloproteasas (SVMP), y las serina proteasas (SVSP) son los tres componentes enzimáticos principales de la familia de proteínas del veneno de serpiente.

Las toxinas de tres dedos (3FTxs), las desintegrinas, las lectinas de tipo C y una amplia variedad de neurotoxinas son polipéptidos no enzimáticos.

Las PLA₂ de veneno de serpiente (svPLA₂) catalizan específicamente la hidrólisis dependiente de Ca^{2+} del enlace acilo glicerofosfolípido sn-2 graso, que libera tanto lisofosfolípidos como ácidos grasos libres (Van Deenen y De Haas, 1983).

Las SVPLA₂ ejercen una impresionante variedad de efectos tóxicos y farmacológicos como componentes que actúan solos o en conjunto de forma sinérgica. Estos efectos incluyen neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemorragia, hemólisis, así como edema, convulsiones, hiperalgesia, inflamación, hipotensión, inhibición de la agregación plaquetaria y anticoagulación.

Se han descrito dos genes PLA₂ ancestrales divergentes que representan las bases de los grupos I y II. Los PLA₂ del

Grupo I fueron aisladas y expresadas en las secreciones de las glándulas de veneno de serpiente de Elapidae (kraits y cobras) e Hydrophidae (serpientes marinas) (Six y Dennis, 2000). Los PLA₂ del Grupo II existen principalmente en las familias Crotalidae (serpientes de cascabel norteamericanas) y Viperidae (Dennis y col., 2011).

Las metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMP) son las principales toxinas en los venenos de la mayoría de Crotalidae y Viperidae (Bjarnason y Fox, 1994); junto con ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa) y el ADAMTS relacionado: ADAM con motivo de trombospondina tipo 1, las SVMP constituyen la familia de reprotinas/adamalisinas con organización de dominio general compartida (Fox y Serrano, 2005).

Las SVMP son proteasas, en su mayoría dependientes de zinc que tienen masas moleculares entre ~20 y 110 kDa. Se clasifican en clases P-I a P-III según su estructura de dominio (Jia y col., 1996). Las SVMP P-I son la clase más sencilla, contienen solo un dominio de metaloproteasa (M); las SVMP P-II se componen de un dominio M y un dominio de desintegrina (D); las SVMP P-III contienen los dominios M y D más un dominio rico en cisteína (C). Hay una clase heterotrimérica de SVMP con dos lectinas de dominio tipo C adicionales (snaclec) (Clemetson, 2010; Zanotto y col., 2019), que también se incluyen en el grupo P-III como una subclase (P-III_d).

Las SVMP juegan un rol significativo en patologías relacionadas con las hemorragias locales y sistémicas, las mionecrosis, las flictenas, e incluso llevando a los pacientes a una hipovolemia y a procesos inflamatorios (Markland, 1998; Rengifo y Rodríguez-Acosta, 2019). Las SVMP, principalmente las

P-III, tienen una mayor actividad hemorrágica y mayor diversos efectos biológicos que las SVMP P-I (Bjarnason y Fox, 1994), degradando componentes que integran las membranas basales de las células endoteliales (laminina, nidógeno, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos), rompiendo drásticamente la pared del vaso y produciendo hemorragias (Baramova y col., 1989); también pueden interferir con la hemostasia a través de actividades fibrinogenolíticas o fibrinolíticas (Salazar y col., 2007; Sánchez y col., 2014), activación de protrombina y/o factor X (Morita y Iwanaga, 1981; Yamada y col., 1996) e inhibición de agregación de plaquetas (Sánchez y col., 2009; Da Silva y col., 2009; Suntravat y col., 2016).

Otro grupo de toxinas de veneno de serpiente son las serina proteasas (SVSP), estas presentan masas moleculares que oscilan entre 26 y 67 kDa, catalizan la escisión del péptido covalente en el lado C-terminal de residuos de aminoácidos cargados positivamente (Di Cera, 2009). Los SVSP están presentes en los venenos de Viperidae, Elapidae y Colubridae. Las SVSP afectan la coagulación sanguínea, inducen agregación plaquetaria, fibrinólisis, actúan sobre sistema del complemento y el sistema inmunológico (Kini, 2005). Los SVSP similares a la trombina convierten el fibrinógeno en coágulos de fibrina, liberando fibrinopéptidos A y B de las cadenas A α y B β del fibrinógeno, respectivamente. Además de la acción sobre el fibrinógeno; también participan en la estimulación de la cascada de coagulación mediante los factores de activación V, VIII y XIII (y posiblemente factor VII y XI), además, estimulan la fibrinólisis y activan la agregación plaquetaria (Castro y col., 2004; Sajevec y col., 2011).

Un diferente conjunto de importantes toxinas son las de tres dedos ("three fingers

toxins") (3FTxs), las cuales juegan un papel esencial en los procesos de sinergismo. Tanto induciendo la amplificación tóxica o sirviendo como acompañante. Las 3FTxs son polipéptidos no enzimáticos que contienen 60-74 residuos de aminoácidos (Fry y col., 2003a; Pahari y col., 2007a). Son abundantemente en los venenos de elapideos (cobras, kraits y mambas) (Fry y col., 2003a) y en Hydrophis (serpientes marinas) (Pahari y col., 2007b); también se han descrito en venenos de colúbridos (Fry y col., 2003b; Pawlak y col., 2006) y en transcriptomas de glándulas de veneno de vipéridos y crotálicos (Jiang y col., 1987; Pahari y col., 2007a, b). A pesar de la semejanza en su estructura, los 3FTx presentan distintas actividades biológicas. Los miembros de esta familia de toxinas incluyen α -neurotoxinas, κ -neurotoxinas (las más frecuentes), fasciculinas, calciseptina, toxinas muscarínicas, cardiotoxinas, citotoxinas, y dendroaspinas (Tsetlin, 1999).

Las cardiotoxinas/citotoxinas son el segundo grupo más grande de 3FTx y se encuentran abundantemente en el veneno de la mayoría de las serpientes elápidas, particularmente en las cobras (Tan, 1982), ejerciendo efectos citolíticos/hemolíticos mediante la formación de poros en las membranas lipídicas (Bilwes y col., 1994).

El índice de toxicidad es uno de los métodos cuantitativos para evaluar el sinergismo, ya que los venenos de serpientes exhiben una toxicidad considerable que puede resultar de la acumulación o los efectos sinérgicos de múltiples toxinas. Los constituyentes interactúan entre sí directamente o conducen indirectamente a una potencia toxicológica y farmacológica mejorada de los venenos. La mayoría de los sinergismos de toxinas se han identificado cuando las familias de proteínas

predominantes (PLA₂, 3FTx, SVMP y SVSP) se administraron conjuntamente. Además de estas acciones sinérgicas complejas, la interacción entre las proteínas de veneno de serpiente (principalmente complejos PLA₂) también contribuye significativamente hacia el incremento de la potencia de los componentes individuales del complejo. Esto agrega otra dimensión a la diversidad estructural y funcional de las toxinas del veneno.

A continuación, presentamos una síntesis de algunos ejemplos de acciones sinérgicas entre toxinas de veneno de serpiente, proporcionando una descripción general de algunas estrategias sinérgicas entre las toxinas, que pueden ayudar a entender los procesos fisiopatológicos y clínicos, así como dar información para permitir el desarrollo de mejores anti-venenos o inhibidores, conociendo las interacciones entre ellas.

Como vemos, ciertas proteínas forman complejos covalentes o no covalentes con otras proteínas o péptidos para inducir actividades farmacológicas más potentes. Estas interacciones sinérgicas entre la proteína del veneno y las subunidades complejas aumentan de manera posible, la potencia tóxica del veneno de serpiente, tal como la subunidad PLA₂, la cual participa en muchos complejos tóxicos, que son principalmente potentes neurotoxinas.

Entre las estrategias sinérgicas de los complejos de toxinas, los cuales existen como monómeros en el veneno, exhibiendo actividades farmacológicas por sí mismos, tal como la sub-unidad, PLA₂, la cual participa en muchos complejos de proteínas de veneno, que terminan siendo neurotoxinas muy potentes. La subunidad individual (PLA₂) contribuye

significativamente a la estructura integrada y a la función elevada de los complejos tóxicos del veneno.

La Crotoxina del veneno del cascabel (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cumanensis*) es un heterodímero formado por una fracción ácida inactiva (crotapotina), no tóxica, que al unirse a una fracción básica tóxica (PLA₂), son capaces de potenciar la neurotoxicidad, donde la crotapotina actúa como acompañante para potenciar la unión específica (Bon, 1982; Faure y col., 1993; Hernández y col., 2007). Se ha observado un sinergismo entre la crotoxina y la crotamina, un polipéptido miotóxico con propiedades de penetración celular (Sánchez y col., 2018), que puede facilitar la internalización (Sribar y col., 2014) de las subunidades B del complejo de crotoxina y así potenciar su toxicidad neuronal.

La β-Bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*), también heterodimérica, con un componente tóxico (PLA₂) unido a un péptido similar a BPTI2, donde el péptido similar a BPTI ayuda a la PLA₂ a unirse al sitio pre-sináptico y potencia la neurotoxicidad (Kondo y col., 1978). Las β-bungarotoxinas, que se comportan como neurotoxinas presinápticas, se sinergizan con α-bungarotoxina y κ-bungarotoxina (3FTxs) post-sinápticas para bloquear la transmisión neuromuscular y producir insuficiencia respiratoria después de un envenenamiento letal por kraits (Ziganshin y col., 2015).

La toxina del cascabel Mojave (*Crotalus s. scutulatus*), otro heterodímero con un componente ácido inactivo (PLA₂) no tóxico, unido a un elemento tóxico básico activo (PLA₂), que potencian la neurotoxicidad y la miotoxicidad sistémica, donde el

componente ácido inactivo actúa como acompañante (Cate y Bieber, 1978).

La viperotoxina F (*Vipera russelli formosensis*), un heterodímero formado por una fracción ácida (PLA₂) no tóxica de baja actividad y una básica tóxica activa (PLA₂), las cuales juntas potencian la neurotoxicidad, donde la fracción ácida actúa como inhibidor y acompañante (Perbandt y col., 2003).

La proteína CB aislada del veneno de la serpiente *Pseudocerastes fieldi*, un heterodímero integrado por una fracción ácida (PLA₂), activa no tóxica y una básica (PLA₂), activa, poco tóxica, que juntas aumentan alrededor de 4 veces la neurotoxicidad, donde la fracción básica actúa como acompañante, aumentando la unión específica (Bdolah y col., 1985).

La fosfolipasa PLA₂-I aislada del veneno de la víbora *Vipera aspis zinnikeri* es un heterodímero, con una fracción ácida (PLA₂) inactiva y no tóxica, unida a una proteína básica tóxica y activa, que potencian la neurotoxicidad; la subunidad inactiva actúa como acompañante (Komori y col., 1996).

La toxina taipoxin derivada del veneno de la serpiente *Oxyuranus s. scutellatus* es un trímero con un componente α -PLA₂ básico muy tóxico, unido a otro componente β -PLA₂ no tóxico y un tercer componente de baja toxicidad γ -PLA₂. Después de unidas todas las sub-unidades hay una máxima neurotoxicidad, donde la subunidad γ actúa como acompañante para potenciar la toxicidad de la subunidad α (Fohlman y col., 1977).

Últimamente, autores (Venkatesh y Gowda, 2013) han reconocido e identificado en el veneno de la serpiente *Daboia russelii*,

un complejo hemorrágico (DR-HC-I) que contenía una PLA₂ y un péptido no enzimático (DNTx-II). Aisladamente, PLA₂ y DNTx-II no producían efectos hemorrágicos, mientras que la combinación produjo una interacción sinérgica, que generó una intensa hemorragia. La DNTx-II tenía una función de chaperona, que le permitía a las fosfolipasas, adherirse selectivamente a la membrana.

La paradoxina aislada del veneno de *Oxyuranus microlepidotus* (Hodgson y col., 2007) y Cannitoxina aislada del veneno de *Oxyuranus scutellatus canni* (Kuruppu y col., 2005) son homólogos de taipoxina. Estructuralmente, tienen subunidades similares y funcionalmente, sus subunidades tienen el mismo mecanismo sinérgico.

La vipoxina es un complejo neurotóxico post-sináptico heterodimérico aislado del veneno de *Vipera ammodytes meridionalis* (serpiente búlgara) (Tchorbanov y col., 1978). Tiene un efecto catalítico, no tóxico en su sub-unidad ácida inerte (INH) que provoca una disminución de 5 veces, en los efectos letales de la PLA₂ de su sub-unidad fuertemente tóxica. La subunidad PLA₂ tiene acción pre-sináptica, pero, cuando se combina con INH, este complejo es "encaminado" al sitio post-sináptico.

Existen variados sinergismos relacionados con svPLA₂s; para los venenos hemorrágicos, las PLA₂ con acción anti-plaquetaria pueden sinergizar con desintegrinas y diversas proteínas de unión de tipo lectina C, que inducen trombocitopenia (Niewiarowski y col., 1994). Las PLA₂ altamente catalíticas liberan lisofosfolípidos, que podrían afectar la membrana y activar la agregación plaquetaria.

Las PLA₂ también se interrelacionan con las L-aminoácidos oxidasas (LAAOs), las cuales comprenden del 1 al 9% de la proteína total del veneno de las familias de serpiente de Viperidae, Crotalidae y Elapidae (Pineda y Rodríguez-Acosta, 2020), generando H₂O₂ para provocar intensos efectos antiplaquetarios y sinergizar con anti-plaquetarios PLA₂ en el mismo veneno (Izidoro y col., 2006).

En el análisis de los complejos sinérgicos 3FTxs, también se han descrito efectos sinérgicos similares. En un anticoagulante aislado y caracterizado del veneno de *Hemachatus haemachatus* (cobra africana de Ringhals), la cual contiene dos anticoagulantes sinérgicos de la familia 3FTx, las proteínas, hemextina A y hemextina B. Solo la hemextina A individualmente exhibió leve actividad anticoagulante. Sin embargo, la hemextina B forma un complejo heterotetramérico 1: 1 con la hemextina A, y mejora sinérgicamente la potencia anticoagulante de la hemextina A; también inhibiendo de forma enérgica la actividad proteolítica del factor de coagulación sanguínea VIIa, sobre el factor tisular soluble recién expuesto, en ausencia de factor Xa (Banerjee y col., 2005; Banerjee y col., 2007).

Algunas 3FTx de veneno de serpiente mamba potencian la toxicidad de otras toxinas. Por ejemplo, S2C4 aislado del veneno de *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (mamba de Jameson) interactúa con toxinas de tipo angusticeps para producir un efecto sinérgico marcado, que supera en exceso las toxicidades individuales (Joubert y Taljaard, 1979). La base molecular exacta de los sinergismos y si estas toxinas interactúan entre sí para formar un complejo proteico dentro del veneno, que aún no se conoce con exactitud.

En el estudio de los complejos sinérgicos de las SVMP, solo algunas de clase P-III (P-IIIId) forman complejos, ya que tienen un sub-unidad covalente o no covalente. Uno de estos complejos, RVV-X, tiene sub-unidades adicionales, compuesta por dos dominios lectina de tipo C, unidas a la cadena principal de proteasa, por puentes disulfuro, que activa el factor X aislado del veneno de la víbora de Russell (Jayanthi y Gowda, 1990); TI-I y TI-II son dos inhibidores de tripsina del mismo veneno. Estas tres toxinas administradas individualmente, no fueron letales para los animales experimentales. Sin embargo, cuando se mezclaron, TI-II y RVV-X, estas se sinergizaron y potenciaron la toxicidad de la otra. Concretamente, la actividad inductora de edema de RVV-X aumentó notablemente en presencia de dosis de TI-I y TI-II, las cuales individualmente no inducían edema (Jayanthi y Gowda, 1990).

Se ha descrito una toxina snacles no enzimática (Lectina tipo C) en el veneno del cascabel de Uraoa (*Crotalus vegrandis*) con actividad coagulante. La proteína purificada (uracolectin) con las secuencias N-terminal DLPSGWSSYEGH y DGPSGWSSYEGH se relacionaban con lectinas de tipo C con actividad coagulante, aisladas del veneno de serpientes *Crotalus oreganus helleri*, *C. adamanteus rattlesnakes* y *Habu Protrobothrops flavoviridis* (Girón y col., 2020). Estas subunidades lectina tipo C, no enzimáticas imparten propiedades distintas, actuando junto con enzimas proteolíticas; en consecuencia, desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento y la selectividad del sustrato, lo que permite que la proteasa acompañante ejerza su actividad proteolítica (Kini, 1996). Estas proteínas coagulantes forman una combinación de metaloproteasa-lectina que se une a la

protrombina o al factor X de coagulación (Girón y col., 2020).

Finalmente, existe un elevado número de métodos cuantitativos para evaluar el sinergismo de toxinas. La presencia de sinergismo entre las toxinas del veneno generalmente se evalúa determinando si la administración concomitante de diferentes componentes de veneno crudo, que aumentan significativamente la potencia letal, o los efectos patológicos de las toxinas individuales *in vitro* o *in vivo*. El uso de tecnologías proteómicas y transcriptómicas ha permitido una determinación general de la presencia de sinergismo entre venenos de serpientes mediante el índice de toxicidad.

En conclusión, las toxinas de los venenos de serpiente no son moléculas ubicadas en espacios estancos, sino que necesitan acompañantes para ejercer la mayoría de sus funciones tóxicas.

Referencias bibliográficas

- Aird SD. 2002. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 40(4): 335–393.
- Banerjee Y, Mizuguchi J, Iwanaga S, Kini RM. 2005. Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringers cobra) venom that inhibits clot initiation and factors VIIa activity. *J Biol Chem* 280(52): 42601–42611.
- Banerjee Y, Lakshminarayanan R, Vivekanandan S, Anand GS, Valiyaveetil S, Kini RM. 2007. Biophysical characterization of anticoagulant hemextin AB complex from the venom of snake *Hemachatus haemachatus*. *Biophys J* 93(11): 3963–3976.
- Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys* 275(1): 63–71.
- Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wuster W. 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc Biol Sci* 276(1666): 2443–2449.
- Bdolah A, Kinamon S, Batzri-Izraeli R. 1985. The neurotoxic complex from the venom of *Pseudocerastes fieldi*. Contribution of the nontoxic subunit. *Biochem Int* 11(4): 627–636.
- Berenbaum MC. 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev* 41(2): 93–141.
- Bilwes A, Rees B, Moras D, Menez R, Menez A. 1994. X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J Mol Biol* 239(1): 122–136.
- Bjarnason JB, Fox JW. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Therap* 62(3): 325–372.
- Bon C. 1982. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 20(1): 105–109.
- Brahma RK, McCleary RJR, Kini RM, Doley R. 2015. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon* 93: 1–10.
- Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci* 61(7): 843–856.
- Cate RL, Bieber AL. 1978. Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) toxin and its subunits. *Arch Biochem Biophys* 189(2): 397–408.
- Clemetson KJ. 2010. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon* 56:1236–1246.
- Da Silva M, Lucena S, Aguilar I, Rodríguez-Acosta A, Salazar AM, Sánchez EE, Girón M E, Arocha-Piñango CL, Guerrero B. 2009. Anti-platelet effect of cumanastatin 1, a disintegrin isolated from South American *Crotalus rattlesnake*. *Thromb Res* 123:731–739.
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. 2011. Phospholipase A(2) Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev* 111(10): 6130–6185.
- Devi A. 1968. The protein and non-protein constituents of snake venoms: Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous vertebrates. Bucherl W, Buckley EE, Deulofen V (Eds). Academic Press, New York, 119–160.

- Di Cera E. 2009. Serine Proteases. IUBMB life 61(5): 510–515.
- Faure G, Harvey AL, Thomson E, Saliou B, Radvanyi F, Bon C. 1993. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. Eur J Biochem 214(2): 491–496.
- Fohlman J, Lind P, Eaker D. 1977. Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. FEBS Letters 84(2): 367–371.
- Fox JW, Serrano SMT. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon 45(8): 969–985.
- Fry BG, Wuster W, Kini RM, Brusica V, Khan A, Venkataraman D, Rooney AP. 2003a. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. J Mol Evol 57(1): 110–129.
- Fry BG, Lumsden NG, Wuster W, Wickramaratna JC, Hodgson WC, Kini RM. 2003b. Isolation of a neurotoxin (alpha-colubritoxin) from a nonvenomous colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. J Mol Evol 57(4): 446–452.
- Girón ME, Ramos MI, Cantillo AC, Oramas JA, Sánchez EE, Jiménez JC, Suntravat M, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2020. Haemostatic and biological activities of the uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*) venom: isolation of a new snake-like uracolectin with coagulant activity. SABER UDO 32:22–33.
- Groten JP, Feron VJ, Suhnel J. 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. Trends Pharmacol Sci 22(6): 316–322.
- Hernández M, Scannone H, Finol HJ, Pineda ME, Fernández I, Vargas AM, Girón ME, Aguilar I, Rodríguez-Acosta A. 2007. Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. Exp Toxicol Pathol 59(2):129–137.
- Hodgson WC, Dal Belo CA, Rowan EG. 2007. The neuromuscular activity of paradoxin: a presynaptic neurotoxin from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*). Neuropharmacol 52(5): 1229–1236.
- Izidoro LFM, Ribeiro MC, Souza GRL, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Goulart L.R, Belebóni RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med Chem 14(20): 7034–7043.
- Jayanthi GP, Gowda TV. 1990. Synergistic interaction of a protease and protease inhibitors from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. Toxicon 28(1): 65–74.
- Jia LG, Shimokawa K, Bjarnason JB, Fox JW. 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function, and relationship to the ADAMs family of proteins. Toxicon 34(11-12): 1269–1276.
- Jiang M, Haggblad J, Heilbronn E. 1987. Isolation and pharmacological characterization of a new alpha-neurotoxin (alpha-AgTx) from venom of the viper *Agkistrodon halys* (Pallas). Toxicon 25(9): 1019–1022.
- Joubert FJ, Taljaard N. 1979. Snake venoms. The amino-acid sequence of protein S2C4 from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (Jameson's mamba) venom. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiol Chem 360(4): 571–580.
- Kini RM. 1996. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? Toxicon 34(11-12):1287–1294.
- Kini RM. 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. Pathophysiol Haemost Thromb 34(4-5): 200-204.
- Komori Y, Masuda K, Nikai T, Sugihara H. 1996. Complete primary structure of the subunits of heterodimeric phospholipase A2 from *Vipera a. zinnikeri* venom. Arch Biochem Biophys 327(2): 303–307.
- Kondo K, Toda H, Narita K. 1978. Characterization of phospholipase A activity of beta1-bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom. Its enzymatic properties and modification with p-bromophenacyl bromide. J Biochem 84(5): 1291–1300.
- Kuruppu S, Reeve S, Banerjee Y, Kini RM, Smith AI, Hodgson WC. 2005. Isolation and pharmacological characterization of cannitoxin, a presynaptic neurotoxin from the venom of the Papuan Taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). J Pharmacol Exp Therap 315(3): 1196–1202.
- Laustsen AH. 2016. Toxin synergism in snake venoms. Toxin Rev 35(3-4): 165–170.
- Lazarovici P, Menashe M, Zlotkin E. 1984. Toxicity to crustacea due to polypeptide-phospholipase interaction in the venom of a chactoid scorpion.

- Arch Biochem Biophys 229(1): 270–286.
- Markland FS. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36(12):1749–1800.
- Morita T, Iwanaga S. 1981. Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 303–311.
- Nawarak J, Sinchaikul S, Wu CY, Liao MY, Phutrakul S, Chen ST. 2003. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 24(16): 2838–2854.
- Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. 1994. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Sem Hematol* 31(4): 289–300.
- Pahari S, Bickford D, Fry BG, Kini RM. 2007a. Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A2 genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalyptophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. *BMC Evol Biol* 7: 175.
- Pahari S, Mackessy SP, Kini RM. 2007b. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol Biol* 8: 115.
- Pawlak J, Mackessy SP, Fry BG, Bhatia M, Mourier G, Fruchart-Gaillard C, Servent D, Menez R, Stura E, Menez A, Kini RM. 2006. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. *J Biol Chem* 281(39): 29030–29041.
- Perbandt M, Tsai IH, Fuchs A, Banumathi S, Rajashankar KR, Georgieva D, Kalkura N, Singh TP, Genov N, Betzel C. 2003. Structure of the heterodimeric neurotoxic complex viperotoxin F (RV-4/RV-7) from the venom of *Vipera russelli formosensis* at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 10): 1679–1687.
- Pifano F, Rodríguez-Acosta A. 1996. Ecological Niche and redescription of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Crotalidae) in Venezuela. *BRENESIA* 45–46: 169–175.
- Pineda ME, Rodríguez-Acosta A. 2020. The report of some basic L-amino-acid oxidases peptides isolated from the Neotropical Lansberg's hognose viper (*Porthidium lansbergii hutmanni* snake venom from Margarita Island (Venezuela). *Saber UDO* 32:213–221.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A. *Serpientes, Veneno y Tratamiento Médico en Venezuela*. Caracas: Universidad Central de Venezuela. 2019.
- Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57(5): 627–45.
- Salazar AM, Rodríguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thromb Res* 120:95–104.
- Sánchez EE, Gonzalez R, Lucena S, Garcia S, Finol HJ, Suntravat M, Girón ME, Fernandez I, Rodríguez-Acosta A. 2018. Crotonamine-like from Southern Pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*) venom acts on human leukemia (K-562) cell lines and produces ultrastructural changes on mice adrenal gland. *Ultrast Pathol* 42(2): 116–123.
- Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena S, Bashir S, Soto JG, Pérez JC. 2009. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch Toxicol* 83(3):271–279.
- Sánchez EE, Girón ME, Uzcátegui NL, Guerrero B, Saucedo M, Cuevas E, Rodríguez-Acosta A. 2014. Biochemical and biological characterisation of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range. *Bol Malariol Sal Amb* 54: 138–149.
- Six DA, Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lip* 1488(1–2): 1–19.
- Sribar J, Oberckal J, Krizaj I. 2014. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update. *Toxicon* 89(1): 9–16.
- Strydom DJ. 1976. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Eur J Biochem* 69(1):169–176.
- Suntravat M, Helmke TJ, Atpaisit C, Cuevas E, Lucena SE, Uzcátegui NL, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A. 2016. Expression, purification, and

- analysis of three recombinant ECD-disintegrins (colombistatins), from a P-III class snake venom metalloproteinase containing disintegrin-like domains, which in effect inhibit platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Toxicon* 122(1): 43–49.
- Tan NH. 1982. Cardiotoxins from the venom of Malayan Cobra (*Naja naja sputatrix*). *Arch Biochem Biophys* 218(1): 51–58.
- Tchorbanov B, Grishin E, Aleksiev B, Ovchinnikov Y. 1978. A neurotoxic complex from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) and a partial amino acid sequence of the toxic phospholipase A₂. *Toxicon* 16(1): 37–44.
- Tsetlin V. 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* 264(2): 281–286.
- Van Deenen LLM, De Haas GH. 1963. The substrate specificity of phospholipase A. *Biochim Biophys Acta* 1963. 70(Sup C): 538–553.
- Venkatesh M, Gowda V. 2013. Synergistically acting PLA₂: Peptide hemorrhagic complex from *Daboia russelii* venom. *Toxicon* 73(2): 111–120.
- Wullschlegel B, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. 2005. Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in *Cupiennius salei*. *J Exp Biol* 208(11): 2115–2121.
- Yamada D, Sekiya F, Morita T. 1996. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. *J Biol Chem* 271(9): 5200–5207.
- Zanotty Y, Álvarez M, Perdomo L, Sánchez EE, Girón ME, Suntravat M, Montero Y, Medina R, Navarrete L F, Rodríguez-Acosta A. 2019. Mutacytin-1, a New C-Type Lectin-Like Protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) Snake Venom Inducing Cardiotoxicity in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Zebrafish* 16(4): 379–387.
- Ziganshin RH, Kovalchuk SI, Arapidi GP, Starkov VG, Hoang AN, Thi Nguyen TT, Nguyen KC, Shoibonov BB, Tsetlin VI, Utkin YN. 2015. Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in *Bungarus multicinctus* and phospholipases A₂ in *Bungarus fasciatus*. *Toxicon* 107(Part B): 197–209.

Recibido: 29/03/2021
Aceptado: 19/04/2021

Analysis of the acid and neutral fractions present in *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Análisis de las fracciones ácida y neutra presentes en *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) por Cromatografía de Gases-Espectrometría de masa

YSBELIA M OBREGÓN*, LUIS B ROJAS[†]*, ROSA L APARICIO^{**}, ALFREDO USUBILLAGA

Abstract

The genus *Carramboa* (family Asteraceae) comprises seven species, among which is the *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) (Cuatrec.), species endemic to the Andean paramos. In this paper we prepared an extract of n-hexane: diethyl ether (3:1) from dried leaves of the plant then followed a march acid-base, yielding two fractions: an acid, which was methylated, and one neutral. Both were analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. The identification was made by comparison with authentic standards and with the use of databases Wiley (6th Edition), Nist 05, and Adams. Compounds identified were: *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (11.16 %), *ent*-kauran-19-oic acid (9.18 %) and *ent*-15 α -hydroxy-16-en-kaur-19-oic acid (17.03 %) of the acid fraction and *ent*-kaur-16-en-19-ol (2.63 %), *epi*-ruilopeziol (5.19 %) and 16 β -kaurano (14.47 %) respectively the neutral fraction. These identified compounds are derivatives of *ent*-kaurene and are frequently found in species belonging to the sub-tribe Espeletiinae. This is the first phytochemical report for *Carramboa tachirensis* and the genus *Carramboa*.

Keywords: Asteraceae, *Carramboa tachirensis*, kaurenics acids, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Resumen

El género *Carramboa* (familia Asteraceae) comprende siete especies, dentro de las cuales se encuentra la *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) (Cuatrec.), especie endémica de los páramos andinos. En el presente trabajo se preparó un extracto de n-hexano:éter dietílico (3:1) a partir de hojas secas de la planta, posteriormente se siguió una marcha ácido-base, obteniéndose dos fracciones: una ácida, la cual fue metilada, y otra neutra. Ambas fueron analizadas por Cromatografía de Gases-Espectrometría de masa. La identificación se realizó mediante el empleo de las bases de datos Wiley (6^a Edición), Nist 05 y Adams. Los compuestos detectados fueron: ácido *ent* kaur-16-eno-19-oico (11,16 %), ácido *ent*-kaurano-19-oico (9,18%) y ácido *ent*-15 α -hidroxi-16-eno-kaur-19-oico (17,03 %) de la fracción ácida y también *ent*-kaur-16-eno-19-ol (2,63 %), *epi*-ruilopeziol (5,19 %) y 16 β -kaurano (14,47 %) de la fracción neutra. Estos compuestos identificados son derivados del *ent*-kaureno siendo encontrados en especies pertenecientes a la sub-tribu Espeletiinae. Este es el primer reporte fitoquímico para *Carramboa tachirensis* y del género *Carramboa*.

Palabras clave: Asteraceae, *Carramboa tachirensis*, ácidos kaurénicos, Cromatografía de Gases-Espectrometría de masa.

Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Correspondencia: apariciorosa12@gmail.com

ORCID: *0000-0001-6152-6696; **0000-0003-4508-1927; ***0000-0002-5020-0954

DOI: [10.54305/RFFUCV.2021.84.1-2.11](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2021.84.1-2.11)

Introduction

Asteraceae or Compositae belong to the subclass Asteridae, Asterales order, which contains only this family, according to the classification system of Cronquist (1981) (Badillo, 1997). More recently, APG (2003) keeps Asteraceae in order Asterales but accompanied by ten families. It is one of the dominant taxa in the flora of Venezuela and consists of herbaceous species, shrubs, and climbers. The number of species increases progressively in the tropics, especially in high-altitude mountain sites and few representatives in lowlands forest formations (Nagashima et al., 2003). According to Llamozas et al. (2003), represents the family Asteraceae taxon angiosperm third highest number of species in Venezuela (805). All these species are included in 13 tribes and the largest in the Heliantheae, which includes herbs, shrubs, and small trees in a total of 72 genera (Badillo, 1997). Some of the unique genus of high Andean mountains and moors are *Carramboa*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamnus*, *Ruilopezia*, *Paramiflos* and *Tamania*. The genus *Carramboa* (family Asteraceae), formerly belong to *Espeletias*, was created by Cuatrecasas (1976) and comprises 7 species, among which is the *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Aristeguieta, 2003), endemic to the Andean highlands and outside the sub-tribe Espeletiinae, this genus, regarded as a relatively primitive, usually unbranched trunk has alternate leaves clustered at the ends of branches and flowers in various shades of yellow (Cuatrecasas, 1976, 2013). The presence of taxa within the genus with leaves of varying size and shape, and the remarkable polymorphism chapters, suggested the

possibility of hybrid populations, based on studies by Morillo and Briceño in 2007, verified the taxonomics status of that *C. tachirensis*, which is a hybrid taxon between *Carramboa pittieri* (Cuatrec.) Cuatrec. and *Ruilopezia marcescens* (Blake) Cuatrec. In the study of the essential oil the leaves the *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec., a total of 38 components were identified, with the main components germacreno-D (44.4 %), trans- β -guaiene (8.0 %), E- γ -bisabolene (3.2 %), β -caryophyllene (3.0 %), α -pinene (2.3 %), α -copaene (2.2 %) and *ent*-kaur-16-en-19-al (6.6 %) (Obregón-Díaz et al., 2015). The volatile components of parental species, *Carramboa pittieri* were analyzed and were detected some monoterpenes, sesquiterpenes, and the *ent*-kaur-16-en-19-al and *ent*-kaur-16-en-19-ol (Rojas et al., 2008). The oil of this *C. tachirensis* hybrid has a greater similarity in its composition to that of oil *C. pittieri* (Cuatrec.) Cuatrec. It is worth mentioning that phytochemical studies of other genera belonging to the Espeletiinae subtribe have been reported (Peña et al., 2012; Aparicio et al., 2013; Morillo et al., 2017). Various biological activities have been described for *ent*-kaurene diterpenes and their derivatives such as plant growth regulators, antimicrobial, antiparasitic and insects, cytotoxic, antitumoral, anti-HIV, androgenic, anti-fertility, as well as hypotensive activity, analgesic, and anti-inflammatory, among others (Ghisalberti, 1997; Cordero et al., 2017; Ríos et al., 2017; Cordero et al., 2021). Some of these compounds are polyhydric and most of them were found cytotoxic activity against several cancer cell lines (Bruno-Colmenarez et al., 2011). This is the first phytochemical report for *Carramboa tachirensis* and the genus *Carramboa*.

Materials and methods

PLANT MATERIAL

Leaves of *C. tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec., were collected in Paramo Batallón on the way to Pregonero, at 2800 m of altitude. A Voucher specimen (Morillo y Rojas 13520) was deposited at the MERF Herbarium and identified by Professor Gilberto Morillo, Faculty of Forestry and Environmental Sciences of the University of Los Andes.

OBTAINING EXTRACT N-HEXANE: ETHER

Fresh leaves of *C. tachirensis* were dried in the oven at 35 °C for 3 days; from ground dried material (689.95 g) underwent removal of n-hexane: diethyl ether (3:1) (J.T.Baker®, Riedel-de Haën®) at room temperature for 4 days. The crude extract was concentrated to dryness to give a solid residue of 34.45 g.

ISOLATION KAURENICS ACIDS

A 34.45 g of the crude extract was dissolved in a mixture of n-hexane-diethyl ether (3:1), stirred with a 5 % solution of NaOH (JT Baker®). The resulting aqueous phase was acidified with concentrated HCl (Riedel-de Haën®) to pH 3 and stirred with n-hexane-diethyl ether (3:1) to give 0.7395 g of the acid fraction. Moreover, the neutral fraction obtained was decolorized by boiling with activated charcoal in hexane and subsequently purified through a silica gel column to afford 8.559 g of solid material.

ANALYSIS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Methylation of the acid fraction

A small portion (10 mg) of the acid reaction was subjected to methylation with

diazomethane generated in situ in ethereal solution and subsequently analyzed by GC-MS using Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph fitted with an HP 5973 mass detector was used. A 30 m long (0.25 mm d.i. and 0.25 μ m film) HP-5MS capillary column was used. The ionization energy was 70 eV, the analysis mass range was 40:500 amu at 3.9 scans/s. The program using a Hewlett-Packard ALS injector, applying a 30:1 split ratio. Helium at 0.9 mL/min was used as carrier gas. The following temperature program was used: initial temperature 100 °C, which was increased at 10 °C/min to 200 °C. A second temperature increase of 8 °C/min was applied to a final temperature of 300 °C to obtain a total analysis time of 30 min. The identification was made by comparison with authentic standards and the use of databases Wiley (6th Edition), NIST 05 and Adams (2007). Furthermore, a comparison of retention times and mass spectra of each of the components with existing patterns in the Research Institute of the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, University of Los Andes.

Results and discussion

The GC-MS analysis of the acid fraction methylated with diazomethane allowed the identification of various kaurenics acids present in the resin *C. tachirensis*. The retention times and the relative abundance of the methyl esters of kaurenics acids identified can be seen in Table I, and their respective structures are shown in Figure 1. Kaurene type diterpenes: *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid (grandiflorénic acid, 4) *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenic acid, 5), *ent*-kauran-16-hydroxy-19-oic acid (6), *ent*-kauran-19-oic acid (7), *ent*-kaur-15 α -hydroxy-16-en-19-oic acid (grandiflorólic acid, 8), *ent*-kaur-15-oxo-16-en-19-oic acid (9), *ent*-kaur-17-

hidroxy-15-en-19-oic acid (10), *ent*-kaur-15 α -*O*-acetoxo-16-en-19-oic acid (11), *ent*-kaur-15-*O*-isobutiloxy-16-en-19-oic acid (12) and *ent*-kaur-15 α -isovalerioxy-16-en-19-oic acid (13) represent the main component of the acidic fraction (63.74% of the same, Table I) and all of them have been reported in several species of the genera *Espeletia*, *Coespeletia*, *Libanothamus* and *Ruilopezia* the subtribe Espeletiinae (Usubillaga and Capra, 1988; Usubillaga et al., 2001; Usubillaga et al., 2003; Meccia et al., 2010; Peña et al., 2012; Aparicio et al., 2013), for that reason are considered important as ethnobotanical markers in different types of frailejones.

The percentage of abundance resulting of acids found in the leaves of *C. tachirensis* was kaurenic acid (11.16 %), *ent*-kauran-19-oic acid (9.18 %), and acid *ent*-15 α -hydroxy-16-en-kaur-19-oic acid (17.03%). These results are consistent with those reported by Morillo et al. (2017), although in different concentrations, they are reported to be in

the presence of *ent*-kaur-15 α -hydroxy-16-en-19-oic acid as the main component (29.3%), as well as *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (17.0%). For both investigations, the conditions of the chromatographic program were similar which allowed us to compare the results obtained. It is important to mention that kaurenic acid has various biological properties such as anti-inflammatory, antipyretic, antibacterial, cytotoxic, and antiparasitic (Ghisalberti, 1997; Cordero et al., 2012; Ríos et al., 2017; Cordero et al., 2021), this compound also known as grandiflorólic acid was first isolated from *Espeletia grandiflora*, an Espeletiinae of Colombia (Nagashima et al., 2003; Bruno et al., 2011). The remaining 36.26 % of this fraction corresponds to other acidic substances minority, possibly derived from *ent*-kaurene that has not been identified.

From the extract of leaves, neutral fractions were identified by GC-MS. The *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol) with an

Table I
Kaurénics acids present in the acid fraction of *C. tachirensis* analyzed as methyl esters

Nº	Compounds	Time (min.)	Area (%)
1	Hexadecanoic acid methyl ester	12.69	2.34
2	Hexadecanoic acid ethyl ester	13.42	0.98
3	Octadecanoic acid methyl ester	14.85	0.95
4	<i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-oic acid methyl ester	15.97	1.89
5	<i>ent</i>-kaur-16-en-19-oic acid methyl ester	16.94	11.16
6	<i>ent</i> -kauran-16 α -hydroxy-19-oic acid methyl ester	18.90	2.64
7	<i>ent</i>-kauran-19-oic acid methyl ester	19.00	9.18
8	<i>ent</i>-kaur-15α-hydroxy-16-en-19-oic acid methyl ester	19.26	17.03
9	<i>ent</i> -kaur-15-oxo-16-en-19-oic acid methyl ester	19.50	5.01
10	<i>ent</i> -kauran-17-hydroxy-15-en-19-oic acid methyl ester	19.62	3.80
11	<i>ent</i> -kaur-15 α - <i>O</i> -acetoxo-16-en-19-oic acid methyl ester	20.84	0.90
12	<i>ent</i> -kaur-15 α - <i>O</i> -isobutiloxy-16-en-19-oic acid methyl ester	21.15	2.27
13	<i>ent</i> -kaur-15 α -isovalerioxy-16-en-19-oic acid methyl ester	22.04	5.59
Total			63.74

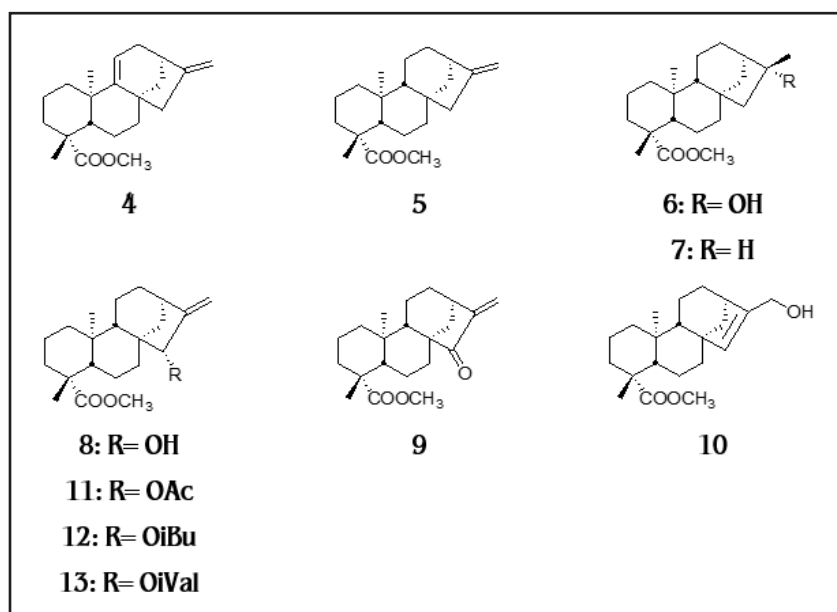


Figure 1. Structures of kaurenics acids identified in the resin acid fraction of *C. tachirensis*.

abundance of 2.63%, ruilopeziol (2.30%), *epi*-ruilopeziol (5.19%), 16 β -kaurano (14.47%) and 16 α -kaurane (2.78 %) respectively, (Figure 2) while 3.83 % is presumed to correspond to a small amount of diterpenes of the *ent*-kaurene series unidentified as shown in Table II. These compounds are derivatives of *ent*-kaurene and are frequently found in species belonging to the subtribe Espeletiinae (Cuatrecasas, 1976).

Regarding the compounds identified in the neutral fraction, the diterpene *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, 8) is important because from this compound have been obtained several semisynthetic derivatives to target new active substances; as in the work of Batista et al. (2007), they modified this diterpene and get derivatives biologically active against trypanosomastigotes the *Trypanosoma cruzi*. Additionally, Hueso-Falc3n et

al. (2011) and R3os et al. (2017) get new derivatives from kaurene with anti-inflammatory activity.

Conclusions

This research is, to our knowledge, the first report made phytochemical to *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec., and it was shown that, like many other species of the subtribe Espeletiinae (family Asteraceae), the leaves mainly produce diterpenes kaurene type.

The acidic fraction analysis allowed the identification of ten major acid series *ent*-kaur-19-oic (corresponding to 59.47% of total); additionally, in the neutral fraction was found significant percentage alcohols as 16 β -kauranol, *epi*-ruilopeziol, 16 α -kaurane, and *ent*-kaur-16-en-19-ol. The analysis of the methyl esters by GC-MS showed *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (11.16%) and *ent*-kaur-15 α -hydroxy-16-en-19-oic acid

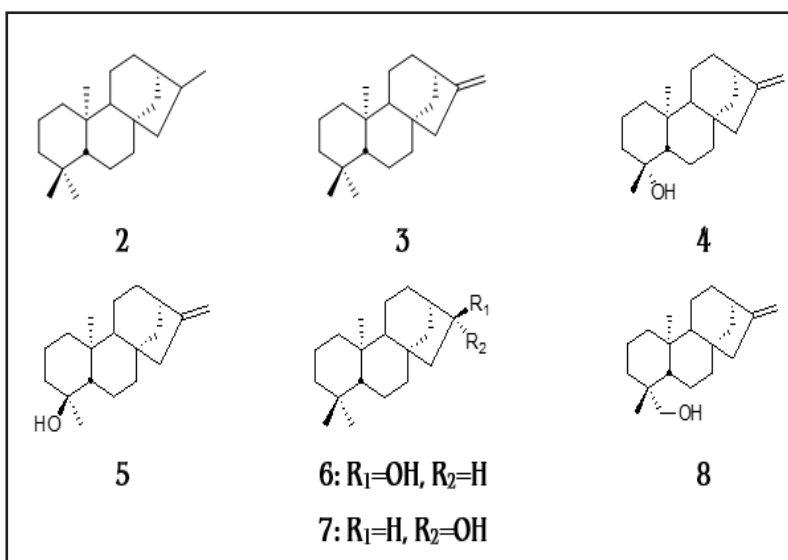


Figure 2. Structures of kaurenics identified in the extract of leaves neutral fraction of *C. tachirensis*.

Table II
Components identified in the resins neutral fraction
obtained *C. tachirensis*

Nº	Compounds	Time (min.)	Area (%)
1	Pentadecanoic acid methyl ester	3.93	0.78
2	Kaurane	4.62	1.29
3	Kaur-16-ene	5.11	1.04
4	ruilopeziol	5.76	2.30
5	<i>epi</i> -ruilopeziol	6.03	5.19
6	16β-Kauranol	6.44	14.47
7	16 α -Kauranol	6.62	2.78
8	<i>Ent</i> -kaur-16-en-19-ol	7.26	2.63
9	Pentacosano (C25)	7.77	0.90
10	Heptacosane (C27)	9.20	30.42
11	Octacosane (C28)	9.88	1.98
12	Nonacosane (C29)	10.59	24.48
13	Triacotane (C30)	11.36	1.49
14	Hentriacotane (C31)	12.27	6.42
Total			96.17

(17.03%) are the most abundant acids in this species, while *ent*-kaur-19-oic acid was found to be the third in abundance, with 9.18 %. Special interest has the *ent*-kaur-15 α -hydroxy-16-en-19-oic acid compound, because of this acid is obtained 15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a substance which induces apoptosis of epithelial cells of prostate cancer (Ruiz et al., 2008) and is generally low in most of the species examined phytochemical frailejón in our laboratory. The *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid was obtained first by hemisynthesis by Cannon et al. (1966) and later isolated as a natural compound *Xylopiá acutiflora* species by Hasan et al. (1982), but their production is not available from natural sources (Aparicio et al., 2007, 2013).

Importantly, as shown in the results tables a percentage of approximately

36.26% in the acidic fraction and 3.83% in the neutral fraction, was not possible to identify, because there is no pattern matching on the computer. To elucidate and identify the major structures of the compounds reported, it is necessary to isolate a more significant amount of each extract and analyze these compounds by the technique of nuclear magnetic resonance spectroscopic studies, which were not possible in this investigation due to the small amount of sample collected.

Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support of Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico-ULA (CDCHT-Mérida-Venezuela, project FA-578-15-08-A), and Professor Gilberto Morillo, School of Forestry and Environmental Sciences of the University of Los Andes for the identification of the botanical material.

References

- Adams RP. 2007. Identifications of essential oil components by Gas Chromatography-Mass Spectrometer, ed 4.1. Biology Department. Baylor University. Pp 1-809.
- Aparicio RL, Bahsas AH, Usubillaga del Hierro A. 2007. Allylic oxidation of *ent*-kaurenic acid, *ent*-kaurenic acid methyl ester and *ent*-kaurenol. *Avan Quím* 2(3): 3-8.
- Aparicio RL, Villasmil TO, Peña A, Rojas J, Usubillaga A. 2013. Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. *Rev Fac Farm* 55(2): 2-5.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot J Linn Soc* 141: 399-436.
- Aristeguieta LS. 2003. Estudio dendrológico de la flora de Venezuela. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Vol. XXXVIII. Caracas.
- Badillo V.M. 1997. Los géneros de las Compositae (Asteraceae) de Venezuela. Clave artificial para su identificación. *Ernstia* 6(2-3): 51-168.
- Batista R., Humberto J.L, Chiari E, Braga de Oliveira

- A.B. 2007. Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. *Bioorg. Med Chem* 15(1): 381–391.
- Bruno-Colmenarez J, Díaz De Delgado GC, Peña A, Alarcón L.V, Usubillaga A, Delgado-Méndez P. 2011. Structure of *ent*-15 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid. *Avan Quím* 6(2): 16–20.
- Cannon J.R., Chow PW, Jeffreies PR, Meehan G.V. 1966. Isolation of (-)-Kaur-16-en-19-oic acid and 15 β -Hydroxy-(-)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* Bartl. *Aust J Chem* 19(5): 861–867.
- Cordero YE, Corao GM, Cova JA, Usubillaga A. 2012. Effect of some *ent*-kaurenes on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Prod Commun* 7: 563–564.
- Cordero de Rojas Y, Ustáriz L, Araujo L, Usubillaga A, Rojas F, Moujir L. 2017. Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. *Rev Fac Farm* 59(2):03–07.
- Cordero YE, Lucena M, Araujo L, Usubillaga A, Rojas L, Aparicio R, Moujir L, Ustáriz F. 2021. Efecto citotóxico de diterpenos derivados del ácido *ent*-kaureno aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. BLACPM. In Press.
- Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1981.
- Cuatrecasas J. 1976. A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytologia* 35:43–61.
- Cuatrecasas J. 2013. A systematic study of the subtribe Espeletiinae: Heliantheae, Asteraceae. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 107: 689.
- Ghisalberti E. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia* 58(4): 303–325.
- Hasan CH, Healey T, Waterman P. 1982. Kaurane and kaurene diterpenes from the stem bark of *Xylopia acutiflora*. *Phytochemistry* 21(8): 2134–2135.
- Hueso-Falcon I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro-Luis J.M, Ravelo A.G, Estévez-Braun A De las Heras B, Hortelano S. 2011. Synthesis and anti-inflammatory activity of *ent*-kaurene derivatives. *Eur J Org Chem* 46: 1291–1305.
- Llamoza S, Duno W, Meier R, Riina F, Stauffer G, Aymard O, Ortiz R. 2003. Libro rojo de la flora venezolana. PROVITA-Fundación Polar-Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser, Caracas.
- Meccia G, Quintero P, Rojas L, Usubillaga A, Carmona J. 2010. Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de Los Andes venezolanos. *Avan Quím* 5(1): 45–49.
- Morillo G, Briceño B. 2007. Estudio sobre *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) y sus afines. *Rev Fac Agron* 24 (Supl 1): 475–481.
- Morillo M, Rojas-Fermín LB, Aparicio R, Usubillaga A. 2017. *Ent*-Kaurene diterpenes and n-alkanes isolated from the leaves of *Coespeletia thyrsoformis* (A.C.SM.) Cuatrec. *Biointerface Res Appl Chem* 7(6): 2226–2229.
- Nagashima F, Kondoh M, Kawase M, Simizu S, Osada H, Fujii M, Watanabe Y, Sato M, Asakawa Y. 2003. Apoptosis-inducing properties of *ent*-Kaurene-type diterpenoids from the Liverwort *Jungermannia truncata*. *Planta Med* 69(4): 377–379.
- Obregón-Díaz YM, Rojas-Fermín LB, Usubillaga A, Pouységu L, Quideau S. 2015. Study of the chemical composition of the essential oil from the hybrid Asteraceae *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. *Rev Fac Farm* 57(1): 17–21.
- Peña A, Alarcón L, Baptista J, Aparicio R, Villasmil T, Usubillaga A. 2012. A Phytochemical Analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. a Midget Espeletiinae from Paramo Ortiz, Venezuela. *Avan Quím* 188 7(3):187–192.
- Ríos N, Villalobos D, Rojas-Fermín L, Aparicio R, Usubillaga A, Mitaine-Offer AC, Lacaille-Dubois MA, Denis D, Peixoto Ph, Pouységu L, Quideau S. 2017. *In vivo* anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*. *Rev Fac Farm* 59(1): 17–21.
- Rojas LB, Gutiérrez R, Cordero de Rojas Y, Usubillaga A. 2008. Chemical composition of the essential oil from *Carramboa pittieri* (Cuatrec.) Cuatrec. (Asteraceae). *Nat Prod Commun* 3(10): 1739–1740.
- Ruiz Y, Rodríguez J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, Galindo I. 2008. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzii*. *Phytochemistry* 69(2): 432–438.

- Usubillaga A, Capra MC. 1988. Chemical constituents of *Espeletia semiglobulata*. *Fitoterapia* 59(5):383.
- Usubillaga A, Aparicio R, Romero M, Rojas, LB, Khouri N. 2001. Study of the essential oils from the leaves of four species of *Libanothamus* from the Venezuelan Andes. *Flavour Fragrance J* 16, 209–211.
- Usubillaga A, Romero M, Aparicio R. 2003. Kaurenic acid in Espeletiinae. *Acta Horti* 597:129–130.

Recibido: 29/04/2021
Aceptado: 24/05/2021

Efecto de la temperatura y humedad sobre algunas propiedades fisicoquímicas de formulaciones tópicas con nanopartículas de plata y zinc

Effect of temperature and humidity on the physicochemical properties of topical formulations with silver and zinc nanoparticles

ISABEL ANDUEZA^{1*}, KARLA CALO^{1**}, MARÍA RODRÍGUEZ^{2***}, JIMMY CASTILLO^{3****}

Resumen

En el desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos, es esencial identificar las posibles inestabilidades que se reflejan en cambios físicos, químicos y/o microbiológicos. Actualmente, en esta área de conocimiento, la nanotecnología ha introducido ingredientes activos metálicos como la plata y el zinc, con excelentes beneficios sobre la piel, una mayor eficacia y efecto más prolongado. Por ello, un grupo de investigadores sintetizaron estas nanopartículas y las incorporaron en dos novedosos productos de aplicación tópica para el mercado local (cremas reparadora y protectora). A las cremas desarrolladas se les evaluó el efecto de la temperatura y humedad sobre algunas de sus propiedades fisicoquímicas, durante 90 días. Los valores de densidad, pH y viscosidad permanecieron constantes bajo las especificaciones preestablecidas. La conductividad disminuye con el tiempo, probablemente debido a la reducción de la movilidad iónica dentro de la base emulsionada. Estos estudios preliminares abren el camino para continuar desarrollando formulaciones con nanomateriales metálicos que, por su versatilidad y alto valor agregado, contribuirán con potenciales aplicaciones terapéuticas y cosméticas.

Palabras clave: Nanopartículas metálicas, estabilidad, tecnología farmacéutica y cosmética, formulaciones tópicas.

Abstract

In pharmaceutical and cosmetic products development is essential to identify the possible instabilities that be reflected in physical, chemical, and/or microbiological changes. Nowadays, in this area of knowledge, nanotechnology has introduced metals as active ingredients, such as silver and zinc, with excellent benefits on the skin, improved efficiency, and extended effects. For this reason, a group of researchers synthesized these nanoparticles and incorporated them into two topical products (restorative and protective creams) for the local market. The novel creams were evaluated. The study related to the effect of temperature and humidity on some of their physicochemical properties, for 90 days. Under these conditions, it was concluded that the values of density, pH, and viscosity, kept constant under the pre-established specifications. The reduction of the conductivity over time was due to the possible decrease of the ionic mobility under the emulsified base. These preliminary studies open the way to continue developing the formulation of metallic nanomaterials. Due to its flexibility and added value, this formulation will contribute to potential therapeutical and cosmetic applications.

Keywords: Metallic Nanoparticles, stability, pharmaceutical and cosmetic technology, topics formulation

-
1. Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 2. Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela. 3. Laboratorio de Espectroscopia Láser, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: isabel.andueza@hotmail.es

ORCID: [0000-0002-1585-862X](https://orcid.org/0000-0002-1585-862X); [0000-0003-2985-9110](https://orcid.org/0000-0003-2985-9110); [0000-0002-7242-1109](https://orcid.org/0000-0002-7242-1109); [0000-0002-6038-1074](https://orcid.org/0000-0002-6038-1074)

Introducción

Las nanopartículas (Nps) son sistemas capaces de controlar la velocidad de liberación de los ingredientes activos, y producir perfiles de liberación sostenidos. Se clasifican en función de diferentes variables, tales como, su naturaleza, su forma, su tamaño, su superficie y sus propiedades fisicoquímicas. Asimismo, es importante resaltar que el empleo de estas tecnologías como vehículos transportadores, realza características importantes en las formulaciones, entre las que se pueden señalar: mayor tolerancia, menor irritación tópica y una mejor penetración; a pesar de comprender que en los productos tópicos no debería existir una absorción sistémica de las moléculas activas, es interesante cierto grado de penetración en la piel con el objetivo de manifestar una mayor eficacia de las funciones terapéuticas. Igualmente, los nanotransportadores contribuyen con el aumento del tiempo de contacto sobre la piel, protección de aquellos componentes que puedan ser susceptibles a la oxidación o que puedan verse afectados por la humedad atmosférica, así como evitar interacciones físicas y químicas entre los ingredientes de una fórmula, por lo que le podría conferir una mayor estabilidad al producto (Verma y col., 2016, 2018).

Actualmente, en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y cosméticos se han incorporado Nps rígidas de materiales inorgánicos, como metales, óxidos metálicos o de sílice (Raj y col., 2012; Antonio y col., 2014). Muchos de estos minerales son esenciales para el metabolismo adecuado del ser humano puesto que actúan en diversos procesos enzimáticos relacionados con la inmunidad

y cicatrización de la piel (Honeyman, 2011). Wang y col. (2020) encontraron que bajos niveles de elementos metálicos podrían estar involucrados en la patogénesis de las cicatrizaciones en lesiones cutáneas. Elementos como el zinc (Zn), cobre (Cu), calcio (Ca), hierro (Fe) y magnesio (Mg), están ampliamente involucrados en la síntesis de ADN, proteínas, proliferación celular y producción de colágeno, entre otros. Por otra parte, Nps metálicas (MNps) como plata (Ag), oro (Au), Zn y Cu han sido empleadas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades debido a sus propiedades antimicrobianas, ópticas, magnéticas, catalíticas y electrónicas (Marlin y col., 2015).

En cuanto a las propiedades antimicrobianas se refiere, algunos estudios han evaluado la eficacia de diversas cremas que contienen compuestos de Ag a bajas concentraciones, encontrando una mayor respuesta frente a una amplia gama de gérmenes al compararlas con otras cremas antisépticas, además de evidenciar un efecto más prolongado (Jung y col., 2008; Bala y col., 2011). La asociación de Ag con dióxido de titanio (TiO₂) ha demostrado una buena actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Estafilococos epidermidis* (Bala y col., 2011), en este mismo sentido, la Ag bajo la forma de Nps, evidenció su capacidad de eliminar otros microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans* (Bruniera y col., 2014; Marlin y col., 2015). Este metal también presenta propiedades cicatrizantes, por lo que se ha indicado en los tratamientos de úlceras venosas, úlceras en pacientes diabéticos y en heridas crónicas (Coutts y Sibbald, 2005; Belcaro y col., 2010). Igualmente, se está

empleando como antiinflamatorio y en el tratamiento de las quemaduras (Bhol y col., 2004; Jain y col., 2009). Desde el punto de vista dermatológico y cosmético se ha investigado que la síntesis de Nps de Ag con extractos naturales, presentaron actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, lo que podrían ser prometedoras candidatas en el desarrollo de productos para la protección solar, disminución del melasma y contra el acné (Lohani y col., 2014; Tyagi y col., 2016; Helmy y col., 2020). Los beneficios de este mineral impulsan al desarrollo de nuevos productos para la regeneración, protección y nutrición de la piel.

Otro de los materiales inorgánicos comúnmente empleado en los productos tópicos es el Zn. Presenta propiedades antimicrobianas, fotocatalíticas y foto-oxidativas (Ali y col., 2018). Su combinación con el colágeno favorece el efecto antimicrobiano debido a su resistencia a la apoptosis epitelial, a través de la protección contra las especies reactivas de oxígeno y posibles toxinas bacterianas, las cuales son inducidas muy probablemente por la síntesis de metalotioneína y proteínas ricas en sulfidrilos que tienen la capacidad de secuestrar radicales libres y de proteger el tejido dañado (Lin y col., 2019). Estudios experimentales muestran que las concentraciones de Zn en los márgenes de las heridas son 15–20% más altas que en el resto de la piel. También, se ha demostrado que la administración tópica de Zn reduce la fase inicial de la hemorragia en las heridas y promueve el crecimiento tanto de la piel dañada como de las vellosidades (Llatas y col., 2011). Este metal bajo la forma de óxido (ZnO) es empleado como regenerador de la piel, ya que acelera el proceso de cicatrización. Se puede encontrar en

productos tópicos para la dermatitis del pañal, irritación de la piel y heridas (Osmond y McCall, 2010; Aksoy y col., 2010; Honeyman, 2011). Nanofibras de quitosano/alcohol polivinílico/ZnO han evidenciado propiedades antibacterianas y antioxidantes para la cicatrización de heridas en pacientes diabéticos (Lin y col., 2019). En este mismo sentido, la combinación de Nps de Ag, ZnO y quitosano inhiben el crecimiento de hongos y bacterias (Mousavi y col., 2020). Además, se han incorporado Nps de ZnO en los filtros solares. Su fotoprotección se debe a la capacidad antioxidante de reemplazar las moléculas activas de la óxido-reducción en las proteínas y las membranas celulares (Rostan, 2002; Juárez-Rebollar y Méndez-Armenta, 2014). La asociación de estas Nps con las de TiO_2 , le confiere a este tipo de formulación un aspecto más agradable, ya que evita el color blanquecino sobre la piel y disminuye la irritación (Wang y col., 2008; Smijs y Pavel, 2011).

Durante el desarrollo de un nuevo medicamento o cosmético resulta fundamental identificar posibles causas de inestabilidad, que pueden dar lugar a alteraciones físicas, químicas y/o microbiológicas en el producto final, dentro de ciertos parámetros específicos y por un tiempo determinado (Rodríguez y col., 2019).

Entre otros productos, las formulaciones tópicas sufren alteraciones dinámicas con el tiempo, que pueden afectar su calidad y efectividad. Estas modificaciones suelen estar mediadas por interacciones entre sus ingredientes, el sistema envase cierre y a su vez, ser potenciadas por diferentes factores del medio ambiente como la temperatura, la humedad, los gases atmosféricos y las radiaciones, entre otros. Esto conlleva a

evaluar sus características bajo ciertas condiciones de almacenamiento antes de ser introducido en el mercado y más aún, cuando se incorporan ingredientes activos novedosos de producción nacional como las MNps.

En función de lo anteriormente planteado, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y humedad sobre algunas propiedades fisicoquímicas de dos cremas emulsificadas con Nps de Ag y Zn sintetizadas en el país, con posibles beneficios protectores o regeneradores sobre la piel.

Materiales y métodos

CREMAS REPARADORA Y PROTECTORA

Se prepararon tres lotes de los siguientes productos desarrollados:

Crema reparadora

Se elaboró una crema emulsificada de fase interna oleosa y fase externa acuosa (O/W), a la que se le incorporó Nps de Ag; Nps de ZnO; Quitosano y TiO_2 . Los lotes fueron envasados en tarros de polipropileno opacos de 60g, con tapa de polietileno de alta densidad.

Crema protectora

Se elaboró una crema emulsificada O/W, a la que se le incorporó Nps de Ag; Quitosano y TiO_2 . Los lotes fueron envasados en tarros de polipropileno opacos de 60g, con tapa de polietileno de alta densidad.

Las Nps de Ag y Zn fueron sintetizadas en el Laboratorio de Equilibrios en Solución ubicado en la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, Caracas.

CONDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD

La evaluación fisicoquímica de las cremas se realizó bajo dos ambientes de temperatura y humedad relativa (HR) previamente estandarizados:

- La primera se llevó a cabo a $30^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ con $70\%\pm 5\%$ HR, tomando en consideración las condiciones climáticas naturales de Venezuela clasificada como IVB.
- La segunda fue realizada a $40^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ con $75\%\pm 5\%$ de HR, con el fin de acelerar la velocidad de degradación de los productos (ICH, 2003; WHO, 2009; WHO, 2018; Rodríguez y col., 2019).

Las determinaciones de las propiedades organolépticas, la gravedad específica, el pH, la conductividad y la viscosidad, se realizaron a los tiempos: t_0 (48 horas), t_1 (1 mes) y t_3 (3 meses), posterior a su elaboración, evaluando cada lote por triplicado, a una temperatura de $26^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$, siguiendo las metodologías que se describen a continuación:

1. Determinación de las propiedades organolépticas.

Las propiedades organolépticas fueron determinadas de forma cualitativa por apreciación visual, evaluando el color, olor, textura y apariencia.

2. Determinación de la gravedad específica.

Para la gravedad específica se empleó un picnómetro de vidrio para muestras semisólidas y una balanza analítica marca Ohaus modelo Pioneer TM, siguiendo la metodología descrita en la USP 36 capítulo 841 (USP 36, 2013).

3. Determinación del pH.

Las cremas fueron previamente dispersadas con agua destilada hasta una concentración de 2% p/p. Se utilizó un medidor de pH marca Corning Scientific Instruments Modelo 5, con un electrodo estándar combinado Ag/AgCl Orion 9104BN, de acuerdo con el método establecido en la USP 36 capítulo 791 (USP 36, 2013).

4. Determinación de la conductividad.

Las MNps poseen carga superficial, por lo que incorporadas en las formulaciones podrían tener la capacidad de conducir la corriente eléctrica. Para evaluar el comportamiento dieléctrico en función del tiempo, se elaboraron dispersiones acuosas de las cremas al 2% p/p y se procedieron a medirlas en un conductímetro Thermo Electrón, modelo Orion 4-Star. Los resultados fueron expresados en microSiemens/centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (Vila Jato, 2001; Rodríguez y col., 2019).

5. Determinación de la viscosidad.

Este parámetro se determinó en un viscosímetro rotacional, Visco-Star Plus L, utilizando la aguja L4 a una velocidad de 10 r.p.m. y $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Los valores de viscosidad de las cremas fueron expresados en miliPascal.segundos (mPa.seg) (Marriott, 2002).

Las determinaciones de todos los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron comparadas estadísticamente, aplicando la prueba de t de comparación de promedios en muestras independientes, con un 95% de exactitud (Mendenhall y col., 2010).

Resultados y discusión

En el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y cosméticos se deben considerar estudios que evalúen bajo ciertas condiciones de almacenamiento y tomando en cuenta los ingredientes de la fórmula y el envase primario definitivo, los posibles cambios en las propiedades fisicoquímicas a lo largo del tiempo, de tal manera de predecir su comportamiento antes de su comercialización. Esto permite garantizar durante un determinado período, las mismas propiedades y características que poseían al momento de su fabricación (Ortega, 2007; USP 36, 2013).

Al someter las cremas reparadora y protectora a diferentes temperaturas y humedades, se hallaron los siguientes resultados:

1. Determinación de las propiedades organolépticas.

Cada una de las cremas evaluadas se presentaron como emulsiones suaves, con color, olor y fluidez característico que permanecieron constantes durante los tres meses de estudio.

2. Determinación de la gravedad específica.

La determinación de la gravedad específica permite realizar la selección adecuada de los envases y establecer los parámetros de llenado en las líneas de producción, tomando en consideración la magnitud referida de la cantidad de masa contenida en un determinado volumen del producto.

Al evaluar estos resultados desde el punto de vista estadístico, se pudo observar que las dos cremas tuvieron ciertas variaciones durante el período de estudio, sin embargo, estas medidas se mantuvieron dentro del rango previamente establecido (0,900 – 1,150 g/mL) (Figura 1).

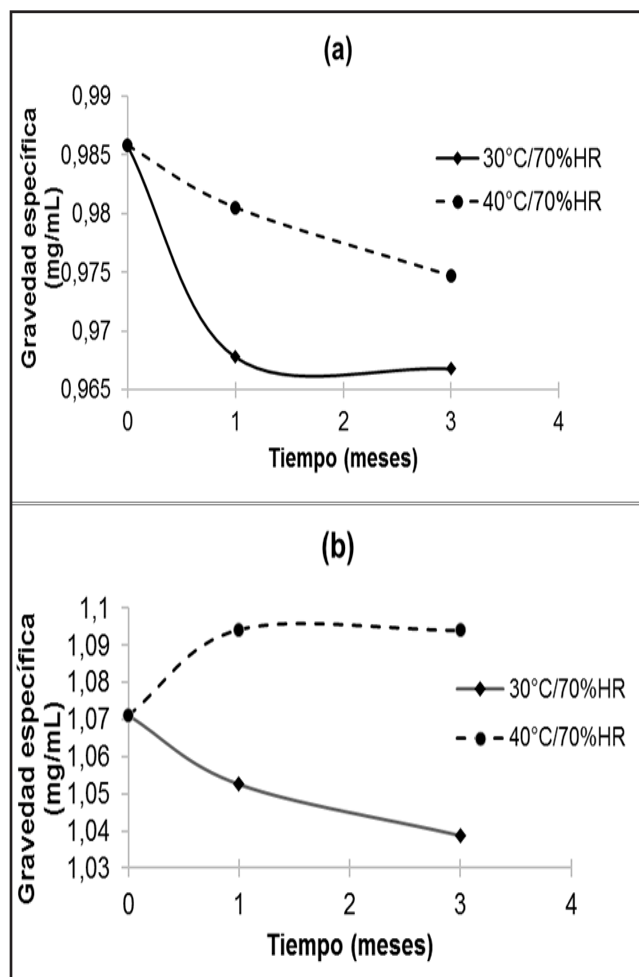


Figura 1. Gravedad específica de: (a) crema reparadora y (b) crema protectora sometidas a diferentes condiciones de temperatura y humedad en función al tiempo, determinada a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. Determinación del pH.

El pH es un factor importante para mantener tanto la estructura como la funcionalidad del estrato córneo en la piel, cualquier pequeño cambio que lo modifique de forma importante y lo aleja

del pH natural, influye negativamente en el mecanismo de reparación celular (Rodríguez y col., 2019; Lukić y col., 2021). En ese mismo sentido, variaciones en el pH catalizan las reacciones degradativas que podrían modificar las especificaciones predeterminadas de las formulaciones en estudio.

Los valores de pH obtenidos para la crema reparadora y protectora se encontraron dentro del rango natural de la piel, el cual oscila entre 4,6 y 5,8 y por lo que serían compatibles fisiológicamente en estos tejidos (Andueza y col., 2014) (Figura 2).

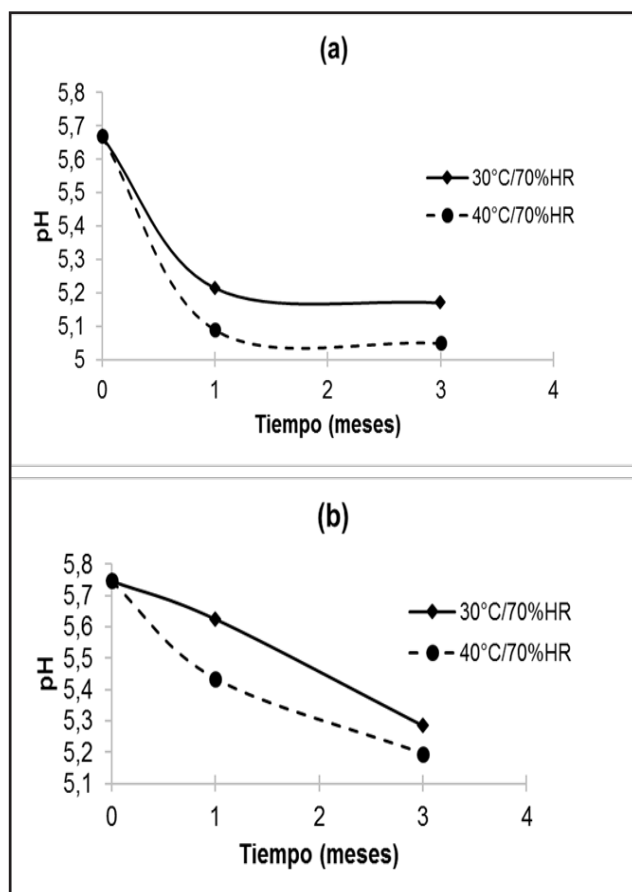


Figura 2. Valores de pH de: (a) crema reparadora y (b) crema protectora sometidas a diferentes condiciones de temperatura y humedad en función al tiempo, determinada a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4. Determinación de la conductividad.

En la Figura 3 se observa que la crema reparadora presenta valores de conductividad considerablemente superiores debido a la combinación de las cargas superficiales de las dos MNps incorporadas (Ag y ZnO). Por otra parte, ambas cremas mostraron una disminución de la conductividad con tendencia a permanecer constante en el tiempo. Esta modificación en las propiedades dieléctricas sugiere una interacción de las Nps con algunos de los componentes de la base, disminuyendo la movilidad de su carga superficial libre en la fase acuosa de la emulsión (Naghdi y col., 2018). Sin embargo, es necesario continuar evaluando este comportamiento por más tiempo.

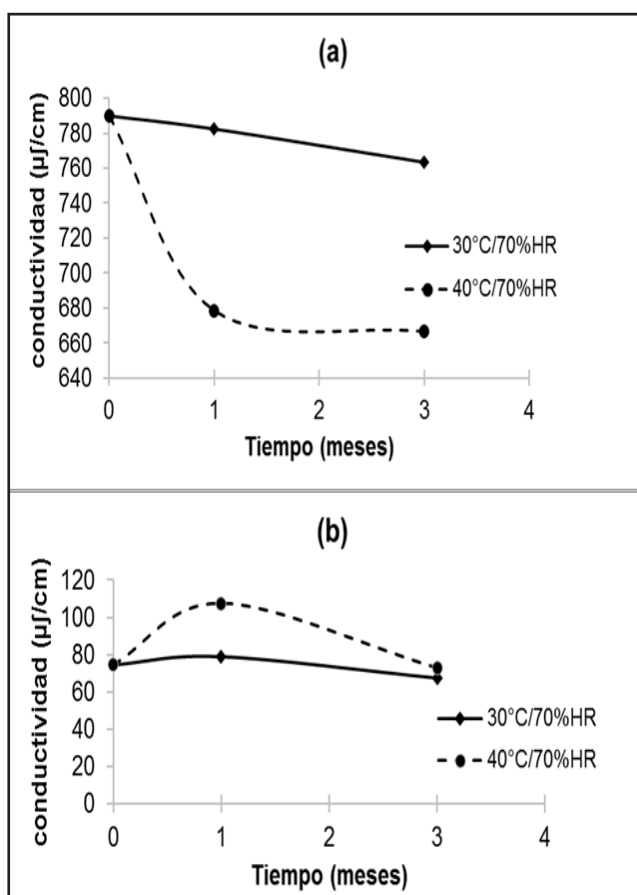


Figura 3. Valores de conductividad de: (a) crema reparadora y (b) crema protectora sometidas a diferentes condiciones de temperatura y humedad en función al tiempo, determinada a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

5. Determinación de la viscosidad.

Establecer las especificaciones de la viscosidad, es de gran importancia en la calidad y estabilidad de los productos, en la selección del envase, así como la percepción sensorial por parte del consumidor (Andueza y col., 2014).

En la Figura 4 se puede apreciar que los valores de la crema protectora tienden a disminuir sin representar una diferencia estadísticamente significativa, mientras que, en la crema reparadora, los valores tienden a aumentar sin observarse una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se puede afirmar que este parámetro se mantiene prácticamente constante en función del tiempo y bajo las condiciones establecidas del estudio.

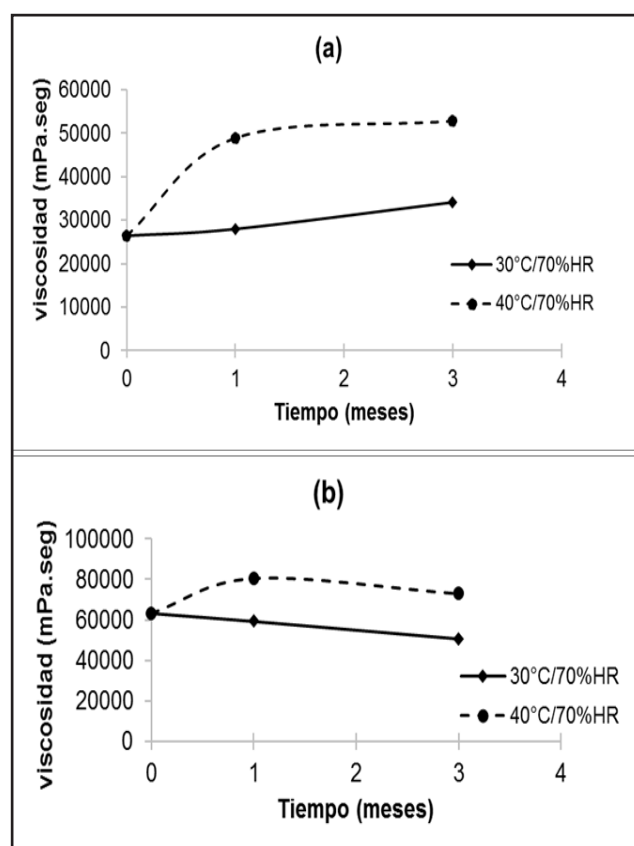


Figura 4. Valores de viscosidad a 10 rpm de: (a) crema reparadora y (b) crema protectora sometidas a diferentes condiciones de temperatura y humedad en función al tiempo, determinada a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Conclusión

Estos estudios preliminares con ingredientes activos de producción nacional abren el camino para continuar desarrollando formulaciones con MNPs que, por su versatilidad y alto valor agregado, son una alternativa innovadora que contribuirán con la introducción de nuevos productos tópicos de aplicación terapéutica y cosmética, siempre bajo la premisa de ser efectivos, seguros, convenientes y estables.

Agradecimiento

Agradecemos al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto. N° 202000020.

Referencias bibliográficas

- Aksoy B, Atakan N, Aksoy HM, Tezel GG, Renda N, Ozkara HA, et al. 2010. Effectiveness of topical zinc oxide application on hypertrophic scar development in rabbits. *Burns* 36(7):1027–35.
- Ali A, Phull A, Zia M. 2018. Elemental zinc to zinc nanoparticles: is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns. *Nanotechnology Rev.* 7(5):413–441.
- Andueza I, Cabrera A, Padilla A. 2014. Evaluación del comportamiento reológico y pH de una crema exfoliante corporal a base de cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) nacional. *Rev Fac Farm UCV* 77 (1 y 2): 40–45.
- Antonio JR, Antônio CR, Cardeal IL, Ballavenuto JM, Oliveira JR. 2014. Nanotechnology in dermatology. *An Bras Dermatol* 89(1):126–136.
- Bala T, Armstrong G, Laffir F, Thornton R. 2011. Titania-silver and alumina-silver composite nanoparticles: novel, versatile synthesis, reaction mechanism and potential antimicrobial application. *J Colloid Interface Sci* 356(2):395–403.
- Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, Ricci A, Dugall M, Pellegrini L, et al. 2010. Venous and diabetic ulcerations: management with topical multivalent silver oxide ointment. *Panminerva Med* 52(2 Suppl 1):37–42.
- Bhol KC, Alroy J, Schechter PJ. 2004. Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model. *Clin Exp Dermatol* 29(3):282–7.
- Bruniera JF, Silva-Sousa YT, Lara MG, Pitondo-Silva A, Marcaccini AM, Miranda CE. 2014. Development of intracanal formulation containing silver nanoparticles. *Braz Dent J* 25(4):302–6.
- Coutts P, Sibbald RG. 2005. The effect of a silver containing Hydrofiber dressing on superficial wound bed and bacterial balance of chronic wounds. *Int Wound J* 2(4):348–56.
- Helmy A, El-Shazly M, Seleem A, Abdelmohsen U, Salem M. 2020. The synergistic effect of biosynthesized silver nanoparticles from a combined extract of parsley, corn silk, and gum arabic: in vivo antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Mater Res Express* 7:025002.
- Honeyman J. Cosmécuticos de origen mineral. 2011. *Rev Chilena Dermatol* 27(2):263–267.
- ICH. 2003. The International Conference on Harmonisation. Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Inglaterra 4–20.
- Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. 2009. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm* 6(5):1388–401.
- Juárez-Rebollar D, Méndez-Armenta M. 2014. Aspectos funcionales de la metalotioneina en el sistema nervioso central. *Arch Neurocienc* 19:34–41.
- Jung B, Lim Y, Kim J, Young Jeong J, Hwan Ha T. 2008. Cosmetic pigment composition containing gold or silver nanoparticles. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Patente Europea EP1909745A1:16–04.
- Lin C, Lee M, Chi M, Chen C, Lin H. 2019. Preparation of Zinc Oxide Nanoparticles Containing Spray and Barrier Films for Potential Photoprotection on Wound Healing. *ACS Omega* 4:1801–1809.
- Llatas F, Fernández V, Sánchis P. 2011. Protección y tratamiento piel periulceral: óxido de zinc, película barrera, eosina al 2%. *Enfermería Dermatológica* 13-14: 46–50.
- Lohani A, Verma A, Joshi H, Yadav N, Karki N. 2014.

- Nanotechnology-based cosmeceuticals. *ISRN Dermatol* 22: 2014:843687.
- Lukić M, Pantelić I, Savić SD. 2021. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*. 8:69.
- Marriott C. 2002. *Rheology En: Aulton ME (ed). The Science of dosage form design. 2da ed. Elsevier Limited. London. Pp. 41–54.*
- Marslin G, Selvakesavan RK, Franklin G, Sarmiento B, Dias AC. 2015. Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *Int J Nanomedicine* 22; 10:5955–5963.
- Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. 2010. *Introducción a la probabilidad estadística. Cap. 10 y 12. 13º ed. Cengage Learning: USA pp. 395–400, 424–430, 488–490.*
- Mousavi SA, Ghotaslou R, Khorramdel A, Akbarzadeh A, Aeinfar A. 2020. Antibacterial and antifungal impacts of combined silver, zinc oxide, and chitosan nanoparticles within tissue conditioners of complete dentures *in vitro*. *Irish J Med Sci* 189(4):1343–1350.
- Naghdi S, Rhee K, Hui D, Park S. 2018. A Review of Conductive Metal Nanomaterials as Conductive, Transparent, and Flexible Coatings, Thin Films, and Conductive Fillers: Different Deposition Methods and Applications. *Coatings* 8(8):278.
- Ortega A. 2007. Actualización de normas de estabilidad de productos farmacéuticos. *Rev Fac Farm* 70 (1): 17–21.
- Osmond MJ, McCall MJ. 2010. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 4(1):15–41.
- Raj S, Jose S, Sumod US, Sabitha M. 2012. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *J Pharm Bioallied Sci* 4(3):186–193.
- Rodríguez G, Vieira M, Andueza I. 2019. Evaluación de la estabilidad de un exfoliante facial ecológico con *Passiflora edulis*. *Rev Fac Farm* 82 (1 y 2): 02–10.
- Rostan EF, DeBuys HV, Madey DL, Pinnell SR. 2002. Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J Dermatol* 41(9):606–11.
- Smijs TG, Pavel S. 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl* 4(1): 95–112.
- Tyagi N, Srivastava SK, Arora S, Omar Y, Ijaz ZM, Al-Ghathban A, et al. 2016. Comparative analysis of the relative potential of silver, zinc oxide and titanium-dioxide nanoparticles against UVB-induced DNA damage for the prevention of skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 383(1):53–61.
- USP 36. 2013. *The United States Pharmacopeia. NF 31. The National Formulary. USA: The United States Pharmacopeial Convention. pp: 377–380, 384–385, 454–454, 1032–1034.*
- Verma A, Singh N, Gautam SP, Devi R, Singh L. 2016. Cosmeceuticals: Acclaiming its most fascinating position in personal care industry. *Indian Res J Pharm Sci* 3(1): 506–518.
- Verma D, Kaul S, Gulati N, Nagaich U, Mukherjee S. 2018. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. *J Pharm* 2: 1–19.
- Vila Jato J. *Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Volumen 1. Madrid. Editorial Síntesis S.A.; 2001. p. 208–316.*
- Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, et al. 2008. Acute toxicological impact of nano- and submicroscaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanoparticle Res* 10(2): 263–276.
- Wang Q, Miao M, Qin Z, Li B, Niu X. 2020. Lower metal element levels in hypertrophic scars: A potential mechanism of aberrant cicatrix hyperplasia. *Med Sci Monit* 26: e925202.
- WHO. World Health Organization. 2009. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. WHO Technical Report Series N° 953. 12:87–130.
- WHO. World Health Organization. 2018. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. WHO Technical Report Series N° 1010. 309–351.

Recibido: 01/09/2021
Aceptado: 17/09/2021

La Revista de la Facultad de Farmacia fue creada en 1959 y constituye una publicación periódica, arbitrada, de aparición semestral, destinada a promover la difusión de artículos científicos en el área de las ciencias de la salud, así como en áreas básicas y aplicadas relacionadas con la obtención, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas Revisiones o Cartas al Editor. Los manuscritos enviados a la Revista de la Facultad de Farmacia serán revisados por el Comité Editorial y —si reúnen la calidad científica y cumplen con las normas de presentación necesarias—, serán sometidos a un proceso de arbitraje externo por personas con competencias similares a las de los productores del trabajo (pares) para su debida evaluación. Queda entendido que el Comité Editorial puede rechazar un manuscrito, sin necesidad de acudir al proceso de arbitraje, si no se incumple con lo mencionado.

El manuscrito deberá ir acompañado de una carta de solicitud firmada por el autor responsable. En caso de ser aceptado, el Comité Editorial no se hace responsable del contenido expresado en el trabajo publicado. Aquellos manuscritos que no se acojan a las condiciones indicadas o que

sean rechazados por dos de los árbitros que dictaminen sobre su calidad y contenido, no serán publicados y serán devueltos a los autores.

FORMA Y PREPARACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

Para la publicación de trabajos científicos en la Revista de la Facultad de Farmacia, los mismos estarán de acuerdo con los requisitos originales para su publicación en revistas biomédicas, según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (2012, 2013¹). Además, los editores asumen que los autores de los artículos conocen y han aplicado en sus estudios la ética de experimentación (Declaración de Helsinki, y el Código de Bioética y Bioseguridad, 2da. edición, 2002, del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Los manuscritos deben ser enviados a los correos de contacto indicados en http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/about/contact o directamente al correo del editor: astern88@gmail.com. Deben estar en formato Word, en hoja tamaño carta a doble espacio, con letra Arial 12. Asegúrese de que no haya dobles espacios en blanco a lo largo del texto.

Todas las páginas deben ser numeradas correlativamente, empezando por el título. El número de la página deberá colocarse en el ángulo superior derecho de cada página. Su longitud no debe exceder de veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas. Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

¹ http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html;
http://bvs.sld.cu/revistas/recursos/vancouver_2012.pdf

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los)autor(es), su filiación institucional y su email. Todo autor debe declarar su número ORCID².
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos. En esta sección se describirán los agradecimientos a personas e instituciones, así como los financiamientos.
- e. Conflicto de interés. Debe declararse la existencia o no de conflicto de interés por el autor o los autores del estudio.
- f. Referencias bibliográficas.
- g. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título en la parte superior y llamadas al pie de la tabla.
- h. Figuras: cada una en página aparte con su título en la parte inferior.
- i. Leyenda de las figuras.

1. La página del título deberá contener: Título del artículo en español e inglés, conciso e informativo, no mayor de veinte palabras. Primer nombre e inicial del segundo nombre y apellido(s) de los autores (con una llamada para identificar al pie de página al autor responsable de la correspondencia, indicando su dirección electrónica). Afiliación institucional y número de ORCID de cada uno de los autores.

2. La segunda página debe contener un resumen en español e inglés, con un máximo de 250 palabras. El texto debe dar una visión general del trabajo, señalar meramente el propósito, los métodos y los hallazgos. No se deben citar referencias. El

resumen debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio o de las observaciones. Inmediatamente después del resumen, proporcionar o identificar como tales 3 a 10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que puedan publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático [Medical SubjectHeading (Mesh)] del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones. La introducción debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los materiales y métodos deben contener la descripción breve y clara que permita la comprensión y la reproducibilidad del trabajo. En caso de técnicas y métodos clásicos ya publicados, se debe indicar sólo la referencia. Los resultados deben ser presentados en forma clara y precisa, con un mínimo de discusión o interpretación personal. Todas las figuras y tablas deben ser citadas en el texto. La discusión debe ser restringida a la interpretación de los resultados y eventualmente a comparar con los resultados de otros autores. Las conclusiones pueden ser incluidas dentro de la discusión; sin embargo, se puede hacer una sección aparte, indicando de forma clara y concisa los nuevos hallazgos. Se pueden incluir recomendaciones de aplicación práctica. Los agradecimientos deben hacerse a las personas o instituciones que han hecho contribuciones al estudio.

² <https://orcid.org/>

4. Referencias bibliográficas: Las mencionadas a lo largo del texto deben citarse de la siguiente manera:

- Un autor: «...fueron publicadas por González (1968)» o bien, «Se han publicado las características de... (González, 1968)».
- Dos autores: ...Álvarez y Martínez (1986),...(Álvarez y Martínez, 1987)
- Tres o más autores: ...Martínez y col. (1986), ...(Martínez y col., 1986)

Use las letras para distinguir entre varios trabajos del mismo autor o autores y año: ...(González y Pérez, 1990a,b).

Utilice punto y coma para separar autores de diversos trabajos y colóquelos en orden cronológico:...(Mijares, 1975; Brenes y Rodríguez, 1961; Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias bibliográficas» y su ordenamiento será alfabético manteniendo las estructuras mostradas en los siguientes ejemplos dependiendo del tipo de bibliografía. Deberán ser citados todos los autores de cada referencia.

ARTÍCULO EN REVISTA:

Ávila JL. 1983. New national approaches to Chagas disease chemotherapy. *Interciencia* 8: 405-417.

Ávila JL, Ávila A, Muñoz E. 1981. Effect of allopurinol on different strains of Trypanosomacrusi. *Am J Trop Med Hyg* 39(3): 769-774.

LIBROS:

Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. 2da ed. Elsevier: San Diego, Ca, USA, 2008.

CAPÍTULOS EN LIBROS:

Peters W, Robinson B. Parasitic infection models. In: *Handbook of antimalarial models of infection*. Eds: Zak O, Sande M. Academic Press: London, 1999. pp. 757-773.

Berry EP. Croton. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Eds: Berry P, Yatskievich K, Holst B. Missouri Botanical Garden Press: USA, 1999. pp. 111-133.

TESIS O TRABAJOS DE ASCENSO:

Rodríguez Caballero RL. Contribución al estudio de targuá (*Croton gossypiifolius Vahl*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias, San José, Costa Rica, 1946.

RESÚMENES EN CONGRESOS:

Muelli M. Cosméticos ecológicos y naturales ¿garantía para los consumidores?. XVIII Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. COLAMIQC, Guatemala, 2007.

5. Tablas: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Tabla I), deben presentarse en páginas separadas, a espacio sencillo, y numeradas correlativamente en números romanos con el título en la parte superior. No se debe duplicar material del texto o de las figuras. En caso necesario coloque material explicativo en notas al pie de la tabla y no en el encabezamiento; explique en notas al pie de la tabla las abreviaturas no estandarizadas o utilizadas; identifique claramente las variables tales como desviación estándar (D.S.) y error estándar de la media (E.E.M.); cite cada

tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

6. Figuras: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Figura 1, Figuras 2 y 3). Estas deben ser de buena calidad, incrustadas en el texto con su leyenda, o bien en archivos aparte en formato .jpg a una resolución de 300 ppp, en cuyo caso deberán estar identificadas con el número de la figura y el apellido del autor principal (Ejemplo: Figura 1-Matos. jpg). En este último caso las leyendas de las figuras deberán presentarse en página aparte a espacio sencillo colocando el número que corresponde a cada figura. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de fotografías de personas evite que el sujeto sea identificable, o acompañe de la autorización escrita de la misma. Cuando se usen símbolos y fechas, números o letras para identificar partes en las figuras, identifíquelas y explique cada una en la leyenda. Si se trata de fotomicrografía, indique la escala e identifique el método de coloración.

7. Fórmulas y ecuaciones: deben presentarse claramente para su reproducción.

Lista de comprobación de preparación de envíos:

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumple con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

1. La petición no ha sido publicada previamente, ni se ha presentado a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al editor).
2. El fichero enviado está en formato Open Office, Microsoft Word.
3. Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
4. El texto tiene interlineado doble; el tamaño de fuente es 12 puntos; se usa cursiva en vez de subrayado (exceptuando las direcciones URL).
5. El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las Normas para autores.

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.