

REVISTA FACULTAD DE
FARMACIA

Volumen 85

N^{os} 1 y 2

2022

ISSN: 0041-8307



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 85- Nos 1 y 2 - 2022
ISSN: 0041-8307
ISSN-e: 2739-0373
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

Directora del Instituto de Investigaciones

Dra. Isabel Andueza

Directora de Postgrado

Dra. Esdrás Arismendi

Revista Facultad de Farmacia

Editora

Dra. Anita Stern Israel

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: Serpientes "semivenenosas" en Venezuela

Crédito Fotos: Javier Mesa, Kenji Navarrete y Luis F. Navarrete

Ética ambiental. Una referencia para una gestión sostenible CIRO ANTONIO FUENMAYOR DÍAZ	3
Atención a las serpientes "semivenenosas" en Venezuela: sus aspectos bioecológicos, farmacológicos y médicos ALEXIS RODRÍGUEZ-ACOSTA	20
Ciclo de vida en el desarrollo de un producto farmacéutico PILAR MARTÍN DE PÉREZ	32
Citometría de flujo como herramienta biotecnológica SORIUSKA J MAYORA H	44
Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1 LETICIA FIGUEIRA, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ	51
Caracterización toxinológica, bioquímica e inmunológica del veneno de la serpiente <i>Bothrops venezuelensis</i> (Macizo del Turimiquire, estado Monagas, Venezuela) CARMEN T DUQUE ZERPA, MARÍA E PINEDA, LUIS F NAVARRETE, ALBA M VARGAS	67
Consumo de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>): composición y efectos en la salud MARÍA EUGENIA ACOSTA MARACAY, EDUARDO ROMERO VECCHIONE	80
New biflavonoids from <i>Iresine diffusa</i> ALÍRICA I. SUÁREZ	91
Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental AURORA DEL VALLE BARRIOS RUDAS, MARCO ANTONIO ÁLVAREZ OCHOA, ELIANA NAVARRO	100
Efecto protector de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en células Vero sometidas a alta glucosa CARLOS CIANGHEROTTI, GIOVANNINA ORSINI, MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN, MARÍA RODRÍGUEZ, JAIRO BERMÚDEZ, ANITA ISRAEL	111
<i>Aa-Integral-Tox</i> : un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> : un modelo animal no convencional MARCO ÁLVAREZ, AURORA BARRIOS, ELIANA NAVARRO	128
Impacto de la COVID-19 durante la pandemia abril 2020 hasta abril 2022 en la po-blación amazónica de Napo – Ecuador MARÍA CARDOZO, MARCO CISNEROS	139
Intoxicación por Barbasco (<i>Lonchocarpus urucu</i>). Reporte de Caso ANTONY HIDALGO, MARCO CISNEROS, CARLOS CASTRO, BRAULIO MUÑOZ, GABRIELA DOMÍNGUEZ, JULIANA TORRES, LUIGI LÓPEZ	147
Normas de publicación	153



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



CDCH-UCV



Ética ambiental. Una referencia para una gestión sostenible

Environmental ethics.
A reference for a sustainable management

CIRO ANTONIO FUENMAYOR DÍAZ

Resumen

La ética está relacionada principalmente con la moral, con la actitud que tiene el hombre en ejecutar acciones buenas o malas que regulan el comportamiento individual y colectivo. Una parte de la filosofía aplicada es la Ética Ambiental, que considera las relaciones éticas entre los seres humanos y el medio ambiente. Al analizar el desarrollo de la humanidad a través de los diferentes períodos históricos, se evidencia que el hombre en la actualidad tiene la necesidad de gestionar los recursos naturales de una manera sostenible para garantizarlos a las generaciones futuras. Este objetivo se puede lograr si se considera a la Ética Ambiental como una referencia para que se incluya en los modelos de desarrollo de los países y de las organizaciones, así poder cumplir con la Agenda 2030 de las Naciones Unidas cuyo fin es tratar de distribuir los recursos naturales de una manera más equitativa y preservar la Biodiversidad.

Palabras clave: Ética, moral, medioambiente, biodiversidad, gestión sostenible

Abstract

Ethics is mainly related to morality, with the attitude that man has in executing good or bad actions that regulate individual and collective behavior. One part of the philosophy is Environmental Ethics, which considers the ethical relationships between human beings and the environment. When analyzing the development of humanity through the different historical periods, it is evident that man today needs to manage natural resources in a sustainable way to guarantee them to future generations. This objective can be achieved if environmental ethics is considered as a reference that is included in the development models of nations and organizations and thus can comply with the United Nations 2030 Agenda whose purpose is to try to distribute resources more equitably and preserve Biodiversity.

Keywords: Ethics, morality, environment, biodiversity, sustainable management

Introducción

Cuando nos referimos a la palabra Ética entendemos que es una parte de la filosofía que considera el pensamiento sobre el bien y el mal basado en la moralidad, que se sustenta en criterios íntegros, lo que nos lleva a preguntar:

¿Qué es lo bueno o malo? ¿Quién es bueno o malo? ¿Hay bondad o maldad absoluta?

La Real Academia de la lengua española (RAE) define la ética como un adjetivo: *“Pertenciente a las acciones de las personas, desde el punto de vista de su obrar en relación con el bien o el mal y en función de su vida individual y sobre todo colectiva”*.

También la RAE la define como: *“Doctrina del obrar humano que pretende regular el comportamiento individual y colectivo con el bien y el mal y los deberes que implican”*.

En base a ello hemos acuñado un pensamiento: *“qué bueno dijeron los malos, que malo dijeron los buenos”*, en este sentido considerar que una persona tiene una actitud moral, inmoral o amoral dependerá del juicio y opinión que emitan otras personas desde su punto de vista basado en una escala de valores, siendo todo relativo sin verdades absolutas. Este pensamiento se extiende hasta la actitud que tienen las personas de respeto y protección del medioambiente y los recursos naturales.

Attfield (2003) la define como “el estudio ético de las interacciones humanas y el impacto humano sobre el mundo natural y el sistema natural”. Posteriormente Attfield (2010) amplía el concepto: *“Como el estudio de las cuestiones y principios relacionados con las interacciones de los*

seres humanos con el ambiente natural, y con sus contextos y consecuencias”. Con respecto a la Ética Ambiental, Lecaros (2013) la define como: “La ética aplicada que reflexiona sobre fundamentos de los deberes del ser humano con la naturaleza, los otros seres vivos y las generaciones futuras”.

Esta definición nos conecta directamente con el concepto de Desarrollo Sostenible cuyos objetivos globales están orientados a la erradicación de la pobreza, proteger el planeta y asegurar la prosperidad para todos como parte de una nueva agenda, (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>) y de la Biodiversidad.

De acuerdo Light y Rolston (2003), la Ética Ambiental es: *“Un nuevo campo de la Ética filosófica preocupada por la descripción de una respuesta ética apropiada para asegurar la preservación o restauración de los valores”*.

Se podría considerar que entre los valores fundamentales a tomar en cuenta están considerados los recursos naturales y la biodiversidad. Attfield (2010) plantea que los problemas ecológicos son la consecuencia de la forma como los seres humanos gestionan los sistemas del mundo natural, como ejemplo de estos problemas el autor indica que la contaminación, el agotamiento de los recursos naturales, la desaparición de las especies y la vida silvestre, además del aumento de la desertificación entre otros. La extensión de estos problemas es global y está comprometido el futuro del planeta.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Al comparar los diferentes períodos del desarrollo de la humanidad se evidencia

una evolución desde estadios elementales con respecto al interactuar con la naturaleza hasta llegar a una comprensión holística de cómo funciona la naturaleza, la toma de conciencia de que el hombre es parte de ella en un planeta finito que a su vez es parte del cosmos y por lo tanto está aprendiendo a gestionar mejor los recursos naturales para poder garantizar su permanencia.

En este artículo se revisa la evolución de la Ética Ambiental de como el hombre va madurando su relación con la naturaleza y cómo gestiona los recursos naturales desde un punto de vista ético ambiental.

Se pueden identificar dos tendencias antagónicas; una antropocéntrica en cierto modo desbastadora y depredadora, y otra holística e integradora conservacionista por medio de la cual el hombre procura mantener un equilibrio con el medioambiente.

Para comprender mejor los conceptos se debe considerar entre los antecedentes a la ética aristotélica, siendo Aristóteles reconocido como el padre de la misma, su ética es considerada como teleológica, el bien se considera un fin en vez de un medio de convivencia basada en una sucesión de causas y efectos, siendo el fin último la felicidad del hombre asociado a la idea de que cada ser humano puede ser mejor persona, o la mejor versión de sí mismo, dentro de sus valores se incluye el respeto y el cuidado al medio ambiente, los otros seres vivos y a los recursos naturales.

Aristóteles plantea la felicidad en tres estadios:

Primario: Basado en placeres y diversiones (hedonismo), considerando la naturaleza como despensa ilimitada e inagotable. Este estadio es considerado básico con niveles de conciencia elementales, solo importa el tiempo presente.

Secundario: El hombre al alcanzar la libertad y la responsabilidad, al ser eliminada la esclavitud tiene la oportunidad y derecho de tomar las propias decisiones, así el hombre desarrollar actividades agropecuarias siendo propietario de su tierra. Adquiere conciencia sobre la responsabilidad de gestionar el ambiente adecuadamente para garantizar su auto sustento, comienza a integrarse a los ciclos de la naturaleza y comprenderlos.

Sublime: Al tomar mayor nivel de conciencia e interpretar y desarrollar un modelo de cómo funciona la Naturaleza, se transforma en filósofo e investigador, es un estadio holístico que incluye los dos anteriores. Se basa en conceptos como existencialismo, visión de futuro, convergencia hacia una actitud ética. El hombre se convierte en gestor y garante de la preservación del medioambiente.

LÍNEAS DEL DEBATE FILOSÓFICO SOBRE LA ÉTICA AMBIENTAL

a) Diagnóstico sobre causas y efectos de la crisis socio ecológica.

El deber ser es que, a nivel planetario, todos los humanos deben haber evolucionado al estadio máximo de felicidad con el fin de preservar el planeta, el medioambiente y sus recursos naturales, apoyándose en términos históricos, sociales, culturales, jurídicos, políticos y económicos que serían las causas.

b) Consideración de intereses morales de las generaciones futuras de humanos.

c) Teoría del valor en el cual se sustentan las obligaciones ético-ecológicas.

De acuerdo con los términos anteriores el hombre ha desarrollado un modelo de interpretación de su existencia y su relación

con la naturaleza, en el cual se sitúa en la cúspide de la pirámide ecológica cuyo entramado sugiere que el resto de los seres vivos están a su disposición considerándolos como recursos inagotables.

Este modelo es una consecuencia del desarrollo de la humanidad desde la época prehistórica, cuando las necesidades básicas debían ser satisfechas en una dinámica de supervivencia ante un medioambiente que podría resultar hostil, las poblaciones eran nucleares, con una estructura tribal, no había un entramado o tejido social desarrollado que integrara las poblaciones entre sí e intercambiaran conocimiento y habilidades, era una dinámica excluyente y se debía proteger el territorio ante invasiones.

Las creencias de los humanos estaban basadas en dogmas y mitos ya que para entonces la visión era arcaica, instintiva, mágica y animista.

A medida que el tamaño poblacional fue creciendo se inició el intercambio cultural y comercial, hasta que llegó el período de la ilustración en el siglo XVIII. Uno de los máximos exponentes de esta nueva visión del mundo fue Kant (1784), considerado padre de la filosofía moderna. Para Kant (2013), *“La Ilustración es la liberación del hombre de su culpable incapacidad”*, rescata el término *“Sapere Aude Incipe”* (atrévete a saber, empieza) citado por primera vez por Horacio poeta romano. A partir desde ese entonces, el hombre por razonamiento comienza a cuestionar todos los dogmas y mitos impuestos por las tradiciones y por las religiones y basados en el desconocimiento de cómo funciona la naturaleza como un sistema y sus procesos. Esto permitió un desarrollo de las artes y ciencias en poco tiempo, al comprender y descubrir cómo eran los fenómenos de la

naturaleza se fueron develando dogmas y mitos, a lo que las instituciones religiosas y oficiales se oponían al poner en riesgo la pérdida del control y poder sobre la población. Una consecuencia positiva de este movimiento fue entender que la naturaleza no es ilimitada y se debe tomar acciones para preservarla.

Posteriormente, Leopold (1949) con su visión plasmada en su obra *A Sand County Almanac* y en los temas de *Environmental Ethics*, destaca a la Ética de la tierra como una secuencia y extensión de la propia ética absoluta estudiada hasta entonces solamente por los filósofos, es un proceso relacionado directamente con la evolución ecológica. Se puede analizar desde dos puntos de vista: ecológico y filosófico; ecológicamente es una limitación de la libre acción de la lucha por la supervivencia, filosóficamente es una diferenciación de la conducta social comparada con la antisocial. Estas dos definiciones se fusionan en una sola relacionada con la tendencia de interdependencia de individuos o grupos para desarrollar modelos de cooperación. Los ecologistas lo denominan beneficios de la simbiosis. La política y economía están más avanzada en las simbiosis, pero han reemplazado una libre competencia en parte por un mecanismo de cooperación con un contenido ético.

Sin embargo, para Leopoldo (1949) aún no se había desarrollado a la par una ética de la relación del hombre con la tierra, animales y plantas que comparten los territorios. La relación con la tierra es estrictamente económica otorgándole privilegios más no obligaciones de preservar los recursos naturales; es en este punto cuando se identifica la oportunidad de desarrollar una Ética Ambiental que pueda garantizar la disponibilidad de los recursos.

En 1972 se realizó en la ciudad de Estocolmo la primera cumbre de las naciones unidas sobre el medioambiente donde se adoptó una declaración que enunciaba los principios para la conservación y mejora del medio humano y un plan de acción que contiene recomendaciones para la acción medioambiental internacional. Esta iniciativa refleja una inquietud a nivel global de transmitir la importancia de incorporar de una manera implícita la ética ambiental en la gestión del medioambiente.

También en el mismo año se publicó el informe del club de Roma sobre el límite del crecimiento de la humanidad, Meadows y col. (1972). La tesis principal de esta publicación es que si en la actualidad el incremento de la población mundial, la industrialización, la contaminación, producción de alimento y la explotación de los recursos naturales mantienen sus tendencias de incrementar sus tasas y valores, se alcanzará los límites absolutos de crecimiento en la tierra.

El modelo de simulación de Meadows (1972 ; Figura 1) fue creado para proyectar esta tendencia considerando adicionalmente factores como: el crecimiento económico y el incremento de la huella ecológica de la población en los próximos 100 años (hasta 2072).

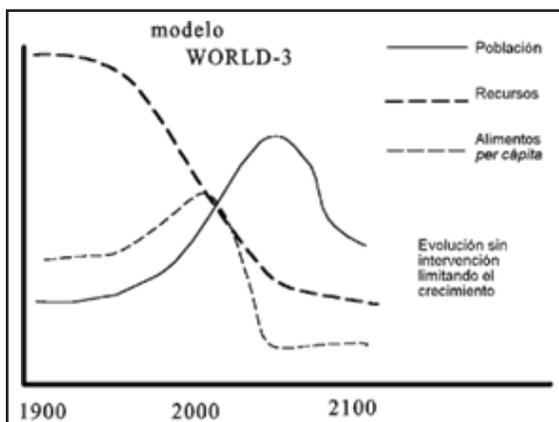


Figura 1. Modelo de crecimiento exponencial (Meadows y col., 1972)

Tomando en cuenta estas apreciaciones la humanidad se encuentra ante una oportunidad para implantar una gestión ambiental sostenible responsable basada en la filosofía de la ética ambiental y garantizar los recursos naturales para las generaciones futuras.

En la Figura 1 se puede apreciar el modelo de crecimiento exponencial propuesto por Meadows y col. (1972), conforme incrementa el tamaño de la población humana en el tiempo, los recursos naturales van disminuyendo a la par y en consecuencia la disponibilidad de alimento per cápita disminuye también. De acuerdo con el modelo se deben tomar acciones para revertir esta tendencia antes del año 2100, hay que hacer énfasis en transmitir la filosofía de ética ambiental en las poblaciones para promover un cambio de actitud positiva ante el medioambiente.

BOOMERITIS

El término Boomeritis, planteado por Wilber (2005), engloba toda la filosofía y cultura de las cohortes demográficas de las personas nacidas entre 1946 y 1964 (*"babies boomers"*) durante la explosión de la natalidad posterior a la segunda guerra mundial. En su obra propone un modelo de dinámica integral de expansión del pensamiento de la humanidad desde la aparición del hombre en la tierra cuya razón de ser era la supervivencia ante una Naturaleza que si bien podría parecer hostil también la consideraba una despensa ilimitada de recursos naturales para su subsistencia, hasta una conciencia integral y holística cuando el hombre adquiere madurez para comprender que con el crecimiento exponencial de la población la disponibilidad de los recursos naturales se ve comprometida, se ha visto en la

oportunidad de redefinir como deben ser gestionados para que estén disponible para las generaciones futuras (Desarrollo Sostenible).

La Dinámica Espiral es un modelo transdisciplinario (bio-psico-sociocultural) diseñado para la transformación cultural y la gestión integral basada en valores, que aborda desde las llamadas "teorías" de la complejidad el desarrollo de la humanidad, analizándolo a través de diferentes sistemas de valores, en tanto emergentes de configuraciones básicas (atractores) repetidas a lo largo de la historia, así como las "visiones de mundo" (zeitgeist) asociadas a cada uno de ellos.

La Dinámica Espiral (*Spiral Dynamics* o SD en inglés) es un modelo que analiza las diferentes formas de pensar de las personas considerando su amplia diversidad de ideas y modos de existir, identificando patrones comunes en un modelo multiestratificado de niveles que recorre el proceso histórico de la humanidad, desde sus inicios hasta la actualidad. De esta forma, resulta una representación del flujo emergente del pensamiento humano expresado a través de visiones del mundo, niveles (modalidades) de existencia y los sistemas de valores implicados en cada una de ellas. A modo analógico, pueden visualizarse estos procesos entre visiones de mundo y sistemas de valores como mareas oscilantes que se confunden y colisionan entre sí, consistiendo al humano en sus modos de existir en el mundo. La Dinámica Espiral describe como estas "visiones de mundo" emergen y fluyen a través de individuos y grupos, describiendo los distintos sistemas bio-psico-socioculturales desplegados como un proceso continuo en forma de espiral expansiva.

El reconocido filósofo Ken Wilber, fundador del Integral Institute, se ha convertido en uno de los más importantes difusores de Dinámica Espiral incluyendo este modelo en su obra, a partir del libro "Una teoría de todo". De acuerdo con el modelo de Wilber (2001) de la Figura 2, en la actualidad la humanidad se ubica entre los memes verde (comunitario ecológico) y el turquesa (visión holística-universal) en la época actual cuando la humanidad tiene un tamaño poblacional de 8×10^9 habitantes y los recursos naturales están disminuyendo. Es importante identificar dentro del total de la población cuál es el porcentaje de personas que realmente han alcanzado el nivel de consciencia holístico y que puedan generar un efecto multiplicador hacia el resto de la humanidad con el fin de poder gestionar mejor la naturaleza y sus recursos para revertir la tendencia propuesta por Meadows (1972).

OBJETIVOS DE POLÍTICAS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

De acuerdo con Marcos (1999) los objetivos de las políticas de las naciones se deben centrar en tres consideraciones principales:

- a) Mantenimiento de un medio limpio y utilizable para el humano.
- b) Preservar espacios naturales.
- c) Proteger la Biodiversidad.

Para garantizar su fiel cumplimiento se debe tener acceso a los recursos que provienen de la sociedad y de los impuestos a ser pagados por los habitantes, en este sentido muchos lo cuestionan y se resisten a cumplir con el cometido debiendo aceptar restricciones en la disponibilidad y acceso a



Figura 2. Modelo de Wilber sobre la Dinámica Espiral (2001)

los recursos. A partir de estos dos puntos de vista se plantea un antagonismo entre el hombre contra la naturaleza que es limitada y en consecuencia los recursos naturales dejando de ser ética la actitud de muchos humanos de carencia de respeto al medioambiente.

Relacionando el objetivo de la protección de la Biodiversidad con la preservación de las especies hay una consideración primordial, ¿Qué es prioritario? Preservar una especie por su valor intrínseco (floreamiento o bienestar de las criaturas vivas según Attfield (2010), en vez de una en peligro de extinción, o se debe dar un tratamiento igualitario en aras de la Biodiversidad, ¿hacia dónde se deben destinar los recursos para su gestión? En consecuencia, cualquier expresión de vida desde su ADN tiene su valor intrínseco de importancia.

Sin embargo, el hombre siempre ha manejado la naturaleza como una despensa natural, ésta pareciera ser exigente con el humano que requiere esfuerzo e ingenio para extraer los recursos más codiciados,

pero a la vez, provee los recursos básicos para satisfacer las necesidades del hombre (nivel arcaico- instintivo de acuerdo con la espiral de Wilber (2005) o aún más proveer un excedente que garantiza un mejor nivel de calidad de vida - nivel holístico universal).

Problemas relacionados con la Ética y la gestión ambiental

La actitud egocéntrica desde el antropocentrismo ha traído problemas relacionados con el medioambiente y la ética ambiental basados en la extensión de la acción humana y se definen claramente tres áreas de atención:

- a) Internacionales
- b) Intergeneracional
- c) Interespecíficos

PROBLEMAS INTERNACIONALES

Con respecto a los problemas Internacionales, se puede ilustrar el caso de las emisiones de los gases invernadero

diferenciadas entre las naciones, siendo un problema global. Hay países que emiten una mayor tasa de emisiones en comparación con otros por lo que surgen las interrogantes, ¿Cómo se pueden mantener o incrementar los porcentajes de emisiones atmosféricas de los países desarrollados en perjuicio de los países en desarrollo como si hubiese derecho sobre la atmósfera?, ¿Es ético comprometer a los países menos desarrollados a que reduzcan sus emisiones limitando su crecimiento?

El acuerdo de París (2016); tratado internacional jurídicamente vinculante, reafirma las obligaciones que deben tener los países desarrollados en apoyar con recursos financieros, tecnológicos y para el fomento de la capacidad los esfuerzos de las partes que son países en desarrollo para construir un futuro limpio y resistente al clima.

Ante posibles conflictos se deben establecer mecanismos de control como son los arbitrajes donde se definen aspectos tales como: el ámbito de discusión geográfico (local, regional o global); legislativo (municipal, nacional, regional o global); poder ejecutivo (nacional o estatal), también hay que considerar el desarrollo de técnicas contables que incluyan la riqueza ambiental para una distribución justa, pero también hay que tomar en cuenta algún posible déficit democrático porque se requiere la representación de las naciones y no de las autocracias.

Issberner y Léna (2021) indican que, si se pudiese eliminar a partir de este momento todas las emisiones de dióxido de carbono de los países con mayores riquezas, no sería suficiente para lograr reducir la huella de carbono en todo el planeta y no sobrepasar los límites acordados para la biosfera hasta 2050. Es decir, a pesar

de las evidentes diferencias de desarrollo económico y abundancia de recursos naturales existentes entre los países del mundo, debería existir un consenso para solucionar el problema más apremiante del periodo antropoceno y reducir en proporciones significativas sus emisiones de gases con efecto de invernadero.

Es un escenario que agota las iniciativas permanentemente en todas las negociaciones internacionales "la cacería de culpables". En consecuencia, las administraciones evitan contraer compromisos y acuerdos evitando así vulnerar su crecimiento económico, mantener la tasa de empleo y además no ir en contra de los grandes capitales.

Durante la celebración del Acuerdo de París, el 22 de abril de 2016, fecha de la firma de dicho acuerdo, se solicitó a los países contraer un compromiso voluntario en vez de imponer los criterios establecidos para el control y gestión eficiente de las emisiones atmosféricas. La propuesta se focalizó en que cada país se comprometiera a reducir sus emisiones de acuerdo con lo que fuese viable. Esta iniciativa permitió que en vez de llevar a una negación estéril se propicie la puesta en marcha de acciones, aunque se produjo una confusión en la identificación de los criterios de evaluación que no estandarizan el análisis comparativo para determinar el esfuerzo realizado por cada país. Siendo el alcance de carácter universal, este acuerdo internacional no prevé sanción alguna hacia los países que incumplan dichos compromisos contraídos.

Este escenario demuestra la debilidad que puede tener la gobernanza sobre el cambio climático. De acuerdo con los autores, al no existir una institución reconocida con un mandato preciso para ejercerla, se hace difícil imponerse a los intereses económicos de los países y de

las organizaciones tanto privadas como públicas.

De acuerdo con Attfield (2010), la ética ambiental como referencia puede contribuir a hacer un mundo sostenible recomendando procedimientos equitativos para contrarrestar el calentamiento global. De acuerdo con el autor, informes del Panel Intergubernamental sobre el cambio climático (IPCC) confirman lo siguiente: "El calentamiento global es parcialmente de origen humano; es probable que muchas tierras bajas dejen de ser habitables; muchas especies tendrán que emigrar para no perecer; los fenómenos climatológicos extraños probablemente serán mucho más frecuentes; y las principales víctimas humanas viven en las naciones más pobres donde enfermedades de origen vectorial como la malaria, la disentería y la salmonela se están propagando y en muchas regiones escapan a todo control" (Brown, 2002).

Para compartir de una manera equitativa los gastos destinados a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero se debe distribuir equitativamente el volumen total permisible de emisiones entre todos los seres humanos, y asignar una fracción adecuada a los gobiernos, al mismo tiempo que se va reduciendo gradualmente el volumen permitido hasta alcanzar la disminución del 60% requerida por el IPCC.

PROBLEMAS INTERGENERACIONALES

La situación intergeneracional tiene relación con la disponibilidad de los recursos que debe garantizar el hombre para sus descendientes y las generaciones futuras, es decir los recursos naturales deben administrarse y gestionarse desde la sostenibilidad. El término de desarrollo

sostenible lo define por primera vez Brundtland 1987 como: "*El desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer las suyas*".

Este concepto se oficializó en la cumbre de la Tierra en Río de Janeiro en 1997. En septiembre de 2015 las Naciones Unidas, por medio de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, se plantean los objetivos para lograr el Desarrollo Sostenible y las metas comunes con el fin de proteger el planeta y garantizar el bienestar social.

Hans (1995) indica que se debe actuar de tal manera en no poner en peligro las condiciones de continuidad indefinida de la humanidad en la tierra. Sin embargo, ya se ha definido que estamos viviendo la nueva era geológica denominada como antropoceno por Crutzen y Stoermer (2000), caracterizada por el impacto del hombre sobre la Tierra y se vislumbra que tiene un tiempo de duración limitado.

PROBLEMAS INTERESPECÍFICOS

Con respecto a los problemas interespecíficos, el hombre tiene que compartir los recursos con otras especies bien sea por alimentación, espacio y recursos, pero teniendo la ventaja de modificar el ambiente hasta cierto límite a su conveniencia, se establece un compromiso de gestionar bien el medio ambiente, tiene que realizarlo desde un punto de vista ético-ambiental basado en el respeto.

Puede considerarse que la ética podría ser asimétrica, ya que en la filosofía vista desde un punto antropocéntrico existe un dilema sobre si los seres vivos diferentes a los humanos tienen su mismo valor intrínseco y habría que introducir el criterio

de gradación para evitar la desigualdad con los humanos.

ANTROPOCENTRISMO TRADICIONAL

De acuerdo con Villarroel (2007), la ética ambiental surge a mediados del siglo XX como una respuesta a dos importantes desafíos; en primer lugar, el hombre como centro del universo se asigna así mismo la pretensión de superioridad moral sobre las otras especies del planeta manifestadas sin reserva, y en segundo término a la posibilidad de encontrar argumentos racionales que permitiesen asignarles un valor intrínseco al ambiente natural y sus elementos no humanos.

Retomando la idea de Leopold (1949) quien plantea que en la tierra está presente una comunidad de entidades vivas que se integran en la Naturaleza (en la actualidad se podría interpretar como una visión de Biodiversidad) que ha sido creada para amarla y respetarla, no para degradarla, además que en cierto aspecto la naturaleza le ha "trasmitido" la cosecha de la cultura, no solo la alimentaria a través del desarrollo de las actividades agropecuarias, sino extensiva a otras actividades y expresiones humanas.

Sin embargo, la ética humanista no justifica una ética ambiental considerándola una utopía de alguna forma, ya que si se realiza una buena gestión ambiental no tiene sentido la existencia de esta.

De acuerdo con Attfeld (2010) en su planteamiento sobre las consecuencias para la teoría ética, los filósofos ambientales que no aceptan la extinción de especies por razones independientes a los intereses humanos no admiten que las especies tienen o no una condición moral independientemente de sus individuos,

aunque posiblemente todos coinciden que todos los individuos tienen una condición que preservar. Otros filósofos no están de acuerdo con ese planteamiento y más bien relacionan los problemas del entorno solo con intereses humanos (antropocentrismo) y que las políticas asociadas no se diferencian de las implícitas en el Biocentrismo.

HIPÓTESIS DE CONVERGENCIA

El antropocentrismo se sustenta en políticas ambientales para preservar las generaciones presentes y futuras donde los valores humanos estén igualmente considerados en ambos casos y debieran ser indistinguibles de las políticas basadas en el valor intrínseco que se le ha atribuido a la naturaleza. Norton (1984) plantea esta propuesta como una hipótesis de convergencia para aceptar un antropocentrismo considerado por el autor laxo o débil, pero puede ser tomado en cuenta siempre y cuando incluya material humano, científico, estético y valores espirituales.

De acuerdo con el autor, suponer que la ética ambiental debe ser no antropocéntrica con el fin de ser aceptada o adecuada, es un error. Hay dos formas de antropocentrismo: débil y fuerte. El débil es adecuado para sustentar a la ética ambiental desde una visión no individualista, más bien colectiva.

RAÍCES HISTÓRICAS DEL DETERIORO DEL MEDIO AMBIENTE

Evidentemente a pesar de justificar el antropocentrismo y otras corrientes filosóficas que incluyen valores como la protección del medio ambiente, es una realidad que existe una progresiva destrucción del medio ambiente y del entorno del hombre. Se ha argumentado

que el pensamiento cristiano podría ser el precursor de esta situación, ya que a través de los dogmas de fe se ha animado indirectamente a la sobreexplotación de los recursos naturales al considerarse la naturaleza como inagotable por ser el hombre el centro de la creación y las otras especies creadas para su uso irrestricto. Sin embargo, el pensamiento judeocristiano, a través del antropocentrismo, se puede interpretar desde dos corrientes: la primera la naturaleza es una despensa inagotable que conlleva a un aprovechamiento del hombre sin proponer una gestión para su mantenimiento y conservación; esta actitud ha traído como consecuencia el desarrollo de una sociedad de consumo que ha llevado a la destrucción progresiva de los ecosistemas. Alternativamente, el hombre al tomar consciencia de su entorno como ser integrante del mismo se convierte en garante de la preservación de la obra divina y procura mantenerla a través de una gestión responsable (ética ambiental).

Previamente en las publicaciones de Aristóteles se hallan indicios del antropocentrismo al considerar que las especies vegetales existen para el uso de los animales y estos a su vez para satisfacer las necesidades del hombre, se puede considerar una incipiente idea de las cadenas tróficas de la teoría ecológica.

AMBIENTALISMOS REFORMISTA Y FUNDAMENTALISTA

Villarroel (2007) indica que en los años 70 había debates éticos, políticos y legales sobre los problemas del entorno, en ese entonces se identificaban dos grupos ambientalistas diferenciados por sus posiciones filosóficas entre: moderados y extremos. El primer grupo defendía la hipótesis del ambientalismo reformista,

este grupo se dedicó a asesorar a las empresas y gobiernos para apoyar la iniciativa de lograr disminuir los impactos ambientales y el agotamiento de los recursos naturales que se generan durante el desarrollo de las actividades por medio de la proposición de medidas preventivas, mitigantes y correctivas. En contraposición, los extremistas abogaban por un ambientalismo fundamentalista cuya visión es hacer una transformación radical estableciendo novedosas y rigurosas prioridades sustituyendo el modelo tecnológico-industrial por medio de la eliminación del capitalismo y del individualismo liberal causantes de la devastación antropogénica del ambiente.

ECOLOGÍA SUPERFICIAL Y ECOLOGÍA PROFUNDA

Adicionalmente a estas tendencias, Naess (1973) a principios de la misma década de los 70, diferenciaba complementariamente dos tipos de propuestas sobre la interpretación de la ecología; superficial y profunda. El autor considera que la ecología superficial se caracteriza por ser de carácter antropocentrista, y en si es una ciencia más del grupo de ciencias de la tierra, tal como son la oceanografía o la meteorología. Así, un ecologista superficial se dedica a apoyar a las empresas en evitar impactos ambientales negativos, asesoran a los gobiernos y empresas en la gestión del medio ambiente con el fin de optimizar el rendimiento del aprovechamiento de los recursos naturales y además advertirles sobre problemas ambientales generados por las tecnologías utilizadas. Hay una sinergia del ambientalismo reformista con la ecología superficial. En cambio, la ecología profunda se propone desde el concepto de Igualitarismo bioesférico

(Devall y Sessions, 1985) citado en Villarroel (2007), se basa en el respeto que se debe tener al valor intrínseco de la naturaleza, lo que contribuiría a una mejor calidad de vida que es independiente del aprovechamiento de los recursos naturales por el ser humano, promoviendo que todos los seres vivos tienen el mismo derecho de vivir y prosperar. Con esta premisa Naess (1973) formula los nudos en la red bioesférica; es un campo de relaciones identitarias, intrínsecas e insolubles según Villarroel (2007) al tratarse el humano así mismo con cuidado, también lo estaría haciendo con el medio ambiente del cual forma parte y sería una solución para la crisis medio ambiental causada por la forma como el hombre explota a la naturaleza sin una ética ambiental.

De acuerdo con Attfield 2010, el concepto del valor intrínseco ha desempeñado un papel protagónico en la ética ambiental, ya que se aplica a todo aquello que merece ser promovido o preservado por su propia naturaleza tenga un valor estético o un valor instrumental (utilitario) y sea o no una fuente de valor estético para el hombre. Para Villarroel (2007) el principio de igualdad bioesférica resultó indeterminado debido a la falta de consistencia, y por la falta de relevancia moral de los seres no humanos principalmente aquellos con menor complejidad biológica. Al final esta propuesta terminó convirtiéndose en una perspectiva de mediación entre propuestas filosóficas y planteamientos religiosos de diversas culturas.

La ecología profunda tiene sus cuestionamientos por parte de feministas quienes consideran que la teoría del yo extendido en la cual se basa es un pretexto de forma antropocéntrica androgénico que irrespeta a la naturaleza al no considerarla

como un "ente independiente del interés y bienestar del humano".

ECOFEMINISMO ECOLÓGICO

Para Warren (1990) el ecofeminismo ecológico es una posición que involucra importantes conexiones: históricas, experiencias simbólicas y teóricas entre la dominación del hombre sobre la mujer y la naturaleza, argumenta que esta posición suministra un marco de referencia para el desarrollo de una ética ambiental que cuestione seriamente la conexión entre el dominio del hombre sobre la mujer y la naturaleza. Warren (1990) plantea que, sin dominación, siendo el hombre diferente a los otros seres vivos puede modificar y gestionar conscientemente las comunidades en las que habita, aunque también considera como alternativa que los humanos son "similares" a las plantas y rocas perteneciendo todos a una comunidad ecológica. Sin embargo, el humano siempre se ha considerado superior a los otros seres por la habilidad consciente que tiene de transformar radicalmente las comunidades, de este modo no se puede asumir cualquier distinción moralmente relevante entre el hombre y los otros seres. Warren (2009) indica que una ética ambiental responsable también debe incluir el feminismo. De lo contrario, incluso la ética ecológica más revolucionaria, liberadora y holística no tomaría en consideración la interconexión entre las dominaciones de la naturaleza y de las mujeres que son tanto una parte del legado histórico y del marco conceptual que sanciona la explotación de los seres no humanos. No hacer visibles estas interconexiones, ambas dominaciones dan como resultado una cuenta inexacta de cómo es que la naturaleza ha sido y sigue siendo dominada y explotada, dando

como resultado una ética ambiental que carece de la profundidad necesaria para ser verdaderamente inclusiva de las realidades de las personas, que al menos en la cultura occidental dominada por el hombre han sido íntimamente ligadas a esa explotación, a saber, las mujeres. Aún más, se puede decir a favor de tal ética ambiental, es tratar de hacer visibles las percepciones ecofeministas en denominadores comunes de las opresiones de las mujeres y la naturaleza es perpetuar, en lugar de superar, la fuente de esa opresión. De acuerdo con Collins (1974), uno de los pilares en los que se basa el patriarcado otra forma de ver la dominación del hombre sobre la mujer y la naturaleza es la devastación medioambiental.

LA ÉTICA AMBIENTAL Y LA GESTIÓN SOSTENIBLE

En la actualidad todos aquellos esfuerzos que se han realizado en materia de conservación no han contrarrestado significativamente los problemas ambientales, por lo tanto, para Kinne (1997) en Castro y col. (2009), es imperativo tomar conciencia ambiental, es importante que los gobiernos se involucren y reconozcan la existencia de una crisis en la civilización que incluye una crisis ecológica con consecuencias negativas a escala planetaria, nos debería inducir a un cambio de actitud generando un cambio en el pensamiento en la humanidad reconociéndose como una especie más parte de la naturaleza (Castro y col., 2009). Este cambio de actitud favorable se garantiza al tomar en cuenta la ética ambiental como una referencia. Por medio de la educación ambiental se aspira a que las nuevas generaciones tengan la oportunidad de participar de un cambio positivo, incorporando la ética ambiental

como una referencia en la cultura, y así se garantice y enriquezca la biodiversidad durante el período que dure el antropoceno.

Adicionalmente hay que tomar en cuenta la ética ambiental como referencia para implantar una gestión sostenible responsable, entendiéndose ésta como una serie de valores humanos, éticos y medioambientales, desde la perspectiva de calidad y excelencia, que tiene por objeto dotar a las sociedades de un instrumento de referencia para el desarrollo sostenible de las empresas, instituciones y comunidades, asegurando la competitividad y fortaleciendo el tejido económico y social del planeta. (en: <https://www.rumbosostenible.com/gestion-sostenible/que-es-la-gestion-sostenible/>)

La gestión sostenible se apoya en tres pilares fundamentales que son: el medioambiente, las generaciones futuras y la economía, los cuales son utilizados para activar la habilidad de hacer que un sistema prospere, mantener la viabilidad económica y velar por la identificación de las necesidades de las generaciones presentes y futuras en relación con la limitación de la disminución de los recursos naturales.

Una gestión sostenible tomando como referencia la ética ambiental para tener un mayor estado de conciencia en la toma de decisiones se hace necesario, porque una gran parte de la habilidad es mantener un buen nivel de calidad de vida en nuestro planeta.

Atfield (2010) sostiene que ante la presencia de los problemas ecológicos actuales como consecuencia de la falta de considerar a la ética ambiental como base para gestionar los recursos, se debe realizar una revisión profunda de la teoría ética tradicional, expresa que los filósofos ofrecen teorías distintas sobre la

diferentes gamas de “pacientes morales” (entidades que debemos conceder consideraciones morales), los filósofos plantean dos tendencias yuxtapuestas: las comunitaristas quienes incluyen solamente aquellos seres que comparten tradiciones o relaciones actuales y los universalistas o cosmopolitas que amplían hacia otros elementos.

Ante este ejemplo, se ilustra que los especialistas deben reconocer la importancia de la ética del desarrollo, permite procesos de participación por medio de los cuales las naciones y sus poblaciones logran evitar la pobreza, la malnutrición, enfermedades endémicas, analfabetismo y otros males asociados (Attfield, 2010). La idea es estar en concordancia con el desarrollo y conciliarlo con objetivos ambientales en especial la sostenibilidad. Al tener las especies que habitan en el bosque un valor intrínseco independiente de los beneficios que aportan al hombre, se hace necesario imponer restricciones a las políticas máximo rendimiento sostenible.

Attfield (2010) indica que en los años 1994 y 1995 se sostuvo un importante debate sobre dos maneras de interpretar la sostenibilidad; una sostenibilidad fuerte vs. una sostenibilidad débil, ambas con ventajas e inconvenientes, respectivamente. En el primer caso se imponen límites al considerar que los capitales naturales y humanos pueden escasear eventualmente, mientras que la débil, no impone límites. Holland (1997) defiende el criterio de sostenibilidad fuerte, ya que hay que honrar y respetar hasta la última partícula de la naturaleza incluyendo todas especies. Contrariamente, Daly (1995) en Attfield (2010) argumenta que aquellos que defienden la

sostenibilidad fuerte no necesariamente se comprometen a preservar todas las especies considerándose una contradicción, aunque Daly no reconoce el valor intrínseco de la naturaleza. Sin embargo, Attfield (2010) reconoce estar de acuerdo con la posición de Daly, pero sostiene que una sostenibilidad fuerte contribuye a resguardar los ecosistemas naturales incluyendo las especies que en ellos habitan, evitando la perturbación de los hábitats y los recursos naturales que los humanos podrán utilizar en el futuro. También el enfoque de una sostenibilidad dura puede ser una base para la formulación de políticas de preservación de la biodiversidad que incluyan planes para la protección de especies en peligro de extinción contra las actividades comerciales y caza furtiva.

POLÍTICA DE MÁXIMO RENDIMIENTO

El desarrollo sostenible y la conservación de la biodiversidad tiene una relación directa con la política del máximo rendimiento sostenible, así Attfield indica que los bosques actuales se pueden preservar a perpetuidad al mismo tiempo que son aprovechados sus recursos, con esta gestión sostenible el ser humano acepta no extraer del bosque más de lo que su regeneración natural pueda reemplazar ante la próxima tala, por lo tanto al respetar este límite máximo tanto la generación actual como las futuras pueden aprovecharse de este rendimiento sostenible.

La política de máximo rendimiento sostenible presenta tres tipos de problemas:

- 1) Errores en el cálculo del rendimiento máximo sin riesgo y falta de precaución.
- 2) Considerar como premisa que los valores contextuales no varían (leyes de la naturaleza).

3) Dependier de una premisa que considera a los ecosistemas como un recurso, un bien consumible o un activo que se libra del consumo inmediato.

Tomando en cuenta la idea de que los ecosistemas son consumibles, la probabilidad de persistencia en el tiempo de un número importante de especies está comprometida debido a que su hábitat será eliminado progresivamente. Con respecto a este planteamiento Atfield (2010) cita literalmente: *“si las criaturas vivas del bosque tienen un valor independiente de los beneficios que aportan a la humanidad, es necesario imponer limitaciones a las políticas de máximo rendimiento sostenible, aun en el caso de los otros problemas que afectan esas políticas sean insignificantes”*

Uno de los objetivos de la gestión sostenible es la conservación de las especies con una injerencia mínima en sus ecosistemas y hábitats, así que el beneficio del ser humano no es el único criterio de sostenibilidad ecológica y en consecuencia hay que reconocer políticas y prácticas de desarrollo sostenibles bien entendidas.

LEGADO ANCESTRAL DE LA CULTURA INDÍGENA AMERICANA

Agar (2004), citado por Meza (2017) refiere que los pueblos tribales e indígenas conservan su sabiduría milenaria, cultura, tradiciones, costumbre, lenguas y creencias, poseen una cosmovisión. De acuerdo como indica Meza, Dilthey (1974) define la cosmovisión como la “visión del mundo” que incluye elementos míticos, mágicos, religiosos, artísticos, racionales, científicos, filosóficos entre otros.

Las culturas precolombinas aportan un legado de visión cosmogónica que debe

ser rescatado oportunamente en aras de enriquecer la cultura actual con la ética ambiental para las futuras generaciones. Ruiz (2009) cita textualmente sobre la sabiduría de los toltecas el siguiente pensamiento referido a la consciencia del hombre sobre cómo justificar su existencia en el planeta: *“este descubrimiento cambió su vida. Una vez supo lo que en verdad era, miró a su alrededor y vio a otros seres humanos y al resto de la naturaleza, y le asombró lo que vio. Se vio a sí mismo en todas las cosas: en cada ser humano, en cada animal, en cada árbol, en el agua, en la lluvia, en las nubes, en la tierra...y vi que la vida mezclaba el tonal y el nagual de distintas maneras para crear millones de manifestaciones de vida”*.

Estas millones de manifestaciones de vida se pueden interpretar como una forma de conceptualizar la biodiversidad.

Los proverbios indígenas le dan importancia a la naturaleza, plantean una reflexión sobre como moderar la imposición del humano sobre los otros seres y los elementos naturales. Asimismo, advierten sobre la responsabilidad del hombre frente a las demás formas de vida: *“Cuando el último árbol sea cortado, el último río envenenado, el último pez pescado, solo entonces las personas se darán cuenta de que el dinero no se puede comer”* (proverbio de la etnia Cree). Todo en la tierra tiene un propósito, cada hierba puede curar una enfermedad, cada persona tiene una misión que cumplir.

Este conocimiento tradicional puede aportar una contribución significativa en el fomento del desarrollo sostenible (Convenio sobre diversidad biológica, 2012). La mayoría de las etnias habitan en regiones donde se localizan la mayoría de los recursos genéticos, han cultivado

y utilizado los mismos de una manera sostenible y responsables por durante milenios, sus prácticas promueven la biodiversidad localmente y mantienen a los ecosistemas en un estado saludable.

Cada vez hay más reconocimiento por la comunidad científica sobre sus conocimientos tradicionales, son valiosos no solo para el sustento de las comunidades indígenas, sino también para la industria moderna, actividades agrícolas y pecuarias. Sus productos son valorados en sus aplicaciones tradicionales incluyendo plantas medicinales utilizadas en la fabricación de medicamentos y cosméticos. Sus propiedades intrínsecas son tomadas en cuenta por los investigadores con el objetivo de desarrollar nuevos productos. Sin embargo, de acuerdo con el código de conducta, existe una preocupación por parte de los indígenas sobre los aspectos negativos que puedan generarse, como el impacto ambiental negativo por la sustracción no controlada de los recursos naturales en su hábitat.

Este planteamiento tiene una relación directa con la industria farmacéutica, sus investigadores deben tener una actitud ética y de respeto a las comunidades indígenas y a su cultura porque son los garantes del conocimiento científico sobre las propiedades (principios activos) de las plantas y animales.

Como conclusión, basados en las anteriores tendencias filosóficas relacionadas con el manejo de la naturaleza, es propicia la oportunidad de implementar un modelo de desarrollo alternativo considerando los aspectos positivos de las tendencias anteriormente expuestas, basándose en la ética ambiental como fundamento para garantizar el desarrollo sostenible y una mejor calidad de vida para el ser humano conviviendo armónicamente con las otras especies vivientes. El desarrollo

sostenible (perpetuo) se basa en la mejora de la calidad de vida, implica un incremento ininterrumpido del bienestar humano, y cada generación tiene derecho a disfrutar de una calidad de vida superior a la su predecesora (el desarrollo es un proceso de mejora y el término sostenible hace referencia a perpetuidad). Se debe preservar el conocimiento ancestral, pero con un mayor nivel de consciencia y considerar a la ética ambiental como una referencia para garantizar un desarrollo y una gestión sostenible de los recursos naturales. Esta referencia está directamente relacionada con el planteamiento de desarrollo sostenible de las naciones, por lo cual la Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) adoptó un compromiso al publicar la agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Para lograrlo, se establece un plan de acción a favor de las personas, el planeta y la prosperidad, para así fortalecer la paz mundial y acceso a la justicia. Los estados miembros aprueban la resolución para estimular iniciativas orientadas a tratar de erradicar la pobreza para lo cual se necesita implantar las bases de un Desarrollo Sostenible.

<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/>

Referencias Bibliográficas

- Agar Corbinos L. 2004. La ética de la investigación en ciencias sociales en el contexto de la globalización de la investigación cuantitativa a la investigación cualitativa. *Acta Bioética* 10(1): 65-68.
- Attfield R. 2003. *Environmental Ethics. An Overview for the Twenty-first Century*. Oxford. Blackwell. London.
- Attfield R. 2010. La ética ambiental y la sostenibilidad global. En *ética Ambiental y políticas internacionales*. Ediciones Unesco. Sector de ciencias sociales y humanas, división de la ética de la ciencia y la tecnología. ISBN 978-92-3-304093. Paris.

- Brown DA. 2002. American heat: ethical problems with the United States response to global warning. Rowman & Littlefield Publishers Inc. Lanham, Boulder, New York, Oxford.
- Castro Cuéllar A, Cruz Burguete JL, Ruiz-Montoya L. 2009. Educar con ética y valores ambientales para conservar la naturaleza. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca México. *Convergencia. Revista de Ciencias Sociales* 16(50): 353-382.
- Collins SA. 1974. Different heaven and earth. A feminist perspective on religion. Valley Forge, Pennsylvania: Judson Press. Daly, Mary. *Beyond God the Father: Toward a Philosophy of Women's Liberation*.
- Convenio sobre diversidad biológica. Tkaríhwaié: ri. Código de conducta ética para asegurar el respeto al patrimonio cultural e intelectual de las comunidades indígenas y locales pertinentes para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica. La secretaría del convenio sobre diversidad biológica. Montreal Canadá: 20 p. 2012.
- Crutzen PJ, Stoermer EF. 2000. The "Anthropocene". In *Global Change Newsletter* 41: 17-18.
- Devall B, Sessions G. 1985. *Deep ecology: Living as if Nature mattered*. Gibbs Smith Publisher. U.S.
- Dilthey W. 1974. Teorías de las concepciones del mundo. Ediciones de la Revista de Occidente Bárbara de Braganza, 12. Madrid.
- Gabi. 2018. Ken Wilber y el diálogo con la nueva era. Filosofía. Esfinge. Disponible en: <https://www.revistaesfinge.com/2018/12/ken-wilber-y-el-dialogo-con-la-nueva-era/>
- Hans J. 1995. *El principio de Responsabilidad: ensayo de una ética para la civilización tecnológica*. Heder: Barcelona, Cataluña, España.
- Holland A. 1997. Substitutability: why strong sustainability is weak and absurdly strong sustainability is not absurd, en J. Foster ed. *Valuing nature? Economics, ethics, and the environment*, Londres, Routledge, pp. 119-134.
- Issberner L, Léna P. 2021. Antropoceno: la problemática vital de un debate científico. UNESCO: Correo, un solo mundo, voces múltiples, Gran Angular. e-ISSN 2220-2315.
- Kant I. 2013. *Crítica de la razón pura 1781*. Alianza Editorial. España. ISBN: 978-84-206-7611-1. España.
- Lecaros JA. 2013. La ética medio ambiental: principios y valores para una ciudadanía responsable en la sociedad global. *Acta Bioethica*. 19(2):177-188.
- Leopold A. 1949. *A Sand County Almanac and Sketches Here and There*. University Press. Oxford, London, U.K.
- Light A, Rolston H III (eds.). 2003. *Environmental ethics: An anthology*. Blackwell, Oxford. Pp175.
- Marcos A. 1999. *Ética Ambiental*. Universitas Philosophica 16: 31-57.
- Meadows DH, Meadows DL, Randers J, Behrens W. 1972. *The limits to Growth*. Universe Books, New York, 1972.
- Meza G. 2017. Ética de la investigación desde el pensamiento indígena: derechos colectivos y el principio de la comunalidad. *Bioética y Derecho* 41: 141-159.
- Naciones Unidas: Informe Brundtland. Informe de la Comisión mundial Sobre el Medio Ambiente y Desarrollo. 1987.
- Naciones Unidas. The Paris Agreement. Climate Change. Process and meetings United Nations Framework Convention on Climate Change 2016.
- Naess A. 1973. The shallow and the deep, long-range ecology movement. A summary. *Inquiry* 16: 95-100.
- Norton BG 1984. Environmental ethics and weak anthropocentrism. *Environmental Ethics* 6(2): 131-148.
- Objetivos y metas del desarrollo sostenible. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>
- Real Academia Española: Diccionario de la lengua española, 23.a ed., (versión 23.5 en línea). <https://dle.rae.es> (17/01/2021).
- Ruiz M. 2009. Los cuatro acuerdos. Un libro de sabiduría Tolteca. Ed. Urano. ISBN 10 84793253X <https://www.un.org/spanish/conferences/wssd/unced.html>. 2002. Consultado el 18 de enero de 2022. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/> Consultado el 17 de marzo de 2022. <https://www.rumbosostenible.com/gestion-sostenible/que-es-la-gestion-sostenible/> Consultado el 17 de marzo de 2022.
- Villaruel R. 2007. Ensayo de hermenéutica referido al entorno. *Ética y Medio Ambiente*. 63: 55-57.
- Warren K. 2009. The power and promise of ecological feminism. *Environmental Ethics*. 12: 125-144.
- Wilber K. 2001. *Una Teoría del Todo. Una visión integral de la ciencia, la política, la empresa y la espiritualidad*. Barcelona: Kairós. ISBN 978-84-7245-495-8.
- Wilber K. 2005. *Boomeritis. Un camino hacia la liberación*. Kairós, Editorial S.A. ISBN 8472455661, 9788472455665.



Atención a las serpientes “semivenenosas” en Venezuela: sus aspectos bioecológicos, farmacológicos y médicos

Attention to “semi-venomous” snakes in Venezuela: their bioecological, pharmacological, and medical aspects

ALEXIS RODRIGUEZ-ACOSTA^{1,2}

Resumen

Las serpientes “semi-venenosas” no poseen una glándula clásica de veneno, como las Viperidae, las cuales tienen una glándula rodeada de un aparato muscular y colmillos con conductos que actúan como una aguja hipodérmica, sino que derraman su veneno a través de un canal en la pared del colmillo (opisthoglifas). Estas serpientes a través de la adaptación han desarrollado una glándula productora de toxinas, que le permiten capturar y matar a sus presas. Esta glándula llamada de Duvernoy, produce una secreción venenosa que es una combinación de proteínas biológicamente dinámicas con variadas influencias farmacológicas demostrando lo contrario de las rutas fisiológicas que mantienen la homeostasis de las presas. Esta secreción se desarrolla durante el curso de la adaptación, la ecología y la evolución de las especies venenosas debido a su participación en la captura de presas, digestión y mecanismo de defensa contra los depredadores. Los componentes del veneno de serpiente ejercen fuerzas selectivas tanto en la presa como en los depredadores e hipotéticamente ofrecen un punto de vista distintivo y dual sobre la co-evolución depredador-presa. En el presente trabajo hacemos una descripción de las principales serpientes semi-venenosas que representan un problema médico en Venezuela.

Palabras clave: Colubridae, Dipsadidae, opisthoglifos, secreción de la glándula de Duvernoy, venenos

Abstract

“Semi-venomous” snakes do not possess a classic venom gland, like the Viperidae, with a muscular apparatus and fangs with ducts that act like a hypodermic needle, but instead, spill their venom through a channel in the wall of the fang (opisthogyphs). Most of these snakes have oral products (Duvernoy’s secretions, or venoms) with unknown biomedical properties, and their potential for causing harm to humans is unknown. Through adaptation, these snakes have developed a gland that produces toxins, which allow them to capture and kill their prey. This gland, called Duvernoy, produces a venomous secretion that is a combination of biologically dynamic proteins with varied pharmacological influences demonstrating the inverse of the physiological routes that maintain prey homeostasis. This secretion implies during adaptation, the ecology and evolution of venomous species due to its participation in prey capture, digestion, and mechanism of defence against predators. Snake venom constituents put forth selective forces on both prey and predators and hypothetically offer a distinctive, dual viewpoint on predator-prey coevolution. In the present work, we make a description of the main semi-venomous snakes that represent a medical problem in Venezuela.

Keywords: Colubridae, Dipsadidae, Duvernoy’s gland secretion, opisthogyphs, venoms

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 de la 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)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.3](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.3)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 13/02/2022

Aprobación: 20/04/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 20-31. 2022

Introducción

El veneno de serpiente es una combinación de proteínas biológicamente activas con múltiples efectos farmacológicos que representan lo contrario de los procesos fisiológicos que mantienen la homeostasis de la presa (Jansa y Voss, 2011), que, a través de la adaptación evolutiva, mantienen una lucha entre depredador y presa, donde cada especie trata de adaptarse y sobrepasar los cambios protectores, que genera la genética de cada animal. El depredador, elabora cambios de adaptación para sobrepasar los cambios genéticos de la presa, para hacerse resistente a las toxinas del depredador. Las toxinas, así definen la ecología, y adaptación de las especies venenosas debido a su participación en la captura de presas, la digestión y la defensa (Jansa y Voss, 2011). Estas señales moleculares de adaptación junto con la variación composicional sugieren que la diversificación de toxinas es una adaptación a la dieta y puede reflejar una carrera de supervivencia depredador/presa (Casewell y col., 2009). Las toxinas de los venenos de serpiente ejercen presiones selectivas sobre ambos: presas (Pifano y col., 1993; Pifano y Rodríguez-Acosta, 1996; Biardi y col., 2000; Biardi y col., 2011) y depredadores (Jansa y Voss, 2011), y potencialmente ofrecen una única, dual perspectiva de la co-evolución depredador/presa.

Desarrollo

Los colúbridos opistoglifos han sido durante mucho tiempo subestimados por la mayoría de los investigadores de toxinas y los médicos tratantes, ya que se asumía que su veneno era de escasa significación debido a su importancia menor en los seres humanos. Pero en el caso de muchas serpientes opistoglifas, el veneno puede causar fuertes reacciones en los humanos.

Otras particularidades que han favorecido a esta falta de atención incluyen la poca cantidad de veneno que suelen inyectar y el bajo potencial letal de la mayoría de las serpientes opistoglifas.

Las serpientes semi-venenosas en Venezuela han sido incluidas en la familia Colubridae, pero la clasificación de la Familia Colubridae en Subfamilias es bastante complicada y a este instante no existe ninguna opción taxonómica del todo satisfactoria, aunque en Venezuela se considera que existen las Subfamilias: Colubrinae y Dipsanidae (Vidal y col., 2007, Zaher y col., 2009). En estudios recientes ambas familias de serpientes fueron reagrupadas en el concepto ortodoxo en una sola familia Colubridae (Estrella y col., 2011a; 2011b). Existen en el país alrededor de 40 géneros que representa el 74% del total de las serpientes del país (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019).

Los síntomas del envenenamiento ofídico ocasionado por las serpientes de la Familia Colubridae, son el resultado de la combinación de efectos de las diversas toxinas, enzimas y no-enzimas que constituyen el veneno de la especie involucrada. La composición de los venenos de Colubridae está sometida a gran variabilidad, lo que constituye un aspecto muy importante a considerar en la investigación de su composición, efectos tóxicos, bioquímicos y hemostáticos, ya que cada veneno constituye una mezcla única de péptidos y proteínas elegidas por selección natural para actuar sobre los sistemas vitales de sus presas. Estas diferencias cualitativas y cuantitativas entre venenos se muestran a nivel de familias, géneros, especies e inclusive intra-especies.

En su aspecto externo, la mayoría tienen un cuerpo grácil, liso, con una

coloración brillante y muy diversa. En Venezuela se tiende a dividir las en dos grupos por la variedad de su coloración; aquellas especies que presentan manchas o bandas transversales oscuras y claras son comúnmente llamadas "tigras". En este conjunto hay algunas especies que asemejan su coloración con algunas venenosas, que dificulta distinguir las de ellas. Las de coloración pareja o con líneas longitudinales, son llamadas "cazadoras".

Son animales, en su mayoría de actividad diurna, con ojos bien desarrollados y pupila generalmente circular. La mayoría son terrestres, pero hay también especies arborícolas, acuáticas y excavadoras, irrumpiendo prácticamente en cualquier hábitat (Pontes-Nogueira y col., 2021). En su mayoría son pequeñas e inofensivas evitando el contacto con los humanos, pero cuando se ven atrapadas se escudan con rabiosos mordiscos, capaces de dejar heridas severas (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019). Entre la familia de los Colúbridos hay ciertas especies opistoglifas (ostentan colmillos posteriores), consideradas inexactamente como "semi-venenosas" para los humanos (Poey, 1873; Assakura y col., 1994), habido a que su veneno es de escasa potencia, y la estructura, posición y mecanismo de inyección de los colmillos reduce la garantía de la inoculación en comparación con serpientes de dentición frontal solenoglifas y proteroglifas. Sin embargo, existen reportes de personas fallecidas por envenenamiento de estas especies (Lancini, 1979), lo cual hace esta clasificación totalmente incorrecta desde el punto de vista médico. Se seguirá usando el término, por razones didácticas, hasta que se esclarezca y salga una nueva clasificación fundada en los hallazgos toxicológicos sobre efectos de estos venenos.

Concretamente, el sistema de inyección de veneno de los colúbridos se despliega menos eficiente que el existente en Viperidae y Elapidae, especialmente porque en sus glándulas de Duvernoy no existe el aparato del músculo compresor que debe generar la presión embólica necesaria para penetrar eficientemente la piel de las presas. La no existencia de este sistema de conducción del veneno es uno de los primordiales motivos por las que se piensan menos importantes desde el punto de vista biomédico. Esta ha sido, hasta ahora, una de las razones de su poco estudio, además por supuesto, la dificultad de las extracciones y la poca cantidad de veneno que se puede obtener, en estas serpientes. De aquí, que sus venenos han sido escasamente estudiados, en comparación de los venenos de Elapidae y Viperidae (Junqueira-de-Azevedo y col., 2016; Lemoine y col., 2004 a,b).

Más de 500 especies de la familia Colubridae *sensu lato* son opistoglifas y producen venenos potentes donde se ha demostrado fuerte acción tóxica, con actividades hemorrágicas, neurotóxicas y proteolíticas: *Clelia*, *Erythrolamprus*, *Helicops*, *Leptodeira*, *Philodryas*, *Thamnodynastes* y una especie opistomegadonte Xenodontinae (Lemoine y col., 2004a; Lemoine y col., 2004b; Díaz y col., 2004; Rodríguez-Acosta y col., 2006; Zaher y col., 2009).

Con respecto a la especie *Clelia clelia* (Figura 1), llamada cazadora negra o tuqui habita en sabanas, selvas de galería, bosques premontanos, selva tropical y subtropical de las partes húmedas de la cordillera de la Costa y de los Andes, estado Zulia y las selvas que rodean al Orinoco en Apure y Amazonas hasta los 2000 metros sobre el nivel del mar (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019).



Figura 1. Tuqui (*Clelia clelia* Daudin, 1803). A) Ejemplar. B) Ofidiofaga.

Foto: Luis. F. Navarrete (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

El género *Clelia* es de importancia para los humanos y animales domesticados, ya que, por alimentarse especialmente de pequeñas cascabeles y mapanares, controlan la población de éstas en su hábitat natural. Es opistoglifa (caracterizada por la presencia de colmillos acanalados ubicados en la parte posterior de la boca) y preponderantemente ofidiofaga, pero pueden alimentarse también de pequeños mamíferos y lagartos. Mata por constricción, pero utiliza su veneno para acelerar la muerte de la víctima y probablemente para pre-digerirla.

Su nombre común es tuqui, ratonera o cazadora, geográficamente se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altitud en distintos países de América: México (Yucatán), irradiando hacia el sur por Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Panamá, Colombia, Guayana Francesa, Venezuela, Surinam, el noroeste del Ecuador, Bolivia, Uruguay, Paraguay, norte de Argentina (Mendoza, La Pampa, Entre Ríos, Jujuy, Misiones), Brasil (Pará, Amazonas, Rio Grande do Sul) y Perú (región occidental hasta llegar a Pasco). Se ha descrito también en las Antillas menores (Dominica, St. Lucia, Barbados), Granada y Trinidad (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019).

Los accidentes humanos informados en el país son raros y no fueron mortales. Pinto

(1991) en Brasil reportó un caso, que presentó edema y sangramiento en la impronta de la mordedura. Chippaux y Goyffon (1989) reseñaron que las mordeduras por *Clelia clelia* produjeron hemorragia, necrosis e inflamación local. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales el veneno administrado a ratones no evidencia actividad hemorrágica (Navarrete y col., 1999).

Por su parte, *Erythrolamprus bizona* es similar por su coloración a una serpiente de coral, de allí que es llamada "falsa coral" (Figura 2). Tiene la cabeza negra hasta los postoculares, con una banda blanca detrás de las parietales. Los anillos rojos tienen de 7-10 escamas con el ápice negro. Es opistoglifa y ofidiofaga por excelencia, aunque también



Figura 2. *Erythrolamprus bizona* (Jan, 1863).

Foto: Javier Mesa (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

se alimenta de lagartos. Esta especie se describe desde Nicaragua, pasando por la costa del Pacífico y el Atlántico de Costa Rica, entrando por Panamá hacia Colombia y Venezuela, incluyendo a las Islas de Trinidad y Tobago. Habita preferentemente en suelos de bosque pre-montano y en bosques lluviosos (0 a 1500 m de altitud). Su mayor actividad la desarrollan en horas vespertinas y nocturnas (Savage, 2002). A pesar de conocerse muy poco acerca de la bioquímica y la farmacología del veneno de *E. bizona*, siendo opistoglifa y bajo estudio experimental en ratones y embriones de pollo, en nuestro laboratorio (Lemoine y Rodríguez-Acosta, 2003), pudimos demostrar en los roedores la aparición de edema y necrosis, síntomas neurotóxicos tales como disnea, parálisis flácida de extremidades posteriores y muerte antes de 114 minutos. Además, tuvo una enérgica acción hemorrágica en los tejidos de aves y mamíferos. Esta serpiente constituye una pila valiosa de toxinas con variadas funciones (actividades hemorrágicas, neurotóxicas y proteolíticas), algunas seguramente con potencial terapéutico, que estimulan para futuras investigaciones farmacológicas.

La *Helicops angulatus*, comúnmente conocida como Mapanare de agua, en cuyo género se describen 16 especies de serpientes acuáticas en los países sudamericanos, a excepción de Chile, se distribuye desde Colombia hasta Bolivia (Peters y Orejas-Miranda, 1970; Dixon y Soini, 1986; Martins y Oliveira, 1998). Es una serpiente que sale de sus madrigueras en horas tempranas de la tarde y penetra en los cursos de agua, para alimentarse principalmente por ranas y peces (Marques y Sazima, 2004) (Figura 3). Es de color pardo verdoso, con bandas transversales negruzcas y un vientre rojizo con manchas oscuras, midiendo hasta un metro de

longitud. Es una serpiente agresiva y mordelona, por lo cual ya se describen accidentes en humanos (Albolea y col., 2000). En nuestro laboratorio, trabajando con un ejemplar, observamos la mordedura de nuestro herpetólogo durante una manipulación en el serpentario por una *Helicops angulatus*. Presentó intenso dolor, seguido por parestesia en la mano mordida, con posterior sensación de adormecimiento labial y mareos. Con estos hallazgos, empezamos a estudiar experimentalmente este veneno en ratones y se hizo un estudio de la acción neurotóxica, hemorrágica y proteolítica de su veneno. No se observaron síntomas hemorrágicos en ratones inyectados con muestras de veneno crudo de *H. angulatus*, pero tuvo actividad proteolítica en la película de gelatina y caseína. Se pudo aislar una neurotoxina con sorprendente actividad que causó síntomas severos y mataba los ratones en 8 minutos, esta toxina se denominó Helicopsina (Estrella y col., 2011b). Estos inicialmente presentaron temblores, las patas se contrajeron y los ratones comenzaron a arquear la espalda, que dio lugar a una postura jorobada o agachada, y letargo,



Figura 3. *Helicops angulatus*, (Linnaeus 1758).
Foto: Luis F. Navarrete.
(Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

incapacidad locomotora por parálisis de las extremidades traseras. A los 8 minutos exoftalmia, taquicardia, relajación del esfínter, disnea, que se hizo evidente y la muerte (Estrella y col., 2011b).

Durante un viaje de trabajo de campo, en la Península de Paraguaná (estado Falcón, Venezuela), se pudo capturar un par de ejemplares de una falsa mapanare comúnmente llamada "Serpiente ojos de gato", cuyo nombre científico es *Leptodeira bakeri* (Figura 4).



Figura 4. *Leptodeira bakeri* (Ruthven, 1936).
Foto: Luis F. Navarrete
(Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

El género *Leptodeira* se encuentra distribuido extensamente desde México hasta la Argentina, extendiéndose orientalmente hasta la Guayana francesa. En Venezuela la *Leptodeira bakeri* solo se describe en península de Paraguaná del estado Falcón, y en la isla de Aruba. Es de hábitos nocturnos, de allí su pupila vertical y generalmente se encuentran cerca de zonas acuáticas, atraídos por sus principales presas; ranas, sapos y lagartijas (Lancini y Kornacker, 1989; Mijares-Urrutia y col., 1995). Se capturaron estos ejemplares en el Piedemonte del Cerro de Santa Ana, a 80 metros de altitud, donde ya había sido descrito (Mijares-Urrutia y col., 1995). Los

ejemplares presentaron una coloración de fondo marrón claro con manchas dorsales oscuras triangulares, y una franja post-ocular oscura semejante a las mapanares. Eran de una talla en promedio de 35 centímetros.

El veneno de esta serpiente se pudo comparar, desde el punto de vista de su dosis letal 50, con venenos de *Crotalus h. atricadatus*, *C. viridis*, y *Sistrurus catenatus edwardsii*, y fue aproximadamente 3 veces más potente que los venenos de *Crotalus atrox*, *C. molossus* y *Agkistrodon contortrix* de 5,1; 4,8 y 5,2 mg/kg, respectivamente (Estrella y col., 2011). Al inyectar este veneno en ratones se observó que producían una actividad neurotóxica pre y postsináptica con hiperestesia en el punto de inoculación, temblor, ataxia, parálisis flácida que podía causar la muerte en cuestión de 55 a 75 minutos por contracción abdominal y disnea progresiva; también tuvo actividad proteolítica en placas de gelatina, (actividad de colagenasa). Su acción hemorrágica se exploró en embriones de pollo y en peritoneo de ratones, observándose una intensa acción hemorrágica.

El género *Leptodeira*, se encuentra en México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Guayana Francesa, Trinidad, Tobago, Colombia, Venezuela, Brasil, Bolivia, Paraguay, norte de Perú, Argentina, y Ecuador (Lancini, 1979; Lancini y Kornacker, 1989), distribuyéndose en toda Venezuela, con localidad típica alrededor de Caracas.

La *Leptodeira annulata ashmeadii* (falsa mapanare) es una serpiente nocturna que se encuentra en el estrato subarboreal de formaciones boscosas y bosques de galería. Sus fuentes de alimentación incluyen huevos de rana, ranas, lagartijas, peces, renacuajos, sapos, serpientes y sus

propios huevos (Lemoine y col., 2004a) (Figura 5).

Al evaluar la actividad tóxica en ratones se demostró claramente una alta actividad neurotóxica, siendo las fracciones que causaron síntomas neurotóxicos en ratones, implicarían toxinas presinápticas y postsinápticas. Al estudiar la actividad hemorrágica en embriones de pollo se reveló una aguda actividad hemorrágica (Figura 6A). Además, el uso en ratones permitió observar también gran actividad hemorrágica en la piel (Figura 6B) y el peritoneo (Figura 6C) (Lemoine y col., 2004a), lo que establece que esta serpiente produce efectos hemorrágicos muy fuertes en los tejidos de los mamíferos. La comparación de la DL_{50} del veneno de *L. annulata ashmeadii* con los venenos de Viperidae indicó valores similares como el *C. vegrandis*, lo cual muestra la toxicidad importante de este veneno (Lemoine y col., 2004a) y sugiriendo que los accidentes pueden producir diversos síntomas en los seres humanos mordidos por la serpiente.



Figura 5. *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell, 1845). Foto: Luis F. Navarrete (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

Otra especie de gran importancia médica, dentro de los colúbridos es la *Philodryas olfersii* (Lora). Ella se ha descrito en Brasil, Paraguay, Argentina, Uruguay, Perú, Bolivia y Venezuela. Dentro del género *Philodryas* se han referido 21 especies, de las cuales dos especies (*olfersii*, y *viridissimus*) se han reportado para Venezuela (Natera-Mumaw y Manzanilla-Pippo, 2000; Rodríguez-Acosta y col., 1997; Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019).

En Venezuela, se describen en gran parte del territorio nacional. Se le localiza frecuentemente en zonas geográficas de características de sabanas, selvas de galería, áreas de selva tropical, hasta los 800 m de altitud y en regiones semi-áridas, al norte de la Cordillera de la Costa. Fenotípicamente exhibe una coloración verdosa uniforme (Figura 7) con la región ventral más clara.

Tiene un desplazamiento muy veloz en el piso de su hábitat y en las ramas de los árboles. Muy agresiva, se encrespa fácilmente y se ha reportado un alto número de casos de accidentes en humanos, caracterizados por presentar edema, eritema y equimosis, linfadenopatía regional, efectos neurotóxicos y efectos miotóxicos. Siendo estos síntomas, en ocasiones similares a los del envenenamiento bothrópico, sin trastornos coagulantes (Rodríguez-Acosta y col., 2006).

Nuestros hallazgos acerca de la acción del veneno de *Philodryas olfersii* en ratones in vivo y embriones de pollo, así como en placas de gelatina, mostró una fuerte actividad de gelatinasa, hemorrágica peritoneal y actividad hemorrágica en los embriones. Mostrando valores de dosis letal (LD_{50}) de 2,4 mg/kg peso. En los ratones inyectados con este veneno, a dosis subletales, se produjo síntomas neurotóxicos.

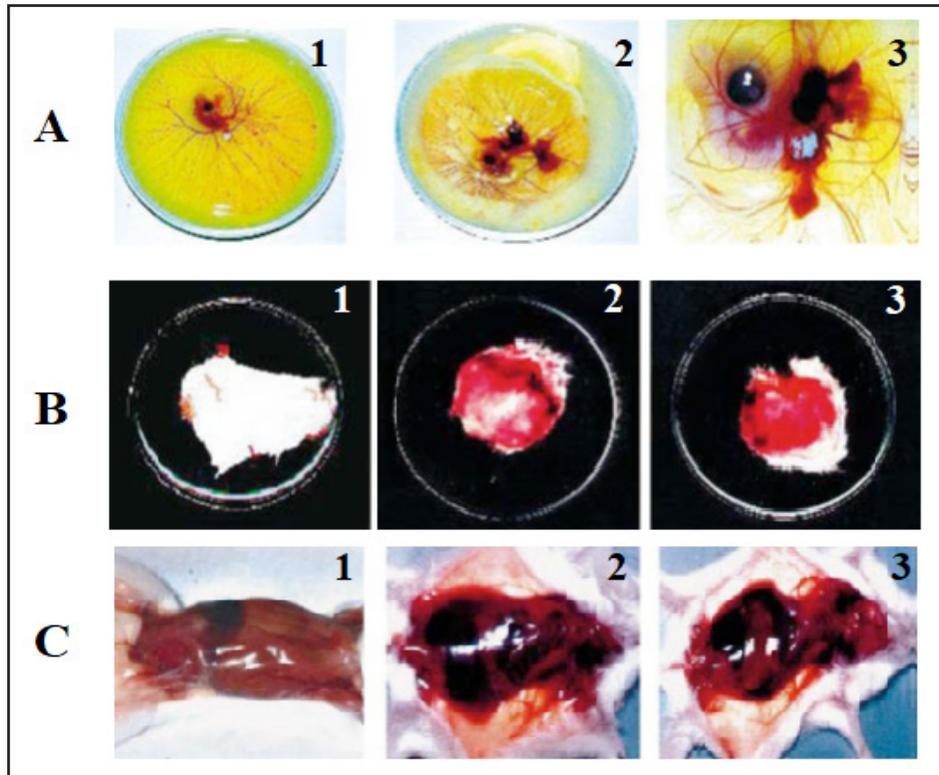


Figura 6. Actividad hemorrágica de veneno de *Leptodeira annulata ashmeadii*. **A)** embriones de pollo: 1) control negativo (solución salina). 2, control positivo (veneno de *Bothrops venezuelensis*). 3) Veneno de *L. annulata ashmeadii*. **B)** piel de ratón: 1) control negativo (solución salina). 2) control positivo (veneno de *Bothrops venezuelensis*). 3) Veneno de *L. annulata ashmeadii*. **C)** peritoneo de ratón: 1) control negativo (solución salina). 2) control positivo (veneno de *Bothrops venezuelensis*). 3) Veneno de *L. annulata ashmeadii*. (Tomado de Lemoine y col., 2004a).

Las acciones más considerables e iniciales fueron los trastornos del equilibrio, la parálisis de las extremidades posteriores, parálisis flácida y la muerte, que ocurrió entre 2 y 6 minutos después de la inyección del veneno.

El género *Thamnodynastes* es de taxonomía complicada, los herpetólogos han reportado 19 especies en Sudamérica, describiéndose de ellas 10 especies en Venezuela. Son de hábitat muy variado, que van desde sabanas, selvas tropicales, incluso incursionan en zonas xerófilas, y están presentes desde el Norte en Colombia (Pérez Santos y Moreno, 1989) y Venezuela, hasta la Argentina (Vega y Bellagamba y 1990).



Figura 7. *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823).
Foto: Kenji Navarrete
(Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

Dentro de este género, en Venezuela se haya el *Thamnodynastes strigilis* (falsa mapanare, sopera; Figura 8), pequeña serpiente que no alcanza los 60 cm, teniendo en promedio entre 35 y 45 cm, distribuida en sabanas y en bosques secundarios. Cuando se aprecia intimidada, aplana el cuello y la cabeza, como lo hace la cobra, siendo esta postura amenazadora muy eficiente contra los humanos. Presenta una coloración variada, donde el dorso es de color pardo grisáceo, teñido con copiosas y muy discontinuas manchas blanquecinas y negruzcas. La región ventral de color blanco amarillenta, con rayas grises irregulares. La cabeza marrón pastosa, con manchas oscuras de distribución anómala.



Figura 8. *Thamnodynastes strigilis* (Myers y Donnelly, 1996) Foto: Javier Mesa (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

Lemoine y col. (2004b) demostraron que la inyección a ratones con el veneno de *Thamnodynastes strigilis*, a dosis subletales, produce edema y necrosis en el área de inyección, síntomas neurotóxicos y hemorrágicos locales y sistémicos. Se determinó que las enzimas responsables de esta actividad hemorrágica fueron metaloproteasas (Assakura y col., 1992; Lemoine y Rodríguez-Acosta, 2003). Con

estas observaciones, se sospecha que la mordedura de esta serpiente debe producir significativas afecciones hemorrágicas y proteolíticas a los pacientes mordidos. Igual a lo ocurrido en otros accidentes causados por serpientes del mismo género (Díaz y col., 2004).

Otra serpiente del mismo género descrita en Venezuela es el *Thamnodynastes cf. Pallidus*, cuyo nombre común es Sopera o candelita (Figura 9). Ella es de amplia distribución en Suramérica, donde se ha reportado en Perú, Brasil, Guyana, Uruguay, Paraguay, Argentina, Ecuador, Bolivia y Venezuela. Desde el punto de vista taxonómico, es de difícil clasificación y probablemente representa un complejo de especies muy similares entre sí. Esta especie, aunque es de talla pequeña puede medir hasta 60 centímetros.



Figura 9. *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) Foto: Javier Mesa (Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

Se desarrolla y tiene como hábitat zonas de vegetación de chaparral, bosques húmedos, piedemontes y tierras bajas de sabanas, desde el nivel del mar hasta 1.000 m de altitud. Su mayor actividad la desarrolla en horas crepusculares y generalmente es arborícola, alimentándose de lagartos (*Pnemidophorus* spp.), anfibios, larvas de insectos y ocasionalmente roedores. Por su agresividad, en un trabajo de campo

observamos un caso de accidente por esta serpiente (Díaz y col., 2004), donde la mordedura en el dedo medio de la mano izquierda y donde eran visibles las marcas de los colmillos, provocó un sangrado evidente, acompañados de edema y calor en la zona. En pocos minutos el edema se hizo ascendente y el dolor se irradió a todo el brazo, además, comenzaron a aparecer equimosis y aumento de la temperatura local del dedo mordido, logrando el edema su superior extensión 35 minutos más tarde. La sintomatología se relacionó con salivación profusa con sabor metálico e intensa cefalea. El detalle del caso fue descrita por Díaz y col. (2004).

Otra Colubridae de importancia médica en Suramérica es el *Xenodon severus* (Linnaeus, 1758, comúnmente llamada Tigra Sapa, Sapamanare, Cuaima Sapa; Figura 10).



Figura 10. *Xenodon severus* (Linnaeus, 1758).
Foto: Luis Navarrete
(Rengifo González y Rodríguez-Acosta, 2019)

Se trata de una especie ampliamente distribuida en la región meridional del continente, se ha conseguido en Venezuela, Colombia, Brasil, Perú y posiblemente en Ecuador y Guyana. En nuestro país es habitual conseguirla en el Piso Tropical y

sub-Tropical, principalmente en las sabanas llaneras y el piedemonte de la Cordillera de la Costa. Su hábitat de preferencia son los cursos de agua, donde se alimenta de batracios y peces. Son generalmente ejemplares de cuerpo pequeño grueso y aplastado, cabeza grande triangular y algo achatada, los ojos de pupila redonda típica de serpientes de hábitos diurna, con una coloración que varía de pardo verdosa grisácea a grisáceo claro u oscuro. Tiene manchas dorsales bien determinadas, parecida a los *Bothrops*. La región del vientre es gris oscura o negra, matizada con ciertas manchas claras. Su tamaño, puede alcanzar hasta 1,8 metros de longitud.

Esta especie de serpiente con dentición Opisthognathina, teóricamente no podría inyectar veneno, sin embargo, debido a que el morder es necesariamente su táctica de defensa, han sido estudiados accidentes en humanos. Por ejemplo, Minton y Weinstein (1987) refieren mordeduras fatales por *Colubridae*. No obstante, pueden ocasionar envenenamientos con edema, dolor, equimosis, esporádicamente parestesias locales o entumecimiento, eritema o sangrado, pero sin necrosis y sin efectos sistémicos.

Finalmente, hay que romper los esquemas médicos acerca que los envenenamientos por colúbridos no tienen significativa morbilidad y mortalidad en humanos. Con lo planteado en el presente trabajo, los accidentes por colúbridos pueden ser una emergencia médica, con serias repercusiones en la salud de los accidentados, siendo que podrían sobrevenir resultados fatales en pacientes que sufren envenenamientos mortales, tales como los reportados en Chile por *Tachymenis peruviana* (Lema, 1978) y en Brasil ocasionado por *Philodryas olfersii* (Salomão y Di Bernardo, 1995). Otro

fenómeno poco observado, pero presente en estos accidentes, se ha reportado en un pequeño número de personas, que la mordedura puede desencadenar una reacción alérgica grave, como una anafilaxia o la aparición de una urticaria (Figura 11); ello suele ocurrir inmediatamente después de una mordedura o varias horas después.



Figura 11. Reacción de hipersensibilidad inmediata (urticaria).

Referencias Bibliográficas

- Albolea ABP, Salomão MG, Almeida-Santos SM. 2000. Why non-poisonous snakes cause snakebites? *Toxicon* 38: 567-568.
- Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. 1994. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). *Toxicon* 32: 819-831.
- Assakura MT, Salomão MG, Puerto G, Mandelbaum FR. 1992. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). *Toxicon* 30:427-438.
- Biardi JE, Coss RG, Smith DG. 2000. California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera inhibits crotalid venom proteolytic activity. *Toxicon* 38: 713-721.
- Biardi JE, Coss RG. 2011. Rock squirrel (*Spermophilus variegatus*) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms. *Toxicon* 57: 323-331.
- Casewell NR, Harrison RA, Wüster W, Wagstaff SC. 2009. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics* 10: 564.
- Chippaux JP, Goyffon M. 1989. Les morsures accidentelles de serpent en France métropolitaine. *La Presse Médicale* 18:794-795.
- De Lema T. 1978. Relato de um envenenamento por uma cobra nao venenosa. *Nat Rev* 4: 62-63.
- Díaz F, Navarrete LF, Pefaur J, Rodríguez-Acosta A. 2004. Envenomation by neotropical opisthoglyphous colubrid *Thamnodynastes cf. pallidus* Linne, 1758 (Serpentes: Colubridae) in Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46: 287-290.
- Dixon JR, Soini P. The reptiles of the upper Amazon basin, Iquitos region, Perú, I-VII. Milwaukee Public Museum, 800 W Wells St., Milwaukee, WI 53233, USA 154 pp, 1986.
- Estrella A, Rodríguez-Torres A, Serna L, Navarrete L, Rodríguez-Acosta A. 2011a. Is the South American water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758) (Dipsadidae: Xenodontinae) venomous? *Herpetotrópicos* 5: 79-84.
- Estrella A, Sánchez EE, Galán JA, Tao WA, Guerrero B, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2011b. Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Arch Toxicol* 85: 305-313.
- Jansa SA, Voss RS. 2011. Adaptive evolution of the venom-targeted vWF protein in opossums that eat pitvipers. *PLoS One* 6: e20997.
- Junqueira-de-Azevedo ILM, Campos PF, Ching ATC, Mackessy SP. 2016. Colubrid Venom Composition: An-Omics Perspective. *Toxins (Basel)* 8: 1-24.
- Lancini A, Kornacker P. Die Schlangen von Venezuela, Verlag Armitano, Caracas. 1989.
- Lancini AR. Serpientes de Venezuela. 1st ed Armitano E. Caracas, Venezuela: 1979.
- Lemoine K, Rodríguez-Acosta A. 2003. Hemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by the false coral snake (*Erythrolamprus Bizona* Jan 1863) (Serpentes: Colubridae) Duvernoy's gland secretion. *Rev Cient FCV-LUZ* 13: 371-377.
- Lemoine K, Salgueiro LM, Rodríguez-Acosta A. 2004a. Neurotoxic, Haemorrhagic and Proteolytic Activities of Duvernoy's gland secretion from Venezuelan opisthoglyphous colubrid snakes. *Vet Hum Toxicol* 46: 10-14.
- Lemoine K, Girón ME, Aguilar I, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta, A. 2004b. Proteolytic, haemorrhagic and neurotoxic activities caused

- by *Leptodeira annulata ashmeadii* (Serpentes: Colubridae) Duvernoy's gland secretion. *J Wild Env Med* 15: 82-89.
- Marques O A V, Sazima I. 2004. História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. En: Marques, O. A. V, Dulepa W (eds): Estação Ecológica Juréia, ambientes físicos, flora e fauna. – Holos, Ribeirão Preto., pp. 257-277.
- Martins M, Oliveira ME. 1998. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History* 6: 78-150.
- Mijares-Urrutia A, Markezich AL, Arends RA. 1995. Discovery of *Leptodeira bakeri* Ruthven (Serpentes: Colubridae) in the Paraguaná Peninsula, north-eastern Venezuela: With descriptive and biological comments. *Caribbean J Sci* 1: 77-82.
- Minton SA, Weinstein S. 1987. Colubrid Snake Venoms: Immunologic Relationships, Electrophoretic Patterns. *Copeia* 4: 993.
- Natera-Mumaw M, Manzanilla-Puppo J. 2000. Nuevos registros geográficos y notas bioecológicas de *Philodryas olfersii* (LICHTENSTEIN, 1823) (Serpentes: Colubridae) en Venezuela. *Mem Fund Las Salle Cien Nat* 153: 51-59.
- Navarrete LF, Lemoine K, Rodríguez-Acosta A. 1999. ¿Is the opisthoglyphous *Clelia clelia* Duvernoy's gland secretion haemorrhagic in humans? *Acta Biol Venez* 19: 19-23.
- Perez-Santos C, Moreno AG. 1989. Una nueva especie de *Thamnodynastes* (Serpentes: Colubridae) en el norte de Colombia. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino* 7(1): 1-9.
- Peters JA, Orejas-Miranda B. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part I. Snakes. *Bull United States Nat Museum* 297: 1-347.
- Pifano F, Aguilar I, Giron ME, Gamboa N, Rodríguez-Acosta A. 1993. Natural resistance of opossum (*Didelphis marsupialis*) to the mapanare (*Bothrops lanceolatus*) snake venom. *Roum Arch Microbiol Immunol* 52:131-136.
- Pifano F, Rodríguez-Acosta A. 1996. Ecological Niche and re-description of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Crotalidae) in Venezuela. *BRENESIA* 45-46: 169-175.
- Pinto RNL, Sa Silva Jr NJ, Aird D, 1991, Human envenomation by the South American opisthoglyph *Clelia clelia plumbea* (Wied). *Toxicon* 29: 1512-1516.
- Poey F. 1873. Mordedura de un jubo. *El Genio Cient. La Habana* 1: 94-98.
- Pontes-Nogueira M, Martins M, Alencar LRV, Sawaya RJ. 2021. The role of vicariance and dispersal on the temporal range dynamics of forest vipers in the neotropical region. *PLoS One* 16: e0257519.
- Rengifo González C, Rodríguez-Acosta A. Serpientes, Venenos y tratamiento médico, en Venezuela. 2º Edición ampliada y revisada. Amazon online. 2019.
- Rodríguez-Acosta A, Lemoine K, Navarrete LF, Girón ME, Aguilar I. 2006. Experimental ophitoxemia produced by the opisthoglyphous Lora snake (*Philodryas olfersii*) (Serpentes: Colubridae) venom. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 193-197.
- Rodriguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Fuentes O. 1997. A case of envenomation by a "non-venomous" snake (*Philodryas viridissimus*) and comparison between this snake Duvernoy's gland secretion and northern South American rattlesnake's venoms. *Arch Ven Med Trop* 1: 29-32.
- Salomão EL, Di-Bernardo M. 1995. *Philodryas olfersii*: una cobra común que mata. Caso registrado na área da 8a delegacia regional de Saúde. *Arquivos da SBZ / Soracaba -SP* 14-16: 21.
- Savage JM. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. University of Chicago Press, 934 pp. 2002.
- Vega L, Bellagamba P. Lista comentada de la herpetofauna de las sierras de Balcarce y Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Williams JD, Echeverria DD (eds.). *Cuad Herp Asoc Herpetol Argentina*. 1990.
- Vidal N, Dewynter M, Gower DJ. 2010. Dissecting the major American snake radiation: A molecular phylogeny of the Dipsadidae Bonaparte (Serpentes, Caenophidia). *CR Biol* 333: 48-55.
- Zaher H, Gobbi Grazziotin F, Cadle JE, Murphy RW, de Moura-Leite JC, Sandro L, Bonatto SL. 2009. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49(11):115-153



Ciclo de vida en el desarrollo de un producto farmacéutico

Life cycle in the development of a pharmaceutical product

PILAR MARTÍN DE PÉREZ

Resumen

El continuo avance y alto desarrollo tecnológico, y la frecuente aparición en el mercado farmacéutico de nuevos productos farmacéuticos, requiere que la industria farmacéutica esté continuamente desarrollando nuevas formas de hacer llegar el fármaco a su destino, de la forma más rápida y eficaz. La industria farmacéutica es un importante elemento de los sistemas de asistencia sanitaria en todo el mundo; está constituida por numerosos departamentos dedicados al descubrimiento, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos para la salud humana y animal. Dentro del marco del desarrollo de nuevos productos farmacéuticos en Venezuela, en el presente estudio se planteó como objetivo describir la ruta que sigue un nuevo producto farmacéutico en su desarrollo, desde que surge la idea original hasta su lanzamiento al mercado venezolano.

Palabras clave: Desarrollo farmacéutico, Investigación y Desarrollo, desarrollo galénico, desarrollo analítico, estabilidad

Abstract

The continuous advance and high technological development and the frequent appearance in the pharmaceutical market of new pharmaceutical products requires that the pharmaceutical industry continuously develops new ways to deliver the drug to its destination in the fastest and most efficient way. The pharmaceutical industry is an important element of healthcare systems around the world; it is integrated by numerous departments dedicated to the discovery, development, manufacture, and marketing of medicines for human and animal health. Within the framework of the development of new pharmaceutical products in Venezuela, this study aimed to describe the route that a new pharmaceutical product follows in its development, from the moment the original idea arises, to its launch into the Venezuelan market.

Keywords: Pharmaceutical development, Research and Development (R&D), technological development, analytical development, stability

Laboratorios Farma, C.A, Caracas Correspondencia: pp1552@hotmail.com. Orcid: [0000-0003-0713-7846](https://orcid.org/0000-0003-0713-7846)

Introducción

El desarrollo farmacéutico es una importante herramienta para el avance de la medicina y un impulsador de la investigación en el campo de la salud, desarrollo tecnológico y de procesos. Mediante este desarrollo se pueden ofrecer formas farmacéuticas de nuevos principios activos y diferentes formas de dosificación de aquellos que ya existen; igualmente, esta actividad constituye el motor de la industria de Medicamentos Genéricos, permite la gestión y extensión del ciclo de vida de productos farmacéuticos ya existentes en el mercado y crea opciones terapéuticas para pacientes con necesidades especiales. La industria farmacéutica es un importante elemento de los sistemas de asistencia sanitaria en todo el mundo, estando constituida por numerosos departamentos dedicados al descubrimiento, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos para la salud humana y animal (Gennaro, 2008).

El desarrollo de un producto farmacéutico implica un trabajo multidisciplinario que incluye prácticamente todos los departamentos de la Industria Farmacéutica que van desde la presidencia, nuevos negocios, asuntos regulatorios, producción, mercadeo, compras, e investigación y desarrollo. El continuo avance y alto desarrollo tecnológico y la frecuente aparición en el mercado farmacéutico de nuevas formas farmacéuticas, requiere que la industria farmacéutica este continuamente desarrollando nuevas formas de hacer llegar el fármaco a su destino de la forma más rápida y eficaz. Por ello, las formas farmacéuticas han de contener los principios activos en las cantidades adecuadas, a la dosis eficaz y menor que la dosis tóxica. Las formas farmacéuticas deben

mantener los principios activos inalterados durante su conservación, teniendo en cuenta la temperatura, la humedad y la luz ambiental. Normalmente, la duración y las condiciones de conservación se definen durante los ensayos de estabilidad precomercialización de los medicamentos. Igualmente, deben garantizar que se alcance la respuesta terapéutica esperada. Las formas farmacéuticas han de mantener los principios activos inalterados durante su conservación. No obstante, para mantener las características de calidad, seguridad y eficacia del medicamento, es necesaria una adecuada conservación del medicamento según las indicaciones del prospecto. Por ello, hay que tener en cuenta la temperatura, la humedad y la luz ambiental. En Venezuela, existe una Industria Farmacéutica nacional activa que desarrolla nuevos productos farmacéuticos, por lo que este trabajo se centró en la industria farmacéutica venezolana, debido fundamentalmente a su carácter estratégico en el ámbito nacional y al crecimiento de las ventas experimentado en diferentes periodos (Organización Mundial de la Salud - OMS, 2009a). Para situar el contexto de la industria farmacéutica y poder comprobar su relevancia en varios aspectos, se pueden señalar sus principales características: complejidad, nivel de competencia, asimetría de información y relaciones con los agentes, regulación y control de precios, Investigación y Desarrollo (I+D), protección de patentes, y gestión del portafolio de medicamentos (Becher y col., 2008). Específicamente, el presente estudio se planteó como objetivo describir la ruta que sigue un nuevo producto farmacéutico en su desarrollo, desde la concepción de la idea original hasta su lanzamiento al mercado venezolano para su comercialización. Aun cuando se indica el papel de diferentes

departamentos que participan en el desarrollo del producto farmacéutico, el énfasis se realizó en las tareas principales que están bajo la responsabilidad del departamento de investigación y desarrollo.

EL PROCESO DE DESARROLLO Y SUS ETAPAS

El proceso de desarrollo de un producto farmacéutico comprende diferentes etapas a las cuales se les ha asignado lapsos de tiempo de acuerdo con la experiencia y registros que se encuentran asentados en el departamento, aunque éstos pueden sufrir variaciones en relación con las proyecciones iniciales (Figura 1).

El proceso de desarrollo se inicia en el Comité Estratégico, que en cada laboratorio está conformado por diferentes miembros, cuyas funciones principales son discutir y aprobar los proyectos potenciales, para luego pasarlos a los diferentes departamentos involucrados. Por lo general,

entre los miembros del Comité Estratégico se encuentra el presidente de la empresa y los directores estratégicos. En ocasiones funciona virtualmente, ya que la propuesta del nuevo producto puede venir de entes externos al Comité.

El primer paso de este proceso es la adquisición del principio activo de la nueva fórmula a desarrollar; en esta etapa el departamento involucrado debe garantizar el abastecimiento de la cantidad de materia prima necesaria para los procesos de producción del nuevo producto, de acuerdo con los requerimientos y especificaciones que se han establecido, para lo cual será solicitada al departamento de compras, quienes se encargan de la detección de la necesidad de la compra, selección del producto de acuerdo a las especificaciones técnicas, establecimiento del presupuesto para la compra y la búsqueda de los proveedores potenciales, quienes después de realizar las ofertas correspondientes reciben la adjudicación como proveedor.

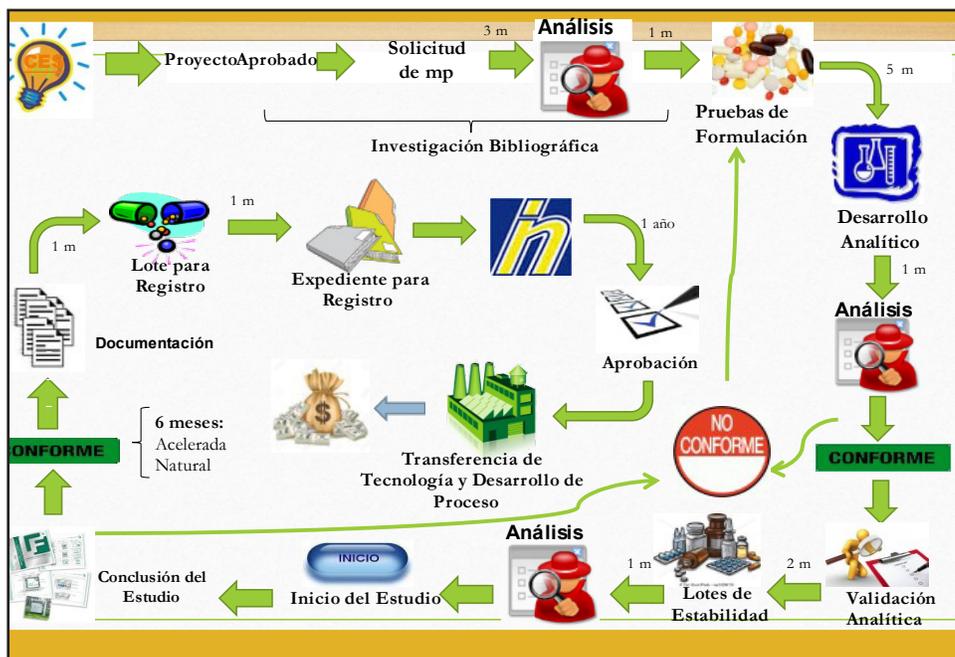


Figura 1. Ciclo de vida del desarrollo de un producto farmacéutico.
*La letra m corresponde a meses

Una vez realizada la compra, se realiza la recepción de las materias primas requeridas en el proceso, generalmente al granel, y se registran sus características como proveedor, procedencia, costo y cantidad recibida.

Para cumplir con la etapa de investigación se utilizan, en primer lugar, los textos oficiales; tales como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea, la Farmacopea Británica y la Farmacopea Japonesa. Igualmente, se recurre a publicaciones en Revistas Científicas reconocidas, y aunque con menos frecuencia, a veces es necesario hacer desarrollos propios de métodos de análisis. En paralelo, el departamento inicia la investigación bibliográfica para determinar una posible fórmula tentativa, con base en la forma farmacéutica y la investigación realizada.

Una vez realizada la compra y recibida la materia prima, se procede a su análisis, de acuerdo con los métodos establecidos, a fin de comprobar el cumplimiento con las especificaciones de calidad establecidas. Cuando el análisis arroja resultados favorables, la materia prima es aprobada para pasar así al área de desarrollo galénico, donde se inician los ensayos de pre-formulación y formulación hasta obtener una prueba que cumpla con las especificaciones galénicas preestablecidas durante la investigación bibliográfica del producto farmacéutico que se desea desarrollar.

Antes de proceder a desarrollar cualquier presentación, es imperativo investigar determinadas propiedades físicas y químicas fundamentales de la molécula del fármaco que constituye el principio activo. De esta información dependen muchos de los pasos y métodos utilizados posteriormente

en el desarrollo de la formulación (Aulton, 2004). Esta fase inicial de la investigación se conoce como pre formulación, la cual se describe como los procesos por medio de los cuales se caracteriza física y químicamente el principio activo, antes de formularlo y de esta forma poder conseguir calidad durante el desarrollo de la forma farmacéutica, pudiéndose anticipar a los problemas que se pudieran presentar durante la formulación, identificando el mejor camino para la elección de la tecnología requerida para su manufactura y para obtener un producto efectivo, seguro y estable dentro de la formulación seleccionada (Auton, 2004).

Esta pre-formulación se envía al área de desarrollo analítico, donde se lleva a cabo el desarrollo del método analítico. Para el desarrollo químico farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima o principio activo de una formulación. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación (Calpena y col., 1991). Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas (Calpena y col., 1991; USP XXII, 1990). La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan (USP XXII, 1990; Rampazoo, 1990). Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias

(Analytical Validation, 1990), y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos.

Así, en esta etapa se emplean libros oficiales, publicaciones en Revistas Científica reconocidas, o alternativamente, se procede a desarrollar un nuevo método analítico en el departamento, el cual estará sujeto a la validación correspondiente. Con la validación se desea demostrar que el resultado obtenido corresponde con el contenido real del producto; es decir, que el método es confiable. La definición de validación de métodos analíticos según la guía de la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) indica que "La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado". Esta etapa es laboriosa e implica mucha inversión de tiempo, tanto en la realización de las pruebas, como en la compilación de los resultados para emitir el expediente de validación.

Los parámetros por determinar en toda validación analítica son:

- **Precisión.** Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí (Calpena y col., 1991). Aunque la USP XXII (USP XXII, 1990) expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, Calpena y col. (1991) incluyen dentro de este acápite la repetibilidad, la reproducibilidad y la robustez del método analítico, mientras que la Norma Británica (British Standard, 1979) incluye sólo la repetibilidad y la reproducibilidad.

- **Exactitud:** Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (Calpena y col., 1991; USP XXII, 1990). A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.
- **Linealidad:** Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido (USP XXII, 1990). Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método.
- **Especificidad:** Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra (Calpena y col., 1991). Se expresa como el grado de inexactitud del método (USP XXII, 1990). La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad.
- **Reproducibilidad.** Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas

en días diferentes (Calpena y col., 1991) y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.

- Límite de cuantificación. Es la habilidad de un método para detectar y cuantificar la cantidad mínima de un analítico en una muestra, la cual puede ser detectada con precisión y exactitud.
- Límite de detección. El límite de detección de un método analítico es el nivel mínimo de la sustancia estudiada para que el método la pueda detectar con certeza razonable. El método puede ser capaz de detectar los niveles más bajos de la sustancia química, pero a esos niveles tan bajos, la probabilidad de un resultado positivo falso puede llegar a ser inaceptable.

Concluido el procedimiento de validación el personal de aseguramiento de calidad emitirá un certificado de validación, que unido al protocolo y el informe final se archivarán durante el tiempo de vida del producto. Este informe debe estar disponible, para el caso de una inspección por parte de la contraloría sanitaria. Para ahondar en el tema y procedimientos para la validación analítica se recomienda consultar la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés).

Después de la validación analítica exitosamente, se procede a elaborar los lotes de la formulación que serán sometidos a los ensayos de estabilidad. La estabilidad de un producto farmacéutico se define como el tiempo durante el cual su actividad química o biológica y sus características físicas no cambian de forma apreciable, es decir, conserva sus

características desde el punto de vista de calidad y cumple especificaciones. Para definir el período de estabilidad de un medicamento o un principio activo, y, por consiguiente, su fecha de caducidad o re-análisis, es necesario desarrollar estudios de estabilidad adaptados a las características propias del producto, del mercado de destino o incluso del envase en el que se comercializa. A partir de los estudios de estabilidad, se obtiene además información sobre las condiciones recomendadas de almacenamiento del producto, cinéticas de degradación, incompatibilidades, adecuación de fórmulas y materiales de acondicionamiento o precauciones para tener en cuenta durante el uso del producto. Los estudios de estabilidad necesarios para la comercialización de principios activos farmacéuticos y medicamentos deben realizarse de forma planificada acorde a la regulación existente a nivel internacional, conforme a las características propias del producto, las condiciones climáticas de los países de destino y otros factores importantes como las características del envase primario o las condiciones de uso (Rodríguez, 2017).

En el caso de la Industria Farmacéutica venezolana, para efectos de registro sanitario el mínimo de lotes a someter a estudio es de 3. Estos 3 lotes se analizan inicialmente y, habiendo obtenido resultados adecuados, se ingresan en las cámaras de estabilidad, que deben estar calificadas para garantizar las condiciones deseadas dentro de las mismas. Este proceso de validación de las cámaras, generalmente se lleva a cabo con una empresa especializada. Los tres lotes mencionados deben someterse a un mínimo de dos condiciones, conocidas como estabilidad natural: $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura con $70\% \pm 5\%$ de humedad

relativa y estabilidad acelerada: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura con $75\% \pm 5\%$ de humedad relativa. En la actualidad está en discusión el cambio de las condiciones para la estabilidad natural, ya que se está considerando el hecho de que Venezuela pase a la zona climática IVB (actualmente está en la zona IV), lo cual implicaría llevar la humedad relativa de la prueba de estabilidad natural a $75\% \pm 5\%$.

Para iniciar el estudio de estabilidad se prepara un protocolo, donde se indican todas las especificaciones del producto, e incluye el formato para rellenar con los resultados analíticos, en los diferentes tiempos de análisis a los que se sometió el producto durante el ensayo de estabilidad; a saber, 1, 3 y 6 meses. En la Tabla I se muestra un ejemplo del protocolo de estabilidad. En este protocolo solo se incluyó la primera parte; es decir, no aparece el formato a rellenar con los resultados analíticos. En la Tabla II se presenta un ejemplo del protocolo completo, cuyo nombre está en discusión, para cambiarlo a "registro de resultados", y que es el documento que se incluirá en el expediente para registro sanitario. También deben reportarse los resultados de todas las especificaciones indicadas en la primera página, para cada condición de estabilidad estudiada. Teniendo los resultados de los estudios de estabilidad, tanto en condiciones acelerada como natural, que cumplan con las especificaciones establecidas, hasta los 6 meses, se puede solicitar un período de validez de 2 años.

Concluidos estos estudios, se inicia la elaboración de la documentación técnica para registro, la cual incluye: Fórmula Unitaria y Porcentual, Justificación de los Excipientes, Método de Fabricación,

que incluye hasta el acondicionamiento del producto y los controles durante el proceso de fabricación, Método de Control, Flujograma del Proceso de Fabricación, desde que se pesan los ingredientes hasta obtener el producto envasado, Certificados de Análisis de las materias primas, Especificaciones de las Materias Primas y los datos del fabricante del principio activo. En paralelo se elabora el lote de donde se tomarán las muestras para enviar al área de Asuntos Regulatorios, y cuyo Certificado de Análisis también formará parte de la documentación técnica a remitir. A continuación, aparece el contenido del expediente técnico correspondiente al producto A, que fue enviado a Asuntos Regulatorios.

EXPEDIENTE PARA REGISTRO SANITARIO

Producto: PRODUCTO A

- Muestras: 3 blísters x 14 tabletas recubiertas c/u
- Fórmula Unitaria y Porcentual
- Justificación de los Excipientes
- Método de Fabricación
- Método de Control
- Reporte Analítico del Producto Terminado
- Estudio de Estabilidad
- Certificados de Análisis de los Principios Activos con que se elaboró el producto, del proveedor
- Certificados de Análisis de los Principios activos del Laboratorio Fabricante, con el que se elaboró el producto
- Certificado de Análisis del Patrón de Referencia

Tabla I. Protocolo de estabilidad

PRODUCTO: DOSIS Y FORMA FARMACÉUTICA: DESCRIPCIÓN DEL ENVASE PRIMARIO:	PRODUCTO A 10 mg TABLETAS Blister de PP/AL/PVC/PVDC con respaldo de foil de aluminio
TAMAÑO DEL ENVASE:	Blister de PP/AL/PVC/PVDC con respaldo de foil de aluminio x 10 tabletas
LABORATORIO FABRICANTE:	Laboratorio de Fabricación

DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES	MÉTODO ANALÍTICO
Aspecto	Tabletas circulares biconvexas de color blanco	Inspección Visual
Peso Promedio (mg)	120,25 – 139,75	Gravimétrico
Dureza (Kp)	No menos de 4	Erweka
Contenido de P.A. (mg/tableta)	10 (9 - 11)	HPLC
% de lo declarado	90 – 110	
Disolución: % disuelto de P.A.	Q ≥ 80% en 20 minutos	HPLC
Condición Microbiológica: <i>Aerobios mesófilos</i> <i>Hongos y levaduras</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ⁵ : Cuenta máx. aceptable 2000 UFC/g 10 ² : Cuenta máx. aceptable 200 UFC/g Ausentes (en 1 g)	Contaje en placas – Dilución 1:10 Contaje en placas – Dilución 1:10 Marcha según USP

LOTES EVALUADOS Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

No. de Lote	Tipo de Lote	Tiempo de Evaluación	Condiciones de Almacenamiento Temperatura / Humedad Relativa
19057	Piloto	6 meses	30°C ± 2°C/70% ± 5% H.R.
		6 meses	40°C ± 2°C/75% ± 5% H.R.
19058	Piloto	6 meses	30°C ± 2°C/70% ± 5% H.R.
		6 meses	40°C ± 2°C/75% ± 5% H.R.
19059	Piloto	6 meses	30°C ± 2°C/70% ± 5% H.R.
		6 meses	40°C ± 2°C/75% ± 5% H.R.

Tabla II. Protocolo de estabilidad

PRODUCTO:	PRODUCTO A 10 mg TABLETAS
LOTE:	19057
FECHA DE ELABORACIÓN:	08-04-2019
TAMAÑO DEL LOTE:	5.000 tabletas (Lote piloto)
LABORATORIO FABRICANTE:	Laboratorios de Fabricación
DESCRIPCIÓN DEL ENVASE:	Blister del PP/AL/PVC/PVDC con respaldo de foil de aluminio x 10 tabletas
FECHA DE INICIO DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD:	16-05-2019

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: 30°C 2 C/70% 5% H.R.

	Inicial	3 meses	6 meses
Fecha de análisis:	29-04-2019	20-08-2019	18-11-2019
Aspecto:	Conforme	Conforme	Conforme
Peso promedio (mg):	133,60	134,8	135,03
Dureza (Kp):	6,10	5,89	6,02
Contenido de P.A. (mg/tableta)			
Muestra 1	9,95	9,86	9,76
Muestra 2	9,94	9,81	9,70
Muestra 3	10,08	9,85	9,59
Promedio	9,99	9,84	9,69
% de lo declarado	99,88	98,40	96,86
C.V.	0,78	0,26	0,88
DISOLUCIÓN - % de P.A. disuelto en 20 minutos			
Muestra 1	100,47	98,70	101,04
Muestra 2	97,12	98,57	96,65
Muestra 3	99,48	101,31	98,41
Muestra 4	91,20	96,13	101,15
Muestra 5	100,25	102,45	99,32
Muestra 6	101,30	95,19	90,52
Promedio	98,30	98,73	97,85
Analista	ATC	GHD	LY

Resultados: Tablas I y II

Discusión de los Resultados: De los resultados de envejecimiento natural, se observa que el producto conserva todas sus especificaciones dentro de los límites establecidos, en el periodo evaluado.

Período de Validez: 2 años

Conservación del Producto: El producto puede almacenarse en condiciones naturales de temperatura ambiente, no mayor de 30°C.

- Método Analítico del Patrón de Referencia
- Especificaciones de los Principios Activos y Excipientes
- Especificaciones del Material de Empaque
- Datos del Fabricante del Principio Activo

El área de Asuntos Regulatorios conforma el expediente para registro, agregándole lo relacionado con la parte sanitaria y se encarga de hacer los trámites ante la Gerencia Sectorial de Registro y Control del Ministerio del poder popular para la Salud, ubicada en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) para someter el expediente a su escrutinio (Cardona y Polanco, 2005). El tiempo estimado para recibir dictamen del INHRR es aproximadamente 1 año (Figura 1); sin embargo, en la actualidad el tiempo promedio para recibir respuesta se ha reducido significativamente. Ya entregado el expediente se entra en una pausa activa, atendiendo otros proyectos, hasta recibir el certificado de registro sanitario, cuando se notifica a la comercializadora y se continúa en pausa hasta que la Gerencia decida el momento oportuno para realizar el lanzamiento del producto. En la Figura 2 se encuentra un ejemplo de un certificado de registro sanitario.

Tomada la decisión de lanzamiento, hay que planificar cómo incorporarlo al mercado de la manera más acertada, de forma tal, que llegue a ser conocido rápidamente tanto por los médicos tratantes como por los pacientes. Para ello es necesario publicitar el producto y garantizar así que el lanzamiento de un nuevo fármaco sea efectivo y de fácil acceso al mercado. Es muy importante establecer y hacer ver a los pacientes y médicos la relación calidad-

precio del producto, pero sobre todo los beneficios en salud que puede obtener el paciente que lo consume y las ventajas competitivas que tiene este fármaco frente a cualquier otro similar en el mercado; ahora bien, si es único en su tipo, pues este será un gran valor añadido que permitirá una comercialización más segura. Es importante el aporte de un mensaje de valor, es decir, un mensaje claro, que indique de forma breve para qué sirve el medicamento y para qué tipo de pacientes es recomendado, pero lo más importante que indique cuál es el valor agregado que este tiene sobre cualquier otro fármaco que trate problemas de salud similares (ClusterFarma, 2022).

Nuevamente, en la etapa del lanzamiento el departamento de I+D entra a jugar un papel protagónico, pues es el responsable del desarrollo y la transferencia del proceso a la planta de fabricación, por ser el que tiene el conocimiento de los detalles que se han vivido a lo largo del desarrollo, que hacen que esa transferencia sea más o menos fluida, aunque es normal encontrar tropiezos en el proceso, por la cantidad de variables que deben manejarse en todo nuevo proceso. Esta etapa se cumple con la intervención tanto de Investigación y Desarrollo, como de Producción, y se considera concluida cuando se hayan fabricado un mínimo de tres lotes, cuyos resultados analíticos estén dentro de las especificaciones, bajo las mismas condiciones de fabricación, y se elabore un informe de desarrollo del proceso, a partir de lo cual la fabricación queda bajo la responsabilidad de la planta. Es pertinente mencionar que el departamento I+D siempre debe estar a la orden para apoyar a la planta en cualquier desviación que surja durante la fabricación de un producto, bien sea nuevo o de antigua data, en pro de que

Gobierno Bolivariano de Venezuela
Ministerio del Poder Popular para la Salud
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
E.F. 0592018-S/REF-0003

**SISTEMA NACIONAL DE REGISTRO SANITARIO DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS
CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO**

El Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" de conformidad con lo establecido en los artículos 1, 18 y 19 de la Ley de Medicamentos, publicada en la Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 37.006 del 03 de Agosto de 2.000; siendo favorables los resultados de la evaluación integral, confiere el Registro Sanitario al siguiente producto farmacéutico:

CLASIFICACION: **ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS**

NOMBRE DEL PRODUCTO:
**** TONERVOL 5 mg TABLETAS ****

No. REGISTRO SANITARIO: E.F. 42.035/18 FECHA DE APROBACION: 24-05-2018 VIGENTE HASTA: 24-05-2025

NOMBRE (s) GENERICO (s) / PRINCIPIO (s) ACTIVO (s):
**** NEBIVOLOL ****

REPRESENTANTE LABORATORIOS FARMA S.A. / VENEZUELA
FARMACEUTICO PATROCINANTE ARACELIS MARIA ORTEGA RIOS
PROPIETARIO LABORATORIOS FARMA S.A. / VENEZUELA
ALMACENADOR SERVOFARMA C.A. / VENEZUELA

El registro del producto autorizado queda sometido a todo lo previsto en la Ley de Medicamentos y cualquier otra Normativa Legal que regule la materia.

Caracas, 31 MAYO 2018

DR. JOSÉ RAFAEL LUNA
Presidente del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Según Resolución N° 626 de fecha 23 de noviembre de 2017
Publicado en la Gaceta Oficial N° 41.286 de fecha 24 de noviembre de 2017

Código de verificación **#SREF-00030V0EF0E523950N92018#**

Cityad Universitaria UCV, Los Chaguaramos, Caracas - República Bolivariana de Venezuela Cod. 1041
Teléfono (+58-212) 219.16.22 <http://www.inhrr.gob.ve> RIF: G-20000101-1
Este certificado puede ser verificado en la dirección electrónica http://www.inhrr.gob.ve/ref_aprobadas.php

Página 1 de 1

Figura 2. Certificado de Registro Sanitario de la Especialidad Farmacéutica Tonervol 5 mg Tabletetas.

los procesos lleguen a feliz término, en el menor tiempo posible y con la calidad requerida.

Conclusiones

A pesar de ser el desarrollo de un producto farmacéutico una tarea multidisciplinaria, la mayor responsabilidad está en el departamento de Investigación y Desarrollo, que desde muy temprano en el proceso tiene que alimentar el resto de las áreas para lograr el objetivo, exitosamente.

El hecho de involucrar al departamento de Investigación y Desarrollo en el desarrollo y transferencia del proceso de fabricación a gran escala es crucial para lograr una fabricación exitosa, dada la cercanía con

el proceso de desarrollo y, por ende, el conocimiento de todas las etapas de la fabricación en pequeña escala, así como los tropiezos encontrados en ese camino.

Agradecimientos

Agradezco a Laboratorios Farma, S.A. por haber impulsado mi desarrollo profesional y por haber permitido el uso de la experiencia adquirida allí, así como su nombre para esta publicación.

A la Dra. Isabel Andueza, por haberme honrado con la invitación para participar en las Jornadas Científicas Farmacéuticas, que fue el punto de partida de esta publicación. A la Dra. Anita Stern Israel, por haberme estimulado a hacer esta publicación.

A la Señora Mayra Laya, por haberme suministrado los documentos que usé como modelo para la publicación y por su paciencia incommensurable.

Referencias Bibliográficas

- Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA).
Analytical Validation, Volumen 3A of The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. Washington D.C.: The Office Publications of the European Community Information Service, 1990;116.
- Aulton ME. 2004. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Mosby doyma.
- Becher y Asociados S.R.L. 2008. Laboratorios e industria farmacéutica, Reporte Sectorial, Año 1, No 2, Argentina, Becher y Asociados S.R.L., pp 1-63.
- British Standard No. BS 5497. 1979. Precision of Test Methods.
- British Pharmacopoeia. 2021. Farmacopea Británica.
- Calpena AC, Escribano E, Fernández C. 1991. Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin* 7(9):749-58
- Cardona R, Polanco Villegas M. 2005. Registro y Control de los Medicamentos en Venezuela: Una visión histórica. *INHRR* 36(1):43-56. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772005000100007&lng=es.
- ClusterFarma. Cómo abordar el lanzamiento de un nuevo fármaco [Internet]. (Consultado junio 2022). Disponible en: farma.ebizar.com/abordar-lanzamiento-de-un-nuevo-farmaco/
- European Pharmacopoeia Online, 10ª edición 2021(10.4).
- Gennaro A. 2008. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton.
- Grimm W. 1998. Drug Development & Industrial Pharmacy. Japanese Pharmacopoeia 17a edición (JP XVII) 2016 Farmacopea Japonesa 24: 313-325.
- Organización Mundial de la Salud – OMS. 2009a. Resumen del Análisis de Situación y Tendencias de Salud en Venezuela. Disponible: http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp_862.htm.
- Ortega A. 2007. Actualización de Normas de Estabilidad de Productos Farmacéuticos. *Rev Fac Farm* 70(1):17-21.
- Rampazoo P. 1990. Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *Il Fármaco* 45:80715.
- Rodríguez M. 2017. Estudios de estabilidad en la industria farmacéutica. *Pharmathec*. Disponible: <https://www.pharmatech.es/articulos/20170711/estudios-estabilidad-en-industria-farmacautica>.
- United States Pharmacopoeial Convention. 1990. USP XXII: United States Pharmacopoeia. 22ed. Easton: Mack Printing 1225-1710.
- United States Pharmacopoeial Convention, I. 2008. USP XXXI. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 26. Formulario Nacional.



Citometría de flujo como herramienta biotecnológica

Flow cytometry as a biotechnological tool

SORIUSKA J MAYORA H

Resumen

La citometría de flujo (CMF) es una técnica analítica en la cual las partículas que se encuentran en suspensión pasan de una en una frente a una fuente de luz, típicamente un haz de luz láser. Esto genera cambios en la dispersión de la luz, lo cual se traduce digitalmente a través de un sistema electrónico para brindar información sobre las características de tamaño y complejidad de la partícula analizada. La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia y los parámetros medibles pueden ser intra o extracelulares, para ellos se emplean marcadores fluorescentes y se requiere que las células sean teñidas previo a su análisis. En Venezuela la citometría de flujo ha sido una herramienta utilizada para la evaluación de posibles agentes farmacológicos en distintas patologías como cáncer e inflamación e internacionalmente se ha empleado para la evaluación de cultivos bacterianos y fúngicos además otras múltiples aplicaciones. En este trabajo se describirán algunos de los procesos biotecnológicos en los que la citometría de flujo ha sido empleada y generados aportes significativos a lo largo de las últimas décadas.

Palabras clave: Citometría de flujo, biotecnología, aplicaciones

Abstract

Flow cytometry (FCM) is an analytical technique in which suspended particles are passed one at a time in front of a light source, typically a laser beam. This generates changes in light scattering, which is digitally translated through an electronic system to provide information on the size and complexity characteristics of the analyzed particle. Most of the applications of flow cytometry are based on fluorescence monitoring and the measurable parameters can be intra or extracellular, for which there are used fluorescent markers, and the cells are required to be stained before analysis. In Venezuela, flow cytometry has been used as a tool for the evaluation of possible pharmacological agents in different pathologies such as cancer and inflammation, and internationally it has been used for the evaluation of bacterial and fungal cultures, as well as other multiple applications. This paper will describe some of the biotechnological processes in which flow cytometry has been used and made significant contributions over the last decades.

Keywords: Flow cytometry, biotechnology, applications

Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, UCV. Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C"
Correspondencia: sori_mayo@hotmail.com. Orcid: [0000-0002-7194-7264](https://orcid.org/0000-0002-7194-7264)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.5)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 31/03/2022

Aprobación: 17/04/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 00-00. 2022

Introducción

La citometría de flujo (CMF) es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la ingeniería de proteínas. Constituye una técnica analítica en la cual las partículas suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser. Esto genera cambios en la dispersión de la luz, lo cual se traduce digitalmente a través de un sistema electrónico para brindar información sobre las características de tamaño y complejidad de la partícula analizada (Figura 1).

Una segunda fuente de información proviene del uso de compuestos fluorescentes que pueden estar ligados a anticuerpos específicos contra la partícula a analizar, elementos cuya estructura química sea capaz de emitir fluorescencia al sufrir algún tipo de cambio en su composición o elementos de unión a ácidos nucleicos.

La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia y los parámetros medibles pueden ser intra o extracelulares, para ello se emplean marcadores fluorescentes y se requiere que previamente al análisis las células sean teñidas. Es de esta manera que se pueden evaluar un sin número de características celulares, no solo de forma fenotípica, sino también funcional, lo cual representa una gran ventaja de esta técnica sobre otras, y lo cual genera como resultado que sea una herramienta que ha ganado un gran terreno en el campo de la evaluación y optimización de los procesos biotecnológicos.

Siendo una técnica bien establecida, la citometría de flujo es capaz de proveer información sobre los cultivos a nivel de cada célula a través del análisis de múltiples parámetros extrínsecos o intrínsecos. Los resultados de esta tecnología permiten expandir las posibilidades en el control de bioprocesos y operaciones industriales (Cossarizza y col., 2017).

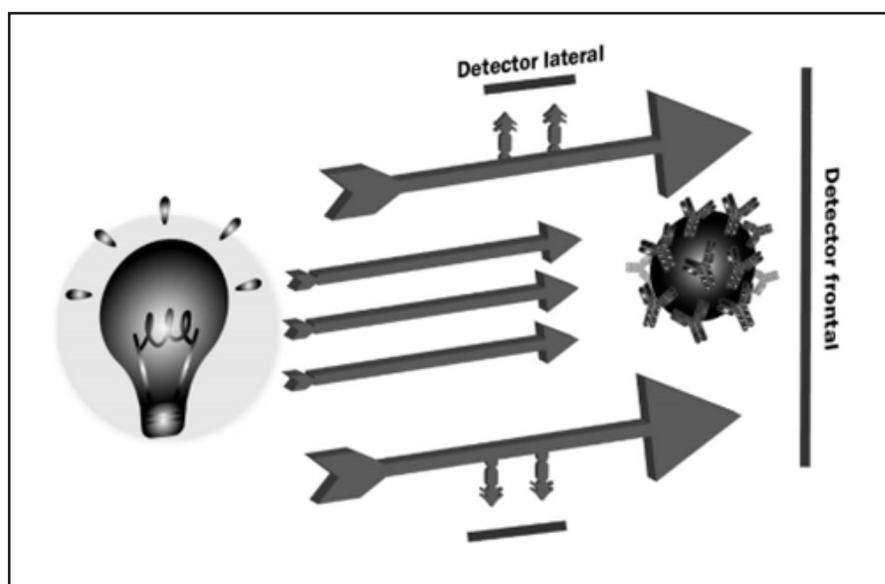


Figura 1. Ilustración del fenómeno de dispersión de luz frontal y lateral en un citómetro de flujo convencional. La dispersión lateral es captada por un detector y traducida para brindar información sobre la complejidad de la partícula analizada, mientras que la dispersión frontal indica su tamaño.

En Venezuela la citometría de flujo ha sido una herramienta utilizada para la evaluación de posibles agentes farmacológicos en distintas patologías como cáncer e inflamación e internacionalmente se ha empleado para la evaluación de cultivos bacterianos y fúngicos, además otras múltiples aplicaciones

En este trabajo se describirán algunos de los procesos biotecnológicos en los que la citometría de flujo ha sido empleada y realizados aportes significativos a lo largo de las últimas décadas.

Aplicaciones de la Citometría de Flujo en el Campo Biotecnológico

El ingeniero agrónomo húngaro Karl Ereky (1919) acuñó el término biotecnología para describir la fusión de la biología con la tecnología. Consiste en que la ciencia y los métodos aplicados a la biología podría utilizarse para convertir las materias primas en productos útiles a partir de organismos vivos. La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que emplea diferentes disciplinas como la biología, química, farmacia y medicina. Se utilizan sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados con el fin de crear o modificar diversos productos o procesos para usos concretos. La creciente lista de productos biotecnológicos incluye medicamentos, dispositivos médicos y diagnósticos, así como cosechas más resistentes, biocombustibles, biomateriales y controles de la contaminación. Por lo que esta ciencia puede ser dividida en muchas ramas que van desde sus aplicaciones médicas hasta las aplicaciones ambientales e industriales. Es por lo que muchos de los procesos se basan en el establecimiento y mantenimiento de cultivos

de microorganismos principalmente de tipo fúngico y bacteriano. La concentración de células viables en un cultivo es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de bioprocesos, aunque existen gran cantidad de métodos para determinar la viabilidad, el usado más comúnmente es el análisis de la integridad de la membrana, defectos en su estructura ocasionan cambios en la permeabilidad celular permitiendo la salida de material intracelular, lo que finalmente puede generar la muerte celular (Rieseber y col., 2021).

Otro de los ensayos más frecuentes es el análisis del ciclo celular, este ensayo es importante para estudiar el crecimiento celular, la senescencia y la apoptosis, lo cual permite investigar mecanismos esenciales, así como evaluar la eficacia de drogas terapéuticas (Kim y Sederstrom, 2015) y métodos de ingeniería genética. Geisinger y Stearns (2021) describen un método basado en citometría de flujo que permite determinar la progresión del ciclo celular en presencia del tratamiento con CRISPR/Cas9, una técnica poderosa utilizada para la edición e ingeniería del genoma.

Aunque resulte innegable que el uso de la citometría de flujo en el campo de la biotecnología aún no ha sido aprovechado a su máximo potencial, sobre todo en los países en vías de desarrollo, es importante destacar los diferentes espacios dentro de esta ciencia en los que la técnica ha demostrado tener importantes aplicaciones.

CMF Y ESTUDIO BACTERIANO

Los métodos convencionales de la microbiología, aunque efectivos son relativamente lentos en comparación a otras técnicas más novedosas, esto se

debe a la necesidad de realizar cultivos los cuales pueden tardar días o semanas para generar resultados. La citometría de flujo permite el análisis múltiple o individual de microorganismos de forma rápida y confiable.

La aplicación de ensayos basados en citometría de flujo permite estudiar como las bacterias presentes en una suspensión ya sea heterogénea u homogénea reaccionan ante la variación en condiciones como temperatura, ausencia o presencia de nutrientes o agentes terapéuticos como los antibióticos.

La detección temprana de la resistencia a los medicamentos contribuye a combatir las bacterias resistentes a los medicamentos y a mejorar los resultados de los pacientes. Para ello, Sawada y col. (2021), validaron la viabilidad del recuento directo de bacterias mediante citometría de flujo cuantitativa de alta sensibilidad mediante el uso de tinción con el fluoróforos SYTO 9 para determinar la resistencia de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a drogas como penicilina y cefotaxime, concluyendo que la citometría de flujo La citometría de flujo cuantitativa de alta sensibilidad presenta una nueva vía para realizar pruebas rápidas de susceptibilidad a los antimicrobianos. De forma similar algunos productos de la industria alimenticia que utilizan organismos bacterianos para su fabricación han recurrido a la citometría flujo para la evaluación rápida de sus procesos, así como la optimización de los mimos. Este es el caso de Chiron y col. (2018), aplicaron ensayos de citometría de flujo para la cuantificación y evaluación de viabilidad de microorganismos en productos probióticos combinando la tinción con dos fluoróforos como lo son el SYTO9 y el yoduro de propidio, encontrando

que con esta tecnología se lograba una cuantificación más rápida comparado con el método clásico. Malacrinò y col., tiñeron bacterias malolácticas y hongos presentes en muestras de medio de cultivo y vino para estudiar su viabilidad a través del uso de distintos marcadores fluorescentes, los investigadores concluyen que la citometría de flujo debe considerarse como una herramienta de valor en el control de calidad microbiológico en los viñedos y para la investigación de la dinámica de crecimiento de microorganismos en los vinos. Gunasekera y col. (2000) desarrollaron un método basado en citometría de flujo para la rápida determinación de la cantidad total de bacterias presentes en muestras de leche utilizando SYTO BC, que es una tinción de ácido nucleico de alta afinidad que penetra tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas, dando una señal fluorescente verde brillante.

CMF, LEVADURAS Y HONGOS

La citometría de flujo ha sido extensamente utilizada para monitorear distintas propiedades de las levaduras. La levadura más estudiada bajo esta técnica ha sido *Saccharomyces cerevisiae* debido a su importante papel en la industria de alimentos y sus múltiples usos en variedad de productos biotecnológicos. El pH intracelular tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones normales de las células de levadura. La capacidad de la célula para mantener esta homeostasis del pH también en respuesta a los cambios ambientales ha ganado cada vez más interés tanto en la investigación básica como en la aplicada. Al respecto, Valli y col. (2017) describen un protocolo que permite la determinación rápida del pH intracelular de las células de *Saccharomyces cerevisiae*. El método se basa en la citometría de flujo

y emplea la sonda fluorescente carboxi SNARF-4F dependiente del pH.

Un parámetro importante en los biorreactores con cultivos filamentosos es la morfología del hongo, dependiendo del objeto deseado para el bioproceso pueden existir características favorables que deben ser cuantificadas. Uno de los organismos más estudiados se refiere al hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum*, el cual tiene un gran número de aplicaciones biotecnológicas como la penicilina. Veiter y Herwing (2019) desarrollaron un método basado en la citometría de flujo que emplea tinción fluorescente el cual permitió evaluar la compleja relación entre la morfología, la viabilidad y la productividad de los hongos, tanto en el desarrollo de procesos como en los procesos de manufactura de rutina. Ehgartner y col. (2017) en su estudio comparativo presentan un método de citometría de flujo para el análisis morfológico como una alternativa rápida y confiable, como una vía alternativa a las herramientas comunes como la microscopía.

CMF EN EL ESTUDIO DE AGENTES FARMACOLÓGICOS

La industria farmacológica evoluciona a medida que la especie humana enfrenta nuevos retos, se necesitan cada vez procedimientos más rápidos y eficientes que permitan evaluar de forma segura diferentes candidatos a agentes terapéuticos. Es en este campo en particular donde la CMF, junto al uso de los cultivos celulares ha logrado una gran contribución al campo a lo largo de los años. Diferentes grupos de investigación, a nivel nacional e internacional, han recurrido a la citometría de flujo para evaluar la acción antitumoral o antiinflamatoria de diversos compuestos

orgánicos. Así, Daddiouaissa y col. (2019) describieron los efectos antiproliferativos *in vitro* y los eventos apoptóticos del extracto líquido iónico de la fruta de Graviola (IL-GFE) en células de cáncer de mama MCF-7 y su comportamiento citocinético para observar su potencial como alternativa terapéutica en el tratamiento del cáncer. Para observar los efectos del extracto de fruta de Graviola emplearon el ensayo de viabilidad celular del extracto, mediante el uso de bromuro de tetrazolio (ensayo MTT) y la distribución del ciclo celular y el mecanismo de apoptosis de la acción de IL-GFE en células cancerosas MCF-7 la observaron mediante citometría de flujo. Así demostraron que el IL-GFE fue capaz de afectar el comportamiento citocinético de las células MCF-7 al reducir la viabilidad celular, inducir la apoptosis y la detener el ciclo celular en la fase G0/G1. De forma similar, Cardullo y col. (2020) sobre las líneas celulares HCT116, HT-29 y PC3, utilizaron el ensayo de apoptosis con anexina V, con el fin de determinar el efecto de los compuestos bisfenol inspirados en honokiol, este último un neolignano natural que muestra una variedad de propiedades biológicas, incluida la actividad antitumoral. Los experimentos de citometría de flujo realizados con estos neolignanos mostraron que la inhibición de la proliferación se debe principalmente a un proceso apoptótico.

En Venezuela, Ramírez y col. (2021) destacan la acción antimalárica y anticancerígena *in vitro* de compuestos sintéticos derivados de 7-cloroquinolonas al evaluar la viabilidad, ciclo celular e inducción de la apoptosis sobre las líneas celulares MCF-7 humana y A549. El efecto de los derivados 6 y 12 de la 7-cloroquinolina sobre la apoptosis y la necrosis de la línea celular MCF-7 humana, fue evaluado por citometría de flujo demostrándose que

estos derivados fueron más activos contra las células MCF-7, evidenciado por su efecto anti-proliferativo y proapoptótico.

La nanotecnología, mediante el uso de nanopartículas de oro, puede servir para tratar con más eficacia algunos tumores cancerígenos, ya que las nanopartículas de oro aumentan el efecto de la radioterapia al reducir la toxicidad de la quimioterapia y aumentar la eficacia de la radioterapia. Así, utilizando la CMF para sus estudios en terapias antineoplásicas, Yun y col. (2020) midieron el efecto de las nanopartículas de oro en líneas celulares de cáncer gástrico humano demostrando un efecto mediante la modulación de mediadores pro-apoptóticos como la caspasa-3, Bax, Bid, y la caspasa-9 y anti-apoptóticos como el Bcl-2 y el Bcl-XL. Igualmente, Daei y col. (2021), abordaron las células de cáncer de vejiga demostrando que las nanopartículas de oro inducen un aumento significativo de la producción de especies reactivas de oxígeno, inducen la apoptosis y suprimen la migración celular en las células 5637 del cáncer de vejiga. Ambos combinaron sus estudios con las nanopartículas de oro y métodos basados en la técnica de citometría de flujo.

Conclusiones

Después de esta breve panorámica sobre las aplicaciones de la citometría de flujo, queda claro que esta técnica tiene mucho que ofrecer al campo de la biotecnología, su implementación en las diferentes industrias de productos biotecnológicos demuestra que se trata de una herramienta aprovechable que, en un futuro próximo, y en conjunto a otros avances tecnológicos podría convertirse en parte fundamental en el desarrollo y optimización de bioprocesos.

Referencias Bibliográficas

- Cardullo N, Barresi V, Muccilli V, Spampinato G, D'Amico M, Condorelli DF, Corrado T. 2020. Synthesis of bisphenol neolignans inspired by honokiol as antiproliferative agents. *Molecules* 25(3):733.
- Chiron C, Tompkins TA, Burguière P. 2018. Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of microorganisms in multistrain probiotic products. *J Appl Microbiol* 124(2):572-584.
- Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, André I, Annunziato F, et al. 2017. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*, 47(10), 1584-1797.
- Daddiouaissa D, Amid A, Kabbashi N, Fazia F, Elnour A, Epandy M. 2019. Antiproliferative activity of ionic liquid-graviola fruit extract against human breast cancer (MCF-7) cell lines using flow cytometry techniques. *J Ethnopharmacol* 23; 236:466-473.
- Daei S, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Khanaki K, Bahreini F. 2021. Anti-cancer Effects of Gold Nanoparticles by Inducing Apoptosis in Bladder Cancer 5637 Cells. *Biol Trace Elem Res* doi: 10.1007/s12011-021-02895-9.
- Díaz M. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Engineeri J* 48: 385-407.
- Ehgartner D, Herwig C, Fricke J. 2017. Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry-the fast alternative to microscopic image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(20):7675-7688.
- Geisinger JM, Stearns T. 2021. Assaying cell cycle progression via flow cytometry in CRISPR/Cas9-treated cells. *Methods Mol Biol* 2329:195-204.
- Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. 2000. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl Environ Microbiol* 66(3):1228-1232.
- Kim KH, Sederstrom JM. 2015. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* 111:28.6.1-28.6.11.
- Lloyd D. 2001. Flow Cytometry of Yeasts. *Curr Protoc Cytom Chapter 11: Unit 11.10.*
- Malacrino P, Zapparoli G, Torriani S, Dellaglio F. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 45(2):127-34.

- Manohar SM, Shah P, Nair A. 2021. Flow cytometry: principles, applications, and recent advances. *Bioanalysis* 13(3):181-198.
- Ramírez H, Fernández E, Rodrigues J, Mayora S, Martínez G, Celis C, De Sanctis JB, Mijares JM, Charris J. 2021. Synthesis and antimalarial and anti-cancer evaluation of 7-chloroquinoline-4-thiazoleacetic derivatives containing aryl hydrazide moieties. *Arch Pharm (Weinheim)* 354(7): e2100002.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:350-360.
- Sajede D, Ziamajidi N, Abbasalipourkibir R, Khanaki K, Bahreini F. 2021. Anticancer effects of gold nanoparticles by inducing apoptosis in bladder cancer 5637 cells. *Biol Trace Elem Res* 28. doi: 10.1007/s12011-021-02895-9.
- Sawada T, Katayama M, Takatani S, Ohiro Y. 2021. Early detection of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by quantitative flow cytometry. *Sci Rep* 11(1):2873.
- Schmid RD, Schmidt-Dannert C, Hammelehle R. 2016. *Biotechnology an Illustrated primer*. Wiley-Blackwell ISBN: 978-3-527-33515-2.
- Valli M, Sauer M, Branduardi P, Borth N, Porro D, Mattanovich D. 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 71(3):1515-21.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods* 243(1-2):191-210.
- Veiter L, Herwing C. 2019. The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry-a fast and statistically sound insight into morphology and viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(16):6725-6735.
- Yun Z, Chinnathambi A, Alharbi SA, Jin Z. 2020. Biosynthesis of gold nano-particles using *Vetex negundo* and evaluation of pro-apoptotic effect on human gastric cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B* 203:111749.



Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1

Anti-inflammatory and antioxidant effect of resveratrol on atherosclerosis. Role of platelet endothelial cell adhesion molecule 1

LETICIA FIGUEIRA¹, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{1,2}

Resumen

La molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1 (PECAM-1) es una glicoproteína con diversas funciones en la biología vascular que está involucrada en la fisiopatología de la aterosclerosis. El resveratrol es un polifenol con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos de PECAM-1 y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol. 40 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en cuatro grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (control resveratrol): Conejarina y resveratrol (2mg/Kg). Grupo 4: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol y resveratrol. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, PECAM-1 y TBARS al inicio, 6ta, y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento de los niveles séricos de PECAM-1 y TBARS en los grupos 2 y 4 desde la 6ta semana de experimentación con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ($p < 0,005$). Desde la sexta semana, el resveratrol inhibió el aumento de las concentraciones de PECAM-1 inducida por la dieta enriquecida con colesterol ($p < 0,005$). En la duodécima semana se observó que el resveratrol revirtió el aumento de los niveles de TBARS inducido por la dieta enriquecida con colesterol ($p = 0,004$). El tratamiento con resveratrol disminuyó la formación de ateromas. En conclusión, la PECAM-1 y TBARS son marcadores séricos de aterosclerosis; corroborando el papel de la inflamación y estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad. Asimismo, la suplementación oral de resveratrol puede inducir efectos antiaterogénicos dependientes de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

Palabras clave: Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1, resveratrol, inflamación, estrés oxidativo, aterosclerosis

Abstract

Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) is a glycoprotein with vascular functions and are involved in atherosclerosis. Resveratrol is a polyphenol and has anti-inflammatory and antioxidant actions. We evaluated the effect of resveratrol on serum concentrations of PECAM-1 and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 40 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 concentration of lipid profile, PECAM-1 and TBARS were determined. Half of the animals were sacrificed on sixth or on twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the PECAM-1 and TBARS levels were significantly higher in Groups 2 and 4 than groups 1 and 3, respectively since on 6th week ($p < 0.005$). Resveratrol treatment reversed the increased levels of PECAM-1 induced by cholesterol diet on 6th week ($p < 0.005$). Resveratrol treatment reversed the increased levels of TBARS induced by cholesterol diet on 12th week ($p = 0.004$). Supplementation of resveratrol diminished the formation of atherosclerotic lesions. These results support that serum PECAM-1 and TBARS levels are markers of atherosclerosis. Likewise, oral supplementation of resveratrol may induce anti-atherosclerotic effects depending on its anti-inflammatory and antioxidants properties.

Keywords: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, resveratrol, inflammation, oxidative stress, atherosclerosis

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.

Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com. Orcid: [0000-0003-3865-5355](https://orcid.org/0000-0003-3865-5355) 2. Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela. Orcid: [0000-0003-1980-5848](https://orcid.org/0000-0003-1980-5848)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.6](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.6)

Disponibile: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 29/05/2022

Aprobación: 06/06/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 51-66. 2022

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica y degenerativa de la pared de las arterias, caracterizada por el reclutamiento de monocitos, formación de células espumosas y lesiones complejas con proliferación de células musculares lisas, núcleo necrótico, cristales de colesterol y calcificación; donde la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel importante (Libby, 2002). La migración transendotelial de leucocitos es un evento clave en los procesos inflamatorios y en la aterosclerosis, el cual es mediado y controlado por diferentes moléculas activadoras y vías de señalización (Woodfin y col., 2007). A pesar de que la aterosclerosis está asociada a factores de riesgo clásicos de enfermedad cardiovascular (ECV), las lesiones ateroscleróticas se desarrollan de manera preferente en regiones de flujo perturbado, caracterizados por una tensión de cizallamiento, lo cual promueve distintos fenotipos pro o antiaterogénicos (Hastings y col., 2007; Harry y col., 2008; Xia y col., 2021).

Se ha sugerido que un complejo mínimo necesario para la respuesta al estrés de cizallamiento de las células endoteliales requiere de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1 (PECAM-1, CD31), la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) (Tzima y col., 2005); en donde el PECAM-1 detecta la fuerza ejercida por el flujo sanguíneo sobre las células endoteliales conllevando la activación transendotelial del VEGFR2, el cual desencadena la activación conformacional de las integrinas, seguido de la estimulación del factor de transcripción nuclear κ -B (NF- κ B), responsable de la expresión de moléculas de adhesión celular, citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (Harry y col., 2008).

La PECAM-1 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), que está presente sobre la superficie de plaquetas, células endoteliales, monocitos neutrófilos y linfocitos (Soriano y col., 2021), la cual es una molécula de señalización, y tiene además diversas funciones en la biología vascular; pues participa en la angiogénesis, función plaquetaria, trombosis, es un sensor mecánico al estrés por cizallamiento, y participa en la regulación de la migración de leucocitos (Woodfin y col., 2007); de hecho estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la PECAM-1 está implicada en la migración transendotelial de los leucocitos, evento clave en la aterogénesis (Muller y col., 1993; Vaporciyan y col., 1993). De igual manera, juega un relevante papel en la regulación de los procesos trombóticos; pues se ha descrito que el aumento de su expresión y actividad está asociada a la inhibición de la formación de trombos (Jones y col., 2009); de hecho, se ha reportado que ratones deficientes en esta proteína exhiben un fenotipo protrombótico (Falati y col., 2006). Por otra parte, la PECAM-1 regula la actividad de las plaquetas (Marcinczyk y col., 2021), pues se ha encontrado que las interacciones plaquetas – células endoteliales contribuyen en la aterogénesis; ya que las plaquetas adheridas potencialmente aceleran la aterosclerosis mediante el reclutamiento de leucocitos, los cuales sirven como una fuente de citoquinas proinflamatorias y activación del inflammasoma, suprimiendo la resolución de la inflamación (Barrett y col., 2019; Rolfes y col., 2020; Brown y col., 2021).

Durante las últimas décadas diversos estudios han examinado el papel del estrés oxidativo sobre la aterogénesis (Kattoor y col., 2017; Forman y col., 2021). En este

sentido, ha sido ampliamente demostrado que la función endotelial se encuentra alterada desde los estadios más tempranos de la aterosclerosis; de hecho, se cree que la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) induce la disfunción endotelial, paso inicial de la aterogénesis, puesto que el estrés oxidativo conlleva la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la inactivación del óxido nítrico (NO), la expresión de genes inflamatorios redox sensibles, como la molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos -1 (MCP-1), entre otros. Todos estos cambios inducen la alteración en la estructura y función de las células endoteliales y contribuyen a la iniciación de la aterosclerosis (Kondo y col., 2009, Vogiatzi y col., 2009; Kattoor y col., 2017; Alonso-Piñeiro y col., 2021). Sin embargo, estudios epidemiológicos y experimentales han sugerido que la ingesta de antioxidantes está asociada con un reducido riesgo de ECV (Figueira y col., 2018, 2019, 2020; Forman y col., 2021; Jiménez y col., 2021), lo cual sugiere la importancia del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad.

El resveratrol (3',5,4' - trihidroxiestilbeno) es un polifenol estilbeno presente en muchas plantas, frutas y vegetales como las uvas, bayas, ciruelas y nueces, el cual ha llamado la atención por sus efectos antioxidantes, antiangiogénicos, inmunomoduladores, antimicrobianos, antidiabéticos, anticancerígenos y en la prevención de las ECV (Figueira, 2010; Zhang y col., 2021). Diferentes evidencias indican que el resveratrol podría ser beneficioso para prevenir el inicio y progresión de la aterosclerosis (Zghonda y col., 2011), pues inhibe la oxidación de las LDL, suprime la agregación plaquetaria,

inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular, disminuye el daño de las células endoteliales, atenúa el engrosamiento de la íntima media y reduce el tamaño de las lesiones ateroscleróticas, modula la producción de NO, inhibe la producción de MCP-1 y controla los niveles de colesterol plasmáticos, factores importantes en la aterogénesis (Labinskyy y col., 2006, Wu y col., 2011; Banez y col., 2020; Meza-Torres y col., 2020). El resveratrol además puede conferir vasculoprotección mediante la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios y pro-aterogénicos en las células endoteliales (Labinskyy y col., 2006), pues puede afectar la vía del NF- κ B, regulando la respuesta inmune; además, regula la diferenciación, crecimiento y proliferación celular mediante la inhibición de la vía PI3K/Akt (Zhang y col., 2021). A pesar de la evidencia descrita, se desconoce los efectos del resveratrol sobre los niveles séricos de PECAM-1 en modelo de aterosclerosis *in vivo*, y la relación del PECAM-1 con el estrés oxidativo; aún más, se conoce todavía menos su evolución a lo largo del proceso aterogénico; es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del PECAM-1 y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) 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 40 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 10 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; Jiménez y col., 2021), 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 National Institute of Health (NIH Publications No. 8023,1978).

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) por método 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 PECAM-1 fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático tipo sándwich competitivo (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). Los TBARS fueron evaluadas por un método colorimétrico, el cual consistió en evaluar el efecto de las EROs sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979).

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, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan

lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary 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 PECAM-1 con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

LÍPIDOS SÉRICOS DE LOS CONEJOS

La Tabla I resume las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones basales de CT y sus fracciones entre los grupos de conejos en estudio. El CT, c-HDL, c-LDL 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 y sus fracciones 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 ($p < 0,0001$).

Tabla I. Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)
Basal			
Grupo 1	71 ± 12	39 ± 9	36 ± 10
Grupo 2	72 ± 11	40 ± 7	38 ± 11
Grupo 3	68 ± 15	45 ± 6	32 ± 7
Grupo 4	68 ± 15	36 ± 10	40 ± 9
6ta semana			
Grupo 1	78 ± 16	42 ± 11	34 ± 8
Grupo 2	607 ± 147 [*]	542 ± 72 [*]	71 ± 19 [*]
Grupo 3	87 ± 19	41 ± 9	38 ± 12
Grupo 4	597 ± 129 [#]	519 ± 83 [#]	68 ± 25 [#]
12ma semana			
Grupo 1	82 ± 15	48 ± 7	35 ± 9
Grupo 2	981 ± 251 [*]	804 ± 91 [*]	89 ± 40 [*]
Grupo 3	84 ± 17	48 ± 10	40 ± 11
Grupo 4	1017 ± 239 [#]	835 ± 101 [#]	94 ± 54 [#]
Valores p			
Grupo 1	0,9672	0,9925	0,9812
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 3	0,2917	0,7514	0,6857
Grupo 4	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.

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PECAM-1 Y TBARS

Como se puede apreciar en las Figuras 1 y 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de PECAM-1 y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. La PECAM-1 y TBARS 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 PECAM-1 y TBARS aumentaron

en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ($p < 0,005$). Sin embargo, en la 6^{ta} y 12^{ma} semana se evidenció una disminución significativa de la concentración de PECAM-1 en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p < 0,0050$) (Figura 1). Por otra parte, en la 12^{ma} semana se observó una disminución significativa de los niveles de TBARS en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p = 0,0040$) (Figura 2).

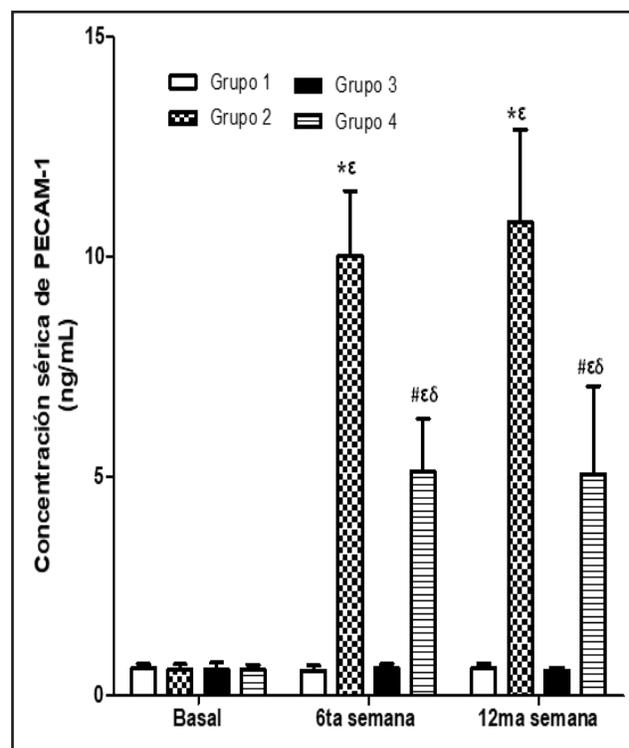


Figura 1. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de PECAM-1 en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6^{ta} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media ($n = 10$ basal y 6^{ta} semana; $n = 5$ en la 12^{ma} semana). * $p < 0,005$ vs. grupo control (Grupo 1). # $p < 0,005$ vs. control resveratrol (Grupo 3). $\delta p < 0,005$ vs. Grupo 2. $\epsilon p < 0,0001$ vs. su respectivo valor basal.

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de PECAM-1 con el perfil lipídico y TBARS, evidenciando correlación positiva significativa entre las variables ($p < 0,0001$).

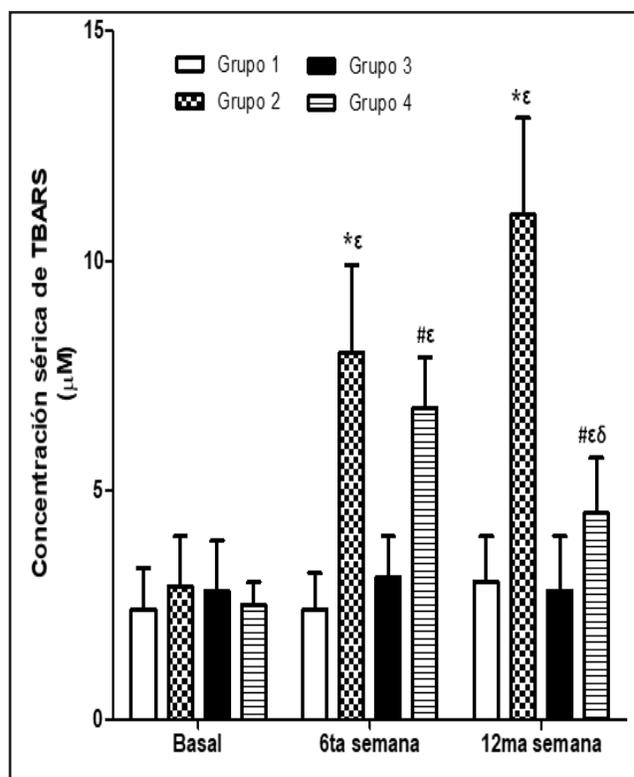


Figura 2. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6^{ta} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=10 basal y 6^{ta} semana; n=5 en la 12^{ma} semana). *p<0,005 vs. grupo control (Grupo 1). #p<0,005 vs. control resveratrol (Grupo 3). δ p<0,004 vs. Grupo 2. ϵ p<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

Tabla II. Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de PECAM-1, TBARS y el perfil lipídico

	r	p
PECAM-1 & CT	0,5249	0,0001
PECAM-1 & c-LDL	0,4579	0,0001
PECAM-1 & c-HDL	0,3288	0,0001
PECAM-1 & TBARS	0,4686	0,0001

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, PECAM-1: Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1, TBARS: Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

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 3).

Discusión

Las ECV constituyen actualmente uno de los principales desafíos sanitarios; pues de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 17,9 millones de personas a nivel mundial están afectadas cada año; y se estima que esta tasa crezca debido al aumento en la incidencia de obesidad y síndrome metabólico, además del incremento en la tasa de complicaciones cardíacas relacionadas con la enfermedad del Coronavirus-19 (COVID-19) (Madjid y col., 2020; Raj y col., 2021).

Ha sido ampliamente descrito que la extravasación de los leucocitos es esencial para la defensa contra infecciones, y es un sello distintivo de la inflamación y de la aterosclerosis; la cual es controlada por una interacción entre receptores de adhesión celular y señales quimiotácticas que regulan el rodamiento, fijación, adhesión y migración transendotelial de los leucocitos; donde la PECAM-1 está implicada en este proceso (Vestweber, 2015; Arif y col., 2021).

La PECAM-1 es una glicoproteína transmembrana tipo 1 de 130 KDa, con 6 dominios extracelulares similares a las Ig, que facilita uniones homofílicas y heterofílicas; además es una eficiente molécula de señalización celular (Woodfin y col., 2007;

Tabla III. 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	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)
3	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)

Wimmer y col., 2019). Está expresada en plaquetas, células endoteliales, neutrófilos, monocitos, linfocitos. Se ha descrito que las uniones inter-endoteliales son especialmente ricas en esta molécula de adhesión celular, pues media la diapédesis de neutrófilos a través de la pared vascular (Schenkel y col., 2004), así como la integridad vascular (Biswas y col., 2006); de hecho, Arif y col., en el 2021 encontraron que la PECAM-1 media la diapédesis de los leucocitos *in vivo* e *in vitro* al desestabilizar las uniones endoteliales, mediante la desfosforilación e internalización de las VE-cadherinas. Además, la PECAM-1 participa en la angiogénesis y remodelado vascular (Collins y col., 2012; Wimmer y col., 2019).

La PECAM-1 también ha sido asociada con la regulación en la producción de NO inducido por cizallamiento (Fleming y col., 2005); de hecho, se ha postulado que esta molécula es un mecanosensor vascular que responde a las fuerzas de cizallamiento,

activando vías de señalización celular que conducen a la liberación de vasodilatadores como el NO (Chrétien y col., 2010); pues el bloqueo de la fosforilación de la PECAM-1 con PP1, un inhibidor de la quinasa Src, bloquea la fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en respuesta al estrés por cizallamiento (Fleming y col., 2005), lo cual demuestra que la fosforilación de PECAM-1 es esencial para la producción de NO a través de la fosforilación de eNOS; donde interviene además el proteoglicano heparán sulfato, glipicano-1 (Bartosch y col., 2021).

En el presente estudio se encontró que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un aumento en las concentraciones del PECAM-1 desde la 6ta semana de experimentación, lo cual estuvo acompañado por incremento en los lípidos séricos y con la presencia de lesiones ateroscleróticas, lo cual apoya la existencia de un estado inflamatorio en la

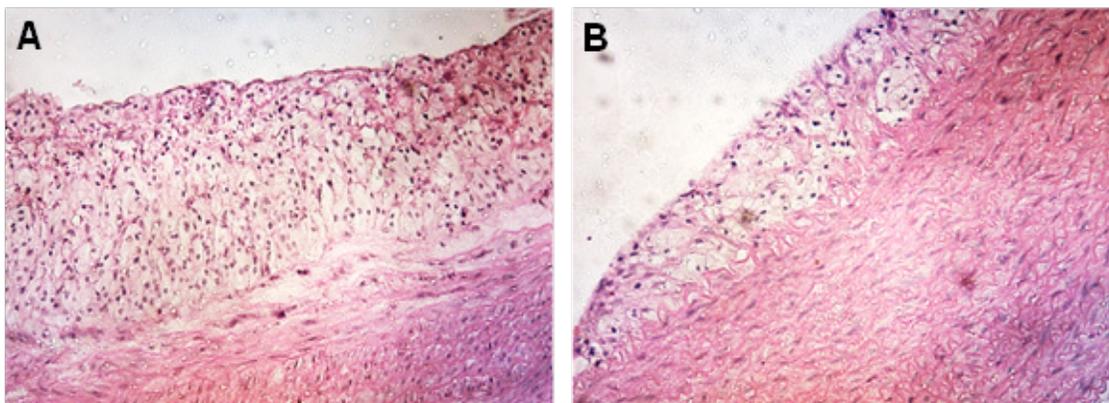


Figura 3. Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio. Lesión tipo IV (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 2. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Lesión tipo III (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 4. Se observa un cúmulo de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares. Tinción hematoxilina – eosina. 50X.

aterosclerosis, sugiriendo la importancia de la inflamación en la aterogénesis, tal y como se ha reportado previamente (González y col., 2007; Figueira y col., 2008; González y col., 2018; Figueira y col., 2018, 2019, Marchio y col., 2019; Wolf y col., 2019; Figueira y col., 2020; Jiménez y col., 2021); asimismo, los resultados de la presente investigación destacan la utilidad de esta molécula como un posible marcador sérico, temprano y no invasivo de aterosclerosis. En este sentido, diversos estudios han demostrado el papel de esta proteína en la aterosclerosis, pues Harry y col. (2008), demostraron un efecto ateroprotector en las regiones de aorta expuestas a flujo sanguíneo perturbado inducido por estrés de cizallamiento en ratones deficientes para PECAM-1; pues se ha descrito que el estrés de cizallamiento genera tensión entre las células endoteliales adyacentes y activa el PECAM-1, lo cual conlleva la translocación nuclear del NF- κ B con la consecuente expresión de mediadores inflamatorios tales como VCAM-1, que promueven la aterosclerosis. En efecto, ratones deficientes en Apolipoproteína E (Apo E) y PECAM-1, muestran una reducción en el tamaño de las lesiones

ateroscleróticas, de la expresión de VCAM-1, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), selectina P, de la activación del NF- κ B y reducida infiltración de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, en comparación con los ratones deficientes en Apo E (Tzima y col., 2005).

Adicionalmente, la PECAM-1 contribuye en la aterogénesis a través de su capacidad de mediar la infiltración de leucocitos; pues estudios *in vitro* han demostrado que las LDL oxidadas (LDLox) promueven la migración de monocitos a través de las células endoteliales estimuladas por citoquinas a través de un mecanismo que involucra la regulación hacia arriba de la PECAM-1 y hacia la baja de VE-cadherinas en las células endoteliales (Hashimoto y col., 2007); por otro lado, se ha descrito en pacientes diabéticos, los cuales tienen una mayor incidencia de aterosclerosis, que la insulina y los niveles elevados de glucosa pueden promover un incremento en la migración de leucocitos a través de las células endoteliales mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación de la PECAM-1 (Okouchi y col., 2002). Por otra parte, se ha puntualizado que

los polimorfismos del gen PECAM-1 humano se correlacionan con la incidencia de aterosclerosis coronaria (Elrayess y col., 2003), enfermedad de las arterias coronarias (Fang y col., 2005) e infarto al miocardio (Sasaoka y col., 2001), lo cual ratifica la importancia de esta molécula en la patogénesis de la aterosclerosis y ECV.

Asimismo, nuestros hallazgos demuestran un aumento en la producción de los TBARS séricos en los grupos a los que se les administró una dieta enriquecida con colesterol desde la 6ta semana de experimentación, lo cual sugiere que la administración de una dieta enriquecida con lípidos induce un aumento en la producción de EROs, tal y como se ha encontrado en otros estudios (González y col., 2007; Figueira y col., 2008, 2010), sugiriendo la importancia del estrés oxidativo en la aterosclerosis (Marchio y col., 2019; Yuan y col., 2019). De hecho Figueira y col., (2010), demostraron que la administración de una dieta hiperlipidémica durante 12 semanas en conejos macho Nueva Zelanda ocasionó un aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática con respecto al grupo control desde la 6ta semana de experimentación, lo cual se acompañó de lesiones ateroscleróticas en la aorta de los conejos; asimismo, evidenciaron que la administración de una dieta hiperlipidémica suplementada con antioxidantes inhibió la formación de las lesiones; sugiriendo que en condiciones de hiperlipidemia con o sin suplementación de antioxidantes existe un incremento en la actividad de GPx debido a un estado de estrés oxidativo; en este sentido, los investigadores sugieren que la elevación en la actividad de la enzima antioxidante representa un mecanismo compensatorio al incremento del estrés oxidativo inducido por la dieta hiperlipidémica; sugiriendo la importancia

del estrés oxidativo en la fisiopatología de la aterosclerosis; tal y como se evidenció en la presente investigación, donde se observó un incremento en la peroxidación lipídica tras la administración de una dieta enriquecida con colesterol. De hecho, estudios clínicos han demostrado un incremento en las concentraciones séricas de hidroperóxidos lipídicos en pacientes con ECV; pues Yilmaz y col. (2020) demostraron disminución de los niveles de malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y superóxido dismutasa (SOD) en pacientes con ECV después de 12 semanas con terapia antioxidante oral, lo cual sugiere la participación del estrés oxidativo en la patogénesis de las ECV, y el beneficio de la terapia antioxidante en la misma.

Igualmente, encontramos una asociación positiva entre la PECAM-1 con los lípidos séricos y los TBARS, lo cual sugiere la relación que tiene tanto la inflamación como el estrés oxidativo durante la aterosclerosis; en este sentido Brown y col. (2021) encontraron que el grado de adhesión plaquetaria se correlacionaba con el grado de expresión de VCAM-1, siendo inhibida por la apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, sugiriendo que la adhesión plaquetaria y el estrés oxidativo contribuye a la activación inflamatoria del endotelio.

Es conocido que la migración de leucocitos al interior de la pared del vaso sanguíneo es un evento temprano en la aterogénesis y es controlado mediante la expresión de moléculas de adhesión celular; en este sentido, el abordaje farmacológico con moléculas con acciones antioxidantes y antiinflamatorias como el resveratrol, ha demostrado disminuir la expresión de moléculas de adhesión celular *in vitro*

como la VCAM-1 e ICAM-1 y atenuar la adhesividad de los monocitos al endotelio (Carluccio y col., 2003).

El resveratrol es un polifenol que ejerce efectos beneficiosos *in vitro* al modular eventos relacionados con la aterosclerosis, pues inhibe la oxidación de las LDL, suprime la agregación plaquetaria, inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular, disminuye el daño de las células endoteliales, modula la producción de NO, inhibe la producción de quimioquinas y la producción de EROs, factores importantes en la aterogénesis (Zghonda y col., 2011). Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que el resveratrol podría ser un agente que previene el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, pues atenúa el engrosamiento de la íntima media y reduce el tamaño de las lesiones ateroscleróticas, mejora la función endotelial (Rush y col., 2007, Silan, 2008), pues produce vasodilatación tanto dependiente como independiente del endotelio (Nagaoka y col., 2007), pues algunos estudios han indicado que el resveratrol inhibe la respuesta contráctil a la noradrenalina y causa relajación en aorta de rata pre-contráctil con fenilefrina (Chen y col., 1996), y reduce el tono vascular en anillos de aorta y en arteria coronaria; siendo este efecto dependiente de un incremento en la expresión de eNOS, de la liberación de NO (Takahashi y col., 2009) y a la disminución de su inactivación (Li y col., 2009).

En el presente estudio, y bajo nuestras condiciones experimentales, se demostró que la suplementación oral de resveratrol (2mg/Kg de peso corporal) durante 12 semanas, fue capaz de disminuir las concentraciones séricas de PECAM-1 y de TBARS en los conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol,

desde la sexta y duodécima semana de experimentación, respectivamente, lo cual estuvo acompañado con una reducción en el tamaño y del grado de las lesiones ateroscleróticas (lesiones leves o inclusive su ausencia), lo cual sugiere que el resveratrol tendría efectos anti-aterogénicos debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En este sentido algunos trabajos han evaluado el efecto del resveratrol sobre la aterosclerosis *in vivo* (Matos y col., 2012; Figueira y col., 2018; Figueira y col., 2019; Seo y col., 2019; Figueira y col., 2020, Jiménez y col., 2021). En este sentido, Seo y col. (2019), encontraron que la suplementación de resveratrol fue capaz de disminuir la severidad de las lesiones ateroscleróticas y la expresión de moléculas de adhesión celular como la ICAM-1 en un modelo murino de aterosclerosis, siendo este efecto dependiente de la vía FERM –quinasa y Nrf2. Por su parte, Matos y col. (2012) encontraron que la administración de resveratrol 2mg/Kg/día durante 4 semanas y 1% colesterol en la dieta, inhibió la progresión de las lesiones ateroscleróticas y redujo la relación íntima/media en comparación al grupo no suplementado con resveratrol. Asimismo, la dieta hipercolesterolémica causó el desarrollo de lesiones ateroscleróticas avanzadas (lesiones tipo III, IV y V) asociadas con un proceso inflamatorio; por su parte, el resveratrol redujo la expresión de MCP-1, VCAM-1, e interleucina-6 (IL-6) en la íntima arterial de los conejos hipercolesterolémicos. Por otra parte, estudios *in vitro* han encontrado que el resveratrol inhibe la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 inducida por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos e inhibe la activación de dos moléculas de inflamación importantes en las vías de señalización, las quinasas

reguladas por señales extracelulares (ERK) y el NF- κ B en cultivo de adipocitos (Kang y col., 2010).

Asimismo, algunos investigadores han indicado que el efecto cardioprotector del resveratrol es debido a su capacidad antioxidante (Muller y col., 2009); ya que es capaz de inhibir el daño oxidativo, actuando sobre radical anión superóxido e hidroxilo (Rahman, 2008), inhibiendo la producción de EROs y la peroxidación lipídica (Labinskyy y col., 2006); siendo dichos efectos mediados por un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, GPx y catalasa (Li y col., 2009), y disminución de la expresión y actividad de la NAD(P)H oxidasa (Chow y col., 2007). De hecho, se ha encontrado que el pre-tratamiento *in vitro* con resveratrol en línea celular de macrófagos fue capaz de inhibir la formación de células espumosas y la producción de EROs inducida por LPS, mediante la inhibición de la expresión de la NAD(P)H oxidasa, a través de la inhibición de la activación de la vía PI3K/Akt (Park y col., 2009). Estos efectos antioxidantes han estado relacionados con una mejoría en la función vascular, pues la disminución de los niveles de anión superóxido asociados con el resveratrol se ven acompañados de un consecuente incremento en la biodisponibilidad del NO, mejorando la función vascular (Li y col., 2009).

Hasta los momentos existe poca evidencia del efecto del resveratrol sobre la PECAM-1. En este sentido, la evidencia ha demostrado que el resveratrol es capaz de inhibir la expresión del PECAM-1 y del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), y reducir la adhesión entre las células inflamatorias y las endoteliales en un modelo murino de pancreatitis aguda, por lo que dicho efecto podría reducir la

severidad del daño pulmonar complicado con pancreatitis aguda (Wang y col., 2006). Asimismo, un estudio *in vitro* encontró que el resveratrol fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por LDLox, la formación de EROs, y suprimió completamente la expresión de PECAM-1 en plaquetas tratadas con LDLox (Jie y col., 2015), destacando los efectos antioxidantes, antiagregantes y antiinflamatorios que tiene este polifenol. Por otra parte, Robich y col., en el 2010, demostraron que la suplementación de resveratrol en un modelo de síndrome metabólico en cerdos, mejoró los factores de riesgo cardiovascular (índice de masa corporal, tolerancia glucosada, colesterol sérico, presión sistólica) y disminuyó la expresión de PECAM-1 y aumentó la expresión de trombospondina-1 en el endotelio, pudiendo modular la angiogénesis; ya que la trombospondina-1 tiene propiedades antiangiogénicas, mediante la disminución de la expresión de la PECAM-1, de la proliferación y migración de células endoteliales. Por lo tanto, la disminución del PECAM-1 y TBARS inducida por el resveratrol en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol, podría contribuir en el efecto antiaterogénico de esta fitoalexina gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

En conclusión, bajo nuestras condiciones de estudio se pudo apreciar que la PECAM-1 es un marcador sérico y temprano de aterosclerosis; lo cual refuerza y corrobora el papel de la inflamación en la fisiopatología de esta enfermedad. Asimismo, los resultados del presente estudio soportan la noción que el resveratrol puede inducir efectos antiaterogénicos dependientes de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes al disminuir las concentraciones séricas de PECAM-1 y de

los TBARS; sugiriendo el potencial valor terapéutico que tiene el resveratrol en las ECV.

Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de María José De Freitas y de Manuel Avelino Dinis.

Conflicto de interés

Los autores no tienen conflicto de interés

Referencias Bibliográficas

- Alonso-Piñero JA, González-Rovira A, Sánchez-Gomar I, Moreno JA, Durán-Ruiz MC. 2021. Nrf2 and Heme Oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress. *Antioxidants (Basel)* 10(9):1463.
- Arif N, Zinnhardt M, Nyamay'Antu A, Teber D, Bruckner R, Schaefer K, Li Y, Trappmann B, Grashoff C, Vestweber D. 2021. PECAM-1 supports leukocyte diapedesis by tension-dependent dephosphorylation of VE-cadherin. *EMBO J* 40: e106115.
- Banez M, Geluz M, Chandra A, Hamdan T, Biswas O, Bryan N, Von Schwarz E. 2020. A systemic review on the antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin, and dietary nitric oxide supplementation on human cardiovascular health. *Nutr Res* 78:11-26.
- Barrett TJ, Schlegel M, Zhou F, Gorenchtein M, Bolstorff J, Moore KJ, Fisher EA, Berger JS. 2019. Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Sci Transl Med* 11:517.
- Bartosch A, Mathews R, Mahmoud M, Cancel L, Haq Z, Tarbell J. 2021. Heparan sulfate proteoglycan glypican-1 and PECAM-1 cooperate in shear-induced endothelial nitric oxide production. *Sci Rep* 11(1):11386.
- Biswas P, Canosa S, Schoenfeld D, Schoenfeld J, Li P, Cheas LC. 2006. PECAM-1 affects GSK-3 β -mediated β -catenin phosphorylation and degradation. *Am J Pathol* 169:314-24.
- Brown E, Ozawa K, Moccetti F, Vinson A, Hodovan J, Bader L, López J, Kievit P, Shaw G, Chung D, Osborn W, Fu X, Chen J, Lindner J. 2021. Arterial Platelet Adhesion in Atherosclerosis Prone Arteries of Obese, Insulin-Resistant Nonhuman Primates. *J Am Heart Assoc* 10: e019413.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R. 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 622-9.
- Chen CK, Pace-Asciak CR. 1996. Vasorelaxing activity of Resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol* 27:363- 6.
- Chow SE, Hshu YC, Wang JS, Chen JK. 2007. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol* 102: 1520-7.
- Chrétien M, Zhang M, Jackson M, Kapus A, Langille B. 2010. Mechanotransduction by endothelial cells is locally generated, direction-dependent, and ligand-specific. *J. Cell Physiol* 224: 352-61.
- Collins C, Guilluy C, Welch C, O'Brien ET, Hahn K, Superfine R. 2012. Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway. *Curr Biol* 22:2087-94.
- Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syvanne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesaniemi YA, Pasternack A, Jukema JW, Kastelein JJ, Zwinderman AH, Humphries SE. 2003. A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G>A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis* 1:131-8.
- Falati S, Patil S, Gross P, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett N, Pixton K, Weiler H, Cooley B, Newman D. 2006. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation *in vivo*. *Blood* 107: 535-41.
- Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK, Sethi S, Koh TH, Chatterjee S. 2005. Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res* 2: 92-9.
- Figueira L, González J, Armas 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, Mercado M, Hernández J, Reigosa A. 2010. La Dimetilarginina Asimétrica

- (ADMA) sérica como marcador de aterosclerosis en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 16 (2):39-44.
- Figueira L, González J. 2010. Efecto de la vitamina C, sobre la glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Act Cient Soc Venez Bioanal Espec* 11(1):30-6.
- 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 (1 y 2):97-109.
- 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):209-16.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 83 (1 y 2):7-23.
- Figueira L, González J. 2008. Efectos 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. 2010. El Resveratrol. Papel en enfermedades Cardiovasculares y Cancer. *INFORMED* 12 (2): 73-84.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. 2005. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J. Cell Sci* 118: 4103-11.
- Forman HJ, Zhang H. 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* 20 (9):689-709.
- 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.
- González J, Figueira L, González D, Álvarez A, Aguilera C y Reigosa A. 2007. Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 10(2):86-90.
- Harry B; Sanders J, Feaver R, Lansey M, Deem T, Zarbock A, Bruce A, Pryor A, Gelfand B, Black,am B, Schwartz M, Ley K. 2008. Endothelial Cell PECAM-1 Promotes Atherosclerotic Lesions in Areas of Disturbed Flow in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2003-8.
- Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Tsujioka K, Kajiya F. 2007. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis* 194(2):e9-17.
- Hastings N, Simmers M, McDonald O, Wamhoff B, Blackman B. 2007. Atherosclerosis – prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes pro-inflammatory priming. *Am J Physiol Cell Physiol* 6: C1824-33.
- Jie S, Beidong C, Yanyang Z, Li B, Wei W, Ruomei Q. 2015. Effect of resveratrol on ROS production and PECAM-1 expression in ox-LDL-stimulated platelets. *Chinese Pharmacological Bulletin* 12:1608-13
- Jiménez J, González J, Figueira L. 2021. Efecto del resveratrol sobre el factor de crecimiento transformante β sérico en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 84 (1 y 2):55-68.
- Jones C, Garner S, Moraes L, Kaiser W, Rankin A, Ouwehand W, Goodall A, Gibbins J. 2009. PECAM-1 expression and activity negatively regulate multiple platelets signaling pathways. *FEBS Lett* 583: 3618-3624.
- Kang L, Heng W, Yuan A, Baolin L, Fang H. 2010. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: Relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie* 92: 789-796.
- Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 19(11):42.
- Kondo T, Hirose M, Kageyama K. 2009. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 16: 2355-62.
- Labinskyy 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): 989-96.
- Li H, Förstermann U. 2009. Resveratrol: A multifunctional compound improving endothelial function. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 425-9.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 6917: 868-74.
- Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon S, Vardeny O. 2020. Potential effects of coronaviruses on the

- cardiovascular system: A review. *JAMA Cardiol* 5: 831-40.
- Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. 2019. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 8563845.
- Marcinczyk N, Misztal T, Gromotowicz-Poplawska A, Zebrowska A, Rusak T, Radziwon P, Chabielska E. 2021. Utility of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 in the Platelet Activity Assessment in Mouse and Human Blood. *Int J Mol Sci* 22: 9611.
- Matos RS, Baroncini LA, Prêcoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, Kaiber F, Prêcoma DB. 2012. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 98(2):136-142.
- Meza-Torres C, Hernández-Camacho J, Cortés-Rodríguez A, Fang L, Thanh T, Rodríguez-Bies E, Navas P, López-Lluch G. 2020. Resveratrol regulates the expression of genes involved in CoQ synthesis in liver in mice fed with high fat diet. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9 (5)431.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 2:449-460.
- Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. 2007. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 4232-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Rev Anal Biochem* 95(2);351-8.
- Okouchi M, Okayama N, Imai S, Omi H, Shimizu M, Fukutomi T, Itoh M. 2002. High insulin enhances neutrophil transendothelial migration through increasing surface expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via activation of mitogen activated protein kinase. *Diabetologia* 45:1449-56.
- Park D, Baek K, Kim J, Lee J, Ryu S, Chin B, Baek S. 2009. Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1 – mediated reactive oxygen species and monocyte chemotactic protein-1. *Exp Mol Med* 41 (3): 171-9.
- Rahman I. 2008. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutr Rev* 66 (1): S42-S45.
- Raj P, Thandapilly S, Wigle J, Zieroth S, Netticadan T. 2021. A Comprehensive Analysis of the Efficacy of Resveratrol in Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Myocardial Infarction and Heart Failure. *Molecules* 26: 6600.
- 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: 1083-9.
- Robich M, Chu L, Chaudray M, Nezafat R, Han Y, Clements R, Laham R, Manning W, Coady M, Sellke F. 2010. Anti-angiogenic effect of high-dose resveratrol in a swine model of metabolic syndrome. *Surgery* 148:453-62.
- Rolfes V, Ribeiro LS, Hawwari I, Böttcher L, Rosero N, Maasewerd S, Santos MLS, Próchnicki T, Silva CMdS, Wanderley CWdS. 2020. Platelets fuel the inflammasome activation of innate immune cells. *Cell Rep* 31:107615.
- Rush J, Quadriatero J, Levy AS, Ford RJ. 2007. Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter ENOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 814-22.
- Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T. 2001. Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 259-69.
- Schenkel AR, Chew TW, Muller WA. 2004. Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J Immunol* 173:6403-8.
- Seo Y, Park J, Choi W, Son D, Kim J, Kim M, Yoon B, Pyee J, Hong J, Go Y, Park H. 2019. Antiatherogenic effect of resveratrol attributed to decreased expression of ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1). Mechanistic link from focal adhesion to monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39(4):675-84.
- Silan C. 2008. The effects of chronic resveratrol treatment of vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 31: 897-902.
- Soriano E, Gibbins J, Hughes C. 2021. Targeting platelet inhibition receptors for novel therapies: PECAM-1 and G6b-B. *Platelets* 32: 761-9.
- 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 Asso Circulation* 15:1512-31.

- Takahashi S, Uchiyama T, Toda K. 2009. Differential effect of Resveratrol on nitric oxide production in endothelial F-2 cells. *Boll Pharm Bull* 32 (11): 1840-3.
- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses W, Dejana E, Schultz D, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz M. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 7057: 426-31.
- Vaporciyan AA, Delisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment *in vivo*. *Science* 5139: 1580-2.
- Vestweber D. 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 15: 692-704.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50: 402-9.
- Wang Z, Ma O, Ren L, Li Z, Li L. 2006. The study in resveratrol function to acute lung injury sourced from severe acute pancreatitis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37(6):904-7.
- Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, Lyck R, Muller WA, Lassmann H, Engelhardt B. 2019. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Front Immunol* 10:711.
- Wolf D, Ley K. 2019. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res* 124(2):315-327.
- Woodfin A, Voisin M, Nourshargh S. 2007. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2514-23.
- Wu J, Hsieh I, Wang Z. 2011. Cardioprotection by Resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *Am J Cardiovasc Dis* 1 (1): 38-47.
- Xia L, Zhang B, Sun Y, Chen B, Yu Z. 2021. Analysis of Syk/PECAM-1 signaling pathway in low shear stress induced atherosclerosis based on ultrasound imaging. *Comput Methods Programs Biomed* 201:105953.
- Yilmaz MI, Romano M, Basarali MK, Elzagallaai A, Karaman M, Demir Z, Demir MF, Akcay F, Seyrek M, Haksever N, Piskin D, Cimaz R, Rieder MJ, Demirkaya E. 2020. The Effect of Corrected Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction on Fmd Levels in Patients with Selected Chronic Diseases: A Quasi-Experimental Study. *Sci Rep* 10(1):9018.
- Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. 2019. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol* 20:247-260.
- Zghonda N, Yoshida S, Araki M, Kusunoki M, Mliki A, Ghorbel A, Miyazaki H. 2011. Greater effectiveness of e-viniferin in red wine than its monomer Resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci Biotechnol Biochem* 75 (7): 1259-67.
- Zhang L, Li C, Kakar M, Khan M, Wu P, Amir R, Dai D, Naveed M, Li Q, Saeed M, Shen J, Rajput S, Li J. 2021. Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* 143: 112164.



Caracterización toxinológica, bioquímica e inmunológica del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas, Venezuela)

Toxinological, biochemical and immunological characterization of *Bothrops venezuelensis* snake venom (Macizo del Turimiquire. Monagas state, Venezuela)

CARMEN T DUQUE ZERPA^{1, 2*}, MARÍA E PINEDA^{2**}, LUIS F NAVARRETE^{3, 4***}, ALBA M VARGAS^{2****}

Resumen

Bothrops venezuelensis Sandner-Montilla, 1952 es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las serpientes de mayor importancia médica en Suramérica. En Venezuela, a pesar de que esta se considera una especie agresiva y que se distribuye en zonas densamente pobladas, sus venenos han sido escasamente estudiados desconociéndose su potencial toxinológico e inmunológico incluso en áreas geográficas de alta endémicidad como el estado Monagas. Este estudio caracterizó bioquímica, toxinológica e inmunológicamente el veneno de *B. venezuelensis* del estado Monagas, evaluando su perfil electroforético, sus actividades letal, hemorrágica, hemolítica indirecta, coagulante, fibrino(geno)lítica y proteolítica sobre caseína, el éster etílico de N-alfa-benzoil-L-arginina (BAEE) y gelatina, además de su inmuno-neutralización por un antiveneno venezolano. Los resultados evidenciaron el perfil toxinológico característico del género *Bothrops*, sin embargo, al comparar con estudios previos resaltan un elevado potencial letal, hemorrágico y hemolítico indirecto, así como importantes variaciones inter e intraespecie de interés clínico. El "Western blot" mostró el reconocimiento parcial de las bandas proteicas más abundantes del veneno (~20-28 y ~41-47 kDa) y un muy débil reconocimiento de bandas de ~30,9-33,3 kDa, sugiriendo limitaciones del antiveneno venezolano para el reconocimiento de grupos con posibles actividades hemorrágica, coagulante y/o fosfolipasas A₂, lo cual implica la necesidad de evaluar el potencial neutralizante de este antiveneno contra las principales actividades inducidas por este veneno y comprobar la efectividad real de este producto terapéutico.

Palabras clave: *Bothrops venezuelensis*, tigre mariposa, estado Monagas, caracterización toxinológica, antiveneno

Abstract

Bothrops venezuelensis Sandner-Montilla, 1952 is recognized by the World Health Organization as one of the snakes of high medical importance in South America. In Venezuela, even though it is considered an aggressive species and that is distributed in densely populated areas, its venoms have been poorly studied. In addition, its toxinological potential is unknown even in geographical areas of high endemicity like the Monagas state, as well as its recognition by the antivenom Venezuelan. This study biochemically, toxinologically, and immunologically characterized the venom of *B. venezuelensis* from Monagas state, evaluating its electrophoretic profile, its lethal, hemorrhagic, indirect hemolytic, coagulant, fibrino(geno)lytic and proteolytic activities on casein, BAEE, and gelatin, in addition to its immuno-neutralization by the Venezuelan antivenom. The results evidenced the characteristic toxinological profile of the *Bothrops* genus, however, when compared with previous studies, they highlight a high lethal, hemorrhagic, and indirect hemolytic potential, as well as important inter and intraspecies variations of clinical interest. The western blot showed the partial recognition of the most abundant protein bands of the venom (~20-28 and ~41-47 kDa) and the very weak recognition of bands of ~30.9-33.3 kDa, suggesting limitations of the Venezuelan antivenom for the recognition of groups with possible hemorrhagic, coagulant and/or phospholipase A₂ activities, which implies the need to evaluate the neutralizing potential of the Venezuelan antivenom against the main activities induced by this venom and verify the real effectiveness of this therapeutic product.

Keywords: *Bothrops venezuelensis*, tigre mariposa, Monagas state, toxinological characterization, antivenom

1. Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 2. Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 3. Serpentario, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. 4. Colección de Herpetología, Fundación Museo de Ciencia, Fundación Museos Nacionales. Correspondencia: ctduque@gmail.com

Orcid: [0000-0003-0873-2962*](https://orcid.org/0000-0003-0873-2962)

Orcid: [0000-0002-9363-6993**](https://orcid.org/0000-0002-9363-6993)

Orcid: [0000-0001-5014-6495***](https://orcid.org/0000-0001-5014-6495)

Orcid: [0000-0001-8953-3644****](https://orcid.org/0000-0001-8953-3644)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.7)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 20/04/2022

Aprobación: 18/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 67-79. 2022

Introducción

Bothrops venezuelensis es reconocida por la OMS como una de las serpientes de mayor importancia médica en Suramérica, (WHO, 2017) donde se restringe a Colombia y Venezuela (Mendoza y col., 2012). En Venezuela esta especie conocida popularmente como tигра mariposa, exhibe una amplia distribución geográfica circunscrita a sistemas orográficos al norte del río Orinoco, extendiéndose desde el oriente a través de las costas venezolanas a las regiones andinas en el occidente del país (Mendoza y col., 2012; Rengifo y col., 2019) y es considerada una de las principales responsables por los accidentes ofídicos reportados al Ministerio de Salud.

Los envenenamientos inducidos por las serpientes de este género implican un cuadro clínico que puede incluir edema, hemorragia, coagulopatías y mionecrosis (Rengifo y col., 2019), consecuencia de la presencia en sus venenos de enzimas hidrolíticas como fosfolipasas A₂ (PLA₂), hialuronidasas, serino proteasas y metaloproteasas, entre otras (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011). Sin embargo, desde hace más de 50 años se conoce que existe una importante variabilidad bioquímica inter e intraespecie en la composición de sus venenos, según la localización geográfica y sus características ontogénicas (Sousa y col., 2013) lo cual hace necesario la caracterización de estos venenos, aspecto de relevancia clínica, farmacológica y biotecnológica (WHO, 2017). A pesar de estas consideraciones, los estudios de esta especie se han restringido a la caracterización del veneno de ejemplares procedentes del tramo central de la Cordillera de la Costa (Distrito Capital y los estados Aragua y Miranda) (López y col., 1999; Sánchez y col., 2014;

Girón y col., 2018), desconociéndose su toxicidad, su variabilidad bioquímica, así como la efectividad del antiveneno venezolano en la mayoría de los estados de distribución de esta especie, incluyendo áreas geográficas de alta endemicidad como el estado Monagas (De Sousa y col., 2013). Tomando esto en consideración, este estudio caracterizó toxinológica, bioquímica e inmunológicamente el veneno de la serpiente *B. venezuelensis* del Macizo del Turimiquire del estado Monagas.

Materiales y Métodos

VENENO

Se utilizó una mezcla de veneno cristalizado obtenido, por el ordeño manual, de cinco individuos adultos de *B. venezuelensis* procedentes del Macizo del Turimiquire en el estado Monagas. El veneno se mantuvo a 4 °C en un desecador al vacío, con CaCl₂ como agente desecante, hasta su evaluación.

ANTIVENENO

Se empleó el antiveneno polivalente producido en la Universidad Central de Venezuela (Biotecfar C. A, Caracas, Venezuela) (Lote 171). Este tiene presentación líquida y está constituido por fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas equinas, obtenidas con venenos de los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Crotalus*. Según el fabricante este producto neutraliza al menos 2 mg de veneno de *B. colombiensis* y 1,5 mg de veneno de *C. durissus cumanensis* por mililitro.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratones blancos cepa BALB-c sin distinción de sexo, con un peso

entre 18-20 g, procedentes del Bioterio del Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

PERFIL ELECTROFORÉTICO

El perfil electroforético del veneno, en presencia (4:1) y ausencia de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714), se realizó en geles de poliacrilamida (12,5%) bajo condiciones disociantes de acuerdo con el método de Laemmli (1970).

ACTIVIDAD LETAL

Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) del veneno por la vía intraperitoneal de acuerdo con el método de Spearman-Kärber (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

Se evaluó por la inyección intradérmica de dosis seriadas del veneno en ratones, empleando la metodología recomendada por la OMS (WHO, 2017). Los resultados se expresaron como dosis hemorrágica mínima (DHM), definida como la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Se evaluó en placas agar-sangre-yema de huevo. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica indirecta mínima (DHIM), cantidad de veneno que induce un halo hemolítico de 20 mm de diámetro (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Se evaluó empleando plasma humano citratado (9:1) como sustrato. Los resultados se expresaron como dosis

coagulante mínima (DCM), definida como la menor cantidad de veneno que induce la coagulación del plasma en 1 min (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

Se evaluó por la observación en SDS-PAGE (12,5 %) del efecto del veneno, por un lapso de 30 min, sobre las cadenas del fibrinógeno de acuerdo con el método de Gay y col. (2005).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

Se evaluó por el método de placas de fibrina de Marsh y Arocha-Piñango (1972). Los resultados se expresaron como actividad fibrinolítica, definida como el área de lisis inducida por microgramo de veneno ($mm^2/\mu g$).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Se empleó el método cinético propuesto por Tu y col. (1965) empleando el sustrato BAEE. Los resultados se expresaron como actividad específica (U/mg), definida como los micromoles de sustrato hidrolizados en un minuto por 1 mg de veneno.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Se evaluó empleando zimografía en gel de acuerdo con el método de Terra y col. (2009). Adicionalmente, para evaluar el compromiso específico de serino y/o metaloproteasas en el veneno, previo a la zimografía se incubaron dosis independientes del veneno ($6 \mu g$), en baño María a $37^\circ C$ durante 30 min, con 12 mM PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) y 20 mM EDTA- Na_2 (etilen di-amino-tetra acetato de sodio).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA

Se evaluó por la observación en SDS-PAGE (12,5 %) del efecto del veneno, durante 30 min, sobre las cadenas de la caseína según el método de Gay y col. (2005).

REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA (WESTERN BLOT)

El Wester blot se realizó a partir de la separación de las proteínas en 40 g del veneno en una SDS-PAGE al 12,5 % empleando el método de Terra y col. (2009).

Análisis estadístico

Los resultados para las actividades letal, hemorrágica, coagulante, hemolítica indirecta, fibrinolítica y esterásica se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar de tres evaluaciones independientes, empleando estadística descriptiva a un intervalo de confianza del 95 % ($P < 0,05$).

Resultados

PERFIL ELECTROFORÉTICO

El perfil electroforético del veneno de *B. venezuelensis* en presencia de inhibidores de proteasas evidenció la presencia de bandas proteicas en el rango de 6-200 kDa. Estas se distribuyeron en tres grupos \sim 20-33; 41-49 y $>$ 69 kDa (Figura 1), con una predominancia de bandas entre los \sim 20-28 y \sim 41-47 kDa. Al comparar este perfil con el obtenido en ausencia de inhibidores de proteasas, se observó en este último la desaparición de las bandas en los rangos \sim 20-33; 41-50 y los 69-177 kDa (Figura 1).

ACTIVIDAD LETAL

Se obtuvo una DL_{50} de $3,51 \pm 0,91$ mg/kg ($n = 3$) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

El veneno indujo actividad hemorrágica en piel de ratón, con una DHM de $0,97 \pm 0,18$ μ g ($n = 3$) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

El veneno indujo hemólisis indirecta, con una DHIM de $0,66 \pm 0,24$ μ g ($n = 3$) (Tabla I).

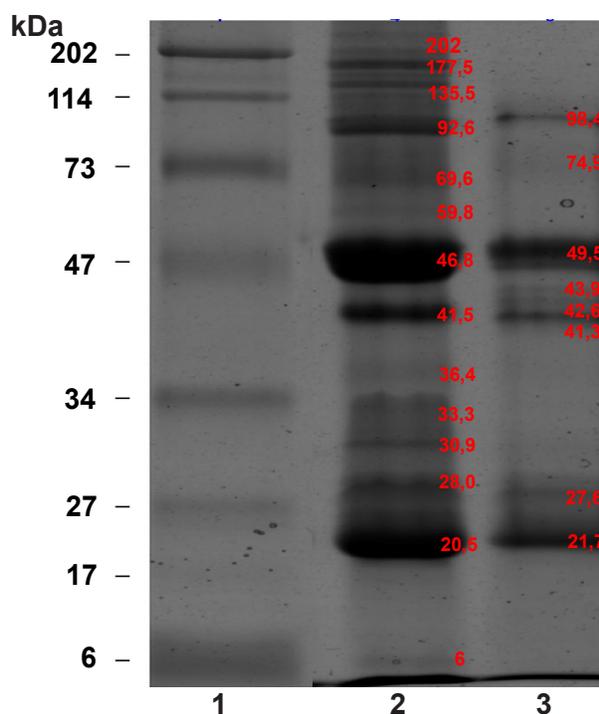


Figura 1. Perfil electroforético del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas). 30 μ g del veneno en ausencia o en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714), se evaluó en geles poliacrilamida (12,5 %) con SDS. Carril 1: Marcadores de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0318). Carril 2: veneno con inhibidores. Carril 3: veneno sin inhibidores. Tinción: azul de coomasie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

Tabla I. Comparación de las actividades letal, hemorrágica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Edo. Monagas) con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (Procedencia)	DL ₅₀ (mg/kg)	DHM (µg/ratón)	DCM (g)	DHIM (µg)	Referencia
<i>B. atrox.</i> (Semania del Cuao. Edo. Amazonas)	8,3	4,2 ± 0,5	NE	NE	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Parguasa Edo. Bolívar)	4,0	2,7 ± 0,4	NE	NE	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	3,07 ± 0,52	5,28 ± 0,37	7,66 ± 0,48	2,75 ± 0,36	Duque y col., 2014.
<i>B. colombiensis.</i> (El Guapo. Edo. Miranda)	11,6	5,3	NE	NE	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Caucagua. Edo. Miranda)	5,8	11,6	NE	NE	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	4,92 ± 0,16	34,6 ± 6,25	< 1	NE	Duque y Vargas, 2015
<i>B. isabellae</i> (Edo. Trujillo)	5,9	11,5 ± 1,20	OM	NE	Rodríguez-Acosta y col., 2010
<i>B. venezuelensis.</i> (Región Central. Cordillera de la Costa)	6,39	OM	OM	NE	Sánchez y col., 2014
<i>B. venezuelensis.</i> (Edo. Aragua)	14	21,4 ± 0,84	0,6 ± 0,06	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	8,3	1,2 ± 0,34	2,1 ± 0,39	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	4,4	1,4 ± 0,40	4,8 ± 0,47	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	16,2	1,2 ± 0,45	1,9 ± 0,57	NE	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis*</i>	3,51 ± 0,91	0,97 ± 0,18	7,83 ± 0,45	0,66 ± 0,24	Este estudio

DL₅₀: dosis letal cincuenta. DHM: dosis hemorrágica mínima. DCM: dosis coagulante mínima. DHIM: dosis hemolítica indirecta mínima. NE: no evaluado. OM: otra metodología. *Los resultados representan la media ± desviación estándar (n= 3, P<0,05).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

El veneno evaluado indujo la coagulación directa del plasma humano, con una DCM de $7,83 \pm 0,45 \mu\text{g}$ (n= 3) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

El veneno de *B. venezuelensis* degradó parcialmente el fibrinógeno, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídica: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). Esta actividad fue selectiva sobre la

cadena α , se inició con $0,03 \mu\text{g}$ de veneno, mientras que la degradación fue completa con concentraciones $\geq 0,5 \mu\text{g}$ (Figura 2).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

El veneno evaluado indujo la degradación directa del gel de la fibrina, con una actividad de $19,47 \pm 3,75 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ (n= 3) (Tabla II).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

El veneno en estudio indujo la degradación del BAEE, con una actividad específica de $158,87 \pm 18,65 \text{ U/mg}$ (n= 3) (Tabla I).

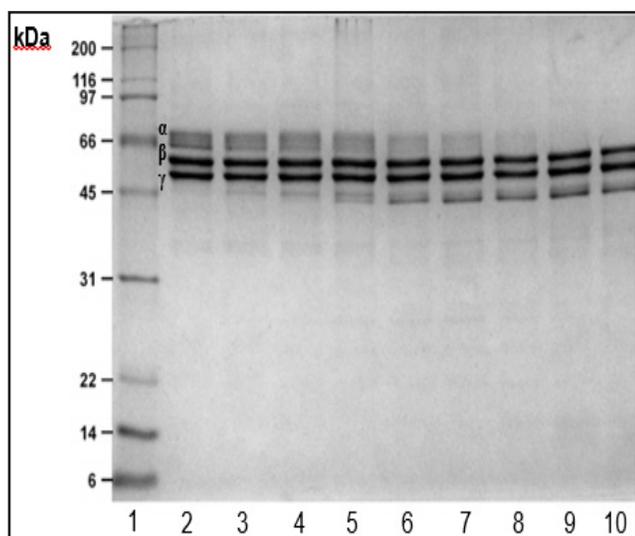


Figura 2. Actividad fibrinogenolítica del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, Estado Monagas). carril 1: marcador de masa molecular (BIO-RAD®, cat. 161-0317), carril 2: 100 µg de fibrinógeno, carriles 3 al 10: fibrinógeno (100 µg) vs. concentraciones seriadas de veneno (3: 0,0078 µg, 4: 0,0156 µg, 5: 0,03 µg, 6: 0,06 µg, 7: 0,125 µg, 8: 0,25 µg, 9: 0,5 µg, 10: 1 µg), tinción: Azul de Coomassie R-250. la evaluación se realizó por duplicado

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Las proteínas en el veneno evaluado indujeron el desarrollo de bandas de degradación en el gel entre los ~43-180 kDa (Figura 3).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA

En el caso de la actividad proteolítica sobre caseína, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídicas alfa (α), beta (β) y kappa (κ), el veneno evaluado degradó la cadena β a bajas concentraciones (0,16 µg), mientras que en el caso de las cadenas α y κ la degradación se inició con 0,31 µg y fue total con 2,5 µg del veneno (Figura 4).

REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA (WESTERN BLOT)

La transferencia de las bandas proteicas del veneno, desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se confirmó con la tinción de rojo Ponceau (Figura 5A). Completado el Western blot se observó una reactividad intensa para las proteínas de alta masa molecular (> 60 kDa), el reconocimiento parcial de ciertas proteínas con una masa entre los ~20-28 y 41-47 kDa y el muy débil reconocimiento de grupos entre los 30,9-33,3 kDa (Figura 5B).

Discusión

El perfil electroforético del veneno de *B. venezuelensis* en presencia de inhibidores de proteasas evidenció la presencia de bandas distribuidas entre los ~6-200 kDa (Figura 1).

Esto sugiere la presencia en el veneno de constituyentes tipo fosfodiesterasas (94-140 kDa), L aminoácido oxidasas (85-150 kDa), hialuronidasas (~73 kDa), serino proteasas (27-64 kDa), PLA₂ (13-18 kDa) y las diferentes clases de metaloproteasas: PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa) y PIII (60-100 kDa), entre otras (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011), con predominancia de serino y/o metaloproteasas de las clases PI y PII (Figura 1).

Por otra parte, la degradación de proteínas observada al comparar los perfiles electroforéticos en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas, evidencia la elevada actividad autocatalítica de las proteasas presentes en el veneno evaluado la cual, de acuerdo a la masa molecular de las

Tabla II. Comparación de las actividades letal, hemorrágica, coagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Edo. Monagas) con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (Procedencia)	Actividad fibrinolítica (mm ² /g)	Referencia
<i>B. atrox.</i> (Serranía del Cuao. Edo. Amazonas)	5,1 ± 0,70	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Parguasa. Edo. Bolívar)	10 ± 1,10	Salazar y col., 2007
<i>B. atrox.</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	NE	Duque y col., 2014
<i>B. colombiensis.</i> (El Guapo. Edo. Miranda)	14 ± 2,10	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Caucagua. Edo. Miranda)	29 ± 3,10	Girón y col., 2008
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	NE	Duque y Vargas, 2015
<i>B. Isabelae</i> (Edo. Trujillo)	50 ± 3,90	Rodríguez-Acosta y col., 2010
<i>B. venezuelensis.</i> (Región Central. Cordillera de la Costa)	OM	Sánchez y col., 2014
<i>B. venezuelensis.</i> (Edo. Aragua)	7,3 ± 3,4	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	30,1 ± 8,9	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	9,5 ± 4,9	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	33,7 ± 1,84	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis*</i>	19,47 ± 3,75	Este estudio

NE: no evaluado. OM: otra metodología. *Los resultados representan la media ± desviación estándar (n= 3, P<0,05)

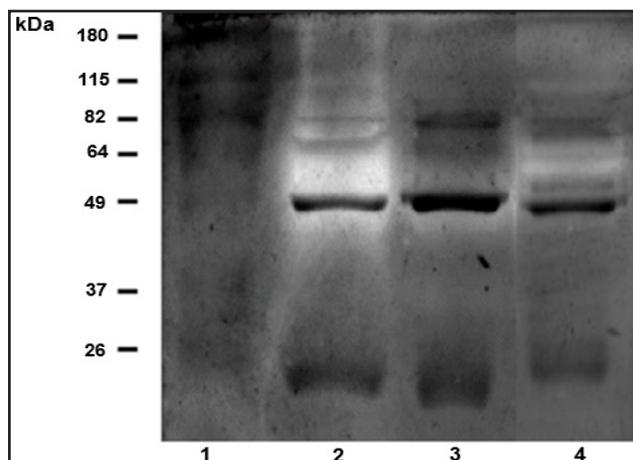


Figura 3. Actividad proteolítica sobre gelatina del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas) y modulación de la actividad en presencia de inhibidores de proteasas. Carril 1: Marcador de masa molecular (Invitrogen® Cat. 10748-010). Carril 2: 6 µg veneno de *B. venezuelensis*. Carril 3: 6 µg veneno de *B. colombiensis* vs. 20 mM EDTA-Na₂. Carril 4: 6 µg veneno de *B. colombiensis* vs. 12 mM PMSF. Tinción: azul de coomasie R-250. La evaluación se realizó por duplicado.

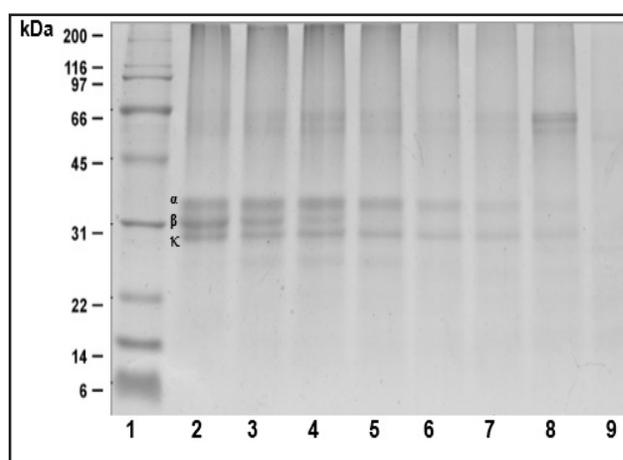


Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire. Estado Monagas) sobre caseína. Carril: 1. Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0317). Carril 2: 100 µg caseína. Carriles 3-9: caseína (100 µg) vs. concentraciones seriadas del veneno (3: 0,04 µg. 4: 0,08 µg. 5: 0,16 µg. 6: 0,31 µg. 7: 0,63 µg. 8: 1,25 µg. 9: 2,5 µg). Tinción: azul de coomasie R-250. La evaluación se realizó por duplicado.

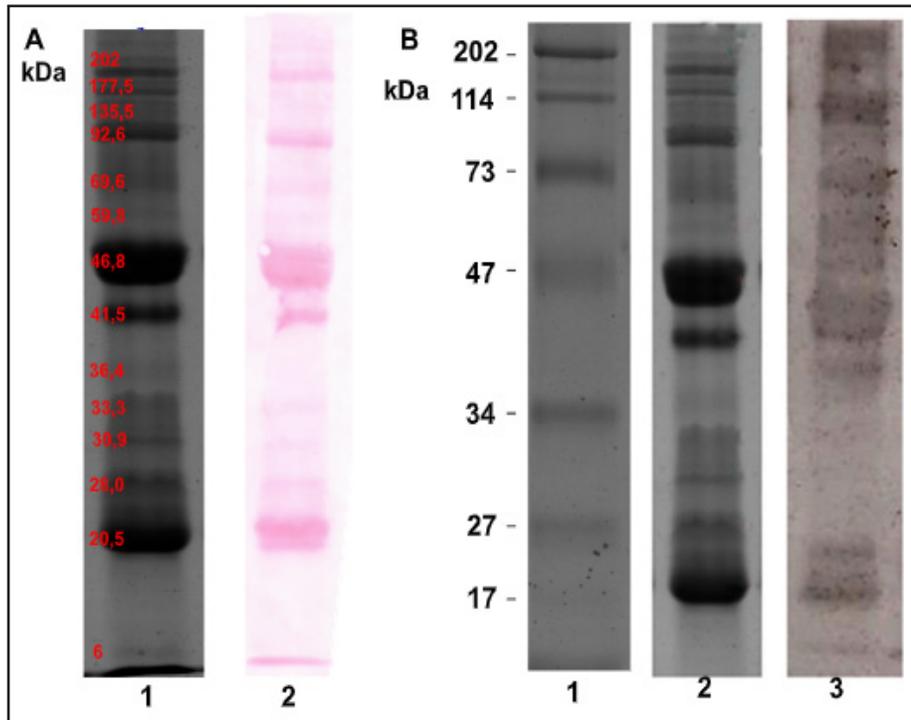


Figura 5. Inmuno-reconocimiento del veneno de *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas) por un antiveneno comercial venezolano. A. Evaluación de la transferencia de proteínas. 1: Electroforesis del veneno/inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714) (4:1). 2: Membrana de nitrocelulosa post transferencia teñida con rojo Ponceau. B. Western-blot. 1: Marcadores de masa molecular (BIO-RAD®. Cat.161-0318). 2: Electroforesis del veneno/inhibidores de proteasas (Sigma® Cat. P-2714) (4:1). 3: Bandas de inmuno-precipitación veneno-antiveneno. 40 µg veneno/antiveneno polivalente venezolano Lote 171 (1/250). Anticuerpo secundario: anti IgG de caballo (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology Lote A0711). Revelado: 4-cloro- α -naftol/di amino benzamida (DBA). La evaluación fue realizada por duplicado.

bandas degradadas, podría estar asociada principalmente a la catálisis de PLA₂, serino y/o metaloproteasas (PI, PII y/o PIII). La expresión de esta actividad autocatalítica, bajo las condiciones de disolución de la electroforesis convencional ha sido reportada con otros venenos de este género como *B. colombiensis* (Duque y Vargas, 2015) e implica la necesidad de incluir en estas determinaciones los inhibidores de proteasas, de manera de poder realizar estimaciones y comparaciones adecuadas del contenido proteico de los mismos.

La caracterización del veneno de *B. venezuelensis* evidenció el desarrollo de actividades: letal, hemorrágica, hemolítica indirecta y coagulante, lo cual coincide con

el perfil característico de los venenos del género *Bothrops* en Venezuela (Salazar y col., 2007; Girón y col., 2008; Duque y col., 2014; Sánchez y col., 2014; Duque y Vargas, 2015; Girón y col., 2018), aunque al comparar con estudios previos para este género resaltan importantes variaciones cuantitativas (Tabla I).

En el caso de la actividad letal el veneno objeto de este estudio exhibió uno de los mayores índices de letalidad, en comparación con los venenos de *B. atrox* del estado Amazonas (Serranía del Cuao) (Salazar y col., 2007), *B. isabellae* del estado Trujillo (Rodríguez-Acosta y col., 2010), *B. colombiensis* del estado Miranda (El Guapo y Caucagua) e incluso al comparar con la

mayoría de sus homólogos listados en la Tabla I (Girón y col., 2008; 2018).

En la evaluación de la actividad hemorrágica, la DHM estimada para el veneno evaluado es notablemente inferior a la reportada para otras especies de importancia médica en Venezuela como *B. atrox* (Girón y col., 2008; Rodríguez-Acosta y col., 2010; Duque y col., 2014), *B. colombiensis* (Girón y col., 2008; Duque y Vargas, 2015) y adicionalmente pudiera considerarse análoga solo a la reportada para venenos homólogos del estado Miranda (Girón y col., 2018) (Tabla I). Esta elevada actividad hemorrágica, sugiere una importante concentración de enzimas tipo metaloproteasas en el veneno evaluado, grupos capaces de inducir la disrupción enzimática de los constituyentes de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea las células endoteliales de los capilares y las vénulas y que adicionalmente se han relacionado a la rápida extensión de los componentes del veneno del área de inyección a la circulación sistémica, aspecto que adquiere un rol clave en la patogénesis de las complicaciones locales y sistémicas resultantes de estos envenenamientos (Anai y col., 2002) y podría implicar que tras el envenenamiento con la especie estudiada los signos de intoxicación sistémica pudieran expresarse rápidamente y de forma más severa durante las primeras horas del envenenamiento en comparación con otros venenos de este género en Venezuela.

En el caso de la actividad hemolítica indirecta, al comparar con estudios previos, se puede referir que esta es una de las actividades menos estudiadas en los venenos venezolanos, a pesar de ser un indicador de enzimas tipo PLA₂ calcio dependientes. Adicionalmente al comparar

la DHM obtenida para el veneno de *B. venezuelensis*, con los estudios en la Tabla I, se puede referir que esta es aproximadamente cuatro veces menor a la reportada para el veneno de *B. atrox* (Pto. Ayacucho, estado Amazonas) (Duque y col., 2014), el cual de acuerdo con sus autores es al menos cinco veces más hemolítico que el de algunos homólogos de Colombia y Brasil. Esto sugiere la presencia de una elevada concentración de enzimas tipo PLA₂ en el veneno evaluado y permite referir que el accidente causado por especímenes de *B. venezuelensis* (Serranía del Turimiquire, estado Monagas) podría involucrar una importante actividad miotóxica (local y/o sistémica), así como un relevante efecto edematizante, los cuales se debe esperar sean potenciados por la elevada actividad hemorrágica del veneno, efectos que en conjunto podrían incrementar el riesgo de compromiso local en las víctimas.

En cuanto a la actividad coagulante del veneno en estudio, esta es notablemente inferior a la reportada en evaluaciones previas con venenos homólogos (Tabla I) (Girón y col., 2008). Sin embargo, no se debe subestimar esta menor actividad ya que esta es similar a la descrita para otras especies del género *Bothrops*, como *B. atrox* (Tabla I) (Duque y col., 2014) y sugiere la presencia en el veneno evaluado de activadores del factor X y/o protrombina (Girón y col., 2008; Sousa y col., 2018).

Adicionalmente el veneno evaluado indujo la degradación directa del fibrinógeno y la fibrina. En el caso de la actividad fibrinogenolítica al comparar con estudios previos realizados con venenos de homólogos del estado Miranda (Girón y col., 2018) o *B. Isabelae* (Rodríguez-Acosta y col., 2010) se puede referir un patrón de degradación similar, caracterizado

por su efecto selectivo sobre la cadena α del fibrinógeno. En cuanto a la actividad fibrinolítica se puede referir un elevado potencial fibrinolítico para el veneno objeto de este estudio en comparación con lo reportado en evaluaciones con venenos de *B. atrox* (Amazonas y Bolívar) (Salazar y col., 2007), *B. colombiensis* (El Guapo, estado Miranda) e incluso venenos homólogos de los estados Miranda (La Boyera) y Aragua (Tabla II) (Girón y col., 2018).

La mayoría de las enzimas responsables por estas actividades han sido clasificadas como α , β o γ fibrinógenasas, según la cadena del fibrinógeno/fibrina sobre la cual actúen más rápidamente e incluyen enzimas tipo: 1) Metaloproteasas dependientes de zinc, capaces de hidrolizar rápidamente la cadena $A\alpha$ del fibrinógeno (Gay y col., 2005), 2) serino proteasas, que incluyen enzimas tipo trombina (degradan las cadenas α y/o β) y las 3) fibrino(gen)olíticas, para las que se ha descrito usualmente actividad tipo β -fibrinogenasa (León y col., 2011). En el caso particular de *B. venezuelensis* no se han identificado las enzimas responsables por las actividades fibrino(gen)olítica, sin embargo, estudios previos empleando inhibidores de serino proteasas refieren que estas actividades son dependientes de enzimas tipo metaloproteasas (Girón y col., 2018).

Por otra parte, el veneno en estudio mostró actividad sobre BAEE, gelatina y caseína. En cuanto a la degradación del BAEE, este efecto se ha reportado en estudios previos con venenos homólogos (López y col., 1999; Girón y col., 2018), sin embargo, la magnitud determinada en el veneno objeto de este estudio es 1,32 veces menor a la reportada por López y col. (1999) y 4,21 veces menor a lo reportado por Girón y col. (2018). Adicionalmente se

puede referir que las enzimas responsables por este efecto corresponden a serino proteasas con actividad hemostática, asociada principalmente a activadores del factor V, fibrinogenolítica, fibrinolítica y/o liberadores de quinina, entre otros (Tu y col., 1965). Todo esto, permite sugerir que existe una importante variabilidad bioquímica en la constitución de serino proteasas en venenos *B. venezuelensis* y adicionalmente el resultado obtenido coincide con la menor actividad coagulante del veneno evaluado en comparación con sus homólogos (Tabla I) (Girón y col., 2018).

En el caso de la actividad proteolítica sobre gelatina, los resultados obtenidos sugieren que esta actividad está asociada a metaloproteasas tipo PII y PIII, además de serino proteasas. Esta actividad ha sido reportada en estudios previos con otras especies de este género en Venezuela, entre estos *B. isabellae* o *B. colombiensis*, para los que se ha reportado que es un efecto asociado a metaloproteasas (Rodríguez-Acosta y col., 2010; Sánchez y col., 2014), mientras que otros estudios con especímenes de *B. venezuelensis*, del centro de la Cordillera de la Costa, reportaron la ausencia de actividad gelatinasa en el lote de veneno empleado y sus fracciones (Sánchez y col., 2014).

En el caso de la actividad proteolítica sobre caseína, la degradación total de las tres cadenas del sustrato, coinciden con reportes previos para venenos *B. venezuelensis* de los estados Aragua y Miranda (Lagunética) (Girón y col., 2018), sin embargo para estos los autores evidenciaron dos patrones de degradación diferentes al observado en este estudio, lo cual sugiere variaciones cuali y/o cuantitativas en los grupos enzimáticos responsables por este efecto (metalo y serino proteasas) (Gay y col., 2005).

En la evaluación de la reactividad inmunológica entre el veneno de *B. venezuelensis* y el antiveneno venezolano, el Western blot mostró la presencia en el antiveneno de anticuerpos capaces de reconocer principalmente antígenos de alta masa molecular (> 60 kDa) como L-aminoácido oxidasas y algunos grupos de serino y metaloproteasas de la clase PIII, entre otros. Además, sugiere una débil a nula presencia de anticuerpos capaces de reconocer proteínas como PLA₂, serino proteasas de baja masa molecular y/o metaloproteasas de las clases PI y PII. Estos resultados coinciden con observaciones realizadas en estudios previos con venenos del género *Bothrops*, para los cuales empleando Western blot y antivenómica se reportó que antivenenos comerciales de Brasil y Costa Rica presentaron alta inmunogenicidad para metaloproteasas del tipo PIII (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011; Sousa y col., 2013), mientras que algunas serino proteasas, metaloproteasas tipo PI e incluso PLA₂ solo fueron parcialmente reconocidas (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011). Esto se ha atribuido a la influencia de la masa molecular sobre la inmunogenicidad (constituyentes > 30 kDa son altamente inmunogénicos) (León y col., 2011); así como a la ausencia de epítopes en común, por ejemplo en el caso de las metaloproteasas se ha propuesto que estos pudieran restringirse a dominios específicos de las clases PII (tipo desintegrina) o PIII (rico en cisteína) (Sousa y col., 2013), mientras que las PI y las PLA₂ son consideradas toxinas pobremente inmunogénicas, lo cual también pudiera relacionarse a un elevado polimorfismo. (Núñez y col., 2009; Calvete y col., 2011; Sousa y col., 2013).

Conclusiones

Los resultados de este estudio exponen por primera vez el potencial tóxico del veneno de *B. venezuelensis* de la región oriental venezolana, este se caracterizó por sus elevados efectos letal, hemorrágico y hemolítico indirecto. La discusión comparativa de estos dos últimos parámetros y la caracterización bioquímica sugieren una importante variabilidad intra-especie en la constitución de serino y metaloproteasas. Adicionalmente la limitada reactividad cruzada evidenciada entre el antiveneno venezolano y ciertos constituyentes del veneno de *B. venezuelensis*, que pudieran incluir PLA₂ y grupos con actividades hemostáticas responsable de los efectos más característicos del veneno, advierten sobre la necesidad de evaluar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano contra estas actividades, tal como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017).

Agradecimiento

Bioterio del Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) ente que financió el estudio, a través del Proyecto PEII N° 2012000783.

Conflicto de interés

No existe conflicto de interés entre los autores del estudio.

Referencias bibliográficas

- Anai K, Sugiti M, Yoshida E, Maruyama, M. 2002. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection *Bothrops jararaca* of venom in rats. *Toxicon* 40: 63-68.

- Calvete J, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas A, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis H, Mourão R, Fatima M, Moura-Da-Silva A. 2011. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics* 74: 510-527.
- De Sousa L, Bastouri-Carrasco J, Matos M, Borges A, Bónoli S, Vásquez-Suárez A, Guerrero B, Rodríguez-Acosta A. 2013. Epidemiología del ofidismo en Venezuela (1996-2004). *Invest Clín* 54 (2): 123-137.
- Duque-Zerpa CT, Fernández I, Vargas A, López JC, Scannone H. 2014. Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, Edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. *Rev Científ FCV-LUZ* 24 (4): 355-362.
- Duque-Zerpa CT, Vargas A. 2015. Caracterización toxinológica del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de Paracotos, estado Miranda, Venezuela. *Rev Científ FCV-LUZ* 25: 239-247.
- Gay C, Leiva L, Teibler P, Acosta de Pérez O. 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
- Girón ME, Padrón V, Ramos MI, Sánchez E, Guerrero B, García A, Uzcátegui N, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2018. Intraspecies geographical variability in the South American tigrá mariposa (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom activities. *Toxicon* 144: 23-33.
- Girón ME, Salazar A, Aguilar I, Pérez J, Sánchez E, Arocha-Piñango C, Rodríguez-Acosta A, Guerrero B. 2008. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp Biochem Physiology C* 147: 113-121.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- León G, Sánchez L, Hernández A, Villalta M, Herrera M, Segura A, Estrada R, Gutiérrez JM. 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflammation Allergy Drug Targets* 10: 1-18.
- López JC, Vargas A, Scannone H, Fernández I. 1999. Estudio cromatográfico, electroforético y enzimático del veneno total y fracción I de la serpiente venezolana *B. venezuelensis* (Tigrá Mariposa). *Rev Científ FCV-LUZ* 9: 314-320.
- Marsh N, Arocha-Piñango C. 1972. Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activators. *Thromb Diath Haemorrh* 28:75-88.
- Mendoza JS, Berrio V, Gómez D. 2012. Reptilia, Squamata, Viperidae, *Bothrops venezuelensis* Leybold, 1873: Distribution extension and first country record. *Check List* 8: 310-312.
- Núñez V, Cid P, Sanz L, De la Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete J. 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics* 73: 57-78.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A, Navarrete LF. 2019. Serpientes, venenos y tratamiento médico en Venezuela. 2da. Ed. Amazon Publisher pp. 120-272.
- Rodríguez-Acosta A, Sánchez E, Márquez A, Carvajal Z, Salazar A M, Girón ME, Estrella A, Gil A, Guerrero B. 2010. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. *Toxicon* 56: 926-935.
- Salazar AM, Rodríguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) (Serpentes: Viperidae) snake venom from different geographical areas in Venezuela. *Thromb Res* 120:95-104.
- Sánchez E, Girón ME, Uzcátegui N, Guerrero B, Saucedo M, Cuevas E, Rodríguez-Acosta A. 2014. Biochemical and biological characterization of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range. *Bol. Malariol. Salud Ambient* 49: 138-149.
- Sousa L, Nicolau C, Peixoto P, Bernardoni J, Oliveira S, Portes-Junior J, Mourão R, Lima-Dos-Santos I, Sano-Martins I, Chalkidis H, Valente R, Moura-Da-Silva A. 2013. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2442.
- Sousa L, Zdenek C, Dobson J, Brouw B, Coimbra F, Gillett A, Del-Rei T, Chalkidis H, Sant'anna S, Teixeira-Da-Rocha M, Grego K, Travaglia C, Moura Da Silva A, Fry B. 2018. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. *Toxins* 10: 411.

- Terra R, Pinto A, Guimaraes J, Fox J. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom-induced pathology. *Toxicon* 54: 836-844.
- Tu A, James G, Chua A. 1965. Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snake. *Toxicon* 3: 8-5.
- WHO, 2017. Guidelines for the production, control, and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO, Geneva. Online: <https://www.medbox.org/dl/5e148832db60a2044c2d4b8a>



Consumo de remolacha (*Beta vulgaris*): composición y efectos en la salud

Beet root (*Beta vulgaris*) consumption:
composition and health effects

MARÍA EUGENIA ACOSTA MARACAY ¹, EDUARDO ROMERO VECCHIONE ²

Resumen

La remolacha (*Beta vulgaris*), es una hortaliza de color rojo-violeta o amarillo, que contiene diferentes pigmentos fotoquímicos que pertenecen a la clase betalaina, cuyo principal compuesto es la betacianida (color rojo - violeta) que representa el 75-95% y que se caracteriza por ser antioxidante. La remolacha contiene además nitrato inorgánico (NO₃) que al ser ingerido se transforma en el organismo a nitrito reducido (NO₂) de manera parcial por el pH ácido gástrico través de mecanismos no enzimáticos. Posteriormente, el remanente de NO₂ es absorbido en el intestino a niveles bajos de oxígeno para convertirse en óxido nítrico (NO), el cual cumple diferentes funciones fisiológicas, entre las cuales destacan en la vasodilatación arterial, reducción de la fatiga muscular, facilitación del transporte de oxígeno (O₂) y sustratos energéticos a los músculos, mejoramiento de la resistencia y el rendimiento deportivo en los atletas. Adicionalmente se le han descrito propiedades terapéuticas como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antihipertensivo y en la reducción de los calambres nocturnos en pacientes con problemas cardiovasculares.

Palabras clave: Remolacha, betalana, nitratos, óxido nítrico

Abstract

Beetroot (*Beta vulgaris*), is a red-violet or yellow vegetable, containing several pigments of the betalain phytochemical class, the main pigment is beta-cyanide (red-violet color) representing 75-95% of all pigments and is characterized by its antioxidant properties. Another important chemical contained in beetroot is inorganic nitrate (NO₃), which after ingestion is transformed to nitrite (NO₂), and then partially reduced by gastric acid pH through non-enzymatic mechanisms. Subsequently, the remnant NO₂ is absorbed in the intestine at low oxygen levels and transformed to nitric oxide (NO), which fulfills different physiological functions in humans, like vasodilation, reduction of muscle fatigue, facilitation of oxygen transport and energy substrates to muscles, and improving endurance and performance in athletes; additionally, it has been described to have anticancer, antiplatelet, antihypertensive therapeutic activity and reduction of night cramps in patients with cardiovascular diseases.

Keywords: Beetroot, betalain, nitrates, nitric oxide

1. Cátedra Biológicas Aplicadas. Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela (UCV). Correspondencia: mariuacosta0103@gmail.com. Orcid: [0000-0003-0721-0046](https://orcid.org/0000-0003-0721-0046)
2. Laboratorio de Estudios Cardiovasculares, Escuela de Medicina José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Orcid: [0000-0003-1287-9473](https://orcid.org/0000-0003-1287-9473)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.8)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 17/03/2022

Aprobación: 16/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 80-90. 2022

Introducción

El desbalance óxido – reducción (REDOX) entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (-OH) y el radical peroxilo (ONOO-) median la producción de radicales libres a través de la reacción de Fenton (Pedraza y col., 2006). Entre las alteraciones producidas por estas especies reactivas se ha descrito el daño a la membrana lipídica (por peroxidación lipídica), a las proteínas (por S-nitrosilación) y al DNA (por oxidación de nucleótidos) (Wootton-Beardy Ryan, 2011).

Este desbalance y alteraciones consiguientes puede inducir a la aparición de numerosas enfermedades inflamatorias, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares, las cuales representan un problema de salud pública por ser la primera causa de muerte mundial (Valcárcel, 2014)

Existen compuestos que regulan la producción de especies reactivas como los antioxidantes, tanto endógenos como exógenos, principalmente los flavonoides, polifenoles, el ácido ascórbico, las betalainas y otros compuestos fitoquímicos presentes en la pulpa de la remolacha (Vulic y col., 2013).

La remolacha (*Beta vulgaris*), está clasificada dentro de la familia *Chenopodiaceae*, cuya zona bulbar puede ser de color rojo o amarillo; las remolachas de color rojo son la de mayor consumo humano, especialmente en Europa, bajo la presentación cocida, cruda, en polvo y en jugos (Casierra y Correa, 2011). Está compuesta por diferentes pigmentos que pertenecen a la clase betalainas, siendo

el principal colorante la betacianida (de color rojo - violeta) representando el 75-95% del total de las sustancias, las cuales son: betanina (Figura 1), isobetanina, probetanina y neobetanina, caracterizadas por ser antioxidantes y tener en su estructura química nitrógeno (N). La otra parte está compuesta por cantidades menores de betaxantina (color amarillo) y los productos de degradación de betalaína (color marrón claro) (Casierra y Correa, 2011).

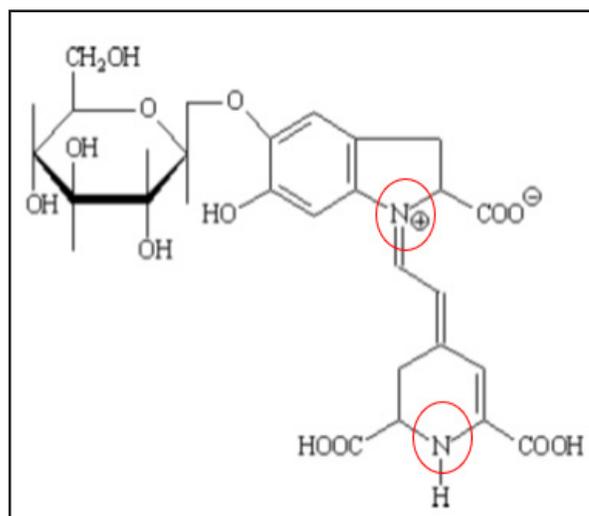


Figura 1. Estructura química Betanina ($C_{24}H_{26}N_2O_{13}$)

El pigmento rojo – violeta (betacianida), es soluble en agua y es estable a pH entre 3 y 7 y se utiliza para mejorar el color rojo de las pastas de tomate, salsas, sopas, mermeladas, helados, dulces y diversos cereales (Roy y col., 2004).

Adicionalmente a los compuestos ya citados, la remolacha contiene productos fenólicos: catequinas, epicatequinas, ferúlicos, protocatequinas, vallinicas, p-coumarina, p-hidroxibenzoicos, cafeína y ácido siríngico, que se caracterizan por poseer importantes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hepatoprotectoras y antitumorales (Vulic y col., 2013).

La remolacha contiene altos niveles de antioxidantes biológicamente accesibles, así como otros componentes que promueven la salud como: potasio, magnesio, ácido fólico, hierro, zinc, calcio, fósforo, sodio, niacina, biotina, vitamina B6 y fibra soluble (Wootton-Beard y Ryan, 2011). Adicionalmente, consumir remolacha en sus distintas presentaciones (polvo, mezclas, jugos, concentrados) es beneficioso para la salud por la cantidad elevada de nitrato inorgánico (NO_3^-) un precursor del óxido nítrico (NO).

Entre los fármacos que aumentan el NO se encuentra el sildenafil y otros inhibidores de la fosfodiesterasa V, el aminoácido L-arginina y el NO inhalado y como fue mencionado anteriormente, uno de los alimentos que aumentan el NO es la remolacha, que ha sido usada para restaurar alteraciones fisiopatológicas que se presentan en enfermedades cardiovasculares y respiratorias, tal es el caso de su uso en dolor torácico y angina de pecho que se presentan en secuela post COVID-19 (Gluckman y col., 2022).

El NO es una molécula gaseosa lábil, constituye la molécula de señalización más pequeña que se conoce, con capacidad para penetrar las membranas celulares por difusión y ejercer su actividad biológica. Presenta un electrón desapareado en la última capa y una vida media de 4 a 8 segundos en medio acuoso oxigenado. La versatilidad química del NO provee mecanismos antioxidantes contra las EROs y las ERN, a través de interacciones radical-radical y metal-ligando (Wink y col., 2001; Goncalves y col., 2011).

El NO es producido de forma endógena por tres isoformas de la enzima sintasa del óxido nítrico (SON), que cataliza la síntesis

de NO a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular y que requieren cofactores como la nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN) y (6R-)5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH(4)). Todas las SON se unen a la calmodulina y contienen hemo. En los mamíferos se expresan por tres distintos genes, que codifican tres isoformas: la SON neuronal (SONn gene localizado en el cromosoma 12, que codifica para SON1), la SON inducible (SONi gene localizado en el cromosoma 17, que codifica para SON2) y la SON endotelial (SONe gene localizado en el cromosoma 7, que codifica SON3) (Förstermann y Sessa, 2012).

La SON1 se expresa constitutivamente en neuronas centrales y periféricas y en algunos otros tipos de células. Sus funciones incluyen la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central (SNC), la regulación central de la presión arterial, la relajación del músculo liso y la vasodilatación a través de los nervios nitrérgicos periféricos. La SON2 se puede expresar en muchos tipos de células en respuesta a lipopolisacáridos, citoquinas u otros agentes. La SON inducible genera grandes cantidades de NO que tienen efectos citostáticos sobre las células diana parasitarias. El NO es requerido para la activación y migración de macrófagos y en condiciones de infección, debido a que el NO es liberado por las células inmunes que presentan actividad antimicrobiana citotóxica. La SON inducible contribuye a la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias y el shock séptico. Mientras que la SON3 se expresa principalmente en las células endoteliales. El NO difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células del músculo liso de la pared

vascular y allí estimula la guanilciclase (GC), enzima que cataliza la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir de GTP; el GMPc desencadena la vasodilatación y de esta forma el NO regula el flujo sanguíneo en respuesta al estrés, ejercicio físico, y la acción de moléculas circulantes como la bradiquinina o la acetilcolina (Martín-Agustín y Sánchez-Medina, 2004). El NO mantiene los vasos sanguíneos dilatados, controla la presión arterial y tiene muchos otros efectos vasoprotectores y antiateroscleróticos. Muchos factores de riesgo cardiovascular provocan estrés oxidativo, desacoplamiento de la SONE y disfunción endotelial. Sin embargo, es de hacer notar que el NO es una molécula con acciones pleiotrópicas, entre ellas, su acción como antiagregante plaquetario (Förstermann y Sessa, 2012; Keshety Erez, 2018).

Anteriormente, se pensaba que el único mecanismo de producción de NO era a través de la arginina, por vía endógena; sin embargo, investigaciones recientes indican la existencia de una alternativa endógena en la formación de NO, a través del consumo de alimentos que contienen NO_3^- , el cual actúa como precursor del NO. Entre estos alimentos se hallan los vegetales de hojas verdes como la espinaca, repollo, lechuga, hinojo, brócoli, así como vegetales y jugos de frutas como zanahoria, granada y especialmente el jugo de remolacha; además de encontrarse en otras presentaciones de este vegetal (López y col., 2020; Domínguez y col., 2018).

La actividad física extrema incrementa el consumo de O_2 entre 100 – 200 veces debido al aumento del metabolismo corporal; las contracciones musculares causan a su vez aumento en la producción de EROs. Cuando

los radicales libres exceden la defensa antioxidante, se produce la peroxidación lipídica y el daño a la organización de la membrana celular, resultando en la producción de malondialdehído (MDA) que es un indicador usado para determinar la cantidad de radicales libres en plasma durante la práctica de deportes extremos y en estados patológicos. Cuando el MDA aumenta, los niveles de los antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) disminuyen, al igual que las concentraciones de los iones zinc (Zn) y cobre (Cu). Una alternativa natural para disminuir los niveles de MDA es la utilización de la remolacha como ingrediente activo en la dieta de los atletas (Hasibuan y col., 2019).

MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE NO (VÍA EXÓGENA)

Como ya se ha expresado a lo largo del texto, la remolacha contiene dentro de su composición nitratos inorgánicos (NO_3^-), un compuesto que se encuentra naturalmente en vegetales y en carnes procesadas, donde se usa como conservante. Una vez ingerida la remolacha en sus diferentes presentaciones, el 25% NO_3^- se reduce a nitrito (NO_2^-) por la acción de las bacterias anaerobias presentes en la cavidad oral, mediada por la enzima nitrato reductasa. Luego en el estómago es convertido a NO, mediante la acción de la secreción gástrica y por medio de un mecanismo no enzimático que requiere pH ácido. Este mecanismo fisiológico depende de la circulación entero-salivar del nitrato inorgánico sin involucrar la actividad de la SONE. El nitrato y el nitrito remanente se absorben desde el intestino delgado hacia la circulación a bajos niveles de presión de oxígeno O_2 y puede convertirse en NO bioactivo en los tejidos y la sangre en condiciones de hipoxia fisiológica (Figura 2) (Domínguez y col., 2017 y 2018).

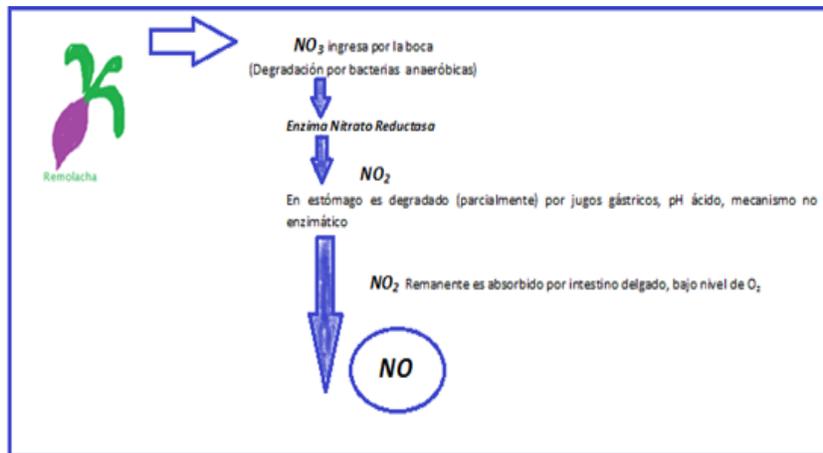


Figura 2. Mecanismo de producción de NO (vía exógena) (Adaptado de Domínguez y col., 2017)

FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL NO

El NO presenta numerosas funciones fisiológicas y hemodinámicas necesarias para las actividades diarias del ser humano. Entre las funciones fisiológicas del NO destacan:

1. Inhibición de la producción de ATP que activa la vía anaeróbica o fosfógeno, un sistema de energía a corto plazo que funciona principalmente al inicio de la actividad muscular intensa, causando una disminución en la producción de O₂ (Conger y col., 2021). El sistema de fosfógenos se encarga de reponer este átomo del grupo fosfato perdido a partir de la fosfocreatina almacenada en el músculo.
2. Reducción de las reservas de fosfocreatina (PCr) durante el ejercicio. La PCr en el músculo esquelético tiene un papel clave en la generación rápida del ATP durante el ejercicio. Los niveles musculares de PCr pueden agotarse casi completamente después del ejercicio máximo y esto contribuye a una reducción rápida en la producción de potencia muscular durante dicho ejercicio. La recuperación de la capacidad de
3. Mejoría en la eficiencia de la respiración mitocondrial y de la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En efecto, existe evidencia acerca de los efectos positivos de la suplementación con nitrato tanto en la eficiencia mitocondrial como en la función contráctil del músculo (Larsen y col., 2011; Hernández y col., 2012). Larsen y col., en 2011, en 14 voluntarios sanos que fueron sujetos por 3 días a la generación de potencia muscular después de un ejercicio máximo hasta la fatiga está íntimamente relacionada con la resíntesis de la PCr muscular a través de la fosforilación oxidativa. La resíntesis de PCr puede verse afectada por el NO. La resíntesis de PCr se determina a través del flujo sanguíneo muscular local y el aporte de O₂ al músculo esquelético. La acidosis resultante de la acumulación de H⁺ inhibe la fosforilación oxidativa y puede limitar el suministro de ATP en el músculo en ejercicio. Un entorno acidificado podría aumentar la disponibilidad de NO a partir de NO₂⁻ durante el trabajo intenso del músculo esquelético (Garnacho-Castaño y col., 2020).

- suplementación con nitrato y ejercicio submáximo, demostraron la reducción de la expresión de translocasa de nucleótido de adenina (TNA), una proteína involucrada en la conductancia de protones mitocondriales, lo que redujo la respiración de fuga y mejoró la eficiencia de la fosforilación oxidativa. Se ha sugerido que la suplementación con nitrato podría dar como resultado una mayor inhibición del citocromo C oxidasa por el NO, lo que podría ser detectado por la célula como una hipoxia leve, iniciando mecanismos de señalización que dan como resultado una regulación a la baja de la TNA y una mayor eficiencia mitocondrial.
4. El NO regula la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. El óxido nítrico modula la contractilidad del músculo esquelético. Por ejemplo, la exposición de tiras de músculo de diafragma de rata al nitroprusiato de sodio, un donador de NO, reduce la generación de fuerza submáxima. La generación de NO por los músculos esqueléticos se ve reforzada por la actividad contráctil. Los efectos inhibitorios del NO sobre la producción de la fuerza de contracción podrían resultar de la interferencia que ejerce el NO sobre la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), posiblemente en el retículo sarcoplásmico. En células intactas, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depende factores como la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico, la recaptación y la amortiguación intracelular de Ca^{2+} , factores que a su vez podrían modificarse diferencialmente por el NO. En el músculo esquelético, el Ca^{2+} se libera del RS a través de los canales del receptor de rianodina (RyR). Se ha demostrado que los toiles hiperreactivos presentes en el canal RyR son reguladores de la probabilidad de apertura de este canal. Existe evidencia que indica que, en el músculo esquelético, el NO aumenta la probabilidad de apertura del canal RyR en ausencia de un agonista de RyR. Sin embargo, otros estudios sugieren que el NO reduce la liberación de Ca^{2+} mediada por el canal RyR en vesículas activadas por cafeína (Heunks y col., 2001).
 5. Disminución de la fatiga muscular asociada a ejercicios de alta intensidad, además de promover la regeneración muscular post-ejercicio (Domínguez y col., 2018).
 6. Vasodilatación. En efecto, el grado de contracción o relajación de las células del músculo liso vascular caracteriza el tono vasomotor general, que regula el nivel de presión arterial local y distribuye el flujo de acuerdo con las necesidades metabólicas. El NO tiene un efecto vasodilatador que está mediado por la generación de GMPc. El GMP cíclico y el AMP cíclico son los principales segundos mensajeros en la relajación de las células del músculo liso. El NO se une a la guanililciclasa soluble, que convierte el GMP en GMP cíclico. El NO puede relajar la célula del músculo liso solo en presencia de un tono contráctil preexistente. Por el contrario, la ausencia de NO mejora el tono contráctil preexistente (Michel, 1998).
 7. Facilitación del transporte de oxígeno y los sustratos energéticos a los músculos Y promoción del intercambio gaseoso. El NO es conocido por su capacidad para mejorar el rendimiento al aumentar el

flujo sanguíneo al tejido muscular. El aumento en el flujo sanguíneo trae más nutrientes esenciales y oxígeno a los músculos que trabajan mientras elimina simultáneamente los desechos metabólicos, mejorando así la función muscular y la resistencia. La utilización de oxígeno es una función compleja que implica 1) la capacidad de transporte de oxígeno de la hemoglobina, 2) el flujo sanguíneo, 3) la extracción de oxígeno por la célula, y 4) su consumo, predominantemente por las mitocondrias. El NO integra estas funciones ya que se libera de la hemoglobina y la SONE en respuesta a la hipoxia, mejorando así el flujo sanguíneo, y actúa como un freno a nivel de las mitocondrias. La fuente de NO que regula el consumo de oxígeno mitocondrial en el músculo esquelético no está del todo claro, pero la evidencia apunta a acciones concertadas de SONE en las células endoteliales microvasculares y las enzimas SONn y SONE localizadas dentro del propio músculo (Stamler y Meissner, 2001).

8. Participación en la expresión de genes, debido a que el NO tiene múltiples blancos moleculares ya que no solo puede influir directamente en la actividad de los factores de transcripción, sino que también modula las cascadas de señalización aguas arriba, la estabilidad y la traducción del ARNm, así como el procesamiento de los productos génicos primarios (Bodgan, 2001).
9. Aumento del proceso de biogénesis. En 2003, se demostró por primera vez que el NO endógeno producido a dosis bajas por la SONE promueve

la biogénesis mitocondrial en varias células y tejidos. Desde entonces, la SONE y la señalización del NO aguas abajo se consideran como los principales determinantes metabólicos en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2008). Se ha establecido que la biogénesis mitocondrial inducida por NO requiere del GMPc. Como consecuencia de la producción de NO-GMPc, se inducen factores clave de transcripción de biogénesis mitocondrial codificados nuclearmente (incluido el factor respiratorio nuclear 1 y el factor de transcripción mitocondrial A), los niveles de ADN mitocondrial (ADNm) aumentan y la función mitocondrial se activa (Nisoli y col., 2003, 2004).

Todas estas funciones fisiológicas han llevado a que numerosos atletas utilicen continuamente suplementos nutricionales o sustancias no-dopaje para mejorar la resistencia y el rendimiento en sus prácticas deportivas, sin llegar a cometer incumplimientos de las leyes que rigen el deporte respectivo y las que establece la Agencia Mundial de Antidopaje (*The World Anti-Doping Agency, WADA*)

De acuerdo con el Colegio Americano del Deporte (*The American College of Sports Medicine, ACSM*) y la Academia de Nutrición y Dietética (*Academy of Nutrition and Dietetics, AND*), los suplementos nutricionales deben ser ajustados en relación con el ejercicio que se practique con la finalidad de mejorar el rendimiento del atleta (Thomas y col., 2016). A su vez, el Instituto del Deporte de Australia (Australian Institute of Sports, AIS) clasifica los ingredientes y suplementos dietéticos para atletas en cuatro grupos (Categorías

A-D), tomando en cuenta la seguridad, legalidad y efectividad en el ejercicio. La Categoría A incluye ingredientes en alimentos y suplementos que pueden mejorar la capacidad del ejercicio, entre ellos, el jugo de la remolacha (Kurowska y col., 2021; Maughan y col., 2018; Serra-Payá y col., 2021). Adicionalmente, el NO almacenado en el tejido muscular, bajo condiciones ácidas e hipóxicas durante el ejercicio explican el beneficio potencial en los atletas, en términos de mejorar la capacidad y la resistencia (Piknova y col., 2015, Olsson y col., 2019). Sin embargo, Daab y col. (2021) al evaluar el efecto del jugo de remolacha (sobre la cinética de recuperación del rendimiento físico, el daño muscular y el dolor muscular percibido después de un partido de fútbol simulado en jugadores de fútbol, demostraron que los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la Proteína C Reactiva (PCR), marcadores de daño muscular e inflamación, alcanzaron su punto máximo inmediatamente y durante el período de recuperación. Pero, no se observaron diferencias significativas en estos marcadores al comparar el grupo placebo y el tratado con el jugo de remolacha; lo que sugieren que la suplementación con jugo de remolacha parece no ser beneficiosa para reducir los biomarcadores químicos de daño muscular e inflamación.

Las cantidades de jugo de remolacha que deben ser ingeridas antes del ejercicio (2,5 – 3 h) son de 250 a 500 mL y en el rango de 3 a 6 días (70 mL diarios) los estudios realizados en jugadores de basquetbol indican que mejoraron la resistencia neuromuscular (López y col., 2020). Resultados similares fueron obtenidos en dieciocho revisiones sistemáticas, las cuales

concluyeron que el jugo de remolacha, rico en NO_3^- , contribuye a un incremento de la concentración de NO_2^- en plasma que produce una disminución del índice de fatiga muscular (Serra-Payá y col., 2021).

El Instituto de Investigación de Cáncer Mundial (en sus siglas en inglés, WCR) y la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (en sus siglas en inglés, IARC), observaron que el consumo de NO_3^- en los vegetales y frutas está correlacionado con un bajo riesgo de desarrollo de cáncer, como resultado de su alto contenido en compuestos bioactivos, especialmente, antioxidantes. La IARC estableció que un alto consumo de jugo de remolacha (toxicidad crónica) ocasiona la formación del compuesto tóxico ácido nitroso (2HNO_2) en la orina. Sin embargo, este compuesto es reducido a óxido nítrico (NO) por la presencia de Vitamina C contenida igualmente en la remolacha (IARC, 2010).

Adicionalmente, el consumo agudo de jugo de remolacha restaura los niveles de presión arterial en pacientes normotensos e hipertensos, debido a la reducción de la presión sistólica y diastólica, considerando una reducción de la presión arterial sistólica de unos 5 mmHg (Wyllie y col., 2013; Siervo y col., 2013; Bahadoran y col., 2017), lo que podría disminuir el riesgo de mortalidad en un 14% y la mortalidad por enfermedades cardiovasculares a un 9%. Efectivamente, se ha demostrado que el jugo de remolacha, cuando se administra a voluntarios sanos normotensos, de 57-71 años, produce un aumento agudo de los niveles plasmáticos de NO_3^- y NO_2^- , alcanzando el máximo en 3 horas y volviendo a los valores basales en 6 horas, esto acompañado de una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica de 7,9 y 5,7 mmHg,

respectivamente (Raubenheimer y col., 2017). En pacientes hipertensos, una cantidad similar de jugo de remolacha administrada durante 4 semanas redujo la PAS, PAD y la rigidez arterial (Kapil y col., 2015). Sin embargo, se han reportado resultados contradictorios ya que la administración de la forma cocida de remolacha, durante 4 semanas, no disminuyó la presión arterial, ni en pacientes posmenopáusicas ni en hipertensos (Bondonno y col., 2015; Romero-Vecchione y col., 2020). Es por lo que se debe seguir ensayando en personas con riesgo cardiovascular de diverso grado que consumen jugo de remolacha en altas cantidades a fin de evaluar su tolerancia, seguridad y balance riesgo-beneficio.

Finalmente, es conocido que los pacientes con calambres nocturnos de las piernas se quejan del dolor intenso que esta patología produce, con alteración del ritmo de sueño y deterioro de la calidad de vida. Al respecto, Romero-Vecchione y col. (2020) demostraron en pacientes postmenopáusicas o con hipertensión que sufrían calambres nocturnos, que la terapia complementaria de remolacha cocida al vapor, ingerida durante la comida de la noche, por cuatro semanas, disminuyó en un 50-100 % la frecuencia de los calambres y mejoró concomitantemente la calidad del sueño. Estos hallazgos sugieren que la ingesta de remolacha cocida durante la cena es aparentemente un suplemento dietético eficaz y seguro para el alivio de los calambres nocturnos de las piernas en pacientes postmenopáusicas y en hipertensos, ambas patologías que se sabe que tienen en común la disfunción endotelial. Sin embargo, es necesario un estudio controlado y aleatorizado con remolacha cocida, en jugo, o deshidratada

en cápsulas, para establecer con precisión el porcentaje de eficacia de este suplemento dietético en el control de los calambres nocturnos en las piernas.

Conclusión

Es evidente el beneficio potencial de la ingesta de remolacha en sus diferentes presentaciones, principalmente en jugo, por los componentes bioactivos que contiene, en particular el contenido de NO₃ que por vía exógena promueve la producción de NO. Sería útil educar a la población acerca del consumo de remolacha y sus efectos beneficiosos.

Se requieren nuevas líneas de investigación para evaluar los mecanismos fisiológicos que relacionen los efectos del NO con la función pulmonar y cardiovascular, así como el rendimiento de atletas en ejercicio de alta intensidad para mejorar su resistencia y eficiencia deportiva.

Referencias Bibliográficas

- Bahadoran Z, Mirmiran P, Kavir A, Azizi F, Ghasemi A. 2017. The nitrate – independent blood pressure – lowering. Effect of beetroot juice: A systematic review and meta-analysis. *Adv Nutr* 8: 830-838.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 11(2):66-75.
- Bondonno C P, Liu AH, Croft K D, Ward N C, Shinde S. 2015. Absence of an effect of high nitrate intake from beetroot juice on blood pressure in treated hypertensive individuals: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 102: 368-375.
- Casierra-Posada F, Pinto-Correa JR. 2011. Crecimiento de plantas de remolacha (*Beta vulgaris L. var. Crosby* Egipcia) bajo coberturas de color. *Rev Fac Nac Agron Medellín* 64(2): 6081-6091.
- Chaudhary S, Singh N. 2020. Coloring of food by the use of natural color extracted by beetroot (*Beta vulgaris*), betalain pigment. *Sustainable Agri-Food Environm Res* 8: 1-6.

- Conger S, Zamzow C, Darnell M. 2021. Acute beet juice supplementation does not improve 30 or 60-second maximal intensity performance in anaerobically trained athletes. *Int J Exerc Sci* 14(2): 60-75.
- Daab W, Amine M, Lairi M, Bouchiba M, Ali Saafi M, Rebai H. 2021. Chronic beetroot juice supplementation accelerates recovery kinetics following simulated match play in soccer players. *J Am Coll Nutri* 40 (1): 61-69.
- Domínguez R, Cuenca E, Maté-Muñoz JL, García-Fernández P, Serra-Paya N, Lozano Estevan MC, Herreros P, Garnacho-Castaño MV. 2017. Effects of beetroot juice supplementation on cardiorespiratory endurance in athletes. A systematic review. *Nutrients* 9(43):1-18.
- Domínguez R, Maté-Muñoz JL, Cuenca E, García-Fernández P, Mata-Ordoñez F, Lozano-Estevan MC, Veiga-Herreros P, da Silva SF, Garnacho-Castaño MV. 2018. Effects of beetroot juice supplementation on intermittent high intensity exercise efforts. *J Internat Soc Sport Nutrition* 15 (2): 1-12.
- Förstermann U, Sessa WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7):829-37, 837a-837d.
- Garnacho-Castaño MV, Palau-Salvà, G, Serra-Payà N, Ruiz-Hermosel MR, Berbell M, Viñals X, Gomis Bataller M, Carbonell T, Vilches-Saez S, Pleguezuelos Cobo E, Molina-Raya L. 2020. Understanding the effects of beetroot juice intake on CrossFit performance by assessing hormonal, metabolic and mechanical response: a randomized, double-blind, crossover design. *J Int Soc Sports Nutr* 17:56.
- Gluckman TJ, Bhave NM, Allen LA, Chung EH, Spatz ES, Ammirati E, Baggish AL, Bozkurt B, Cornwell III W, Harmon KG, Kim JH, Lala A, Levine BD, Martinez, MW, Onuma O, Phelan D, Puntmann VO, Rajpal S, Taub PR, Verma AK. 2022. 2022 ACC Expert consensus decision pathway on cardiovascular sequelae of COVID-19 in adults: myocarditis and other myocardial involvement, post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection and return to play. A report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J Am Coll Cardiol* 79(17): 1717-756.
- Goncalves R, Negrao C, Krieger M. 2011. Óxido nítrico y sistema cardiovascular: Activación celular, reactividad vascular y variant genética. *Arq Bras Cardiol* 96(1): 68-75.
- Hasibuan R, Apollo F, Nailuvar R. 2019. Effect of beetroot juice (*Beta vulgaris* L) during training on malondialdehyde level in athletes. *Research Gate Impact Factor* 8 (12): 298-301.
- Hernández A, Schiffer T, Ivarsson N, Cheng A, Bruton J, Lundberg J, Weitzberg E, Westerblad H. 2012. Dietary nitrate increases tetanic Ca²⁺ and contractile force in mouse fast-twitch muscle. *J Physiol* 590 (15): 3575-3583.
- Heunks LMA, Machiels HA, Dekhuijzen RPN, Prakash YS, Sieck GC. 2001. Nitric oxide affects sarcoplasmic calcium release in skeletal myotubes. *J Applied Physiol* <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.5.2117>
- Kapil V, Khambata R S, Robertson A, Caulfield M J, Ahluwalia A. 2015. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients. a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension* 65:320-327.
- Keshet R, Erez A. 2018. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Models Mechan* 11(8): 1-11.
- Kurowska A, Antosik K, Kobilinska M, Decyk A. 2021. Beetroot juice-legal doping athletes? *Central Eur J Sports Sci Med* 3(35): 57-70.
- Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E. 2011. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab* 13:149-159.
- Lopez-Samanes A, Parra A, Moreno-Perez V, Courel-Ibanez J. 2020. Does acute beetroot juice supplementation improve neuromuscular performance and match activity in young basketball players? A randomized, placebo-controlled study. *Nutrients* 12 (1):188.
- Martin-Augustin O, Sánchez-Medina F. 2004. Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm* 45(4): 303-317.
- Maughan J, Burke L, Dvorak J, Larson-Meyer D, Peeling P, Phillips S. 2018. IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *British J Sports Med* 52 (7): 439-455.
- Michel JB. 1998. Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system. *Pathol Biol (Paris)* 46(3):181-9.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896-899.
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi

- E. 2004. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:16507-16512.
- Olsson H, Al-Saadi J, Oehler D, Pergolizzi J, Magnusson P. 2019. Physiological effects of beetroot in athletes and patients. *Cureus* 11(12): e6355.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. 2010. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 94: v-vii, 1-412.
- Pedraza Chaverri J, Cárdenas Rodríguez, N. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química* 17(2), 164-173.
- Piknova B, Park J, Swanson K, Dey S, Noguchi C, Schechter A. 2015. Skeletal muscle as an endogenous nitrate reservoir. *Nitric Oxide* 47: 10-16.
- Raubenheimer K, Hickey D, Leveritt M, Fasset R, Ortiz de Zevallos J, Allen JD. 2017. Acute effects of nitrate-rich beetroot juice on blood pressure, hemostasis and vascular inflammation markers in healthy older adults: A randomized, placebo-controlled crossover study. *Nutrients* 9:1270.
- Romero-Vecchione E, Martin-Harsel A, Acosta M. 2020. Dos casos de calambres nocturnos en las piernas que mejoraron con la ingesta suplementaria de remolacha (*Beta vulgaris rubra*) en la dieta. *VITAE* 81: 1-6.
- Roy K, Gullapalli S, Chaudhuri U, Andchakraborty R. 2004. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *Int J Food Sci Technol* 39(10):1087-1091.
- Scarpulla RC. 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88:611-638.
- Serra-Payá N, Gamarlho-Castaño M, Sánchez-Nuño S, Albesa-Albiol L, Girabent-Farres M, Moizé Arcone L, Pardo Fernández A, García Fresneda A, Castizo-Olier J, Viñals X, Molina-Raya L, Gomis Bataller M. 2021. The relationship between resistance exercise performance and ventilatory efficiency after beetroot juice intake in well-trained athletes. *Nutrients* 13 (4):1094.
- Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I, Mathers J. 2013. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: A systematic revision and Meta-Analysis. *J Nutri Dis* April 17: 818- 826.
- Stamler JS, Meissner G. 2001. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiol Rev* 81(1):209-237.
- Thomas D, Erdman K, Burke L. 2016. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports medicine. Nutrition and athletic performance. *J Acad Nutri Diet* 116 (3): 501-528.
- Valcárcel Ares MN. 2014. Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial. Disponible en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/11895>
- Vulic J, Cebovic T, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Pjilas S, Canadanovic- Brunet J, Velićanski A, Cvetković D, Tumbas V. 2013. Antiradical, antimicrobial, and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food Func* 4(5): 713- 721.
- Wootton-Beard P, Ryan L. 2011. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. *J Functional Foods* 3(4): 329-334.
- Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, Blackwell JR, Skiba PF, Winyard PG, Jeukendrup AE, Vanhatalo A, Jones AM. 2013. Beetroot juice and exercise: Pharmacodynamic and dose-response relationships. *J Appl Physiol* 115: 325-336.



New biflavonoids from *Iresine diffusa*

Nuevos biflavonoides de *Iresine diffusa*

ALÍRICA I. SUÁREZ

Abstract

Three new methoxylated and unsymmetrical biflavonoids with: a flavone-flavanone structure, diffusanone A (1), flavonol-isoflavone, diffusanone B (2), 3-methoxylated-flavonol-flavone, diffusanone C (3) had been isolated from a dichloromethane fraction of *Iresine diffusa* Humb. & Bonpl. ex Willd. leaves, a plant with recognized medicinal properties. The structures of the new compounds were established based on extensive spectroscopic experiments of 1D and 2D NMR, IR, and mass spectrometry. This is the first report of biflavonoids in *Iresine* genus.

Keywords: *Iresine diffusa*, Amaranthaceae, biflavonoids, medicinal properties

Resumen

Tres nuevos asimétricos y metoxilados biflavonoides con estructuras de: flavona-flavanona, diffusanona A (1), flavonol-isoflavona, diffusanona B (2) y 3-metoxi-flavonol-flavona, diffusanone C (3) han sido aislados de una fracción de diclorometano obtenido de las hojas de *Iresine diffusa* Humb. & Bonpl. ex Willd., una planta con reconocidas propiedades medicinales. Las estructuras de los nuevos compuestos fueron establecidas basadas en diversos experimentos de RMN en 1D y 2D, IR y espectrometría de masas. Este es el primer reporte de biflavonoides en el género *Iresine*.

Palabras clave: *Iresine diffusa*, Amaranthaceae, biflavonoides, propiedades medicinales

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: alirica1@yahoo.es.

Orcid: [0000-0002-3317-5179](https://orcid.org/0000-0002-3317-5179)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.9](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.9)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 19/04/2022

Aprobación: 11/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 91-99. 2022

Introduction

Iresine diffusa Humb. and Bonpl. ex Willd., belongs to the Amaranthaceae. Some species of *Iresine* are widely used in the traditional medicine of American countries for different purposes. *Iresine herbsti*, one of the more known species (Jaafar and Jaafar, 2021) had been pharmacologically validated with effects on the central nervous system (De Feo et al., 1996, Capasso and De Feo, 2002), and in Brazil is used as a wound-healing agent (Schmidth et al., 2009); in Peru, it is used in magical rituals to expel bad spirits (De Feo, 2003), the plant and their medicinal uses had been expanded in some Asia and Africa countries (Al-Fartosy and Abdulwahid, 2015, Mohmed, 2019). The antiviral activity of the Newcastle disease virus has been reported (Andleeb et al., 2020), as well as antibacterial activity (Chaudhuri and Sevanan, 2012), and treatment for anemia (Lee and Pei, 2008). Phytochemical studies demonstrated the presence of isoflavones (Valentová et al., 2011), and several classes of compounds were published from a GC/MS analysis (Ijioma et al., 2017).

Iresine diffusa, the target species of this study, is commonly used in Peru to treat hemorrhages, malaria, and ovary inflammations (Pabon et al., 2009), in Mexico the specie is used by the Mayas for the treatment of several diseases such as malaria, typhoid, and prostate cancer (Rios et al, 2005). Previous phytochemical studies of this plant have shown the isolation of steroids, glycosylated triterpenes and drimenes (Rios et al., 2005), guanidines alkaloids (Killian et al., 2020). In Venezuela, this plant is known as valerian, and it is recognized for sedative properties. Previous research in our group demonstrated the presence of methylenedioxy flavonoids

including a coumaronochromone (Suárez et al., 2016), and the effect of one of these flavonoids on the cellular viability of *Leishmania mexicana* (De-Gouveia et al., 2017). As part of this continuing research on this specie, now three new unsymmetrical biflavonoids which have in common an ether linkage, and methoxyl and methylenedioxy groups in their structures, have been isolated from the dichloromethane fraction of *Iresine diffusa* leaves. The structural elucidations of the isolated flavonoids were established by spectroscopic and spectrometric methods. The dimeric compounds were identified as three different structures composed by flavone-flavanone named difussanone A (1), flavonol-isoflavone difussanone B (2) and flavonol-flavone difussanone C (3). Until now *I. diffusa* is the first specie in the genus to present biflavonoids.

Materials and Methods

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

1D and 2D NMR experiments were performed in CDCl₃ on a Bruker AM-500 spectrometer operating at 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C). Chemical shifts (δ) were recorded in ppm with reference to the solvent signals. Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) was performed using a QTRAP 3200 de Applied Biosystem. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer model 283. Column chromatography was performed on Silica gel 60H (230-400 μ) from Merck, and precoated silica gel GF254 plates from (Merck) were used for TLC. Melting points were measured on a Kofler hot-stage apparatus and are uncorrected. Optical rotation was taken in a polarimeter ATAGO-Polax-2L.

PLANT MATERIAL

The leaves of *I. diffusa* were collected in San Diego de Los Altos, Miranda state, in June 2008, and authenticated by Dr. Stephen Tillett. A voucher specimen (MYF26730) has been deposited at the Herbarium Víctor Manuel Ovalles (MYF) of the Pharmacy Department of the Universidad Central de Venezuela.

EXTRACTION AND ISOLATION

The air-dried and ground leaves of *I. diffusa* (350 g) were extracted by Soxhlet with methanol. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford 12 g of crude. The obtained extract was dissolved in MeOH:H₂O (50:50) and partitioned with n-hexane, dichloromethane, and ethyl acetate consecutively to give 1.06 g, 1.42 g, and 1.25 g respectively. The dichloromethane fraction (1.00 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with a solvent system of CHCl₃/EtOAc in gradient to afford ten sub-fractions based on TLC analysis. The sub-fractions (F1 + F2), and (F3 + F4) gave pure single flavonoids previously reported by us. Sub-fractions F5 and F6 gave by precipitation two yellow solids, which after identification were characterized as the biflavonoids 1 and 2. The subfractions F7 and F10 were further combined and rechromatographed on a silica gel column eluting with CHCl₃/MeOH of increasing polarity, to yield the biflavonoids 2 and 3.

Results and Discussion

Chromatographic separation of the dichloromethane fraction of *I. diffusa* leaves has led to the isolation of three new biflavonoids (1-3) Figure 1.

Compound 1 was isolated as a yellow amorphous powder, mp 197-201 °C. The preliminary analysis of its NMR spectra suggested a biflavonoid structure or a mixture of two different flavonoids. The ESI-MS m/z 583 (M+H) clearly confirmed a biflavonoid compound type, which molecular formula was determined as C₃₂H₂₂O₁₁ corroborated with the ¹³C NMR analysis. The IR spectrum exhibited the more significant signals, carbonyl absorption bands at 1648, 1655, and 1620 cm⁻¹; typical absorption of the methylenedioxy group was also evident between 935-920 cm⁻¹. The ¹³C NMR spectrum analyzed with the help of the DEPT-135 experiment showed that from the total 32 carbons of the molecule, 4 are sp³ and 28 are sp² including two carbonyls. The ¹³C NMR resonances showed two different carbonyl systems at δ_c 195.7 and 183.1 ppm, these chemical shifts suggested that the biflavonoid is made up of a flavanone and flavone units. The signals at 183.1, 105.3, and 163.1 in ¹³C NMR, are part of an α-β unsaturated carbonyl system, which clearly identified the flavone unit. An ABC system with resonances at δ_H 7.45 (d, J = 8.10 Hz), 7.42, and 7.92 as multiplet was observed in the ¹H spectra. The ¹H and ¹³C NMR also revealed the signal of one methoxyl group (δ_H 4.17, δ_c 61.3 ppm) and among this, the presence of a methylenedioxy moiety in 1 was corroborated by the resonances at (δ_H 6.04, δ_c 102.5 ppm).

The flavanone unit (II) showed characteristic ¹³C signals at 195.7, 43.3, and 79.2 ppm supported by the resonances observed in ¹H NMR at δ 5.42 (1H, dd, J = 12.8, 2.9 Hz) corresponding to the oxygenated methine at 2 positions, and methylene with δ 3.17 (1H, dd, J=12.8, 15.6 Hz) and 2.83 (1H, dd, J =15.6, 2.9 Hz) signals corresponding at the protons in

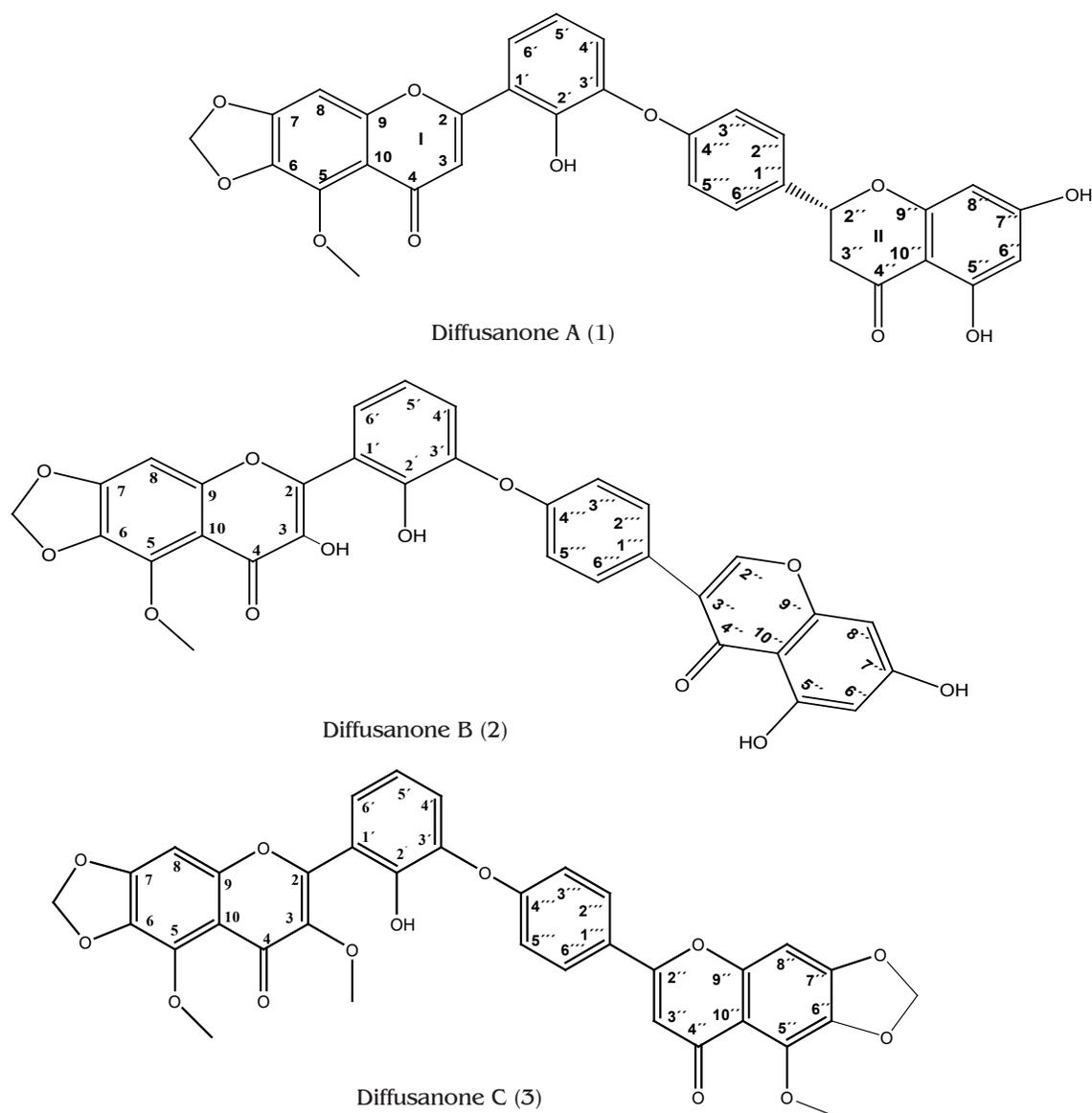


Figure 1. Structures of diffusanones A, B and C

the position 3 of the flavanone (Table I). The ring B of the flavanone unit was identified as a p-substituted benzene system evidenced by a set of two ortho-coupled doublets at δ_{H} 7.19 (d, $J=8.6$ Hz), and 7.55 (d, $J=8.6$ Hz) each integrating for two protons. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum (in CDCl_3) showed also relevant signals, a low-frequency broad singlet at 13.01 ppm corresponding to a chelated hydroxyl group at the C-5 position in a flavonoid moiety and a signal for OH (brs) at 11.96 ppm.

The assignment of ^{13}C NMR and ^1H resonances in the dimeric structure were confirmed by HMQC and HMBC experiments (Figure 2). The methoxyl and methylenedioxy groups were placed at the 5, and 6,7 positions of the ring A in the flavone unit. The HMBC and HMQC correlations were consistent with this placement. Finally, an exhaustive analysis of NMR data, considering the quaternary and oxygenated carbons, and comparison with literature data (Ariyasena et al., 2004,

Table I. ^{13}C , ^1H NMR data of the compounds (1-3) in CDCl_3

Position	Compound					
	1		2		3	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) m(J Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) m(J Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) m(J Hz)
2	163.1		151.7			153.9
3	105.2	6.83 (s)	136.2			141.4
4	183.1		173.6			174.2
5	152.1		153.9			153.3
6	138.3		135.8			134.8
7	153.2		152.4			153.2
8	93.5	6.57 (s)	93.9		6.78(s)	93.1
9	156.6		154.8			154.8
10	112,2		112.7			112.9
1'	123.3		123.4			125.9
2'	164.1		163.7			161.2
3'	138.9		142.6			141.2
4'	128.9	7.43(d, 7.6)	125.2		7.37 (m)	130.5 7.43 (m)
5'	126.3	7.92 (dd, 7.6, 2.0)	125.1		7.37(m)	131.2
6'	126.1	7.45 (d, 8.1)	111.1		7.06(d, 2.7)	129.0
2''	79.2	5.42 (dd, 12.8, 2.9)	153.5		7.89(s)	154.0
3''	43.3	2.83 (dd, 15.6, 2.9)	125.7			108.1
		3.17 (dd, 12.8, 15.6)				
4''	195.7		178.7			178.2
5''	164.7		149.4			153.9
6''	96.7	6.05 (s)	121.9		8.16(d,6.8)	134.6
7''	156.7		156.7			153.5
8''	95.4	6.04 (s)	92.9		6.68(s)	92.9
9''	153.3		141.5			155.2
10''	103.2		99.5			112.6
1'''	138.3		112.8			131.4
2'''	120.1	7.55 (d, 8.6)	119.5		7.06 (d,6.9)	128.6
3'''	130.5	7.19 (d,8.6)	130.5		7.20 (d,6.9)	128.2
4'''	164.4		163.7			161.2
5'''	130.3	7.19 (d,8.6)	130.0		7.20 (d,6.9)	128.2
6'''	119.9	7.55 (d,7.6)	120.7		7.06 (d,6.9)	128.6
$\text{OCH}_2\text{-O}$	102.5	6.04 (s)	102.3		6.10 (s)	102.1
OCH_3	61.3	4.17 (s)	61.4		4.15, 4.20	61.1
						61.2

de Oliveira et al., 2002) suggested that the linkage between the flavanone/flavone units is made up of ether between I-C-3' and II-C-4''', which was confirmed by heteronuclear multiple bond connectivity experiment

(HMBC) (Figure 2). A comparison with the literature on flavanones related to the values of the diaxial coupling between H-2 and H-3 ($J = 12.8$ Hz) suggested that the configuration of C-2 is S, with an optical

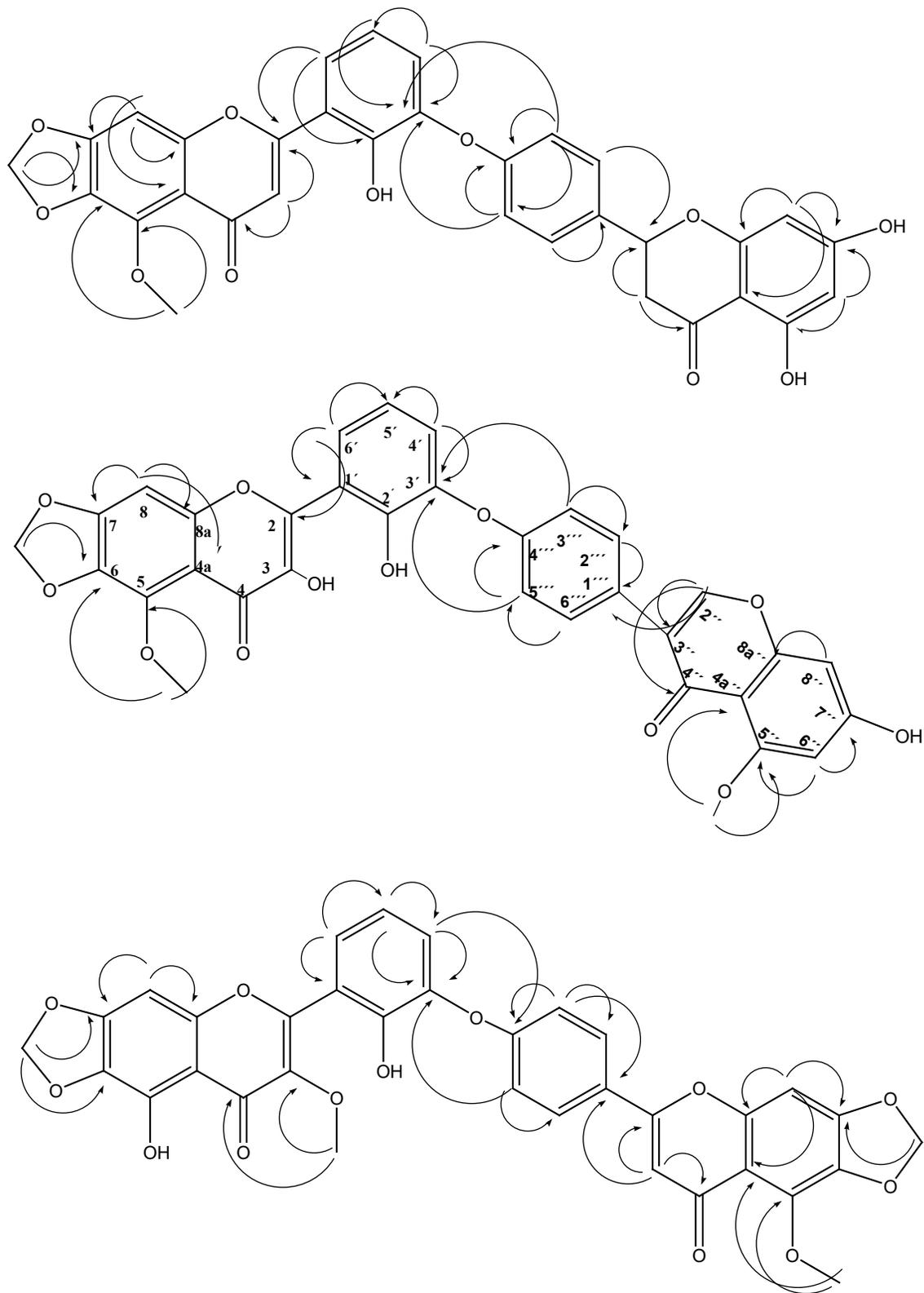


Figure 2. Selected HMBC correlations for 1, 2 and 3

rotation of (-19.5°) (Liu et al., 2018, Kang et al., 2000). A search in the literature data of the characterized compound showed, first that the methylenedioxy group is not very common in reported biflavonoids, and that the molecular weight and formula assigned to compound 1 did not lead to a known structure. Biflavonoid 1 was given the name diffusanone-A.

Compound 2 was obtained as a yellowish solid mp 193-196 °C. The molecular formula of 2 was determined as $C_{34}H_{22}O_{13}$, based on its ESI-MS data (m/z 639 [M + H]) and ^{13}C NMR. Both the 1H and ^{13}C NMR of 2 gave common signals with 1 such as the methoxyl and methylenedioxy groups, but differences were also evident between these substances in the carbonyls' chemical shifts (183.1, 195.7) in 1 vs (173.7, 178.7) in 2. The clear presence of an isoflavone as part of the dimeric structure was demonstrated by the signals at (δ_H 7.82 (s), δ_C 153.5 ppm), further established by HMBC and HMQC correlations. Two singlets at δ_H 4.15 and 4.20 ppm which correlated in the HMQC with the carbons at δ_C 61.4 ppm indicated that two methoxyl groups were present in the biflavonoid skeleton. The 1H NMR spectrum also revealed a para-substituted aromatic system as part of the isoflavone unit, as was confirmed by strong correlations between the doublets of doublets integrating for 2 at δ 7.06 in the 1H NMR and the C-2 (153.5 ppm) evidenced in the HMBC. Close analysis of the remaining spectral data suggested that the second part of the biflavonoid 2 was a flavonol. Correlations observed in the HMBC spectrum between the signal at δ_H 7.20 (H-3'', H-5'') and 163.7, revealed a substitution at C-3' of the flavonol moiety. Moreover, additional correlations in the HMBC spectrum (Figure 2), proved the ether linkage between the flavonol and

the isoflavone monomers, similar to the difussanone A. Thus, a literature survey revealed that this is the first isolation of compound 2 from natural sources, and by analogy with the previously described compound 2 was named diffusanone B.

Compound 3 was isolated as a pale yellow amorphous solid, mp.148-150°C, and possessed a molecular formula of $C_{35}H_{24}O_{13}$ determined from its ESI-MS data m/z 653 [M+H], suggesting again a flavonoid dimeric structure. Close examination of NMR spectra of 3 indicated that is a dimeric structure composed of two asymmetric units, a 3-methoxylated-flavonol and a flavanone. The ^{13}C and DEPT experiments were consistent with the calculated formula. The ^{13}C NMR spectrum of 3 displayed the signals of two different α,β unsaturated carbonyl groups at δ 174.2 and 178.2 ppm, which suggested that the dimer was composed of a flavonol and flavanone units. Two sets of orto coupled protons at δ_H 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz) and 8.24 (d, 8.8 Hz), identified the para-substituted phenyl ring, also characterized in the compounds 1 and 2. The 1H NMR spectrum showed three signals for methoxy groups at δ 3.81, 4.06, and 4.08 ppm, integrating for three protons each one, this fact and the lack of chelated hydroxyl group suggested that both C-5 and C-5'' are methoxylated. The signal for the methylenedioxy group was also integrated for four protons indicating that both units of the biflavonoid have this moiety (Agrawal, 1989; Harbone et al., 1975). The key long-range correlation between δ 7.43 ppm (H-4') and 141.2 (C-3'); and between 7.92 (H-3''', H-5''') with C-3', required an ether linkage between C-3' and C-4'''' such as was established for compounds 1 and 2 and, corroborated by the presence of two non-hydrogenated carbons at δ

141.2, and 161.2 ppm. Accordingly, the structure of **3** was established as shown, and this biflavonoid was given the name diffusanone C.

Conclusions

Three new biflavonoids (1-3) were isolated from *Iresine diffusa* in this study. These dimers composed of flavone-flavanone, flavonol-isoflavone, and methoxy-flavonol-flavone showed all their linkage through an ether function. The flavonoids especially the isoflavones are known in the Amaranthaceae, and *Iresine* genus, but so far this is the first report of biflavonoids in *Iresine*.

References

- Agrawal PK. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier 1989:98-116.
- Al-Farhoshi AJM, Abdulwahid AA. 2015. Antioxidant activity of anthocyanins extracted from Iraqi *Iresine herbstii* L. flowers after drying and freezing. Am J Analit Chem 3: 382-394.
- Andleeb A, Ashral A, Muzammil S, Naz S, Asad F, Ali T, Rafi R, Al-Gahnim KA, Al-Misned F, Ahmed Z, Mahbooh S. 2020. Analysis of bioactive composites and antiviral activity of *Iresine herbstii* extracts against Newcastle virus in ovo. Saudi J Botanical Sci 27: 335-340.
- Ariyasena J, Baek S-H, Perry NB, Weavers RT. 2004. Ether-Linked Biflavonoids from *Quintinia acutifolia*. J Nat Prod 67: 693-696.
- Capasso A, Feo VA. 2002. Central nervous system pharmacological effects of plants from northern Peruvian Andes: *Valeriana adscendens*, *Iresine herbstii* and *Brugmansia arborea*. Pharmaceut Biol 40:274-293.
- Chaudhuri D, Sevanan M, Uma Devi P. 2011. Review on Medicinal and Pharmacological properties of *Iresine herbstii*, *Crozophora rothleri* and *Ecbolium lineaum*. Afr J Tradit Complement Altern Med 8:124-129.
- Chaudhuri D, Sevanan M. 2012. Investigation on Phytochemical and Antibacterial Activity of the Leaf and Stem Extracts of *Iresine herbstii*. Int J Pharm Bio Sci 3(4): 697-705.
- De Feo V. 2003. Ethnomedical Field Study in Northern Peruvian Andes with Particular Reference to Divination Practices. J Ethnopharmacol 85:243-256.
- De Feo V, Capasso A, De Simone F, Sorrentino L. 1996. CNS Pharmacological Effects of Aqueous Extract from *Iresine herbstii*. Pharma Biotechnol 34:184-188.
- de Oliveira MCC, de Carvalho MG, da Silva CJ, Werleb AA. 2002. New Biflavonoid and Other Constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). J Braz Chem Soc 13(1): 119-12.
- De Gouveia Y, Hernández-Rodríguez V, Rodríguez-Durán J, Suárez AI, Benaim G. 2017. Efecto de un metilendioxi flavonoide aislado de *Iresine diffusa* sobre la viabilidad celular de *Leishmania mexicana* y la homeostasis intracelular del Ca²⁺. Invest Clínica 58 (4): 334-351.
- Harbone JB, Mabry TJ, Mabry H. The Flavonoids, Part I, Academic Press, London, 1975. pp. 100-103.
- Ijioma SN, Igwe, KK, Nwakudu ON, Madubuike AJ, Achi NK. 2017. Preliminary evaluation of phytochemicals in *Iresine herbstii* ethanol extract using gas-chromatography mass spectrometry analysis. J Environ Life Sci 2: 21-28.
- Jaafar NS, Jaafar IS. 2021. *Iresine herbstii*: An Overview. Res J Pharm and Techn 14(11): 6119-6124.
- Kang SS, Kim JS, Son KH, Chang HW, Kim HP. 2000. A new prenylated flavanone from the root of *Sophora flavescens*. Fitoterapia 71: 511-518.
- Killian C, Jhonson SL, Ma H, Mckeown B, McDougall L, Hurta R, Liu Y, Seeram, NP. 2020. Celosiadines A and B, unusual guanidines alkaloids from *Iresine diffusa*. Nat Prod Res 36(1): 356-360.
- Liu Y, Dong JY, Ren B. 2018. A new flavanone from seeds of *Psoralea corylifolia* with α -Glucosidase inhibitory activity. Nat Prod Comm 13(7): 841-843.
- Mohmed SM. 2019. In Vitro Efficacy of Leaf Extract of *Iresine herbstii* and *Isaria fumosurosea* to control Aphis Gossyph Glover. Plant Archives 19 (2): 1224-1228.
- Pabon CV, Deharo E, Albán-Castillo J, Estevez Y, Lores FA, Rojas R, Gamboa, D, Sauvain M, Castillo D, Bourdy, G. 2009. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. J Ethnopharmacol 123:413-422.
- Rios MY, Berber L A. 2005. 1H and 13C assignments of three new drimenes from *Iresine diffusa*

-
- Humb. and Bonpl. ex Willd. Mag Reson Chem 43: 339-342.
- Schmidh C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, Bittencourt CF, Zanetti GD, Heinzmann BM, Laufer S, Merfort I. 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. J Ethnopharmacol 122: 523-532.
- Suárez AI, Ramirez C, Palacios R, Rojas K, Delle Monache F, Tillett S. 2016. Flavonoids from *Iresine diffusa*. Rev Fac Farm UCV (1 y 2): 2-6.
- Valentová M, Marek R, Švajdlenka E, Kubínová R, Suchým V, 2011. A new isoflavanone from *Iresine herbstii*. Fitoterapia 82: 272-275.



Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito *Aedes aegypti* ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental

Functionality indices in *Aedes aegypti* mosquito larvae under the action of Fipronil: An experimental approach

AURORA DEL VALLE BARRIOS RUDAS*, MARCO ANTONIO ÁLVAREZ OCHOA^{1**}, ELIANA NAVARRO^{***}

Resumen

Las características morfofuncionales del estadio larvario de un invertebrado holometábolo como el mosquito *Aedes aegypti*, el principal vector de los arbovirus, han incentivado el uso de este organismo como un modelo alternativo no convencional para las investigaciones en el campo de la toxicología experimental. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de nado, la actividad cardíaca contráctil y el estado de óxido-reducción de las larvas del mosquito *Aedes aegypti* bajo la acción del Fipronil, un agente insecticida de actividad neurotóxica. Se determinó la concentración efectiva cincuenta a las 3 horas de tratamiento; $CE_{50} = 30 \pm 0,011 \mu\text{M}$ con la cual se pudo registrar un 50% de la población larvaria sobreviviente y con signos de intoxicación motora, cardíaca y metabólica. Se evaluó la respuesta larvaria en medio natural de cultivo, en cloroquina y en adrenalina, depresor y estimulante de la función cardíaca, respectivamente. Se realizaron video registros analizados en el programa Tracker Analysis, V5.1, con el programa GraphPad Prim. En cuanto a la intoxicación motora, se obtuvo el índice de variabilidad de la velocidad angular correspondiente al valor de $0,6 \pm 0,02$ con un IC 95% de 0,53 a 0,62 y $p=0,0006$. En cuanto a la intoxicación cardíaca, se obtuvieron los índices de variabilidad de la fuerza y de la energía cinética de la actividad cardíaca contráctil, $0,8124 \pm 0,0201$, IC 95% de 0,7430 a 0,8518, $***p<0,0001$ y de $0,6957 \pm 0,028$, IC 95% de 0,6395 a 0,7510 y $****p<0,0001$, respectivamente. En cuanto el estado metabólico se pudo determinar un avanzado estado de reducción en larvas tratadas con Fipronil. El bioensayo con Fipronil en el modelo larvario, no convencional, de *Aedes aegypti* permitió corroborar su acción sobre la actividad mitocondrial así como la caracterización de índices de variabilidad motora y cardíaca como posibles parámetros morfofuncionales para el diagnóstico de señales de intoxicación inducida por agentes con propiedades neurotóxicas como el Fipronil.

Palabras clave: Larvas del *Aedes aegypti*, Fipronil, índice de variabilidad del comportamiento de nado, índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil

Abstract

The morphofunctional characteristics of the larval stage of a holometabolous invertebrate such as the *Aedes aegypti* mosquito, the main vector of arboviruses, have encouraged the use of this organism as an alternative non-conventional model for research in the field of experimental toxicology. The objective of the present work was to evaluate the swimming behavior, cardiac contractile activity, and the oxidation-reduction state of *Aedes aegypti* larvae under the action of Fipronil, an insecticidal agent with neurotoxic activity. The effective concentration of fifty at 3 hours of treatment was determined, $EC_{50} = 30 \pm 0.011 \mu\text{M}$ with which it was possible to register 50% of the surviving larval population with signs of motor, cardiac and metabolic intoxication. We tested larval response in natural culture medium, in chloroquine and adrenaline, depressant and stimulant of cardiac function respectively. Video records were made and analyzed in the Tracker Analysis program, V5.1, together with the GraphPad Prism program. Regarding motor intoxication, the angular velocity variability index corresponding to the value of 0.6 ± 0.02 with a 95% CI of 0.53 to 0.62 and $p=0.0006$ was obtained. Regarding cardiac intoxication, the variability indices of force and kinetic energy of cardiac contractile activity were obtained, 0.8124 ± 0.0201 , 95% CI from 0.7430 to 0.8518, $***p<0.0001$ and 0.6957 ± 0.028 , 95% CI from 0.6395 to 0.7510 and $****p<0.0001$, respectively. As soon as the metabolic state could be determined in larvae treated with Fipronil an advanced state of reduction. The bioassay with Fipronil in the unconventional larval model of *Aedes aegypti* allowed to corroborate its action on mitochondrial activity as well as the characterization of motor and cardiac variability indices as possible morphofunctional parameters for the diagnosis of signs of motor, cardiac and metabolic intoxication of agents with neurotoxic properties such as Fipronil.

Keywords: *Aedes aegypti* larvae, Fipronil, swimming behavior variability index, cardiac contractile activity variability index

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. ¹Correspondencia: marco.alvarez@ucv.ve
Orcid: [0000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)* ; Orcid: [0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)** ; Orcid: [0000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)***

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.10](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.10)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 11/05/2022

Aprobación: 18/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 100-110. 2022

Introducción

En los últimos años, los estudios experimentales realizados sobre las características morfofuncionales del estadio larvario de un invertebrado holometábolo como el mosquito *Aedes aegypti*, el principal vector de los arbovirus, han venido incentivado la promoción de este organismo como modelo alternativo no convencional para las investigaciones en el campo de la toxicología experimental (Álvarez y col., 2021a). Dentro de estas características morfofuncionales, medibles y cuantificables, se destacan, su patrón de nado caracterizado por movimientos serpenteantes, con fases de estiramiento y contorsión, que definen un comportamiento de nado (CN) con desplazamiento acuático zigzagueante circular (League y col., 2015). Cabe destacar que dicho movimiento es sensible a la luz ultravioleta (Álvarez y col., 2021b). Por otra parte, su actividad cardíaca se encuentra circunscrita a una estructura en forma de vaso ubicada a lo largo del abdomen y subdividida en la región de la aorta torácica, la cual no participa en la propulsión de la hemolinfa, mientras que la región del corazón abdominal, compuesta por músculo estriado con una visible actividad cardíaca contráctil (ACC) controla la circulación de la hemolinfa (Glenn y col., 2010; Andereck y col., 2010). La ACC ha sido reconocida como una contracción miogénica, sin desestimar que se encuentra regida parcialmente por al menos un componente de control neuronal, ya que responde a los péptidos cardio activos promotores de la disminución de la tasa de contracción y reguladores selectivos del ritmo cardíaco retrógrado en otras especies (Kasai y Cagan, 2010; Dulcis y col., 2001; Ejaz y Lange, 2008; Leódido y col., 2013; Neckameyer y Argue, 2013; Neckameyer y

col., 2000). Las características descritas, particularmente el CN y la ACC, sumadas a su rápida reproducción, su secuencia genómica en estudio (Nene y col., 2007), así como, los insignificantes costos para invertir en su obtención y mantenimiento, hacen de esté un organismo con gran potencial para estudios que profundicen sobre la propia fisiología larvaria, así como la valoración de un modelo experimental no convencional que cumple con el principio de las 3R para ser utilizado en la caracterización de productos químicos contaminantes con actividad tóxica poco valorada. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el CN y la ACC de las larvas del mosquito *Aedes aegypti* bajo la acción del Fipronil, un agente insecticida neurotóxico. El Fipronil ha sido considerado como un insecticida de amplio espectro, perteneciente a la familia de los fenilpirazoles que altera el funcionamiento del sistema nervioso central perturbando a las mitocondrias, lo que resulta en un estrés mitocondrial y en un desequilibrio redox, características del definido síndrome de agotamiento del ADN mitocondrial (Souders y col., 2021).

Materiales y Métodos

MODELO LARVARIO DEL *Aedes aegypti* Y FIPRONIL

Para el desarrollo del objetivo propuesto se hizo uso de larvas de *Aedes aegypti* en estadio cuatro (L4) (Figura 1a), obtenidas del reservorio que ha sido descrito en trabajos previos. Las mismas fueron seleccionadas al azar y colocadas en capsulas de 24 pozos a razón de 4 larvas/pozo. La sensibilidad a la luz UV fue evaluado en cada grupo larvario a través de la estimulación con un pulso de luz UV proveniente de un

dispositivo DP-323BE que emite una radiación con una longitud de onda superior a 350 nm. Una vez verificada la respuesta al estímulo, particularmente un incremento en el movimiento zigzagueante, se armaron cuatro grupos larvarios, incluyendo el grupo control, para ser incubados en 50, 100 y 150 μM de Fipronil (Figura 1b). Estas concentraciones fueron seleccionadas a partir de la revisión de los datos obtenido de los Modelos Cuantitativos de Relación Estructura-Actividad (QSAR), vinculados con la fisiología y la ecología del *Aedes aegypti* (Devillers y col., 2014). El grupo control se mantuvo en agua de cultivo. Un ensayo piloto permitió determinar, a través de observación y

monitoreo continuo, la respuesta motriz ante la luz UV, pre y postratamiento con Fipronil, pudiéndose evidenciar una elevada tasa de inmovilización larvaria a las 3 horas de tratamiento; un efecto además dependiente de la concentración y del tiempo de incubación (Figura 1c). Fue a la concentración de $30 \pm 0,011 \mu\text{M}$ donde se pudo registrar un 50% de la población larvaria sobreviviente y con signos de intoxicación, asumiéndose como la Concentración Efectiva Cincuenta a las 3 horas de tratamiento (CE_{50} 3hrs). Este dato fue obtenido con un Intervalo de Confianza (IC) de 95%. La pérdida de la respuesta motriz ante la luz UV fue considerada como un efecto subletal.

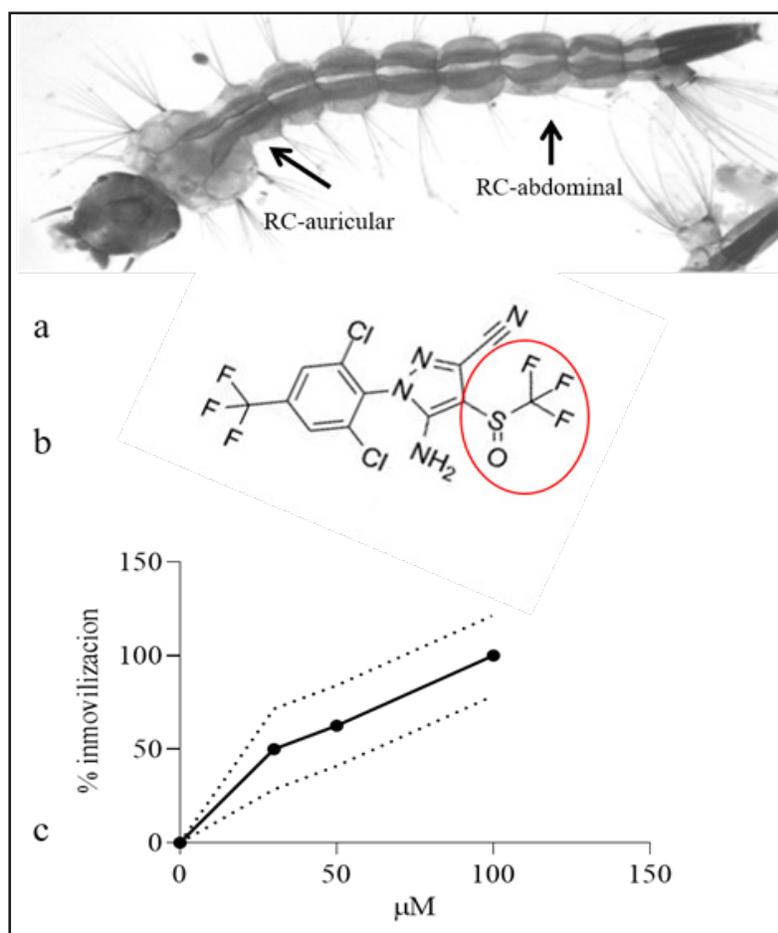


Figura 1. Larva L4 de *Aedes aegypti* (1a). Región Cardíaca (RC), auricular y abdominal. Estructura química de la molécula de Fipronil (1b). Pirazoles de segunda generación que contienen un sustituyente único llamado trifluorometilsulfinil como sitio activo de la molécula. Relación entre el porcentaje de inmovilización ante la luz UV y la concentración de Fipronil (1c). CE_{50} 3hrs = $30 \pm 0,011 \mu\text{M}$. IC95%. N = 4 larvas por concentración. CE: concentración efectiva 50; IC: Intervalo de confianza.

REGISTRO Y VALORACIÓN DE LA CONDUCTA DE NADO

Para el registro de la CN, se realizaron videos de la actividad motora antes de que las poblaciones larvarias fuesen tratadas con la CE_{50} de Fipronil, consideradas como las fases de pretratamiento o control y postratamiento, respectivamente. Para ello, se hizo uso de un portaobjeto con un espacio circunferencial definido por aro metálico colocado sobre el portaobjetos para circunscribir el campo de observación y el área de movimiento larvario. Las larvas seleccionadas al azar fueron colocadas en dicho espacio y observadas a través del lente objetivo de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, con cámara Nikon adaptada e iluminación episcópica. Una vez enfocadas, se realizaron videos a razón de 15 cuadros/segundo, durante 30 segundos, teniendo cuidado de eliminar posibles fuentes de artefactos de movimiento, así como sombras, reflejos y cambios en la intensidad de la luz o deformaciones en la imagen como resultado de la curvatura de la lente. Para la valoración de la actividad motora, se tomaron en cuenta los ciclos de movimientos cóncavos-convexos considerados como periodos de relajación (larva estirada) y periodos de encogimiento (larva curvada). Dichos ciclos fueron seguidos por un punto de masa, entre la porción cefálica y caudal, a lo largo del video mediante el programa de análisis y construcción de modelos, Tracker (Conklin y col., 2015; Brown, 2007). Dicho procesamiento generó un Tacograma del perfil del movimiento larvario, así como un fichero de datos numéricos que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad para la valoración de los parámetros angulares como: la velocidad, ω ($^{\circ}$ /seg), y la aceleración angular, α ($^{\circ}$ /seg²). Los valores obtenidos permitieron

establecer una relación de sensibilidad y especificidad para cada uno de ellos, así como, determinar el Valor del Área Bajo la Curva (ABC) o el Índice de Variabilidad del Comportamiento de Nado (IVCN).

REGISTRO Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL

Para el registro de la ACC, las larvas tratadas con la CE_{50} y con su respectivo registro de CN, fueron colocadas en una ranura de 1 mm², diseñada sobre una lámina porta objetos, para reducir la movilidad larvaria durante la realización del video registro de la ACC, como ha sido propuesto en protocolos diseñados por otros autores y modificado para nuestra experimentación (League y col., 2015). Bajo estas condiciones fue posible enfocar y visualizar el área cardiaca abdominal de las larvas a través del menor objetivo de aumento, 10X, de un microscopio de contraste de fase Olympus BX50, con cámara digital Nikon adaptada. Los respectivos videos fueron realizados a razón de 15 cuadros/segundos, durante 30 segundos. La valoración de la ACC se llevó a cabo a través del seguimiento de un punto de ACC circunscrito a un área rectangular de búsqueda definida sobre el área del corazón inmediatamente medial a los troncos traqueales longitudinales, con ayuda del programa de análisis de videos Tracker. Dicho punto de contracción era seguido a lo largo de la secuencia de frame de los respectivos videos. El registro de ACC generó un Tacograma del perfil de ACC, así como un fichero de datos numéricos de los picos (c) de contracción que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad para la valoración de la frecuencia promedio de contracción (fpc) y del valor del intervalo de picos de contracción (c-c) en función

del tiempo expresado en segundos. Cabe destacar que el valor del intervalo c-c fue estimado de acuerdo con el cálculo utilizado para la obtención del tiempo de duración del intervalo R-R de un electrocardiograma (My EKG, 2022). El valor promedio de la desviación estándar de los intervalos c-c permitió definir la Variabilidad Total de la Actividad Cardíaca Contráctil (VACC-total), así como, el Índice de Variabilidad de la Actividad Cardíaca Contráctil (VACC-índice).

FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

En un intento por entender la etiología de la variabilidad funcional de las larvas de *Aedes aegypti* tratadas con Fipronil, se realizó un ensayo para la evaluación de la función mitocondrial. Para ello, las larvas sobrevivientes e intoxicadas fueron incubadas en una solución 10 μ M de Verde Janus (VJ), a temperatura ambiente y con exposición a ciclos de luz-oscuridad de 48 hrs. El VJ o 8-[[4-(dimetilamina) fenil]diazetil]-N, N-dietil-10-fenilfenazina-10-ilo-2-amina es un colorante catiónico lipofílico supra vital que al igual que otros cationes lipofílicos, es captado solo por mitocondrias metabólicamente activas. En su forma oxidada, tiene un color azulado y absorbe al máximo a 595 nm. Tras la reducción por deshidrogenasas mitocondriales, el VJ se convierte en dietilsafranina que es de color rosa. La actividad alterada de la deshidrogenasa mitocondrial a menudo se asocia con daño y disfunción mitocondrial (Ahmad y col., 2018). Las imágenes obtenidas fueron analizadas a través del programa de análisis de imágenes ImageJ -Fiji (Schindelin y col., 2018).

Análisis estadístico

Los valores medios, pre y postratamiento, de las respectivas variables fueron tratados mediante un análisis de la prueba no pareada

y consideradas de manera independientes o no relacionados para determinar así la existencia de una diferencia significativa entre ambos valores medios. También fue realizado el análisis del Área Bajo la Curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic) para establecer los posibles índices de variabilidad de los respectivos parámetros. Esto fue realizado a través del programa GraphPad Prim.

Resultados

COMPORTAMIENTO DE NADO

El CN quedó representado a través de un Tacograma caracterizado por un patrón de trazos de movimientos activos (ma) cóncavos-convexos, con una fase de contracción y estiramiento (c-e), seguido de un patrón de trazos de las larvas en posición de estiramiento o inmovilidad (e) (Figura 2a). Luego de las 3 horas de tratamiento con Fipronil, hubo una reducción del patrón de trazos de movimientos activos cóncavo-convexo (ma) con fases de contracción y estiramiento (c-e), caracterizado por un patrón constante de trazos en fase de estiramiento (Figura 2b). La prevalencia de las larvas intoxicadas en la fase de estiramiento fue mayor respecto al estado inicial al tratamiento. Bajo esta condición no hubo respuesta al estímulo UV. Dicho efecto se tradujo en cambios en la velocidad angular (ω) y aceleración angular (α), al comparar la condición pre y postratamiento, se obtuvo una reducción significativa de la ω de 62 rad/seg a 10 rad/seg. De la comparación entre las distintas Áreas Bajo la Curva (ABC) de la relación Sensibilidad/Especificidad de los distintos parámetros angulares (ω y α), resultó de mayor significancia el ABC de la velocidad

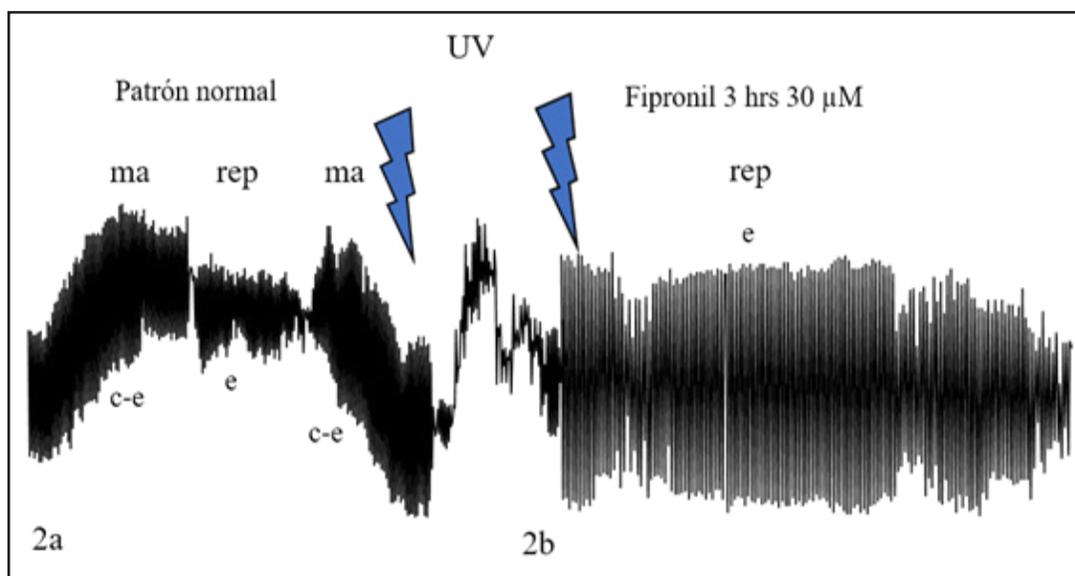


Figura 2. Trazos del patrón de movimiento larvario pretratamiento (2a) y postratamiento (2b) con Fipronil 30 μ M y bajo el estímulo de luz UV. Movimiento activo (ma) con fases de contracción-estiramiento (c-e) y el reposo (rep) en fase de estiramiento (e). Estímulo UV (rayo).

angular, particularmente $0,6 \pm 0,02$ con un IC 95% de 0,53 a 0,62 y $p=0,0006$, traducido en una probabilidad de 60% de seleccionar al azar larvas con reducción de velocidad angular en una población larvaria tratada con Fipronil respecto a la selección en una población control.

ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL

La ACC fue visualizada a través de un Tacograma que permitió determinar, a partir de las ondas de contracción, las respectivas frecuencias promedio de contracción (fpc), representadas en la condición inicial control (Figura 3a) como una serie de ondas contráctiles (c), con intervalos de tiempo c-c regulares y de amplitud entre -0,2 y 0,2 ms, registradas a largo del vaso dorsal y alternadas entre periodos de sístole y diástole, con un valor inicial de 109 ± 21 c/seg. En la condición de postratamiento con Fipronil (Figura 3b), la fpc quedó representada como una serie de ondas contráctiles (c) de amplitud e intervalos regulares, más, sin embargo,

con un retardo entre los intervalos de aparición de la sístole y la diástole, con un valor de fcp de $26,50 \pm 16$ c/seg y una diferencia significativa de $***p=0,04 < 0,05$. Una alteración similar fue registrada en el control cloroquina (Figura 3c) y no en el control adrenalina (Figura 3d) en donde el intervalo c-c permaneció similar al control. La reducción de la fpc permitió determinar la variabilidad total de los cambios en la fpc ($Vt-fpc$), correspondientes a 0,11 ms y 0,6 ms al comparar el pre y postratamiento con Fipronil, con una estadística significativa de $*p=0,02 < 0,05$, dando como resultado que la $Vt-fpc-Fipronil > Vt-fpc-control$. A mayor fpc menor variabilidad en el segmento c-c. Por otra parte, la relación sensibilidad/especificidad permitió determinar los índices de variabilidad de los parámetros cinéticos de la ACC, tales como la fuerza de contracción fc (c/seg^2) y la energía cinética de la contracción ($ecc-K(kg.mm^2/seg^2)$), particularmente $0,8124 \pm 0,0201$, IC 95% de 0,7430 a 0,8518 y $****p < 0,0001$ y de $0,6957 \pm 0,028$, IC 95% de 0,6395 a 0,7510

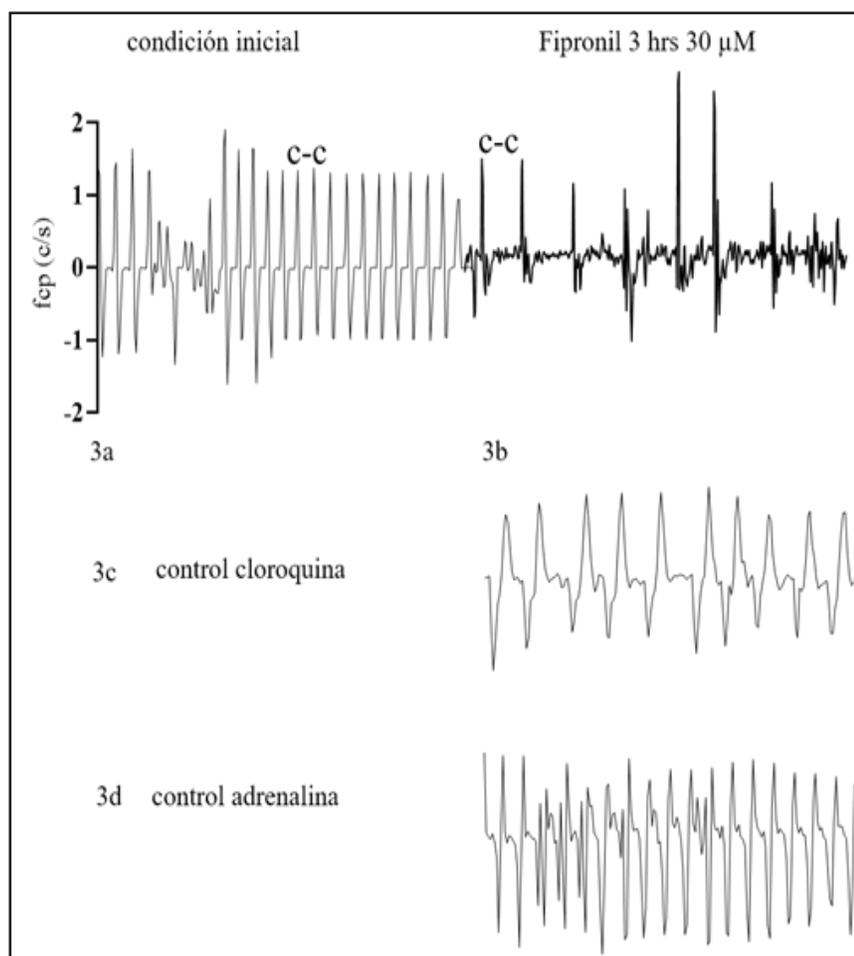


Figura 3. Actividad Cardíaca Contráctil (ACC) de larvas de *Aedes aegypti*. Pretratamiento (3a) y postratamiento con Fipronil CE_{50} luego de 3 horas (3b). Frecuencia promedio de contracción (fpc) expresada en onda contráctil/segundo. Controles cloroquina (3c) y adrenalina (3d). Se destaca el incremento en el intervalo de tiempo de contracción c-c.

y $****p < 0,0001$, respectivamente. Por lo que para el bioensayo de Fipronil se tendrá una probabilidad de 81,24 % en la selección de larvas afectadas en su energía cinética de la fpc así como una probabilidad de 69,57 % en la selección de larvas afectadas en su fuerza de contracción. Dos índices de intoxicación para la señal cardíaca con Fipronil.

FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

Respecto a la actividad mitocondrial, cabe destacar que se pudo observar cambios en la coloración en las larvas control, tratadas y muertas al ser coloreadas

con el Verde Janus, respectivamente (Figura 4). Se logró apreciar que las larvas sobrevivientes e intoxicadas con Fipronil, respondieron emitiendo una coloración rosa, típico del estado de reducción del VJ, que nos indica un aparente daño celular y ausencia de oxígeno. Mientras que, las larvas control y las no sobrevivientes, no presentaron degradación oxidativa del VJ.

Discusión

Los resultados obtenidos junto con el apoyo de estrategias del análisis de imagen han permitido profundizar sobre

la fisiología de la larva del mosquito *Aedes aegypti*, particularmente alrededor de la fisiología de su comportamiento de nado (CN), su actividad cardíaca contráctil (ACC) y su actividad mitocondrial. Adicionalmente, permitieron ilustrar la actividad cardiotóxica del insecticida de amplio espectro, Fipronil, hasta el momento poco reconocida, vinculada muy probablemente con alteración mitocondrial. Respecto a la fisiología del comportamiento de nado (CN), encontramos que nuestros resultados coinciden con los reportados por otros autores para la mayoría de los insecticidas neurotóxicos (Chaton y col., 2001), en donde, la inmovilización larvaria se ha caracterizado como una respuesta subletal dependiente de la concentración y el tiempo. Sin embargo,

nuestra estimación de la CE_{50} del Fipronil, mostró que la inmovilización larvaria se presenta antes de las 24 horas, a diferencia de la inmovilización inducida por el Fipronil en otros modelos de experimentación, tales como los cladóceros, en donde la reducción en la velocidad de nado ha sido expresada después de las 48 horas (Rocha y col., 2015). Resulta evidente que la acción del Fipronil, además de tener un efecto concentración y tiempo dependiente, también varía de acuerdo con la especie. Además de las coincidencias con otros autores, nuestra investigación ha demostrado que la pérdida de actividad motora se encuentra vinculada con la pérdida de la sensibilidad larvaria caracterizada por una pérdida de la hiperquinesis inducida por el estímulo de la UV, sirviendo ello, para establecer un índice

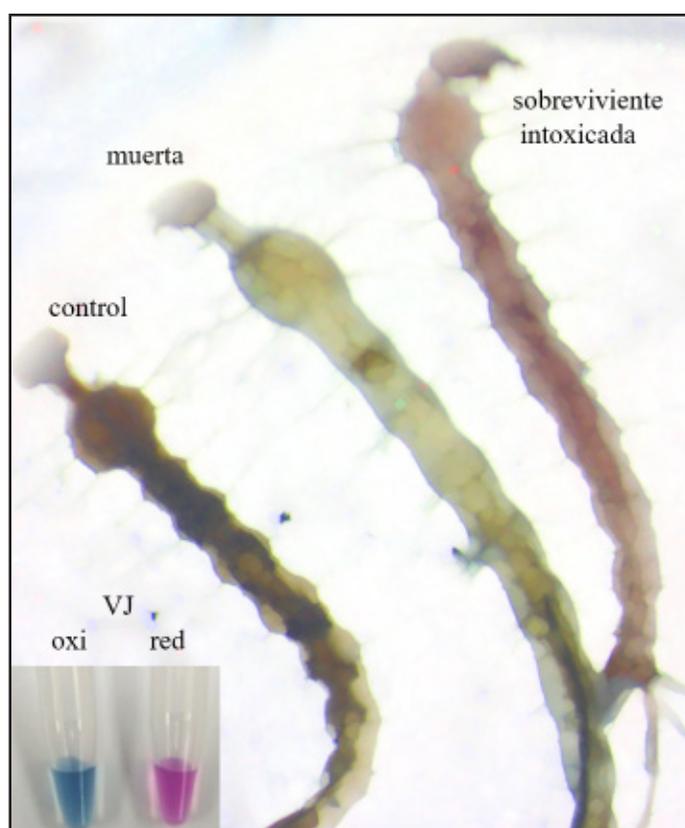


Figura 4. Respuesta larvaria al colorante vital Verde Janus. Las larvas sobrevivientes a Fipronil presenta una coloración rosa, estado reducido del colorante, a diferencia del control y las larvas sin síntomas vitales. Se muestra el estado óxido-reducción del colorante. Tomado de: Ahmad y col., 2018 y modificado para la presente investigación.

de variabilidad del comportamiento de nado (IVCN), un parámetro conductual hasta el momento no considerado. En cuanto a la insensibilidad de las larvas tratadas con Fipronil al estímulo UV, cabe destacar que las rodopsinas constituyen una de las familias de proteínas fotorreceptoras que conforman la retina de los mosquitos y que regulan la información visual subyacente al comportamiento de los mosquitos adultos, incluido el apareamiento, la búsqueda de huéspedes, el descanso y la puesta de huevos. Dentro de estas proteínas se encuentra la rodopsina ultravioleta (UV) Aaop8 que se expresa en las células R7 de la región central y ventral de la retina de la larva del *Aedes aegypti* (Bownik y Szabelak, 2021). Si bien nuestros resultados no contienen evidencias de la presencia de esta proteína en la población larvaria experimentada, resulta evidente la pérdida de sensibilidad debido a la UV en aquellas larvas tratadas con Fipronil. Dicho resultado, ha permitido establecer un vínculo causa-efecto que abre la posibilidad de generar nuevas investigaciones para su certificación. En tal sentido, el análisis de imagen ha permitido hacer uso de patrones vectoriales vinculados con el movimiento circular larvario tales como: velocidad angular (ω) y aceleración angular (α), para interpretar el movimiento de nado y así obtener posibles indicadores de la variabilidad del comportamiento como el IVCN, surgido desde la cuantificación de estas dimensiones angulares. Respecto a la fisiología cardiaca de las larvas del *Aedes aegypti* bajo el efecto del Fipronil, encontramos igualmente respuestas comunes como la reducción de la ACC, como se ha expresado en otros modelos de experimentación tratados con Fipronil. Así, en la especie *Daphnia magna*, un

crustáceo planctónico, el Fipronil promueve la reducción de las contracciones cardiacas de una manera tiempo y concentración dependiente. De igual manera, ha sido reportado que este insecticida afecta la actividad cardiaca de las abejas. Recientemente, ha sido reportado que el Fipronil promueve cardiotoxicidad en las larvas de pez cebra, con irregularidad de los latidos del corazón e interrupción de la formación de vasos sanguíneos (Reinwald y col., 2022). Algunos autores han vinculado dichas alteraciones con una inhibición la actividad mitocondrial, resultante del agotamiento de ATP. Sobre la base de los estudios mencionados se podría plantear la hipótesis de que la cardiotoxicidad promovida por el Fipronil, puesta en evidencia en nuestra investigación a través de la variabilidad de ACC, pudiera ser el resultado de disfunciones mitocondriales (Nicodemo y col., 2014). Esta hipótesis está confirmada en nuestra investigación a través del análisis del estado de oxidorreducción mediado por el Verde Janus, indicativo de la disfuncionalidad mitocondrial, que nos sugiere que la actividad cardiotóxica promovida por el Fipronil, podría estar dirigida por su acción sobre la cadena respiratoria. De todo lo anteriormente expuesto se concluye que el modelo larvario del mosquito *Aedes aegypti*, más allá de ser visto como un blanco a ser destruido para el requerido control de las muy peligrosas enfermedades transmisibles, podría también ser visto como un posible modelo invertebrado no convencional para la toxicología experimental, y que, además, se ve fortalecido con herramientas como el análisis de imagen para la caracterización de efectos tóxicos subletales como la cardiotoxicidad promovida por el Fipronil.

Referencias Bibliográficas

- Ahmad F, Alamoudi W, Haque S, Salahuddin M, Alsamman K. 2018. Simple, reliable, and time-efficient colorimetric method for the assessment of mitochondrial function and toxicity. *Bosn J Basic Med Sci* 18(4):367-374.
- Álvarez M, Hernández C, Barrios A. 2021b. Respuesta funcional y morfológica ante la luz UV emitida por larvas de *Aedes aegypti* tratadas bajo condiciones de oxidación avanzada: Un análisis morfométrico. RETEL. Disponible en: URL:<https://www.sertox.com.ar/es/respuesta-funcional-y-morfologica-ante-la-luz-uv-emitida-por-larvas-de-aedes-aegypti-tratadas-bajo-condiciones-de-oxidacion-avanzada-un-analisis-morfometrico/>
- Álvarez M, Hernández C, Morales E, Hernández F, Velásquez V, Zuleta G. 2021a. Respuestas morfofuncionales de larvas de mosquito *Aedes aegypti* a la Tetrametrina-Real-ZZ®. *Rev Toxicol* 38: 34-38.
- Andereck JW, King JG, Hillyer JF. 2010. Contraction of the ventral abdomen potentiates extracardiac retrograde hemolymph propulsion in the mosquito hemocoel. *PLoS One* 5(9): e12943.
- Bownik A, Szabelak A. 2021. Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(25):33254-64.
- Brown D. 2007. Combining computational physics with video analysis in TrackerR. <https://physlets.org/tracker/trackerJS/>.
- Chaton PF, Ravanel P, Meyran JC, Tissut M. 2001. The Toxicological Effects and Bioaccumulation of Fipronil in Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti* in Aqueous Medium. *Pesticide Biochem Physiol* 69: 183-188.
- Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Woods IG. 2015. Video Hacking: Automated tracking and quantification of locomotor behavior with open-source software and off-the-shelf video equipment. *J Undergrad Neurosci Educ* 13(3): A120-A125.
- Devillers J, Lagneau C, Lattes A, Garrigues JC, Clémenté MM, Yébakima A. 2014. In silico models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. *SAR QSAR Environ Res* 25(10):805-835.
- Dulcis D, Davis NT, Hildebrand JG. 2001. Neuronal control of heart reversal in the hawkmoth *Manduca sexta*. *J Comp Physiol A* 187(10):837-49.
- Ejaz A, Lange AB. 2008. Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extrudentatum*. *Peptides* 29(2):214-25.
- Glenn JD, King JG, Hillyer JF. 2010. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol* 213:541-550.
- Kasai Y, Cagan R. 2010. *Drosophila* as a tool for personalized medicine: a primer. *Per Med* 7(6):621 – 632.
- League GP, Onuh OC, Hillyer JF. 2015. Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 218(3):370-380.
- Leódido ACM, Ramalho-Ortigão M, Martins GF. 2013. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Struct Dev* 42(6):539-550.
- MyEKG. 2022. La web del Electrocardiogram. <https://www.my-ekg.com/formulas-calculos-ekg/calculadora-intervalo-rr>.
- Neckameyer W, Woodrome S, Holt B, Mayer A. 2000. Dopamine y senescence in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Aging* 21: 145-152.
- Neckameyer WS, Argue KJ. 2013. Comparative approaches to the study of physiology: *Drosophila* as a physiological tool. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304 (3): R177-R188.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B,C, Loftus B, Xi Z, et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316(5832):1718-1723.
- Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC, Guelfi M, Balieira KV, De Jong D, Mingatto FE. 2014. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ Toxicol Chem* 33 (9):2070-2075.
- Reinwald H, Alvincz J, Salinas G, Schäfers C, Hollert H, Eilebrecht S. 2022. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere* 291(Pt 1):132746.
- Rocha M, Kimler KJ, Leming MT, Hu X, Whaley MA, O'Tousa JE. 2015. Expression and light-triggered movement of rhodopsins in the larval visual system of mosquitoes. *J Exp Biol* 218(Pt 9):1386-1392.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ,

Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nature Methods* (7): 676–682.

Souders li CL, Rushin A, Sanchez CL, Toth D, Adamovsky O, Martyniuk CJ. 2021. Disease network data for the pesticide fipronil in rat dopamine cells. *Data Brief* 38:107299.



Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en células Vero sometidas a alta glucosa

Protective effect of the root of *Ruellia tuberosa* L. on antioxidant enzymes activity in Vero cells subjected to high glucose

CARLOS CIANGHEROTTI^{1*}, GIOVANNINA ORSINI^{2**}, MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^{3***}, MARÍA RODRÍGUEZ⁴, JAIRO BERMÚDEZ⁴, ANITA ISRAEL^{1****}

Resumen

El estrés oxidativo es el resultado de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el contexto de mecanismos antioxidantes insuficientes. El estrés oxidativo intrarrenal juega un papel fundamental en el inicio y la progresión del daño renal en la diabetes. La evidencia indica que en los riñones, la sobreproducción de EROs es el denominador común que vincula a la alteración de las vías metabólicas con alteración de la hemodinamia renal asociada con la nefropatía diabética. Existen varios mediadores celulares de la nefropatía diabética, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras. En la búsqueda de fármacos capaces de abolir, disminuir o prevenir la nefropatía diabética se han descrito nuevas especies, fitofármacos y productos naturales para el tratamiento no sólo de la diabetes, sino también de sus complicaciones. La *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una de estas plantas de uso etnomédico, cuyas partes aéreas presentan actividad: antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y analgésica. Sin embargo, su raíz ha sido menos estudiada. Nosotros hemos reportado la actividad analgésica, antiinflamatoria, antidiabética, del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) en animales de experimentación. Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares de la acción de la RT, se evaluó su capacidad protectora *in vitro* en células de epitelio renal (Vero) en cultivo, sometidas a altas concentraciones de glucosa. Los resultados muestran que la RT protegió a las células Vero del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, inducido por la alta glucosa, por el peróxido de hidrógeno y por el nitroprusiato de sodio, respectivamente. Igualmente, la RT contrarrestó el decremento de la actividad enzimática de la CAT, SOD total, CuZn-SOD, GPx y GR inducida por la glucosa *in vitro*. Estos resultados establecen a la RT como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, a través de un mecanismo que involucra la disminución del estrés oxidativo y nitrosativo. Estos hallazgos contribuyen a la validación del uso tradicional de la RT, así como a la caracterización farmacológica de su género.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, enzimas antioxidantes, glucotoxicidad

Abstract

Oxidative stress results from the overproduction of reactive oxygen species (ROS) in the context of concomitant insufficient antioxidant pathways. Intrarenal oxidative stress plays a critical role in the initiation and progression of diabetic kidney disease. Evidence indicates that in the kidneys ROS overproduction is the common denominator linking altered metabolic pathways with impaired renal hemodynamics known to be associated with diabetic nephropathy. Various cellular mediators of diabetic nephropathy, reactive oxygen, and nitrogen species, among others, are known. In the search for drugs that are capable of abolishing, reducing, or preventing diabetic nephropathy, new species, phytopharmaceuticals, and natural products have been described for the treatment not only of diabetes but also of its complications. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) is one of these plants for ethnomedical use, whose aerial parts have been extensively studied, finding antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activity. However, its root has been less studied. We have reported the analgesic, anti-inflammatory, and antidiabetic activity of the aqueous extract of the root of *R. tuberosa* (RT) in experimental animals. To get insight into the molecular mechanisms of RT action, its *in vitro* protective capacity was studied in renal epithelial cells (Vero) in culture, subjected to high concentrations of glucose. The results show that RT protected Vero cells from oxidative stress and nitrosative stress induced by high glucose, hydrogen peroxide, and sodium nitroprusside, respectively. Similarly, RT counteracted the decrease in enzymatic activity of CAT, total SOD, CuZn-SOD, GPx, and GR induced by glucose *in vitro*. These findings establish RT as an antioxidant with a protective effect on renal damage in diabetes *in vitro*, through a mechanism that involves the reduction of oxidative and nitrosative stress. These findings contribute to the validation of the RT's traditional use and the pharmacological characterization of its genus.

Keywords: *Ruellia tuberosa* L., oxidative stress, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, antioxidant enzymes, glucotoxicity

1. Unidad de Neuropéptidos, 2. Herbario "Victor Manuel Ovalles", 3. Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia y 4. Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ¹Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com ; astern88@gmail.com

Orcid: [0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)*

Orcid: [0000-0001-8932-9942](https://orcid.org/0000-0001-8932-9942)**

Orcid: [0000-0002-4439-9856](https://orcid.org/0000-0002-4439-9856)***

Orcid: [0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)****

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.11](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.11)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 01/04/2022

Aprobación: 15/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 111-127. 2022

Introducción

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígenos (EROs) ejercen un papel importante en la señalización celular involucrada en la proliferación, diferenciación, apoptosis y defensa inmunitaria en varias líneas celulares, incluidas las células renales (Ozbek, 2012). Sin embargo, en situaciones patológicas, como la diabetes, la sobreproducción de EROs en el riñón está implicada en la inflamación renal, lo que afecta la estructura y función renal y posteriormente conduce al daño renal. La hiperglicemia induce la producción de EROs, estimula el reclutamiento de numerosas células inflamatorias y la producción de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y factores de transcripción implicados en los procesos patológicos de la nefropatía diabética. El estrés oxidativo renal es a menudo la consecuencia de la regulación hacia arriba de la producción de las EROs inducida por enzimas prooxidantes y la depleción concomitante de antioxidantes (Jha y col., 2016). Dentro de estas especies se encuentran: el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el radical hidroxilo (OH \cdot) y el producto de la conjugación del $O_2^{\cdot-}$ con el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito (ONOO $^-$). El $O_2^{\cdot-}$ es el producto de la reducción parcial del O_2 llevado a cabo principalmente en la mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones, en los peroxisomas (ricos en oxidasas) y en la membrana plasmática por la acción de la NAD(P)H oxidasa (Bergendi y col., 1999; Dröge, 2002). Lee y col. (2003) observaron que tanto la inhibición del complejo I mitocondrial por la rotenona, como la inhibición de la NAD(P)H oxidasa por la apocinina, bloqueaban la producción de las EROs inducida por la glucosa en las células mesangiales y la secreción de

fibronectina en las células del epitelio tubular, sugiriendo la participación de los dos sistemas generadores de $O_2^{\cdot-}$ en el daño renal. Más aún, se ha reportado la sobreexpresión de algunas de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa, como la NOX-4 y la p22phox en los riñones de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) (Etoh y col., 2003), así como también en las células mesangiales sometidas a una alta concentración de glucosa *in vitro* (Xia y col., 2006).

Por su parte, el óxido nítrico (ON) es producto de la conversión de la L-arginina a citrulina mediante la acción de la sintasa del óxido nítrico (NOS), de la cual existen varias isoformas: la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS). Adicionalmente, en la mitocondria se encuentra una variante de la nNOS con modificación postraduccional, denominada mNOS (Finocchietto y col., 2009; Stefano y Kream, 2011). El NO también se forma a partir otras fuentes, tal como es el caso de los nitritos citosólicos y mitocondriales a través de la acción de la nitrito reductasas (Stefano y Kream, 2011). Basu y col. (2008), demostraron que el citocromo C mitocondrial es capaz de catalizar la conversión de nitrito en NO, estableciéndose de esta manera una actividad nitrito reductasa de esta proteína clave en la vida y muerte de la célula. Recientemente, se identificó el gen mAtNOS1 que codifica para la proteína 1 asociada al NO (NOA1), una posible nueva sintasa, la cual está ligada a la regulación del NO mitocondrial y es necesaria para la modulación dependiente de O_2 de los complejos de la cadena respiratoria (Zemojtel y col., 2006; Heidler y col., 2011). Sin embargo, aún se desconoce la vinculación de estas nuevas fuentes de NO en la diabetes y en el daño renal en la diabetes.

Las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleídos son oxidados por las EROs, constituyendo así el daño oxidativo de la célula que conlleva la disfunción del tejido (Dröge, 2002). Sin embargo, las células cuentan con sistemas de defensa antioxidante para contrarrestar este daño (Yu, 1994). Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre (CuZn-SOD), la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la hemooxigenasa 1, entre otras (Yu, 1994; Erdmann y col., 2008).

Las SODs catalizan la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y O_2 , mientras que la CAT y la GPx reducen el H_2O_2 a H_2O . En pacientes con nefropatía diabética se ha observado una inhibición de la expresión de algunas de estas enzimas, tales como la CAT y la SOD, favoreciéndose así el desbalance oxidativo celular (Hodgkinson y col., 2003). Asimismo, algunos modelos de animales diabéticos que sobreexpresan la CAT o la SOD, presentan una significativa disminución del daño renal (Craven y col., 2001; DeRubertis y col., 2004; Brezniceanu y col., 2008) y de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en las células renales en cultivo (Craven y col., 2001).

Las altas concentraciones de glucosa incrementan la formación de las EROs, tanto en las células mesangiales como en las del epitelio tubular (Ha y col., 2002 a,b). Este aumento del estrés oxidativo está asociado a la glucosa intracelular, ya que el pretratamiento con citocalacina B (un inhibidor del GLUT-1) bloquea la producción de las EROs en las células mesangiales (Ha y col., 2002a). Estas moléculas estimulan diversas cascadas de señalización dentro de las células renales, siendo consideradas

la proteína quinasa C (PKC), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la janus kinasa (JAK), como las principales mediadoras de los efectos de las EROs en relación con la nefropatía diabética (Lee y col., 2003; Marrero y col., 2006). La activación de estas vías de señalización estimula la expresión de algunas proteínas profibróticas por la acción de factores de transcripción, tales como: el NF- κ B, la AP-1 y la Sp-1 (Lee y col., 2003). De esta manera las EROs aumentan la expresión del TGF- β , del PAI-1 (el cuál disminuye la degradación de la matriz extracelular), de la fibronectina y del colágeno IV (Ha y col., 2001; Lee y col., 2003; Ha y Lee, 2003; Lui y Desai, 2005; Xia y col., 2006); trayendo como consecuencia la inducción de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), la glomerulosclerosis y la proteinuria (Craven y col., 1997; Ha y Lee; 2003; Shah y col., 2007).

La hiperglicemia puede generar EROs en las células renales de manera indirecta a través de los productos de glicosilación avanzada (AGEs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la angiotensina II (ANG II) (Leehey y col., 2000; Scivitaro y col., 2000; Lee y col., 2003). Esta última, induce la producción de las EROs tanto en las células mesangiales como en las del epitelio tubular (Jaimés y col., 1998; Ha y col., 2002).

Los niveles de ambas especies, las EROs y las ERNs, dependen de la relación de producción inicial de O_2^- y de NO (NO/O_2^-). Razones de NO/O_2^- mayores que 10 traen como consecuencia nitrosación de proteínas lo que lleva a la entrada de la célula a un estado de reposo, siendo la ERN predominante el NO^+ . Razones alrededor de 1 conducen a una máxima activación celular, en donde se produce activación de las proteasas, la oxidación de los dedos de

zinc "zinc fingers" y alteración de la función de varias proteínas, por nitración de éstas, todo esto mediado por la acción de la especie predominante bajo esas condiciones, el ONOO. Finalmente, relaciones menores o iguales a 0,5 promueven la oxidación y carbonilación de proteínas, la oxidación de ácidos nucleicos y la oxidación de lípidos, estableciéndose la condición de estrés oxidativo que conduce a la muerte celular. Este último nivel es mediado predominantemente por el NO_2^- y el OH. (Wink y Mitchel, 1998; Quijano y col., 2005; Frein y col., 2005; Ullrich y Kissner, 2006; Pacher y col., 2007; Leon y col., 2008; Poderoso, 2009; Zielonka y col., 2010).

La capacidad antioxidante de una planta y su actividad antidiabética se encuentran íntimamente relacionadas (Rahimi y col., 2005). Especies que poseen constituyentes antioxidantes, tales como, la mangiferina (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge, *Mangifera indica* L.), el galato de epigallocatequina (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), la swertiamarina y la swertisina (*Enicostemma hyssopifolium* (Willd.) I. Verd.), la epicatequina (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) o la apigenina (*Teucrium polium* L.), a su vez, ejercen un efecto insulino mimético, atribuido a la presencia de estos compuestos (Patel y Mishra, 2011; Patel y col., 2012b).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011; Kensa y col., 2012 a y b) que se encuentra en Venezuela es *Ruellia tuberosa* L., conocida como escopetera, escopetilla o yuquilla, la cual pertenece a la familia Acanthaceae. Al igual que en otras partes del mundo, en nuestro país esta especie es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes (Ciangherotti y col., 2013; Chothani y col., 2010), así como

también para el manejo de las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Gil y col., 2003; Giraldo y col., 2009).

Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera han revelado un potencial efecto atrapador de EROs y de especies reactivas de nitrógeno (ERNs), tales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el NO, principalmente los extractos orgánicos (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012a,b). Igualmente, las partes aéreas de la *R. tuberosa* L. han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Doss, 2010, 2013; Chothani y col., 2010; Shahwara 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. La evaluación farmacológica del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) ha permitido validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, 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). Actualmente se conoce que el extracto acuoso de la raíz *R. tuberosa* L. ha mostrado actividad antidiabética y potente actividad antioxidante (Pastorello y col., 2012), actividad hipoglicémica y antihiperlipidémica (Ciangherotti y col., 2016), y ha sido capaz de disminuir el daño oxidativo pancreático inducido por la diabetes mediante una disminución en el daño celular en la isletas de Langerhans (Asadullah y col., 2018), lo que apoya la posibilidad que los extractos de esta planta produzcan un importante

efecto protector del daño renal inducido por la glucosa, en parte por contrarrestar uno de sus mayores mediadores, el estrés oxidativo. De hecho, su extracto acuoso ya ha sido reportado como protector gástrico frente a un estímulo oxidativo como lo es el etanol (Afzal y col., 2015).

Con el fin comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan contribuir a la protección de RT frente a las complicaciones de la diabetes, se estudió la relación de la actividad protectora del extracto acuoso de la raíz de la RT con su potencial modulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógenos en un ambiente de glucosa normal o alta *in vitro*. Para ello, se evaluó la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en ambiente de alta glucosa (HG) y en presencia de peróxido de oxígeno, L-NAME y de nitroprusiato de sodio en células renales (Vero). Igualmente se evaluó la capacidad de RT de contrarrestar el decremento de la actividad enzimática de la CAT, SOD total, CuZn-SOD, GPx y GR inducida por la glucosa *in vitro* en células Vero. Estos hallazgos pretenden consolidar los conocimientos acerca del potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía; y contribuir 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.

Materiales y Métodos

LÍNEAS CELULARES

Las células Vero, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fueron adquiridas

en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

CULTIVO CELULAR

Para los experimentos *in vitro* fueron empleadas las células Vero en cultivo. Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa (Kannan y Jain, 1994). Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM, 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2200 rpm. El sedimento se trató con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar los ensayos correspondientes. Además del tratamiento con el RT, las células se trataron con los protocolos descritos en la Tabla I.

Tabla I.

Protocolo de tratamientos para los experimentos *in vitro*

Citotoxicidad y enzimas antioxidantes

NG, control con glucosa normal (8 mM).

HG, alta glucosa (35 mM)

RT (concentraciones crecientes)

HG + RT

L-NAME, H₂O₂ o nitroprusiato de sodio

HG + L-NAME, H₂O₂, o nitroprusiato de sodio

HG + RT + L-NAME, H₂O₂ o nitroprusiato de sodio

Para ello, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ a 37°C), bajo un

ambiente de 8 mM de glucosa durante 24 horas. El medio se removió y se reemplazó por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles, 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa, 35 mM de glucosa; pozos RT (concentraciones crecientes) y pozos alta glucosa + RT. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ a 37°C) durante 96 horas, reemplazando con medio nuevo sobre el mismo esquema cada 24 horas. Al término de este tiempo el medio fue nuevamente reemplazado, pero solo con medio completo. Se preparó una solución de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (2,5 mg/mL) y se añadió 100 µL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3h (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa fue disuelta con la incorporación de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color del MTT-formazan formado y luego se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro de placa (BioRad, modelo Berchmark). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE EPITELIO RENAL BAJO UN AMBIENTE CON ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Se incubaron 2 millones de células en una placa de cultivo de 150 cm² con medio completo (5% CO₂ a 37°C) durante 120 horas (el medio se cambió cada 24 horas), utilizando el mismo protocolo de tratamientos del ensayo de glucotoxicidad. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina al 10% en EDTA a 37°C por 5 minutos, una vez tripsinizadas, las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron

en un volumen final de 500 µL para realizar los ensayos de las enzimas antioxidantes.

ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) por los O₂⁻ 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 49 mM. Se colocaron 2,45 mL de la mezcla en tubos y se mantuvieron a 27 °C. Se adicionaron 500 µL de muestra, diluida 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 nM (pH 7) e inmediatamente después, la reacción comenzó con la adición de 50 µL de xantina oxidasa (8,4 unidades). 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.

Para determinar la actividad de las isoformas de la SOD, en paralelo se utilizó el N,N-dietilisotiocianato de sodio, un inhibidor de la isoforma CuZn-SOD, por lo tanto se cuantificó directamente la isoforma Mn-SOD e indirectamente, la CuZn-SOD.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)

Se basa en la disminución de la absorbancia del H₂O₂ debido a su degradación por la

catalasa presente en la muestra de acuerdo con el método de Aebi (1982).

En una celda de cuarzo se colocaron 25 μL de la muestra diluida 1,33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), se adicionó 725 μL de H_2O_2 7,7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos. De acuerdo con Aebi, se utilizó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual quedó definida de acuerdo con la siguiente fórmula: $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A1 y A2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (Lawrence y Burk, 1976) y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. La GPx, al reducir los hidroperóxidos consume glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado, proceso que consume NAD(P)H. Para la determinación de GPx, la muestra se diluyó con amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0) en una proporción de 1:8. Luego a 100 μL de esta dilución se le adicionaron 800 μL de una mezcla de reacción que contenía: EDTA 1 mM, azida de sodio 1 nM, NAD(P)H 0,2 nM, GSH 1 mM y 1U de GR/mL en amortiguador de fosfatos. De la misma manera, se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100 μL de amortiguador de fosfatos. Los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y su contenido se traspasó a una

celda de cuarzo que contenía 100 μL de H_2O_2 0,25 mM y la absorbancia se midió inmediatamente a 340 nm, cada minuto, durante 3 minutos. La actividad de la GPx se calculó promediando los cambios de la absorbancia por minuto de la muestra menos el promedio de los cambios de la absorbancia por minuto del inespecífico y se multiplicó este valor por 12,8, factor que se obtuvo del coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H (6,22) y el factor de dilución (8). Los datos se expresaron como U/mL. Entonces, por definición, una unidad de GPx es la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NAD(P)H por minuto.

ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

Se siguió el método de Carlberg y Mannervik (1975), en el cual se mide la desaparición de NAD(P)H a 340 nm de una mezcla de reacción que contiene: EDTA 0,5 mM; GSSG 1,25 mM y NAD(P)H 0,1 mM en amortiguador de fosfatos 0,1 M (pH 7,6). Se colocó en un tubo, 950 μL de la mezcla de reacción y 50 μL de la muestra (diluida 1:5) en amortiguador de fosfatos, los tubos se agitaron e inmediatamente se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto por 3 minutos. La actividad de la GR se determinó promediando los cambios de absorbancia por minuto de la muestra y multiplicando este valor por 0,16 (el inverso del coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H = 6,22). Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NAD(P)H por minuto.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas totales se determinaron en las células en cultivo. Para ello se

utilizó el método de Lowry (1951), que se fundamenta en la reacción de las proteínas con cobre y el reactivo de Folin-Ciocalteu, formándose un complejo coloreado el cual absorbe energía electromagnética a 660 nm. Se preparó una mezcla de reacción de los siguientes reactivos: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 M; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% y tartrato sódico-potásico al 2%, en relación 100:1:1. En un tubo se agregó 190 μL de agua destilada, 10 μL de la muestra (células cultivadas) y se agitó suavemente. Luego se añadió 2 mL de la mezcla de reacción, se agitó y se mantuvo en oscuridad por 10 minutos. Una vez culminado el tiempo, se agregaron 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en agua destilada, preparado en el momento), se esperaron 30 minutos para la formación del color y se leyó a 660 nm en un espectrofotómetro. Las absorbancias de las muestras se interpolaron en una curva estándar de albúmina (0-100 μg). Los resultados se expresaron como mg de proteína.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm \text{E.E.M.}$). 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. Valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

Efecto del estrés oxidativo sobre la respuesta protectora del RT frente a la citotoxicidad inducida por glucosa.

En la Figura 1 se observa la modulación del inductor del estrés oxidativo, el H_2O_2 , sobre el efecto protector del RT sobre la disminución de la viabilidad celular bajo condiciones de HG. El tratamiento con H_2O_2 en condiciones de glucosa normal produce un efecto citotóxico, el cual es revertido parcialmente por el cotratamiento con el RT, mostrando un importante efecto protector en otro modelo de estrés oxidativo adicional al del ambiente HG. En este último, el H_2O_2 mostró ser mucho más citotóxico y revirtió completamente el efecto protector del RT, llegando a ser más citotóxico que la alta concentración de glucosa sola ($p < 0,01$). El tratamiento con RT revirtió parcialmente el efecto citotóxico inducido por HG+ H_2O_2 ($p < 0,01$).

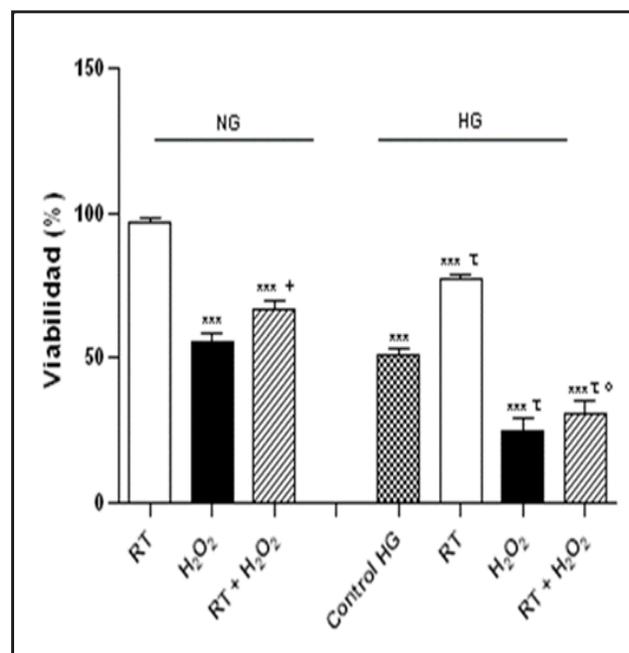


Figura 1. Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 100 μM) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. + $p < 0,01$ con respecto al grupo H_2O_2 . † $p < 0,001$ con respecto al control HG. †† $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NOS POR EL L-NAME SOBRE LA RESPUESTA PROTECTORA DEL RT SOBRE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR GLUCOSA

Mediante el uso del ensayo de la glucotoxicidad con MTT se evaluó el papel del NO sobre la respuesta protectora del RT sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa. Como se observa en la Figura 2, en células Vero en cultivo en condiciones de glucosa normal, el bloqueo de la sintasa de óxido nítrico (NOS) con el L-NAME (1mg/mL) conduce a un aumento de la viabilidad celular comparado con su propio valor basal. De manera similar, en condiciones de alta concentración de glucosa, el tratamiento con el L-NAME produjo, por sí mismo, un efecto protector frente a la muerte celular inducida por HG y adicionalmente incrementó el efecto protector del RT ($p < 0,001$).

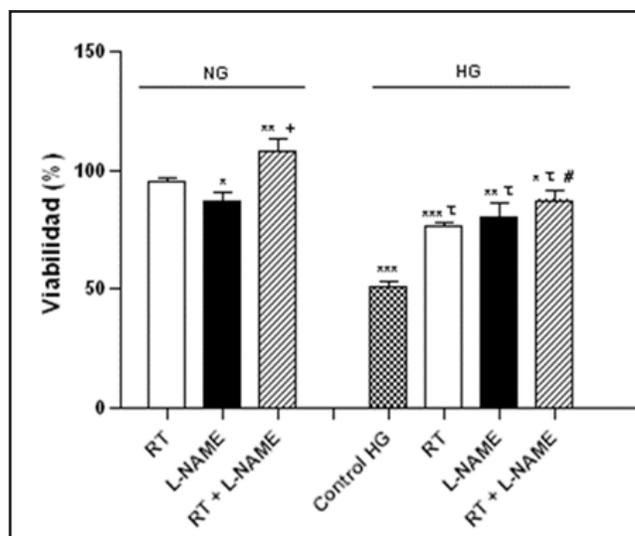


Figura 2. Efecto de la inhibición de la NOS por el L-NAME (1mg/mL) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. † $p < 0,001$ con respecto al control HG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

En la Figura 3 se puede observar que la combinación del RT con el NPS, un donador de NO, por un lado, no modifica la viabilidad basal del RT y por el otro disminuye el efecto protector del RT frente al HG, es decir la producción del NO en todos los casos disminuye los efectos del RT. Adicionalmente, el tratamiento con el RT fue capaz de inhibir el moderado efecto citotóxico del NPS sobre las células Vero ($p < 0,01$), sugiriendo un papel contraregulador al daño celular inducido por el estrés nitrosativo.

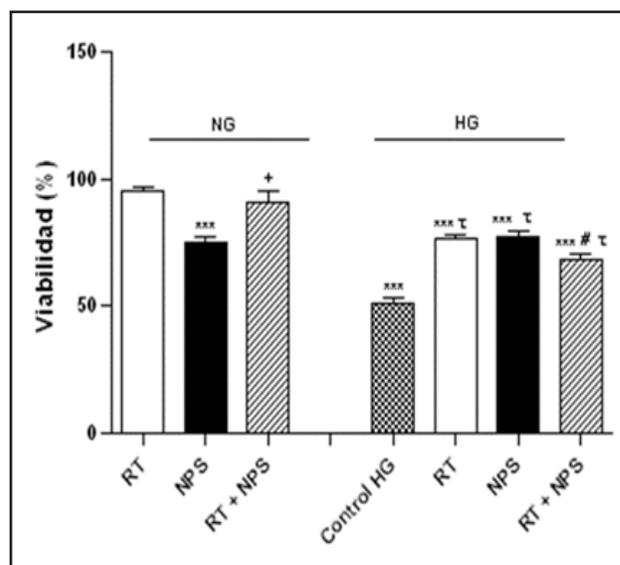


Figura 3. Efecto del nitroprusiato de sodio (NPS, 100 μ M) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. + $p < 0,01$ con respecto al grupo NPS. † $p < 0,001$ con respecto al control HG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

EFECTO DEL RT SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La condición de alta concentración de glucosa *in vitro* disminuyó la actividad de todas las enzimas antioxidantes evaluadas (Figuras 4 a 7). El tratamiento *in vitro* con

RT incrementó significativamente (Figura 4, $p < 0,05$) la actividad basal de la CAT, y revirtió parcial o completamente los efectos inhibitorios del HG por el tratamiento con el RT sobre la CAT, GPx, GR y SOD total, respectivamente (Figuras 4 a 7). Estos efectos se relacionan con la actividad protectora frente al daño oxidativo y nitrosativo.

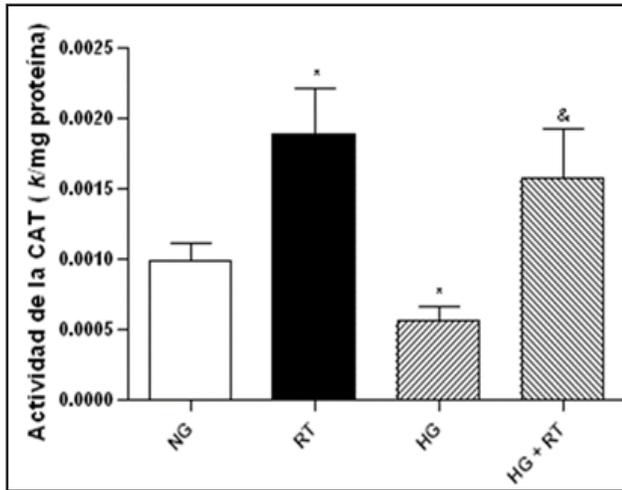


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la catalasa (CAT) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5

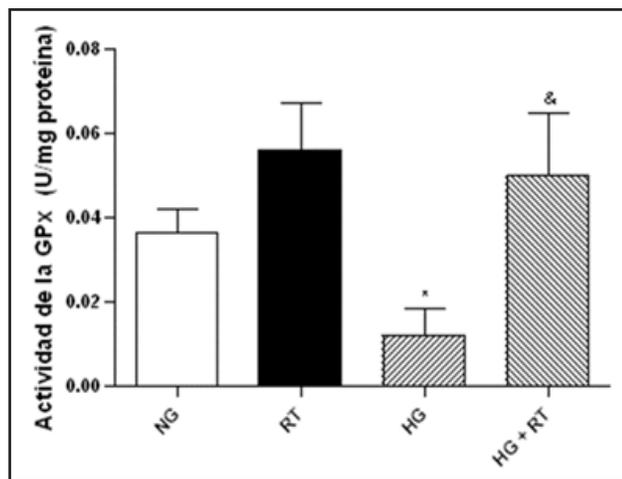


Figura 5. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad del glutatión peroxidasa (GPx) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5

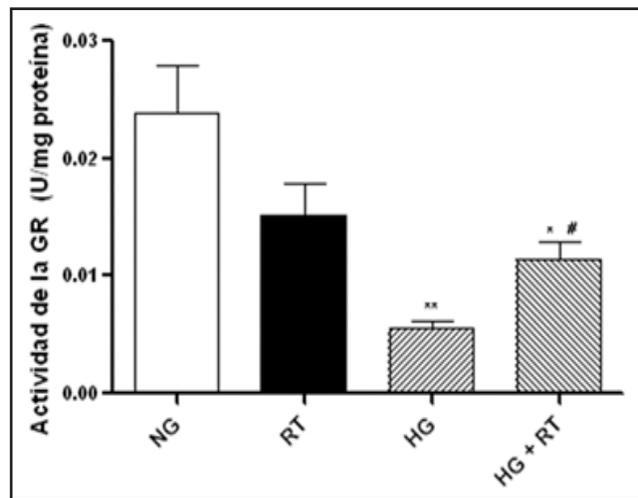


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo HG. N=5

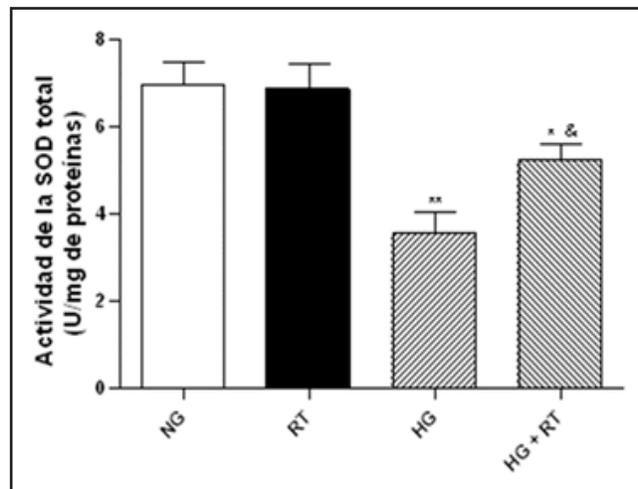


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo HG. N=5

Discusión

La diabetes es una enfermedad metabólica responsable del metabolismo anómalo de los hidratos de carbono, caracterizada por hiperglicemia resultante

de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas (American Diabetes Association, 2007a,b; World Health Organization, WHO, 2011). La diabetes está asociada a lesiones, disfunción e insuficiencia de órganos vitales, especialmente de los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. Los pacientes con diabetes padecen una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, arterioscleróticas, vasculares periféricas, cerebrales y renales. La nefropatía diabética es una de las complicaciones vasculares más importantes y la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes tipo 2 (Thomas y Karalliedd, 2018).

Uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal inducido por la hiperglicemia es la formación de EROs (Brownlee, 2001; Sen y Packer, 1996). Recientes estudios sugieren que la hiperglicemia induce estrés oxidativo y disminuye los mecanismos de defensa antioxidante (Nishikawa y col., 2000). Estas especies reactivas inician la modificación de lípidos, proteínas, carbohidratos y del ADN. Las modificaciones de estas moléculas afectan su función, distribución y metabolismo. Las EROs pueden iniciar entonces una cascada de señalización que induce daño celular y disfunción vascular. Así, la acción de las EROs representa un fenómeno crucial involucrado en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad microvascular.

Además de las EROs, la hiperglicemia conduce al daño renal a través de varios mediadores importantes, tales como: los AGEs, la ANG-II y las ERNs (Hannken y col., 2000; Tsiani y col., 2002; Gorin y col., 2004; Kanwar y col., 2005). Estos mediadores a su vez están íntimamente relacionados

a la activación de la vía de señalización diacilglicerol/proteína quinasa C/quinasas reguladas por señales extracelulares/factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de células B activadas (DAG/PKC/MAPK/NF- κ B) en condiciones de alta concentración de glucosa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Ohshiro y col., 2006). A través de estas señales, conjuntamente orquestadas con otras rutas metabólicas, tales como: las de los polioles, las hexosaminas y el mio-inositol, ocurren los cambios nucleares que favorecen la expresión de factores profibróticos, pro-inflamatorios y, en algunos casos, pro-apoptóticos que conducen al daño tubular, al ensanchamiento del mesangio, a la fibrosis glomerular y a la proteinuria, entre otros (Steffes y col., 1984; Dalla-Vestra y col., 2001; Liu, 2004; Simonson, 2007).

Se ha sugerido que los antioxidantes podrían prevenir las complicaciones de la diabetes. Al respecto, en la farmacología de *Ruellia tuberosa* L. se le ha atribuido actividad antioxidante, específicamente se ha demostrado la presencia de una marcada actividad antioxidante en los extractos de las partes aéreas de la planta con una CI_{50} de $51,0 \pm 3,22 \mu\text{g/mL}$ (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012a,b).

Uno de los mecanismos mediante el cual el RT podría ejercer su efecto renoprotector y antioxidante es a través de su acción sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que el RT previno la reducción de la actividad de estas enzimas antioxidantes inducidas por la glucosa *in vitro*, lo que contribuye a la disminución del estrés oxidativo por esta vía. Estos resultados coinciden y avalan los reportados por Ciangherotti

y col. (2013), quienes demostraron que, en un modelo experimental de diabetes inducido por la ETZ, la RT mostró actividad antioxidante y 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*. Estos resultados coinciden con los reportados por Safitri y col. (2019) quienes demostraron la capacidad antidiabética del extracto de la raíz de *R. tuberosa* L. en ratas diabéticas, reflejado en una disminución en los niveles altos de glucosa en sangre, una disminución en las actividades de la proteasa, la reparación en los perfiles de proteínas y recuperación en los perfiles histopatológicos del riñón.

Se ha sugerido que esta actividad protectora esta mediada por compuestos polifenólicos presentes en el extracto de *Ruellia tuberosa*, que posiblemente este vinculado a su actividad antioxidante, hipoglicemiante y antihiperglicemiante (Ciangherotti y col., 2016), tal y como se reporta para otros extractos ricos en polifenoles, como el de *Ichnocarpus frutescens* y el de *Hibiscus sabdariffa* L. (Kumarappan y col., 2008; Lee y col., 2009) o algunos compuestos polifenólicos como el resveratrol y la mangiferina (Li y col., 2010; Schmatz y col., 2012).

El incremento del H_2O_2 ha sido asociado al daño renal en la diabetes en modelos experimentales *in vitro* donde esta especie reactiva induce apoptosis en varios tipos de células renales, tales como los fibroblastos, las células mesangiales y el epitelio tubular (Zanatta y col., 2003; Sommer y Wolf, 2007; Zhuang y col., 2007; Hasegawa y col., 2008; Kim y col., 2009; Wijesinghe y col., 2011). Zhuang y col. (2007) y Kim y col. (2009)

demostraron que el H_2O_2 induce apoptosis a través de un incremento de las EROs, de la fosforilación de las ERKs y de la activación de la caspasa 3, en células de epitelio tubular y mesangiales, respectivamente. Asimismo, en células Vero este inductor de estrés oxidativo produjo una disminución de la viabilidad celular, aumento de la fragmentación del ADN e incremento de la apoptosis (Zanatta y col., 2003; Sommer y Wolf, 2007; Wijesinghe y col., 2011). Todos estos hallazgos apoyan nuestro modelo experimental en células Vero, el cual fue susceptible a una significativa disminución de la viabilidad celular inducida por el H_2O_2 . Este efecto fue parcialmente inhibido por el co-tratamiento con el RT, consolidando aún más a este extracto como antioxidante y protector del daño oxidativo renal.

Esta actividad protectora frente al daño inducido por el H_2O_2 puede explicarse de dos maneras: 1) que el incremento basal de la actividad de la CAT inducida por el RT, aumente la degradación del H_2O_2 ; 2) el RT a través de su actividad atrapadora de $O_2^{\cdot-}$, contribuya al aumento de la actividad de la CAT por disminución de su inhibición por el $O_2^{\cdot-}$, de manera que se degrade más H_2O_2 ; y 3) que alguno de los componentes químicos del RT presente actividad atrapadora del H_2O_2 , tal como ha sido demostrado con las partes aéreas de la planta (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012). Como era de esperarse, en condiciones de glucotoxicidad, el tratamiento con el H_2O_2 aumentó el efecto citotóxico de la HG, muy probablemente por el incremento exacerbado del estrés oxidativo. Lo cual se refleja en la abolición y reversión de la acción del RT sobre el daño glucotóxico.

Todos estos hallazgos establecen al RT como un extracto antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la

diabetes, tanto *in vitro* (presente estudio) como *in vivo* (Ciangherotti y col., 2013, 2021), a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, del estrés nitrosativo, y de la vía de señalización de la PKC-NF-kB (Ciangherotti y col., 2018). Esto sumado al mecanismo mediado a través de la inhibición del aumento de la fosforilación de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK), conocidos mediadores del daño renal en la diabetes, y 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, del peso del riñón, y del contenido de proteínas y de colágeno I renal, en la diabetes inducida por ETZ (Ciangherotti y col., 2021).

Los resultados del presente estudio aportan información acerca de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., a la vez que contribuye tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género. Hasta la fecha sólo se conocía el efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA), la actividad contráctil sobre la musculatura lisa del íleo de cobayo, la actividad colinérgica y la actividad estrogénica de *Ruellia praetermissa*. Scinf.ex. Lindau (Salah y col., 2000; Salah y col., 2001; Salah y col., 2002). Este conocimiento etnofarmacológico del género, sienta las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

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.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Aebi H. 1982. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie pp. 273-86.
- Afzal K, Uzair M, Ahmad Chaudhary B, Ahmad A, Afzal S, Saadullah M. 2015. Genus *Ruellia*: Pharmacological and Phytochemical Importance in Ethnopharmacology. *Acta Poloniae Pharm Drug Res* 72(5):821-827.
- American Diabetes Association. 2007a. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 30(Suppl1):S4-S41.
- American Diabetes Association. 2007b. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30:S42-S47.
- 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 M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using *in vitro* model. *J Pharmacy Res* 4(12):4344-4347.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J* 3(22):29-34.
- Asadullah M, Aulanni'am A, Srihardyastutie A. 2018. Effects of *Ruellia tuberosa* L. Root extracts on the pancreatics of diabetic rat. *J Pure App Chem Res* 7(2):116-121.
- Ashraful A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. *Pharmaceutic Biol* 47(3):209-214.
- Basu S, Azarova NA, Font MD, King SB, Hogg N, Gladwin MT, Shiva S, Kim-Shapiro DB. 2008. Nitrite reductase activity of cytochrome c. *J Biol Chem* 283:32590-7.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology, and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874.

- Brezniceanu M, Liu F, Wei C, Chénier I, Godin N, Zhang S, Filep JG, Ingelfinger J, Chan J. 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 57:451-459.
- Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46:223-234.
- Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-5480.
- Chen J, Giridhar KV, Zhang L, Xu S, Wang QJ. 2011. A protein kinase C/protein kinase D pathway protects LNCaP prostate cancer cells from phorbol ester-induced apoptosis by promoting ERK1/2 and NF- κ B activities. *Carcinogenesis* 32(8):1198-206.
- 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 Vene Farmacol Terap* 32(4): 57-66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicémica aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas normales y con diabetes experimental. *Rev Fac Farm* 79 (1 y 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- κ B en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2): 99-116.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Perdomo L, Álvarez M, Orsini G, Israel A. 2021. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la activación de las ERK1/2 renal en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina. *Rev Fac Farm* 84 (1 y 2): 96-114.
- Craven P, DeRubertis F, Kagan V, Melhem M, Studer R. 1997. Effect of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF- α and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 8:1405-1411.
- Craven P, Phillips S, Melhem M, Liachenko J, DeRubertis F. 2001. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. *Metabolism* 50:1043-1048.
- Dalla Vestra M, Saller A, Mauer M, Fioretto P. 2001. Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 14: S51-S57.
- DeRubertis F, Craven P, Melhem M, Salah E. 2004. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes* 53:762-768.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95.
- Erdmann K, Cheung B, Immenschuh S, Schröder H. 2008. Heme oxygenase-1 is a novel target and antioxidant mediator of S-adenosylmethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 368:937-41.
- Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. 2003. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 46:1428-1437.
- Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, González AS, Converso DP, Antico Arciuch VG, Serra MP, Poderoso JJ, Carreras MC. 2009. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med (Maywood)* 234:1020-8.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V. 2005. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol* 70:811-23.
- 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.
- Gorin Y, Ricono J, Wagner B, Kim N, Bhandari B, Abboud H. 2004. Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 381:231-239.
- HA H, Lee H. 2003. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 14: S246-S249.
- Ha H, Seo J, Lee E, Kim Y, Lee H. 2001. Reactive oxygen species mediate upregulation of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by mesangial cells cultured under high glucose. *J Am Soc Nephrol* 12:836A.

- Ha H, Yang Y, Lee H. 2002. Mechanisms of reactive oxygen species generation in LLC-PK1 cells cultured under high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13:531A.
- Ha H, Yu M, Choi Y, Kitamura M, Lee H. 2002. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 13:894-902.
- Haneda M, Koya D, Kikkawa R. 2001. Mesangial cell dysfunction as pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 134:16-29.
- Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl R, Wolf G. 2000. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27Kip1: Role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 11:1387-1397.
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Washida N, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. 2008. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1):51-6.
- Heidler J, Al-Furoukh N, Kukat C, Salwig I, Ingelmann ME, Seibel P, Krüger M, Holtz J, Wittig I, Braun T, Szibor M. 2011. Nitric oxide-associated protein 1 (NOA1) is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes. *J Biol Chem* 286:32086-93.
- Hodgkinson A, Bartlett T, Oates P, Millward B, Demaine A. 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 52:846-51.
- Iglesias M, Ziyadeh F, Isono M, Kouahou M, Kalluri R, Mundel P, Chen S. 2002. Effect of high glucose and TGF- β on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 62:901-913.
- Jaimes E, Galceran J, Raji L. 1998. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 54:775-784.
- Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 25(12):657-684.
- Kannan K, Jain SK. 1994. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 26(7):322-5.
- 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 Archives* 12(1): 69-74.
- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* l. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives* 12(1): 125-128.
- Kim OS, Kim YS, Jang DS, Yoo NH, Kim JS. 2009. Cytoprotection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured mouse mesangial cells by erigeroflavanone, a novel compound from the flowers of *Erigeron annuus*. *Chem Biol Interact* 180(3):414-20.
- Kumarappan CT, Mandal SC. 2008. Polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens* attenuates diabetic complications in streptozotocin-treated diabetic rats. *Ren Fail* 30(3):307-22.
- Lawrence R, Burk R. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.
- Lee H, Yu M, Yang Y, Jiang Z, Ha H. 2003. Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: S241-S245.
- Lee WC, Wang CJ, Chen YH, Hsu JD, Cheng SY, Chen HC, Lee HJ. 2009. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food Chem* 57(6):2206-10.
- Leehey D, Singh A, Alavi N, Singh R. 2000. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 58: S93-S98.
- Leon L, Jeannin JF, Bettaieb A. 2008. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* 19:77-83.
- Li X, Cui X, Sun X, Li X, Zhu Q, Li W. 2010. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 24(6):893-9.
- Li X, Pabla N, Wei Q, Dong G, Messing RO, Wang CY, Dong Z. 2010. PKC- δ Promotes Renal Tubular Cell Apoptosis Associated with Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 21(7): 1115-1124.
- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P. 2004. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci* 75(21):2505-13.
- Liu RM Leena P, Desai LP. 2015. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse

- cycle for fibrosis. *Redox Biol* 6: 565-577.
- 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.
- Manikandan A, Doss VA. 2010. 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, Doss VA. 2013. Effect of 50% hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on Lipid Profile in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Int J Prev Med* 4(7): 744-747.
- Marrero M, Banas-Berceli A, Stern D, Eaton D. 2006. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F762-768.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Ohshiro Y, Ma R, Yasuda Y, Yamamoto J, Clermont A, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern T, King G. 2006. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C-Null Mice. *Diabetes* 55:3112-3120.
- Ozbek E. 2012 Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol* 2012: 9.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López-Gramko JT, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 75(1): 46-50.
- Patel MB, Mishra SH. 2011. Hypoglycemic activity of C-glycosyl flavonoid from *Enicostemma hyssopifolium*. *Pharm Biol* 49(4):383-91.
- Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic. *Property Asian Pacific J Trop Biomed* 320-330.
- Poderoso JJ. 2009. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 484:214-20.
- Quijano C, Romero N, Radi R. 2005. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radical Biol Med* 39(6):728-741.
- Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59(7):365-73.
- 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 Pharmaceutical Res* 4(6):2860-2868.
- Safitri A, Srihardyastutie A, Roosdiana A, Aulanni'am A, Laili Octaviana EN. 2019. Effects of Root Extract of *Ruellia tuberosa* L. on Kidneys of Diabetic Rats. *J Math Fund Sci* 51(2): 127-137.
- Salah AM, Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M, Vierling W, Wagner H. 2000. *In vitro* purgative effect of *Ruellia praetermissa*. *Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae)*. *J Ethnopharm* 72:269-72.
- Salah A, Dongmo A, Kamanyi A, Bopelet M, Wagner H. 2001. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory effect by *Ruellia praetermissa*. *Pharma Biol* 39(1): 16-19.
- Salah AM, Gathumbi J, Vierling W, Wagner H. 2002, Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermissa* *Sceinf. ex. Lindau (Acanthaceae)* in female rats. *Phytomedicine* 9(1):52-5.
- Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, Bagatini M, Martins CC, Abdalla FH, Daci da Silva Serres J, Zanini D, Vieira JM, Cardoso AM, Schetinger MR, Morsch VM. 2012. *Biochimie* 94(2):374-83.
- Scivittaro V, Ganz M, Weiss M. 2000. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F676-683.
- Sen CK, Packer L. 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10(7):709-20.
- Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. 2007. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:16-28.
- Shahwara D, Ullaha S, Ahmadb M, Ullaha S, Ahmada N, Khan MA. 2011. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. *Iranian J Pharma Sci* 7(2):107-115
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. *Kidney Int* 71:846-854.
- Sommer M, Wolf G. 2007. Rosiglitazone increases PPARgamma in renal tubular epithelial cells and

- protects against damage by hydrogen peroxide. *Am J Nephrol* 27(4):425-34.
- Stefano GB, Kream RM. 2011. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med Sci Monit* 17:RA221.
- 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.
- Thomas S, Karalliedd J. 2018. Diabetic nephropathy. *Medicine* 47(2):86-91.
- Tsiani E, Poli Lekas P, Fantus GI, Dlugosz J, 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.
- Ullrich V, Kissner R. 2006. Redox signaling bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg Biochem* 100:2079-86.
- Wijesinghe WA, Senevirathne M, Oh MC, Jeon YJ. 2011. Protective effect of methanol extract from citrus press cakes prepared by far-infrared radiation drying on H₂O₂-mediated oxidative damage in Vero cells. *Nutr Res Pract* 5(5):389-95.
- Wink DA, Mitchel JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5):434-56.
- World Health Organization WHO. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/07/06/2011>.
- 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.
- Yu B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-62.
- Zanatta, M, Sandri, P, Arslan. 2003. Ascorbic acid increases cell death in fibroblast and Vero cultures after oxidative and thermic stress. *Riv Med Lab - JLM*. 4:3-4.
- Zemojtel T, Kolanczyk M, Kossler N, Stricker S, Lurz R, Mikula I, Duchniewicz M, Schuelke M, Ghafourifar P, Martasek P, Vingron M, Mundlos S. 2006. Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett* 580:455-62.
- Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B. 2010. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J Biol Chem* 285:14210-6.



***Aa-Integral-Tox*: un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes aegypti*: un modelo animal no convencional**

***Aa-Integral-Tox*: an innovative protocol to evaluate neuro-cardio-toxicity using *Aedes aegypti* mosquito larvae: an unconventional animal model**

MARCO ÁLVAREZ^{*1}, AURORA BARRIOS^{**}, ELIANA NAVARRO^{***}

Resumen

Aa-Integral-Tox: un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardio-toxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes aegypti*: un modelo animal no convencional. Explorar los efectos inducidos por agentes tóxicos sobre órganos blancos, ha priorizado la búsqueda de diversos modelos animales de experimentación. Aquí exponemos un modelo no convencional como el estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti* (*Aa*), en un protocolo denominado *Aa-Integral-Tox*, para evaluar la neuro-cardio-toxicidad con el uso del clorhidrato de verapamilo. La CL_{50} obtenida fue de 0,6598 mg/mL con un IC95% entre 0,4128 y 1,156. A las 3 hr de tratamiento, en un mismo animal, la conducta de nado (CN) mostró una caída significativa de la velocidad angular (ω), con valores de $-19,55 \pm 15$ rad/s en comparación a los valores control de 101 ± 44 , rad/s, lo cual se tradujo en un índice de variabilidad de conducta de nado de (IvCN) de $0,8127 \pm 0,0158$ e IC 95% entre 0,7817 a 0,8436 $p < 0,0001$. La actividad cardíaca contráctil (ACC) mostró una la reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción de 68 ± 14 c/s a $22 \pm 2,0$ c/s, con un alargamiento de los intervalos de contracción de $89 \pm 1,5$ ms y $274 \pm 4,94$ ms, lo cual se tradujo en un índice de variabilidad de ACC (IvACC) $0,7948 \pm 0,0194$ % con un IC 95% entre 0,7570 a 0,8326 y un valor de $p < 0,0001$. El marcaje con Rojo de Rutenio determinó un desplazamiento de Ca^{+2} desde el espacio endoperitrófico hacia el espacio ectoperitrófico del cuerpo larvario. Con este modelo alternativo no convencional se podría garantizar altos índices de predictividad para estimar la eficiencia de los bioensayos de toxicidad, impactando sobre los principios de las 3R de los modelos convencionales.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, neuro-cardio-toxicidad integral, clorhidrato de verapamilo

Abstract

The exploring effects induced by toxic agents on target organs has prioritized the search for various experimental animal models. Here we present an unconventional model such as the larval stage of the *Aedes aegypti* (*Aa*) mosquito, in a protocol called *Aa-Integral-Tox*, to evaluate neuro-cardio-toxicity with the use of verapamil hydrochloride. The LC_{50} obtained was 0.6598 mg/mL with a 95% CI between 0.4128 and 1.156. At 3 hours of treatment, in the same animal, swimming behavior (SB) showed a significant drop in angular velocity (ω), with values of -19.55 ± 15 rad/s compared to control values of 101 ± 44 , rad/s, which translated into a swimming behavior variability index (IvSB) of 0.8127 ± 0.0158 and 95% CI between 0.7817 and 0.8436 $p < 0.0001$. The contractile cardiac activity (CCA) showed a significant reduction in the average contraction frequency from 68 ± 14 c/s to 22 ± 2.0 c/s, with a lengthening of the contraction intervals of 89 ± 1.5 ms and 274 ± 4.94 ms, which translated into a CCA variability index (IvCCA) $0.7948 \pm 0.0194\%$ with a 95% CI between 0.7570 to 0.8326 and a value of $p < 0.0001$. Ruthenium Red labeling determined a shift of Ca^{+2} from the endoperitrophic space to the ectoperitrophic space of the larval body. With this non-conventional alternative model, high predictive rates could be guaranteed to estimate the efficiency of toxicity bioassays, impacting the 3R principles of conventional models.

Keywords: *Aedes aegypti*, integral neuro-cardio-toxicity, verapamil hydrochloride

1. Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. Correspondencia: alvarezmenator@gmail.com

Orcid: [0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)*

Orcid: [0000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)**

Orcid: [0000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)***

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.12](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.12)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 30/08/2022

Aprobación: 20/09/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 128-138, 2022

Introducción

La necesidad de explorar los efectos inducidos por agentes tóxicos sobre órganos blancos en los seres vivos, ha priorizado la búsqueda de diversos modelos animales de experimentación e índices de funcionalidad que faciliten la identificación de las señales de daños a través de observaciones directas y fáciles de cuantificar (Castillo-Salas y col., 2013). Como es sabido, las señales de daño más comunes han sido caracterizadas a través de bioensayos de toxicidad realizados en los modelos animales convencionales que, por lo general, continúan siendo el estándar de oro para la predicción del riesgo tóxico en humanos (Olson y col., 2000; Euwema y Swanson, 2022). Sin embargo, ha sido claramente demostrado que estos bioensayos resultan altamente costosos ya que requieren grandes cantidades de estos animales, así como de gran cantidad de compuestos para realizar las pruebas que no siempre resultan predictivas. Esta situación ha hecho pensar qué la identificación de señales de daños inducidas por agentes tóxicos pudieran también ser obtenidas a través de otros modelos animales no convencionales, de menor costo y mayor facilidad para su obtención y mantenimiento (Gullace y Caturin, 2020). De la búsqueda de nuevos modelos animales de experimentación, ha surgido el pez cebra con el cual particularmente en nuestro laboratorio hemos generado algunos aportes de reconocida significancia (Zanotty y col., 2019; Álvarez y col., 2021). Sin embargo, hasta el poder adquirir y mantener a dicho modelo, nos ha resultado oneroso. Ante tal circunstancia y por encima de todas las limitaciones, hemos explorado otros modelos no convencionales como es el caso del estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti* (*Aa*), una alternativa que

exponemos en la presente investigación bajo un protocolo innovador que hemos denominado *Aa-Integral-Tox*, inspirado en un protocolo diseñado para el pez cebra, el *ZeGlobalTox* (Cornet y col., 2017). Al igual que dicho protocolo, nuestro *Aa-Integral-Tox*, integra la respuesta neuro-cardio-tóxica en un mismo animal, impactando así sobre los principios básicos de las 3R, reducción, remplazo y refinamiento de los modelos convencionales. Pensamos que este modelo alternativo no convencional podría garantizar los altos índices de predictividad que proponen algunos autores para estimar la eficiencia de los bioensayos de toxicidad (Hornberg y col., 2014; Blomme y col., 2016). Con el uso del modelo larvario del mosquito de *Aa*, hemos podido identificar, medir y cuantificar fácilmente, en un mismo animal, la toxicidad aguda y los efectos subletales de algunos compuestos específicos (Álvarez y col., 2021a; Álvarez y col., 2021b., Barrios y col., 2022., Hernández y Álvarez., 2020). En esta oportunidad, para la validación de nuestro protocolo integral de experimentación toxicológica, *Aa-Integral-Tox*, hemos hecho uso del fármaco Pamiwell-80, una versión comercial del clorhidrato de verapamilo (clo-ver), para cuantificar la respuesta neuro-cardio-tóxica a través de su efecto sobre el comportamiento del nado (CN) y la actividad cardiaca contráctil (ACC) de las larvas del mosquito *Aa*. Cabe destacar que el verapamilo, es un conocido bloqueador no dihidropiridínico de los canales lentos de Ca^{+2} tipo L, generador de efecto inotrópico y se sospecha que posee la propiedad de anestésico local (<https://anestesiario.org/2010/revision-anestésicos-locales-i/>), 1,6 veces mayor a una concentración equimolar de procaína (Fahie y Cassagnol, 2022; Basile, 2004; Flynn y Pasko, 2000). A pesar de su conocida y frecuente aplicación

en el tratamiento de la hipertensión arterial sistémica y pulmonar, angina de pecho, arritmias, hemorragia subaracnoidea, miocardiopatía hipertrófica, ha sido recientemente clasificado como un agente mortal a dosis única (Euwema y Swanson, 2022), un efecto subyacente a toda esa actividad beneficiosa reportada.

Materiales y Métodos

PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

Nuestro protocolo *Aa-Integral-Tox* ha sido pensado como una herramienta metodológica para detectar, en un mismo animal, las señales de daño que pudieran estar subyacentes a la acción beneficiosa de los agentes medicamentosos de amplio uso en la medicina. En tal sentido contempla: 1) un ensayo de toxicidad aguda, en este caso con el clo-ver y 2) la identificación y cuantificación de los efectos subletales. Para ello, las larvas de *Aa*, fueron colocadas al azar en cápsulas de 24 pozos a razón de 4 larvas/pozo/concentración, a temperatura ambiente, en un rango de concentraciones de clo-ver (0,1 mg/mL a 1,6 mg/mL de solución fisiológica 0,9%), definida a partir de la concentración única seleccionada de acuerdo con la información registrada recientemente sobre su clasificación como un agente mortal a dosis única. El ensayo de toxicidad permitió determinar la concentración letal y tóxica cincuenta (CL_{50} , CT_{50}) a ser utilizadas en la evaluación de los efectos tóxicos subletales a partir de la cuantificación de la mortalidad y la toxicidad larvaria. Para el análisis de los efectos tóxicos subletales fueron analizadas las larvas sobrevivientes a los distintos tratamientos. Así, se evaluó la respuesta larvaria a la luz UV, los cambios en el movimiento zigzagante o conducta

de nado (CN), así como variación de la actividad cardiaca contráctil (ACC), consideradas como señales de daño (Barrios y col., 2022). Por otra parte, cabe destacar que se hizo uso de larvas de pez cebrá mantenidas en el laboratorio (Álvarez y col., 2021), como control positivo de la acción toxica del verapamilo descrita por otros autores (Xiaoqing y col., 2016). Las larvas de pez cebrá fueron sometidas a la CT_{50} . El Pamiwell-80 utilizado fue suministrado por la Dra. Maritza Padrón de la Cátedra de Farmacología del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. N° code GUJ/DRUGS/G/25/1667. Lote N°DT11is.05/2021-04/2024. Wellona Pharma.

REGISTRO DEL COMPORTAMIENTO DE NADO (CN)

Las larvas tratadas y sobrevivientes fueron transferidas individualmente hacia un portaobjeto con un espacio circunferencial definido por un aro metálico colocado sobre el portaobjetos, lo cual permitió circunscribir el campo de observación y el área circular del movimiento zigzagante de las larvas en un mínimo de solución 500 μ l. Una vez enfocada la muestra, bajo el lente objetivo de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, con cámara Nikon adaptada e iluminación episcópica, se realizaron videos cortos de 30 s, a razón de 15 cuadros/s. Se eliminaron las posibles fuentes de artefactos de movimiento, así como sombras, reflejos y cambios en la intensidad de la luz o deformaciones en la imagen como resultado de la curvatura de la lente. Para la cuantificación del comportamiento de nado, los respectivos videos obtenidos fueron analizados mediante el programa de análisis y construcción de modelos, Tracker (Conklin y col., 2015). Para el análisis, el trazo de los

movimientos zigzagueante fue considerado como un proceso continuo de encogimiento (larva curvada) y relajación (larva estirada) dentro de un ciclo de movimientos cóncavo-convexo en un área circular. Dichos movimientos fueron seguidos por un punto de masa fijados, entre la porción cefálica y caudal, y registrados a lo largo del video. El procesamiento generó un Tacograma del perfil del movimiento larvario, así como un fichero de datos numéricos que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad Prism para la estimación de la velocidad angular, ω (rad/s).

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL (ACC)

Una vez realizado el registro de CN en las larvas tratadas sobrevivientes, las mismas larvas fueron colocadas bajo el objetivo de 10x de un microscopio Olympus BX50 de contraste de fase BX50, con cámara Nikon a través de la cual fue ubicada la región cardiaca abdominal inmediatamente medial a los troncos traqueales longitudinales. Dicha región fue circunscrita a un área rectangular de búsqueda sobre la cual se realizaron videos de 30 s a razón de 15 cuadros/s. El análisis cuantitativo de la ACC fue realizado en el mismo programa de análisis Tracker, simulando la dinámica de una partícula en movimiento oscilatorio. Para ello, fue definido un punto de ACC en la región cardiaca el cuál fue seguido de forma automática a lo largo de la secuencia de cuadros de los respectivos videos. El registro de ACC, generó un fichero de datos numéricos que fue trasladados al programa estadístico GraphPad Prism para la obtención del perfil gráfico de la frecuencia de ACC, visualizado a través de una secuencia de ondas de contracción con picos de intervalo c-c, en función del

tiempo. La realización de la gráfica en un Tacograma de la ACC permitió realizar la estimación de las variables estadística como la frecuencia promedio de contracción (fpc) y con ello el valor de la duración de los respectivos intervalos c-c, de acuerdo con el cálculo utilizado para la obtención del tiempo de duración del intervalo R-R de un electrocardiograma (My EKG. 2022). Los valores de desviación estándar de dichos intervalos de tiempo permitieron obtener la variación de la ACC-total (vACC-t).

TINCIÓN *IN VIVO* CON ROJO DE RUTENIO

Una vez realizados los registros de la CN y la ACC en la población larvaria tratada y sobreviviente, se procedió a una incubación *in vivo* de dichas larvas en una solución de Rojo de Rutenio (RR), un colorante inorgánico utilizado en microscopía para la tinción diferencial y diagnóstico del movimiento del calcio citoplasmático. Este ha sido clasificado como una herramienta farmacológica para analizar posibles mecanismos celulares vinculados con la inhibición del transporte de calcio a través de los canales de membrana (Vincent y Duncton, 2011) y en los últimos años ha sido promovido como un posible agente bloqueante de la activación de canales iónicos estimulados por la sobre carga de calcio sistólico inducida en condiciones fisiopatológicas (Nazıroğlu, 2022). Se utilizó una concentración de 0,01% en el agua de cultivo de las larvas, a un pH de 7,4, durante un tiempo de 15 seg. Transcurrido el tiempo de coloración fue registrado el patrón del marcaje de las larvas con el RR y analizadas con el programa Image J. Fiji. El histograma del marcaje en esta población larvaria sobreviviente fue contrastado con el del marcaje de las larvas control.

Análisis estadístico

La relación sensibilidad/especificidad, representada a través de la curva de operación característica del receptor (*Receiver-Operating Characteristic* [ROC]), denominada curva ROC, por sus siglas en inglés, permitió caracterizar, a través del valor del Área Bajo la Curva (ABC), el índice de variabilidad de la CN (IvCN) y el Índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil (IvACC), en función de los cambios en la velocidad angular y en la frecuencia promedio de contracción cardíaca, respectivamente. El análisis estadístico de todos los datos fue realizado a través de ANOVA de una vía, acompañado con la prueba complementaria de Brown-Forsythe realizado con el programa GraphPad Prism.

Resultados

TOXICIDAD AGUDA

El efecto letal del clo-ver sobre la población larvaria de mosquitos *Aa*, se obtuvo a las 3 hr del tratamiento quedando representado a través de la respuesta de mortalidad ante las concentraciones utilizadas y fue expresado en una curva concentración/respuesta con transformación lineal con ajuste de intervalos de confianza de 95% (IC 95%) (Figura 1), a partir de la cual se obtuvo una $CL_{50} = 0,6598$ entre un IC 95% entre 0,4128 y 1,156 mg/mL. La CL_{50} , aplicada a las larvas de pez cebra permitió corroborar la alta tasa de mortalidad larvaria promovida por el clo-ver. A diferencia de las larvas de *Aa*, en donde el efecto letal fue registrado a las 3 hrs del tratamiento, las larvas de pez cebra comenzaron a experimentar perturbación de la CN, reducción significativa de la

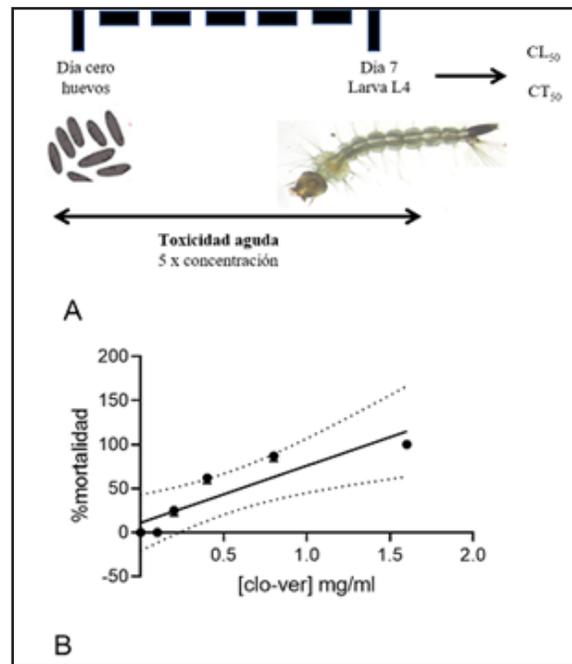


Figura 1. Protocolo *Aa-Global-Tox*. Parte A. Toxicidad aguda clo-ver. Letalidad. Cinco concentraciones de clo-ver: 01, 02, 0,4, 0,8, 1,6 mg/mL. Transformada de la relación concentración & respuesta mortalidad. Ajuste no lineal. $CL_{50} = 0,65$. IC 95% 0,4 a 1,1 mg/mL. N=16 larvas/punto

velocidad angular (ω), $p < 0,0001$, torsión corporal y paralización cardíaca a los 30 s de contacto con la CL_{50} del clo-ver (Figura 2).

EFFECTOS SUBLETALES

Los efectos subletales fueron registrados en el 50% de la población larvaria sobreviviente a la CL_{50} , a nivel del patrón normal de la CN (Figura 3A) y del patrón normal de la ACC (Figura 3B). Respecto a las señales de daño producidos por el clo-ver sobre la conducta de nado (CN), representados en el Tacograma de CN, (Figura 4A), se pudo determinar que el patrón normal de movimientos cóncavos-convexos cambia, presentando una reducción significativa de las fases contorsión (c) y un incremento en las fases de reposo (r), o estado de reposo

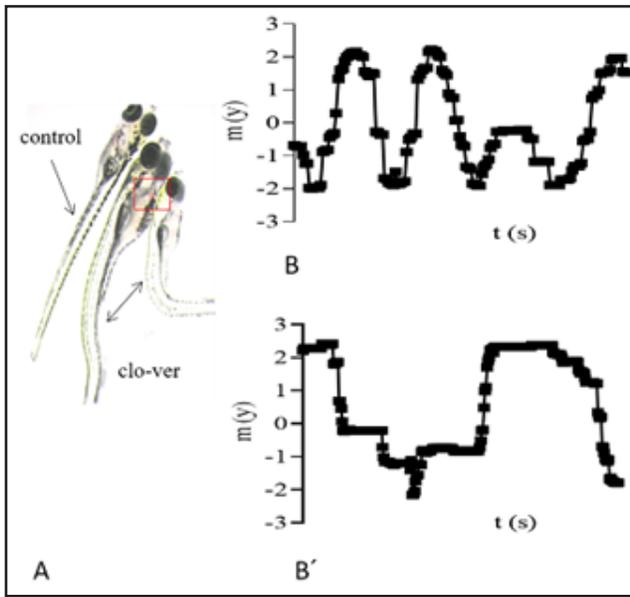


Figura 2. Larvas de pez cebra tratadas con clo-ver $CL_{50}=0,65$ mg/mL. $N=16$ larvas/punto. Grupo de larvas control y tratadas (A). Cardiotoxicidad inmediata con paralización del bombeo sanguíneo (recuadro), acompañada de torción corporal (flechas), trazos desincronizados durante el desplazamiento enlentecimiento con reducción de la velocidad angular hasta la paralización completa y muerte (B, control y clo-ver. (B). Control $\omega = 10,78 \pm 8,4$ %/s. clo-ver. $\omega = 8,3 \pm 1,2$ %/s.

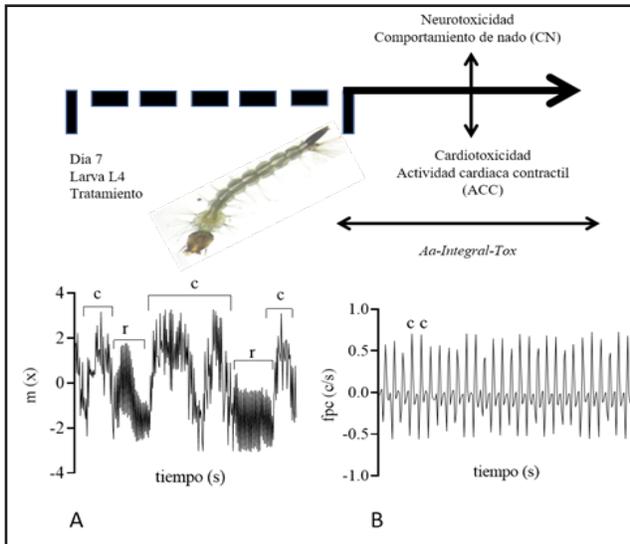


Figura 3. Protocolo *Aa-Global-Tox*. Parte B. Organotoxicidad. Efectos subletales. Larvas sobrevivientes a la CT_{50} . Neurotoxicidad (A). Patrón normal promedio del comportamiento de nado (CN). Tacograma de CN. Representación del desplazamiento larvario en el eje x en función del tiempo (s), con fases de contorsión (c) y reposo (r). Cardiotoxicidad (B). Patrón normal promedio de la actividad cardíaca contractil (ACC). Tacograma de la ACC. Representación de la frecuencia promedio de contracción (fpc) en función del tiempo. Picos de contracción (c) e intervalos c-c

prolongado, con una caída a cero de la velocidad angular (ω). Se obtuvieron valores de ω para el control de 101 ± 44 , rad/s, para el clo-ver de $-19,55 \pm 15$ rad/s, (Figura 4A´). Bajo esta condición no hubo respuesta al estímulo UV. Respecto a las señales de daño producidos por clo-ver sobre la actividad cardíaca contractil (ACC), se pudo determinar que el patrón normal cambia, presentando una reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción con un retardo en el tiempo de aparición entre los intervalos de sístole y diástoles o picos de c-c (Figura 4B). Las respectivas frecuencias promedio de contracción (fpc): control y clo-ver fueron de 68 ± 14 c/s y $22 \pm 2,0$ c/s, respectivamente (Figura 4B´). A partir de estos valores de fpc, se pudieron determinar los valores promedio de los intervalos c-c correspondientes, particularmente; $89 \pm 1,5$ ms y $274 \pm 4,94$ ms. La desviación estándar de dichos valores ($N=24$), permitió obtener la variación de la ACC-t, particularmente para un valor promedio normal de 1,41 ms (A) y de 4,9 ms clo-ver (B), con una estadística significativa arrojada del ANOVA, de $***p < 0,0001$ y $r^2 = 0,99$, fortalecida con la prueba de Brown-Forsythe que arrojó un $***p < 0,0001$, expresándose como resultado que la $vACC-t(B) > vACC-t(A)$. A una menor frecuencia de contracción una mayor variabilidad del intervalo c-c.

ÍNDICE DE VARIABILIDAD DE LA CONDUCTA DE NADO (IvCN)

De la relación sensibilidad/especificidad del parámetro de velocidad angular (ω) antes y después del tratamiento con clo-ver, se obtuvo un ABC de $0,8127 \pm 0,0158$ % con un IC 95% entre 0,7817 a 0,8436 y un valor de $p < 0,0001$, lo cual se traduce en una probabilidad de aproximadamente 84,36 % de seleccionar al azar larvas con reducción

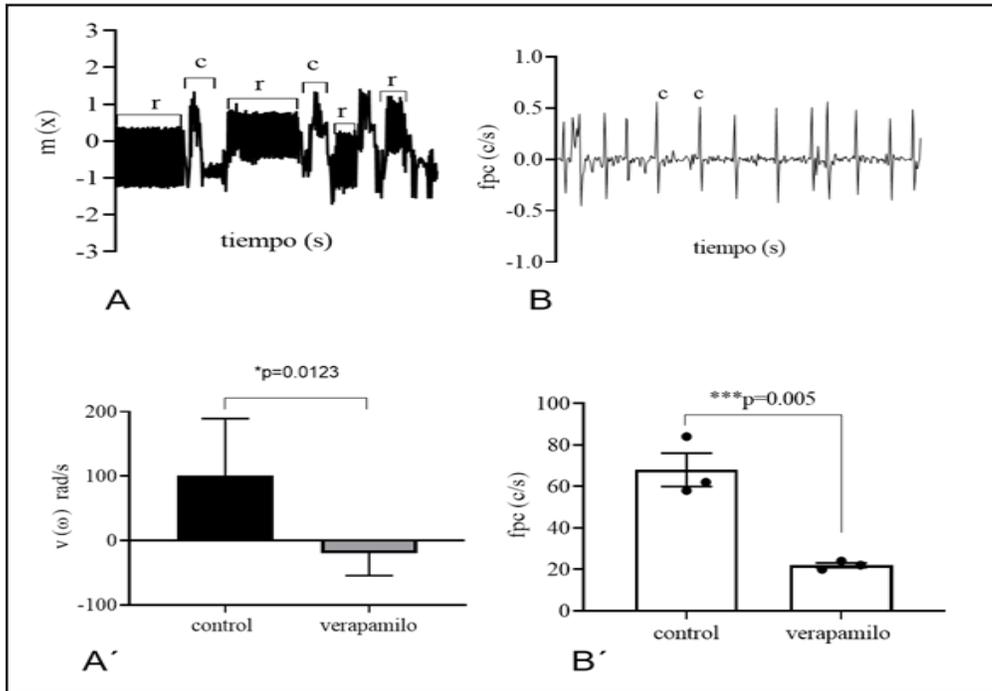


Figura 4. Tacograma del CN en larvas sobrevivientes. Incremento de las etapas de reposo (A), con reducción significativa de la velocidad angular (A'). Tacograma de ACC (B), con alargamiento del intervalo c-c y una reducción significativa de la frecuencia promedio de contracción (B')

de velocidad angular en una población larvaria tratada, respecto a la selección en una población control (Figura 4A).

ÍNDICE DE VARIABILIDAD DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL (IvACC)

De la relación Sensibilidad/Especificidad del parámetro de variabilidad de la ACC antes y después del tratamiento con clo-ver, se obtuvo un ABC de $0,7948 \pm 0,0194$ % con un IC 95% entre 0,7570 a 0,8326 y un valor de $p < 0,0001$, lo cual se traduce en una probabilidad de aproximadamente 79,48 % de seleccionar al azar larvas con reducción de frecuencia de contracción e incremento en el intervalo c-c en una población larvaria tratada respecto a la selección en una población control (Figura 5 A y B).

TINCIÓN CON RR

El marcaje positivo al RR de las larvas control (Figura 6A), se presentó circunscrito,

con mayor intensidad, a la región de los ciegos gástrico (cg) (recuadro A), así como al espacio endoperitrófico (eendp) (flecha. A'), mientras que en las larvas tratadas con clo-ver (Figura 6B), se presentó esparcido hacia el espacio ectoperitrófico (eectp), (Figura 6B'), y con menor intensidad. El análisis histomorfométrico permitió visualizar dicho esparcimiento (Figura 6C).

Discusión

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el protocolo de experimentación diseñado para un modelo animal no convencional como el de la larva del mosquito *Aedes aegypti* (Aa) y que hemos denominado *Aa-Integral-Tox*, resultó ser un bioensayo innovador, de mucho menor costo y de mayor accesibilidad. El protocolo *Aa-Integral-Tox*, permitió la evaluación *in vivo*, en un mismo animal, de dos importantes señales de daño, como

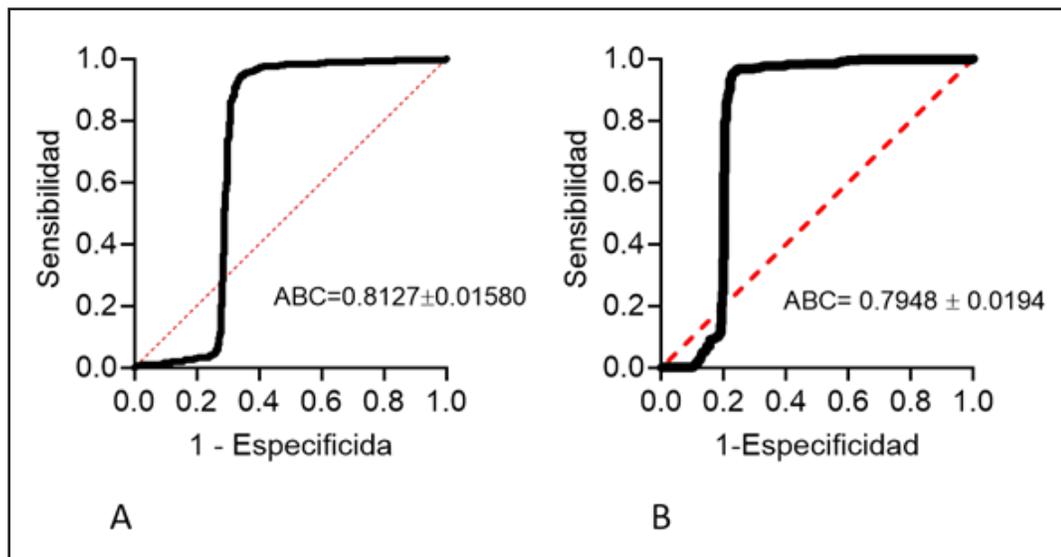


Figura 5. Sensibilidad y especificidad de la prueba de toxicidad del clo-ver. (A). Índice de variabilidad de la conducta de nado (IvCN) en función de la variabilidad de la velocidad angular (ω). (B). Índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil (IvACC) en función de la variabilidad de la frecuencia promedio de contracción

la neuro y la cardiotoxicidad, subyacentes, en este caso, al clorhidrato de verapamilo (clo-ver), un fármaco bloqueante de los canales de Ca^{+2} tipo L, en su presentación comercial de Pamiwell-80. Hasta donde se conoce, ningún registro al respecto ha sido reportado. Cabe destacar que, a nivel experimental, el verapamilo ha sido usado para estudiar la insuficiencia cardíaca en modelo larvario de pez cebra y que también, por otros autores, se ha mostrado su relevancia en el del pez cebra para predecir la neurotoxicidad a mucho más bajas concentraciones (Irons y col., 2010; De Esch y col., 2012; Legradi y col., 2014). Si bien la expresión de neuro-cardiotoxicidad, registrada por nuestros resultados son equivalentes a las encontradas por los autores antes señalados, se obtuvo a una mayor concentración y menor tiempo. Una mayor concentración que, en las larvas del *Aa*, tardó mayor tiempo para expresar iguales señales de daño. Es decir que podríamos estar hablando de una característica de toxicidad diferencial para el verapamilo, dependiente de la especie,

de la concentración y de los tiempos de exposición, en contraste con otros autores. Con el uso de clo-ver, las larvas de pez cebra resultaron ser más sensibles respecto a las larvas del mosquito *Ae*. En cuanto a la neurotoxicidad, validada a través del IvCN, cabe destacar que las investigaciones sobre los sistemas sensoriales de los mosquitos constituyen un recurso valioso debido a la amplia variedad de vías sensoriales que han sido descritas para este invertebrado (Montell y Zwiebel, 2016). A pesar de que numerosos estudios han aclarado que muchas de esas vías sensoriales están mediadas por receptores y particularmente fotorreceptores, un conocimiento sobre la vinculación de estos fotorreceptores con las respuestas motoras no ha sido claramente establecido, entre otras razones y según algunos autores, debido a la carencia de estudios capaces de monitorear al mismo tiempo dicha vinculación (Bui y col., 2019). Dentro de los fotorreceptores descritos para larvas del *Ae*, el gen que codifica para rodopsina *Aaop8* y que funciona como receptor ultravioleta,

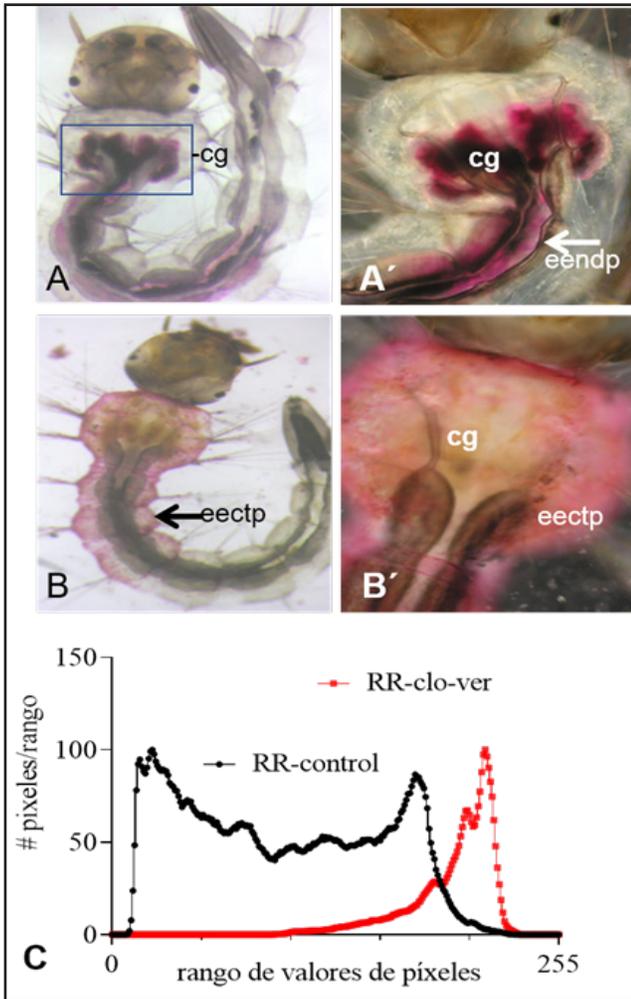


Figura 6. Marcaje de larvas de *Aedes aegypti* con RR. Control (A-A'). Se destaca el colorante retenido en los ciegos gástricos (cg). clo-ver (B-B'). Se destaca la dispersión del colorante hacia el espacio endoperitrítico. El histograma de densidad en valores de píxeles (C) cuantifica el mayor marcaje de RR contenido en el espacio y su redistribución con el tratamiento de clo-ver

ha sido identificado dentro de las células fotorreceptoras R7 especializadas que divide la retina de los mosquitos *Aedes aegypti* (Hu y col., 2014). Si bien nuestros resultados carecen de una identificación de dicho receptor, la pérdida de la sensibilidad larvaria a la luz UV, en presencia de clo-ver, demostrada en nuestros resultados, sugiere una posible vinculación entre la pérdida de la actividad motora observada y una posible alteración de este fotorreceptor. Otros ensayos serán necesarios para corroborar

si el sistema de fotorreceptores de luz UV pudiera ser considerado considerado como posible órgano blanco de acción de agentes como el verapamilo. En cuanto a la cardiotoxicidad, validada a través del IvACC, nuestros resultados han fortalecido la estructura cardiaca del modelo larvario del mosquito *Aa* como un órgano blanco en bioensayos de toxicidad. A pesar de ser un órgano pequeño, delicado y de difícil de manipulación, su ciclo de contracción y relajación, como en la mayoría de los animales de experimentación, se traduce en unión reversible entre Ca^{+2} y las proteínas contráctiles como paso final de la actividad cardiaca contráctil (Glen y col., 2010). El sistema cardiaco de las larvas de *Aa*, a través de su conformación tubular, de fibras estriadas, organizadas en sarcómeros, con toda la maquinaria de líneas Z y túbulos T (Barbosa Da Silva y col., 2019), respondió al clo-ver, muy probablemente a través de un desequilibrio en la homeostasis del calcio promovido por las características del fármaco. Un desequilibrio que pudiera traducirse en la descompartmentalización de sitios de almacenamiento de calcio como fue puesto en evidencia a través del marcaje con RR. Su aplicación pareciera conducirnos a pensar que las membranas epiteliales internas de la estructura larvaria pudieran ser definidas como posibles sitios blancos de acción del verapamilo. Por último, cabría expresar que el protocolo *Aa-Integral-Tox*, repercutió sobre los principios de las 3R, ya que permitió, con dos índices fisiológicos del mismo animal y no en animales por separados, obtener más información con menor número de animales. Contar con dos nuevos índices de funcionalidad biológica con una alta sensibilidad y eficiencia, como el IvCN y el IvACC, abre las puertas no solo para explorar sobre posibles estrategias para el

control de mosquitos, sino también para avanzar hacia un mejor conocimiento de la biología de estos insectos, contribuyendo a la vez a la promoción del mismo como un modelo alternativo en la experimentación animal.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Álvarez A, Álvarez M, Perdomo L, Rodríguez A. 2021. Clinical cardiac alteration and hemostatic toxicities caused by Scorpion (*Tityus discrepans*) venom and its purified fraction on Zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Invest Clin* 62 (4): 325-338.
- Álvarez M, Hernández C, Morales E, Hernández F, Velásquez V, Zuleta G. 2021. Respuestas morfofuncionales de larvas de mosquito *Aedes aegypti* a la Tetrametrina-Real-ZZ®. *Rev Toxicol* 38: 34-38.
- Álvarez M, Hernández C, Barrios A. 2021. Respuesta funcional y morfológica ante la luz uv emitida por larvas de *Aedes aegypti* tratadas bajo condiciones de oxidación avanzada: Un análisis morfométrico. *Retel: Revista de Toxicología en Línea* 64: 48-84.
- Basile J. 2004. El papel de los bloqueadores de los canales de calcio existentes y más nuevos en el tratamiento de la hipertensión. *J Clin Hipertens (Greenwich)* 6 (11):621-29.
- Barbosa da Silva H, Godoy RSM, Martins GF. 2019. The Basic Plan of the Adult Heart Is Conserved Across Different Species of Adult Mosquitoes, But the Morphology of Heart-Associated Tissues Varies. *J Med Entomol* 56(4):984-996.
- Barkai AI, Williams RW. 1983. The exchange of calcium in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 104:139-48.
- Barrios Rudas ADV, Álvarez Ochoa MA, Navarro E. 2022. Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito *Aedes aegypti* ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental. *Rev Fac Farm* 85(1 y 2):100-110.
- Bensimon-Brito A, Cardeira J, Dionisio G, Huisseune A, Cancela ML, Witten PE. 2019. Revisiting *in vivo* staining with alizarin red S, a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev Biol* 16:2.
- Blomme EAG, Will Y. 2016. Toxicology Strategies for Drug Discovery: Present and Future. *Chem Res Toxicol* 29:473-504.
- Bui M, Shyong J, Lutz EK, Yang T, Li M, Truong K, Arvidson R, Buchman A, Riffell JA, Akbari OS. 2019. Live calcium imaging of *Aedes aegypti* neuronal tissues reveals differential importance of chemosensory systems for life-history-specific foraging strategies. *BMC Neurosci* 20(1):27.
- Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Ian G. Woods IG. 2015. VideoHacking: Automated Tracking and Quantification of Locomotor Behavior with Open-Source Software and Off-the-Shelf Video Equipment. *J Undergrad Neurosci Educ* 13(3): A120-A125.
- Cornet C, Calzolari S, Miñana-Prieto R, Dyballa S, van Doornmalen E, Rutjes H, Savy T, D'Amico D, Terriente J. 2017. *ZeGlobalTox*: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *Int J Mol Sci* 18(4):864-883.
- Chapman RA. 1983. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 245(4): H535-52.
- De Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D. 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini-review. *Neurotoxicol Teratol* 34:545-553.
- Euwema MS, Swanson TJ. 2022. Deadly Single Dose Agents. 2022. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 28722879.
- Fahie S, Cassagnol M. 2022. Verapamil. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 30860730.
- Flynn JT, Pasko DA. 2000. Bloqueadores de los canales de calcio: farmacología y lugar en la terapia de la hipertensión pediátrica. *Pediatr Nephrol* 15 (3-4):302-16.
- Glenn JD, King JG, Hillyer JF. 2010. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol* 213(4):541-550.
- Gullace FA, Caturin ED. El animal de laboratorio como reactivo biológico. Revisado: 21/05/2020. <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00013655.pdf>.
- Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thougard AV, Toft DB, Mow T. 2014. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. *Drug Discov Today* 19:1131-1136.
- Hu X, Leming MT, Whaley MA, O'Tousa JE. 2014. Rhodopsin coexpression in UV photoreceptors of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J Exp Biol* 217(Pt 6):1003-8.
- Irons TD, MacPhail RC, Hunter DL, Padilla S. 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor

- activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 32:84-90.
- Legradi J, el Abdellaoui N, van Pomeran M, Legler J. 2014. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ Sci Pollut Res* 22:16277-16289.
- Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. 1998. Ruthenium red-catalyzed degradation of peroxides can prevent mitochondrial oxidative damage induced by either tert-butyl hydroperoxide or inorganic phosphate. *Arch Biochem Biophys* 349(2):275-80.
- Montell C, Zwiebel LJ. 2016. Chapter ten-mosquito sensory systems. In: Raikhel AS, editor. *Advan Insect Physiology*. Cambridge: Academic Press; pp. 293-328.
- Naziroğlu M. 2022. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol *Metab Brain Dis* 37(3):711-728.
- Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32(1):56-67.
- Vincent F, Duncton MA. 2011. "Agonistas y antagonistas de TRPV4". *Curr Top Med Chem* 11 (17): 2216-26.
- Xiaoqing Guo, Melanie Dumas, Bonnie L. Robinson, Syed F. Ali, Merle G. Paule, Qiang Gu, Jyotshna Kanungo, 2017. Acetyl L-carnitine targets adenosine triphosphate synthase in protecting zebrafish embryos from toxicities induced by verapamil and ketamine: An *in vivo* assessment. *J Appl Toxicol* 37(2): 192-200.
- Zanotty Y, Álvarez M, Perdomo L, Sánchez EE, Giron ME, Jimenez JC, Suntravat M, Guerrero B, Ibarra C, Montero Y, Medina R, Navarrete LF, 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.
- Zhu XY, Wu SQ, Guo SY, Yang H, Xia B, Li P, Li CQ. 2018. A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents. *Zebrafish* 15(3):243-253.



Impacto de la COVID-19 durante la pandemia abril 2020 hasta abril 2022 en la población amazónica de Napo – Ecuador

COVID-19's impact during the pandemic from April 2020 to April 2022 in the Amazonian population of Napo – Ecuador

MARÍA CARDOZO^{1*}, MARCO CISNEROS^{2**}

Resumen

Trabajo retrospectivo, descriptivo, longitudinal, unicéntrico sobre los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital José María Velasco Ibarra de la provincia de Napo Ecuador. El objetivo fue determinar la población amazónica afectada por la infección de la COVID-19, durante la pandemia 2020 a 2022, mediante la determinación de variables epidemiológicas y clínicas que englobaron el grado de disfunción pulmonar. En el periodo estudiado, se recibieron un total de 181 pacientes con diagnóstico de la COVID-19, hombres (N= 118) y mujeres (N= 63). De estos pacientes ingresaron 33 indígenas (18,23%), con edad promedio de 60,3 años, con un Pa/FiO₂ promedio al ingreso de 83,3 mmHg. La cantidad de días promedio de hospitalización fue de 9,41 días, la mortalidad ocurrida alcanzo un 41,26% mientras que la mortalidad esperada de acuerdo con los scores de gravedad fueron los siguientes: por la escala de Murray 68,7% y por el score de Apache II 66,7%. Las comorbilidades más frecuentes que se observaron en la población fueron hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus tipo II, insuficiencia renal aguda e hipotiroidismo. Aun cuando las vacunas no impidieron el ingreso de los pacientes, fueron las comorbilidades la causa de deceso en el 37,5% de los pacientes vacunados. Para el cierre de este trabajo en abril 2022 la tasa de ingreso por la COVID-19 disminuyó de manera dramática; posterior a la vacunación masiva solo ingresaron 9 pacientes confirmados. Se concluye que la mortalidad en nuestro centro fue menor a la esperada por los scores de gravedad utilizados.

Palabras clave: COVID-19, UCI, población indígena

Abstract

Retrospective, descriptive, longitudinal, single-center study on patients admitted to the ICU at José María Velasco Ibarra Hospital in the province of Napo, Ecuador. The objective was to determine the Amazonian population affected by the COVID-19 infection, during the 2020 to 2022 pandemic, determining epidemiological and clinical variables that encompassed the degree of pulmonary dysfunction. In the period studied, a total of 181 patients diagnosed with COVID-19 were received, men (N= 118) and women (N= 63). Of these patients, 33 indigenous (18.23%) were admitted, the average age was 60.3 years, with an average Pa/FiO₂ at the admission of 83.3 mmHg. The average number of days of hospitalization was 9.41 days, the mortality reached 41.26% while the expected mortality according to the severity scores was as follows: by the Murray scale 68.7%, and by the Apache II score 66.7%. The most frequent comorbidities in the population were arterial hypertension, obesity, type II diabetes mellitus, acute renal failure (ARF), and hypothyroidism. Even when the vaccines did not prevent the admission of the patients, comorbidities were the cause of death in 37.5% of the vaccinated patients. For the closure of this work in April 2022, the admission rate for COVID-19 decreased dramatically after mass vaccination, only 9 confirmed patients were admitted. It is concluded that mortality in our center was lower than expected due to the severity scores used.

Keywords: COVID-19, ICU, Indigenous population

1. Médico Tratante. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. 2. Médico Residente. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. Correspondencia: luzthmin@gmail.com

Orcid: [0000-0001-6490-2490*](https://orcid.org/0000-0001-6490-2490)

Orcid: [0000-0002-8581-1034**](https://orcid.org/0000-0002-8581-1034)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.13](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.13)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 18/08/2022

Aprobación: 02/11/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 139-146. 2022

Introducción

A finales de diciembre del 2019 por primera vez se identificó un nuevo coronavirus como la causa de un grupo de casos de neumonía la cual se propagó rápidamente, seguida de un número creciente de casos en otros países del mundo, a tal punto que en 11 de marzo del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara la COVID-19, (termino designado por la OMS en febrero del mismo año), como pandemia (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard). Hasta finales de julio del 2022 se han registrado 565.207.160 casos confirmados de la COVID-19 y 6.373.739 muertes notificadas a la OMS, al 19 de julio de 2022 se han administrado un total de 12.219.375.500 dosis de vacunas. El Ecuador, no siendo ajeno a esta realidad global, registra que desde el 3 de enero de 2020 hasta el 22 de julio de 2022 han habido 940.179 casos confirmados de la COVID-19 con 35.781 muertes, en tanto que hasta el 15 de julio de 2022 se han administrado un total de 36.204.111 dosis de vacunas (Ortiz-Prado y col., 2020).

Las comunidades indígenas de todo el mundo comparten características comunes tales como tasas más altas de pobreza extrema, mayor dificultad para el acceso a los servicios de salud, asociadas a la condición de aislamiento voluntario en que habitan algunas comunidades, así como el idioma, lo cual las hacen especialmente vulnerables a la COVID-19 (Gracey y King, 2009). Como un claro indicador, la pandemia de influenza H1N1 de 2009 resultó en una mortalidad entre 3 y 6 veces mayor entre los pueblos indígenas que entre las poblaciones no indígenas de las Américas y el Pacífico (La Ruche y col., 2009).

Sin embargo, en la población de Napo Ecuador desde el inicio de la pandemia se observó una conducta de auto confinamiento por parte de las comunidades indígenas, que fue producto de la desinformación e incertidumbre generalizada causada por las acciones gubernamentales que restringieron la movilización de la población (La Ruche, 2020).

Napo es una de las 24 provincias que tiene el Ecuador y está ubicada en la región oriental o amazónica del país, su capital es la ciudad de Tena, allí está ubicado el Hospital General José María Velasco Ibarra (HJMVI), clasificado como un Hospital tipo II. Napo fue la última provincia del Ecuador en infectarse con los casos de COVID-19, siendo que la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) se convirtió en la unidad de referencia regional (Actualización de casos de coronavirus en Ecuador, 2022).

Cabe señalar que en el año 2020, de acuerdo con informes en estudios chinos, se estableció que hasta un 20% de las personas infectadas por COVID-19 requerían ingreso hospitalario, aunque las tasas varían y entre los que están hospitalizados, hasta una cuarta parte necesita ingreso en una UCI, lo que representa aproximadamente del 5% al 8% de la población total infectada (Yang y col., 2020; Guang y col., 2020).

La población que se describirá en el presente estudio se trata de los pacientes que fueron hospitalizados en la UCI del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena. Ya que hasta el momento existe una limitada información sobre el efecto que la pandemia por COVID-19 tuvo en la Amazonia en la esfera clínica, así también es limitada la relación de tiempo que abarcan los diferentes estudios en las poblaciones indígenas del Ecuador. En

este escenario el presente estudio buscó mediante la descripción de variables demográficas y clínicas, informar el impacto de la COVID-19 en la población amazónica atendida durante 2 años de pandemia.

Materiales y Métodos

Se trata de un estudio retrospectivo, descriptivo, longitudinal, unicéntrico, donde se exponen la población ingresada a la UCI del HJMVI.

Se incluyeron a todos registros clínicos de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos desde abril del 2020 a abril del 2022, con diagnóstico de Insuficiencia respiratoria aguda, secundaria a neumonía por COVID-19, clasificándolos en casos sospechosos aquellos que contaban al menos con prueba rápida de anticuerpos a través del método de inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral y casos confirmados mediante análisis de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), emitidos por el Instituto Nacional de Salud Pública del Ecuador (INSPI).

Esta distribución se realiza geográficamente y da a conocer cuántos pacientes fueron recibidos de otras provincias, ya que aun con nuestras limitaciones hubo pacientes cuya complejidad debían ser manejados en instituciones de mayor resolubilidad, sin embargo, por falta de espacio físico muchos centros hospitalarios de otras provincias solicitaron traslados a nuestro centro.

En cuanto a la población se los clasificó con base en las variables de interés, las cuales fueron número total de pacientes, promedio de edad, sexo, indígenas a aquellos quienes se autoidentificaban como

tal, promedio de días de hospitalización en UCI, mortalidad global, distribución geográfica de ingresos, promedio de relación presión parcial de oxígeno arterial y fracción inspirada de oxígeno ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) como indicador indirecto del nivel de compromiso de la función pulmonar (de Luis Cabezón y col., 2014).

Para efectos de comparación porcentual, se utilizó la escala de Murray, la cual, mediante algunos ítems, clasifica el síndrome de distrés respiratorio en nivel de gravedad. Murray y col., (1988) desarrollaron un sistema de puntuación para establecer la existencia de lesión pulmonar aguda o síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, mediante la evaluación y sumatoria de cuatro variables. La definición completa, de acuerdo con el grupo de trabajo de Murray, requería identificar una causa o factor de riesgo etiológico, diferenciar el cuadro clínico como agudo o crónico y finalmente la aplicación de un puntaje de lesión pulmonar desarrollado a partir de la evaluación de la radiografía de tórax, hipoxemia, presión positiva al final de la espiración (PEEP) y distensibilidad pulmonar. De acuerdo con esta puntuación se puede diferenciar entre lesión pulmonar aguda o síndrome de insuficiencia respiratoria aguda y de manera indirecta de acuerdo con el puntaje más alto se puede establecer la gravedad del cuadro y su probabilidad de muerte Tabla I (de Luis Cabezón y col., 2014; Villar y col., 2011). Además se utilizó la clasificación fisiológica de enfermedades agudas y crónicas II (APACHE II por sus siglas en inglés) (Kądziołka y col., 2019).

Las condiciones mórbidas previas, son factores de riesgo que empobrecen los pronósticos del paciente, de allí que se tomaron en cuenta al momento del análisis, tales como asma, enfermedad

Tabla I
Puntaje de la escala de Murray**

Radiografía de tórax	Relación Pa/O ₂ ⁺	Compliance mL/cmH ₂ O	PEEP* cm H ₂ O	Puntuación	Mortalidad (%)
Normal	> 300	> 80	< 5	0	0
Un cuadrante	225 – 299	60-79	6 - 8	1	25
Dos cuadrantes	175 – 224	40 – 59	9 - 11	2	50
Tres cuadrantes	100 – 174	20 – 39	12 - 14	3	75
Cuatro cuadrantes	< 100	< 19	> 14	4	80

+ Pa/O₂ Relación entre la presión parcial de oxígeno en sangre arterial y la fracción inspirada de oxígeno.

* PEEP (por sus siglas en inglés) Presión positiva al final de la espiración. ** Murray y col., 1988

Fuente: Luis Cabezón y col. (9)

cardiovascular, enfermedad renal crónica, comorbilidades metabólicas (efecto conjunto de diabetes, hipertensión y obesidad) (Dessie y Zewotir, 2021).

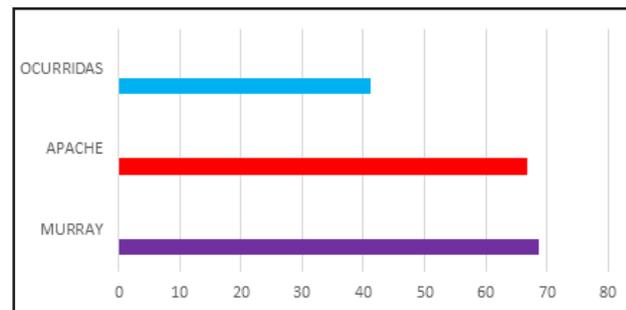
Para finales del año 2021 se logra la vacunación masiva por parte del estado ecuatoriano (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard), a partir del mes de noviembre ingresan pacientes vacunados a la UCI de allí que se buscó determinar el número de pacientes que aun vacunados requirieron el ingreso a la UCI para su asistencia.

Resultados

Desde el 26 de abril del 2020 hasta el 30 de abril del 2022, en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital José María Velasco Ibarra se recibieron un total neto de 181 pacientes con diagnóstico de COVID-19, de los cuales 118 fueron hombres (64,19%) y 63 fueron mujeres (34,80%), de estos pacientes ingresaron 33 indígenas (18,23%), la edad promedio fue 60,3 años con un Pa/Fio₂ promedio al ingreso de 83,3 mmHg.

La cantidad de días promedio de hospitalización fue de 9,41 días, la mortalidad ocurrida alcanzó un 41,26% mientras que la mortalidad de acuerdo

con las escalas de gravedad fueron los siguientes: por la escala de Murray 68,7%, por el score de Apache 66,7% (Figura 1).

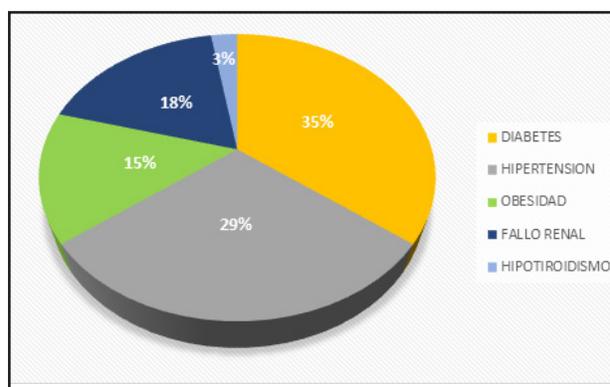


Fuente: Registros clínicos de pacientes

Figura 1. Porcentaje de muertes esperadas vs. ocurridas

Los pacientes ingresaron principalmente provenientes de la misma provincia de Napo, sin embargo, por el colapso de otros centros se recibieron pacientes provenientes de otras provincias Chimborazo 12%, Sucumbíos 4%, Orellana 25%, Tungurahua 17%, Pastaza 21%, Pichincha 21%. Un 10,49% de los pacientes (n= 19) requirieron diálisis en un centro fuera del hospital.

Las comorbilidades más frecuentes que se observaron en la población fueron hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus tipo II, insuficiencia renal aguda, hipotiroidismo y en muchos pacientes desnutrición (Figura 2).



Fuente: Registros clínicos de pacientes

Figura 2. Comorbilidades de los pacientes ingresados con COVID-19

Al final del año 2021 los ingresos en franca disminución se pudo evidenciar un total de 16 pacientes vacunados, de ellos solo 5 contaban con una dosis, fueron 7 pacientes con dos dosis y con tres dosis fueron 4 pacientes (Tabla II), aun así, las comorbilidades fueron causa de deceso en el 37,5% de los pacientes vacunados.

Tabla II

Total de ingresos de pacientes vacunados

Número de dosis	Número de pacientes
1 dosis	5 pacientes
2 dosis	7 pacientes
3 dosis	4 pacientes

Fuente: Registros clínicos de pacientes

Discusión

Históricamente, la población indígena ha mostrado malos indicadores de salud con altas tasas de morbilidad, discapacidad y mortalidad temprana, las cuales están relacionadas con sus propias condiciones sociales, ambientales, geográficas y culturales (Gracey y King, 2009). No ajenos a esta realidad, cerca del 7% del total de la población del Ecuador está constituida por indígenas, y en la provincia Napo

aproximadamente el 56% de la población está integrado por indígenas (The World Bank, 2022), por lo que en este estudio se analizó las características epidemiológicas y demográficas de un total de 181 pacientes ingresados en la UCI desde el 26 de abril del 2020 hasta el 30 de abril del 2022, de los cuales tan solo 33 (18,23%) eran indígenas, lo cual guarda relación con los datos publicados por Ronquillo de Jesús y col., (2022) reportan en un estudio realizado en Méjico, que el 16,6% del total de los pacientes ingresados en UCI eran indígenas; sin embargo, tomando en cuenta el porcentaje de paciente indígenas diagnosticados con COVID-19 publicado en el estudio epidemiológico realizado en Ecuador por Ortiz-Prado y col., (2021), donde la población de estudio difiere considerablemente de la reportada a nivel nacional (18,23 % vs. 7%). Y las diferencias encontradas podrían explicarse por las características y la población incluida en el estudio de Ortiz-Prado, quienes reportan que en términos de etnicidad, los montubios e indígenas autoidentificados tenían una tasa de letalidad del 14% y 9%, respectivamente, que es sorprendentemente más alta que la de los mestizos (6%) y otros grupos étnicos que viven en Ecuador. Esto probablemente se deba a la reducción del acceso a la atención médica para los grupos vulnerables. Para la influenza, las minorías étnicas tienen la tasa de mortalidad estimada más alta, muy probablemente debido a sus determinantes sociales de la salud, las desigualdades sociales y el acceso reducido a la atención médica, especialmente en las zonas rurales.

La mayor parte de la población de estudio en base al sexo fueron hombres 118 (64,19%) en comparación con las mujeres 63 (34,80%), evidenciándose que en la población de estudio la COVID-19 que requirieron ingreso a UCI afecta más a

los hombres en comparación con mujeres (relación estimada hombres *vs.* mujeres 1,8:1), de igual forma el promedio de edad de ingreso fue de 60,3 años, datos que difieren con el estudio publicado por Argoty-Pantoja y col., (2021) en el que se incluyeron un total de 412.017 casos de COVID-19, con un 1,1% de población indígena. En este estudio se demostró que la tasa bruta de letalidad por 1000 personas-semana fue 64,8 % mayor entre los indígenas que entre los no indígenas (29,97 frente a 18,18, respectivamente), y aumentó más del doble entre los pacientes ambulatorios (5,99 frente a 2,64, respectivamente). Evidenciándose una tasa estimada de letalidad de 1:09 en relación de hombres frente a mujeres, respectivamente; sin embargo el promedio de edad guarda cierta relación con este estudio (61,7 *vs.* 60,3).

Uno de los determinantes que marcó la seriedad durante el mayor pico de la pandemia desencadenada por la COVID-19 fue el resultado deficiente y una alta mortalidad, especialmente en las cohortes de pacientes de mayor edad dentro de las UCI reportado en el estudio alemán publicado por Kloka y col., (2022) en el cual se describe una mortalidad del 37%, lo cual dista considerablemente de lo reportado en Francia que a pesar de haber experimentado uno de las crisis sanitarias más álgidas de la pandemia, reportó una mortalidad del 19,7% de los pacientes ingresados en UCI según lo describe Martinot y col. (2021). Estos hallazgos discrepan con los del presente estudio que reporta una mortalidad bruta del 41,6%, lo que constituye una importante diferencia en los indicadores de mortalidad; sin embargo al compararlo con la realidad a nivel de Latinoamérica específicamente en Brasil con mortalidades reportadas entre el 34%

y 47% según da Silvera Moreira (2021) podría asumirse que determinantes como el acceso a los servicios de salud, así como el nivel de ingresos per cápita, así como la asignación de recursos de los gobiernos a los servicios de salud son determinantes importantes en los números netos de mortalidad generados por la pandemia (Chiquete y col., 2022).

La mayor parte de trabajos en los cuales se basa los estudios publicados dentro de la literatura no toman en cuenta la gravedad de la enfermedad durante el ingreso, así como la necesidad de hospitalización por la debilidad en los distintos sistemas de vigilancia de evento centinela que dejan por fuera a una gran cantidad de pacientes asintomáticos, así como aquellos que fallecieron sin diagnóstico molecular lo cual no es factor a consideran en este estudio. De igual forma se puede considerar que la fortaleza del presente estudio está en el tiempo total que se ha logrado cubrir (2 años), lo cual ha permitido considerar que no existe una clara injerencia de la etnia indígena como un determinante de valor claro en morbimortalidad de los pacientes ingresados en UCI.

Dentro de las debilidades que se deben mencionar en el presente estudio, está el tamaño poblacional, así como la característica de unicéntrico, que muy difícilmente pueden ser tomadas como referente para inferir datos estadísticamente sólidos, sin embargo, al ser un centro de referencia regional, constituye un aporte importante para los estudios sucesivos en relación con esta población y esta patología. Se recomienda la realización de estudios que abarquen una mayor población, similares a los tomados en el diseño de este estudio.

Conclusiones

- La mayor parte de la población ingresada que requirieron ingreso a UCI fue la de sexo masculino, cuyas edades superaban los 50 años.
- La etnia indígena no fue un claro determinante de riesgo y mortalidad en los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de esta casa de salud.
- La mortalidad por COVID-19 en esta unidad hospitalaria, guardó ligeras diferencias con el promedio internacional, sin embargo, la misma se mantuvo por debajo de la media a nivel de Latinoamérica para los pacientes de mediana de edad.
- La vacunación masiva produjo una drástica disminución en la tasa de ingresos en la unidad de cuidados intensivos.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés tanto con empresas públicas o privadas.

Referencias bibliográficas

- Actualización de casos de coronavirus en Ecuador – Ministerio de Salud Pública [Internet]. [citado 14 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/actualizacion-de-casos-de-coronavirus-en-ecuador/>
- Argoty-Pantoja AD, Robles-Rivera K, Rivera-Paredes B, Salmerón J. 2021. COVID-19 fatality in Mexico's indigenous populations. *Public Health* 193:69-75. 36(5):e00080020.
- Chiquete E, Alegre-Díaz J, Ochoa-Guzmán A, Toapanta-Yanchapaxi LN, González-Carballo C, Garcilazo-Ávila A, Santacruz-Benitez R, Ramírez-Reyes R, Wong-Chew RM, Guerrero G, Schmulson M, Berumen J, Sandoval-Rodríguez V, Eduardo Ruiz-Ruiz E, Carlos Cantú-Brito C. 2022. Ethnicity and other COVID-19 death risk factors in México. *Arch Med Sci* 18(3):711-8.
- da Silveira Moreira R. 2020. COVID-19: intensive care units, mechanical ventilators, and latent mortality profiles associated with case-fatality in Brazil. *Cad Saude Publica*
- de Luis Cabezón N, Sánchez Castro I, Bengoetxea Uriarte UX, Rodrigo Casanova MP, García Peña JM, Aguilera Celorrio L. 2014. Síndrome de distrés respiratorio agudo: revisión a propósito de la definición de Berlín. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 61(6):319-127.
- Dessie ZG, Zewotir T. 2021. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis* 21(1):855.
- Gracey M, King M. 2009. Indigenous health part 1: determinants and disease patterns. *Lancet Lond Engl* 374(9683):65-75.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei Ch-L, Hui DSC, Du B, Li L-J, Zeng G, Yuen K-Y, Chen R-C, Tang C-L, Wang T, Chen P-Y, Xiang J, Li S-Y, Wang J-L, Liang Z-J, Peng Y-X, Wei L, Liu Y, Hu Y-H, Peng P, Wang J-M, Liu J-Y, Chen Z, Li G, Zheng Z-J, S Qiu S-Q, Luo J, Ye C-J, Zhu S-Y, Zhong N-S, China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. 2020. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382(18):1708-20.
- Kądziołka I, Świstek R, Borowska K, Tyszecki P, Serebnicki W. 2019. Validation of APACHE II and SAPS II scales at the intensive care unit along with assessment of SOFA scale at the admission as an isolated risk of death predictor. *Anaesthesiol Intensive Ther* 51(2):107-11.
- Kloka JA, Blum LV, Old O, Zacharowski K, Friedrichson B. 2022. Characteristics and mortality of 561,379 hospitalized COVID-19 patients in Germany until December 2021 based on real-life data. *Sci Rep* 12(1):11116.
- La Ruche G, Tarantola A, Barboza P, Vaillant L, Gueguen J, Gastellu-Etchegorry M. epidemic intelligence team at InVS, 2009. The 2009 pandemic H1N1 influenza and indigenous populations of the Americas and the Pacific. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 14(42):19366.
- Martinot M, Eyriey M, Gravier S, Bonijoly T, Kayser D, Ion C, Mohseni-Zadeh M, Camara S, Dubois J, Haerrel E, Drouaine J, Kaiser J, C Ongagna JC, Schieber-Pachart A, Kempf C, Centre Alsace COVID-19 Study Group. 2021. Predictors of mortality, ICU hospitalization, and extrapulmonary complications in COVID-19 patients. *Infect Dis Now* 51(6):518-25.

- Murray JF, Matthay MA, Luce LM, Flick MR. 1988. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* (antes *Am Rev Respir Dis*) 138: 720-723.
- Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, Muslin C, Gómez Jaramillo AM, Barba-Ostria C, Cevallos-Robalino D, SanchesSanMiguel H, Unigarro L, Zalakeviciute R, Gadian N, López-Cortés A. 2020. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 98(1):115094.
- Ortiz-Prado E, Simbana-Rivera K, Diaz AM, Barreto A, Moyano C, Arcos V, Eduardo Vásconez-González E, Paz C, Simbaña-Guaycha F, Molestina-Luzuriaga M, Fernández-Naranjo R, Feijoo J, Henríquez-Trujillo AR, Adana L, López-Cortés A, Fletcher I, Lowe R. 2021. Epidemiological, sociodemographic and clinical features of the early phase of the COVID-19 epidemic in Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis* 15(1):e0008958.
- The World Bank. 2022. Indigenous Peoples Overview - Disponible en: <https://www.worldbank.org/en/topic/indigenouspeoples>
- Tuaza Castro LA. 2020. El COVID-19 en las comunidades indígenas de Chimborazo, Ecuador. *Lat Am Caribb Ethn Stud* 15(4):413-24.
- Villar J, Blanco J, Kacmarek RM. 2011. Acute respiratory distress syndrome definition: ¿do we need a change? *Curr Opin Crit Care* 17(1):13-7.
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponible en: <https://covid19.who.int>
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y. 2020. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respiratory Medicine*. *Lancet Respir Med* 8(5):475-481.
- Ronquillo de Jesús E, Suárez V, López-Perea P, Suarez Quezada M, von Borries-Medrano E. 2022. COVID-19 cases, hospitalizations, outpatients, and deaths in Mexico by ethnicity and state-level income. *J Infect Dev Ctries* 16(06):969-80.



Intoxicación por Barbasco (*Lonchocarpus urucu*). Reporte de Caso

Barbasco (*Lonchocarpus urucu*) poisoning. Case Report

ANTONY HIDALGO^{1,*}, MARCO CISNEROS^{2,**}, CARLOS CASTRO^{2,***}, BRAULIO MUÑOZ^{2****},
GABRIELA DOMÍNGUEZ^{2,*****}, JULIANA TORRES^{2,*****}, LUIGI LÓPEZ^{2,*****}

Resumen

El Barbasco (*Lonchocarpus urucu*) es una especie de planta de la familia Fabaceae, que tiene actividad plaguicida contra una amplia variedad de insectos y arácnidos. La rotenona es el compuesto activo del Barbasco. Cuando es ingerido en grandes cantidades, la rotenona tiene baja toxicidad en aves, pero es moderadamente tóxica en ratas. El principal peligro para la salud humana asociado con el uso de rotenona proviene de la inhalación del polvo o el aerosol. Se presenta el caso de un paciente masculino de 27 años, nacido y residente en la ciudad de Tena, provincia de Napo, Ecuador, quien presenta Insuficiencia Respiratoria Aguda, secundaria a Edema Agudo de Pulmón por ingestión deliberada de Barbasco. Las manifestaciones clínicas en el caso clínico que se presenta fueron manifestaciones digestivas seguidas rápidamente de alteraciones de la consciencia y depresión respiratoria secundaria a edema agudo pulmón, cuyo tratamiento fue de soporte de la insuficiencia, por ejemplo, intubación endotraqueal a la insuficiencia respiratoria, medicamentos vasoactivos para la insuficiencia hemodinámica, etc., teniendo como resultado una resolución rápida de la sintomatología.

Palabras clave: Barbasco, Rotenona, Insuficiencia Pulmonar aguda

Abstract

Barbasco (*Lonchocarpus urucu*) is a plant species of the Fabaceae family, which has pesticidal activity against a wide variety of insects and arachnids. Rotenone is the active compound of Barbasco. When ingested in large quantities, rotenone has low toxicity in birds, but is moderately toxic in rats. The main human health hazard associated with the use of rotenone comes from inhalation of the dust or aerosol. Is presented a case of a 27-year-old male patient, born and resident in the city of Tena, province of Napo, Ecuador, who presents Acute Respiratory Failure, secondary to Acute Pulmonary Edema due to deliberate ingestion of Barbasco. The clinical manifestations that is presented were digestive manifestations quickly followed by alterations of consciousness and respiratory depression secondary to acute pulmonary edema, whose treatment was to support the insufficiency, for example, endotracheal intubation for respiratory failure, medications vasoactive agents for hemodynamic failure, etc., resulting in rapid resolution of symptoms.

Keywords: Barbasco, Rotenone, Acute Pulmonary Insufficiency

1. Médico Tratante. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. 2. Médico Residente. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. Correspondencia: hidalgotony@gmail.com

Orcid: [0000-0002-7283-7745](https://orcid.org/0000-0002-7283-7745)*

Orcid: [0000-0002-8581-1034](https://orcid.org/0000-0002-8581-1034)**

Orcid: [0000-0003-2321-1786](https://orcid.org/0000-0003-2321-1786)***

Orcid: [0000-0001-8907-8645](https://orcid.org/0000-0001-8907-8645)****

Orcid: [0000-0002-0251-6137](https://orcid.org/0000-0002-0251-6137)*****

Orcid: [0000-0002-0279-4268](https://orcid.org/0000-0002-0279-4268)*****

Orcid: [0000-0002-2511-1650](https://orcid.org/0000-0002-2511-1650)*****

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.14](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.14)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 11/07/2022

Aprobación: 04/11/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 147-152. 2022

Introducción

El Barbasco (*Lonchocarpus urucu*) es una especie de planta de la familia Fabaceae, del género *Denis* y *Lonchocarpus*, nativa de las selvas tropicales de Paraguay, Perú, Brasil, Colombia, Guyana, Venezuela, y Ecuador en hábitats desde 100 a 1800 msnm. Los aborígenes de la Amazonía utilizan las raíces del Barbasco para pescar en los ríos, arroyos o lagos. La técnica consistía en machacar las raíces de estas plantas y echarlas al agua. Luego de un periodo de tiempo, los peces aparecían ahogados, flotando en la superficie, para ser recogidos y utilizados en la alimentación, sin producir efecto tóxico en los humanos (Alarco, 1988) (Figura 1).



Figura 1. Planta de Barbasco (*Lonchocarpus urucu*)

La planta de Barbasco tiene actividad plaguicida contra una amplia variedad de insectos y arácnidos que se encuentran en la horticultura doméstica y comercial en frutos de arbustos y vid, árboles frutales, árboles de sombra, flores, arbustos y hortalizas (Ray, 1991).

La rotenona es el compuesto activo en los insecticidas orgánicos, es un pesticida relativamente seguro que se puede utilizar en la agricultura y en la cría de animales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la rotenona, junto con la piretrina, otro insecticida orgánico de uso doméstico común, como moderadamente

perigoso: está categorizado en un nivel 3 en una escala de 1 (más tóxico) a 4 (menos tóxico). Cuando es ingerido en grandes cantidades, la rotenona tiene baja toxicidad en aves, pero es moderadamente tóxica en ratas. El principal peligro para la salud humana asociado con el uso de rotenona en la administración de la pesca (y en la investigación) proviene de la inhalación del polvo o el aerosol, lo cual puede prevenirse utilizando respiradores (Robertson y Smith-Vaniz, 2018).

Al respecto se reporta un caso de Insuficiencia Respiratoria Aguda, secundaria a Edema Agudo de Pulmón por ingestión deliberada de Barbasco (rotenona), cuya especie de planta es característica de esta región y es usada para la pesca con lo cual es un producto de fácil acceso para la población nativa de esta región y es utilizada también en casos de intento autolítico. El caso fue tratado en la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena provincia de Napo.

CASO CLÍNICO

Se presenta el caso de un paciente masculino de 27 años, nacido y residente en la ciudad de Tena, provincia de Napo, Ecuador. De estado civil casado, autoidentificación etnia indígena, teniendo como antecedente patológico de importancia, diagnóstico previo de trastorno depresivo menor en seguimiento y manejo por parte de psicología, sin más referencia tanto de antecedentes quirúrgicos o familiares de importancia, que ingresa en septiembre del 2021 al establecimiento de salud por servicio de emergencia por intento autolítico con rotenona derivada de sustancia herbácea (barbasco//cube), teniendo como causa probable, según

referencia de familiar (hermana), disputa familiar. Dicha sustancia provoca deterioro progresivo del estado de consciencia por lo cual es movilizado por personal de atención prehospitalaria. Al momento de ingreso a emergencia, presentó los siguientes signos vitales: Frecuencia cardiaca: 90 latidos por minuto, frecuencia respiratoria: 11 respiraciones por minuto, saturación de oxígeno (Sat. O₂): 90%, con apoyo de mascarilla con reservorio a 15 litros, presión arterial de 67/45 mmHg. Durante la exploración física inicial de emergencia es relevante mencionar el importante deterioro del estado de consciencia reflejado en 8/15 puntos en la escala de coma de Glasgow (ECG) dado por ocular 1, verbal 2, motor 5, mismo que compromete la integridad de la vía aérea que ameritó intubación orotraqueal con subsecuente ventilación mecánica invasiva, así como nivel respiratorio como pertinentes positivos de relevancia resalta la presencia de crepitantes bilaterales, basales durante la auscultación que se corroboran con presencia de infiltrado para hilar difuso bilateral en radiografía de tórax pleuropulmonar (Figura 2). Finalmente, a nivel hemodinámico presenta hipotensión sostenida a pesar de amplia reanimación hídrica que ameritó uso de amina vasoactiva (Norepinefrina), para mantener cifras tensionales que garanticen perfusión de órgano diana.



Figura 2. Radiografía de tórax al ingreso, denota infiltrado para hilar bilateral.

Los exámenes paraclínicos reportaron leucocitos 13,2 K/ μ L, neutrófilos del 61%, linfocitos del 39%, basófilos del 2%, eosinófilos del 0,8%, hemoglobina 16 g/dL, hematocrito: 51%, plaquetas 318000, glucosa 119 mg/dL, urea 12 mg/dL, creatinina 0,76 mg/dL, glutamato-piruvato transaminasa (GPT) 106 U/L, glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) 117 U/L, panel de drogas en orina negativo. La gasometría arterial reportó pH 7,12, PO₂ 275 mmHg, PCO₂ 25,8 mmHg, lactato 16 mmol/L, HCO₃ 10,3 mmol/L, exceso de base -19, relación entre la presión de oxígeno arterial y la fracción inspirada de oxígeno (PaO₂/FiO₂) 620 mmHg. Bajo este contexto se solicita valoración a Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Permanece en terapia intensiva por 3 días, tiempo en el cual los requerimientos de administración de medicamento vasoactivo disminuyeron progresivamente una vez estabilizado y modificado parámetros de soporte ventilatorio. Se indica antibiótico por probable neumonía por aspiración secundaria al compromiso neurológico antes mencionado, sin embargo, desde su ingreso y durante su estancia en la UCI, el paciente no presenta alzas térmicas, así como marcadores de respuesta inflamatoria sistémica (leucocitosis, taquicardia o taquipnea) o demás biomarcadores de proceso séptico activo (procalcitonina). Se realiza radiografía de control (Figura 3), en la cual se evidencia disminución de infiltrado pulmonares, además de bajos parámetros de soporte ventilatorio dado por una baja fracción inspirada de oxígeno (FiO₂): 30%, volumen corriente de 350 mL, calculado a 8 mL/kg de peso ideal, flujo: 40, PEEP: 5 cmH₂O y adecuado patrón de distensibilidad pulmonar evidenciado por presión pico: 21 cmH₂O, presión meseta: 13

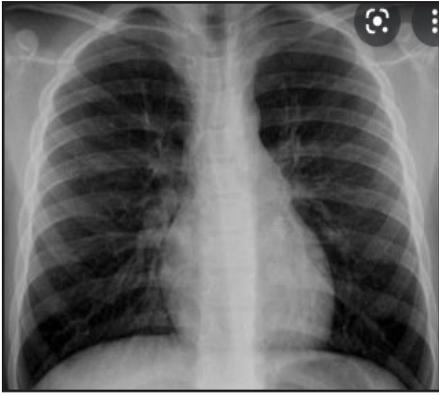


Figura 3. Radiografía de tórax, 48 horas posterior al inicio de cuadro clínico.

cmH₂O, compliance dinámica: 51 cmH₂O, por lo que tomando en cuenta evolución clínica y resolución radiológica tras 24 horas de instaurado el cuadro, como edema agudo de pulmón secundario a ingestión accidental de Barbasco.

Tras 48 horas de intubación y soporte ventilatorio invasivo, el paciente evoluciona favorablemente y permite retiro progresivo del soporte ventilatorio con subsecuente extubación exitosa, y es dado de alta de la unidad.

Discusión

El envenenamiento con el pesticida Barbasco (Rotenona) de origen vegetal en las regiones de la Amazonia Ecuatoriana para nada es infrecuente, aunque no hay estudios epidemiológicos de su incidencia, pero es relativamente común observarlos y sus efectos son fatales si no son atendidos de una manera urgente. La ingestión humana de rotenona y rotenoides en concentraciones bajas es relativamente atóxica y causa síntomas gastrointestinales leves como náusea, vómitos, mientras que concentraciones altas pueden provocar neurotoxicidad observada como convulsiones, coma e insuficiencia

respiratoria (Wood y col., 2005). El modo de muerte reportado en una paciente joven fue insuficiencia cardiopulmonar y la necropsia mostró hemorragias en la submucosa gástrica, pulmones, corazón y timo, derrame pleural serohemorrágico y ascitis, congestión renal yuxtamedular y daño cerebral hipóxico (De Wilde y col., 1983), la característica significativa de la necropsia fue la hepatotoxicidad severa sin el componente hemorrágico (Patel, 2011).

En el caso que se presenta, el paciente llegó luego de la ingestión deliberada de Barbasco posterior a discusión familiar presentando inmediatamente insuficiencia respiratoria con necesidad de aporte de O₂ suplementario, disminución de la escala de Glasgow, acidosis metabólica e hipotensión por lo que fue necesario asegurar la vía aérea e ingresarlo a la Unidad de Terapia Intensiva

La rotenona es un tóxico metabólico altamente específico que afecta la respiración celular aeróbica, bloqueando el transporte de electrones mitocondriales al inhibir la NADH ubiquinona reductasa (Singer y Ramsay, 1994). Los efectos de la rotenona son, por tanto, similares a los producidos por otros tóxicos que afectan el transporte de electrones o la fosforilación oxidativa, incluyendo antimicina, cianuro y dinitrofenol. La captación celular de oxígeno se bloquea y la producción de energía celular en forma de nucleósidos trifosfatos se reduce considerablemente. En los peces envenenados con rotenona, la captación celular reducida de oxígeno sanguíneo da como resultado un aumento de la PO₂ sanguínea, mientras que los aumentos compensatorios en el metabolismo anaeróbico celular y la producción asociada de ácido láctico provocan acidosis sanguínea (Fajt y Grizzle,

1998). La muerte se produce por anoxia tisular, especialmente insuficiencia cardíaca y neurológica (Ling, 2005).

La rotenona es un compuesto activo derivado de las raíces Derris o ñame del género *Lonchocarpus* (Fabaceae) (Sweetman, 2005). En 1848, se usó como veneno para peces para exterminar orugas que comen hojas, así como para envenenar puntas de flecha en el sudeste asiático y América del Sur durante siglos (Ling, 2005). Fue aislado por el botánico francés Geoffroy en 1895, y en 1902 fue aislado como un compuesto cristalino puro de roten (nombre japonés para *Derris elliptica*) por el químico japonés Nagai que lo llamó rotenona.

La rotenona es altamente tóxica para los organismos acuáticos. Las dosis letales de rotenona son 300-500 mg/kg para un adulto, 143 mg/kg para un niño y 132 mg/kg para ratas (Patel, 2011). La rotenona está clasificada como un agente de clase II (moderadamente peligroso) por la OMS (Patel, 2011). Los síntomas tóxicos de la intoxicación aguda van desde náuseas, vómitos rápidos, entumecimiento, temblores, descoordinación, convulsiones, depresión del sistema nervioso central, dificultad respiratoria, bradicardia, arritmia, emesis, somnolencia, respiración irregular y lenta hasta coma, anuria, acidosis, insuficiencia cardiopulmonar, paro respiratorio, convulsiones y muerte (OMS, 2009). No existe un antídoto específico, pero la intoxicación humana por rotenona puede tratarse mediante lavado gástrico y tratamiento con carbón activado. N-acetilcisteína, antioxidantes (tocoferol y coenzima Q10) aunque ninguno de estos tiene evidencia probada de tratamiento (OMS, 2009).

Las manifestaciones clínicas en el caso que se presenta fueron similares a las reportadas en la literatura después de intoxicaciones por rotenona o rotenoides: manifestaciones digestivas seguidas rápidamente de alteraciones de la consciencia y depresión respiratoria secundaria a edema agudo pulmón, cuyo tratamiento fue de soporte de las insuficiencias, por ejemplo, intubación endotraqueal para la insuficiencia respiratoria, medicamentos vasoactivos para la insuficiencia hemodinámica, etc., teniendo como resultado una resolución rápida de la sintomatología. Cabe señalar que en ningún caso de este tipo de envenenamiento nuestra unidad a utilizado N-acetilcisteína como antioxidante.

Referencias bibliográficas

- Alarco de Zadra A. Perú. El libro de las plantas mágicas. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología. CONCYTEC. Lima, 1988.
- De Wilde A, Heyndrickx A, Carton D. 1986. Un caso de envenenamiento fatal con rotenona en un niño. *J Ciencia Forense* 31:1492mi8.
- Fajt JR, Grizzle JM. 1998. Blood respiratory changes in common carp exposed to a lethal concentration of rotenone. *Transactions of the American Fisheries Society* 127: 512-516.
- The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Disponible: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44271>
- Ling N. 2003. Rotenona: una revisión de su toxicidad y uso para la ordenación pesquera. *Ciencia para la Conservación*. Publicado por Departamento de Conservación PO Box 10-420 Wellington, Nueva Zelanda.
- Patel F. 2011. Pesticidal suicide: Adult fatal rotenone poisoning. *J Forensic Leg Med* 18(7):340-2.
- Ray DE. 1991. Plaguicidas derivados de plantas y otros organismos. En *Manual de toxicología de plaguicidas* Editado por: Hayes WJ Jr, Laws ER Jr. Nueva York, NY: Academic Press 2-3.
- Robertson RD, Smith-Vaniz WF. 2008. ROTENONA: Una herramienta esencial pero difamada para la

- evaluación de la diversidad de los peces marinos. FO-RUM. *BioScience* 58(2): 165-171.
- Singer TP, Ramsay RR. 1994. The reaction site of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187:198-202.
- Sweetman SC. 2004. *Martindale: The Complete Drug Reference*, 34th Edition 34th. The Pharmaceutical Press: London. 1510.
- Wood DM, Alshaf H, Streete P, Dargan PI, Jones AL. 2005. Muerte después de la ingestión deliberada del pesticida rotenona: reporte de un caso. *Crit Care* 9: R280-R284.

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.