

Serrapeptasa como coadyuvante anti-inflamatorio posterior a trauma quirúrgico. Estudio experimental

Serrapeptase as an anti-inflammatory adjuvant after surgical trauma. Experimental study

Linda Rincón-Rubio¹, Bernardette Gil-Masroua², Marisela Cemborain-Valarino³, Angelique Bookaman-Salazar⁴, Katiana Gutiérrez Barroso⁵, Carlos Ciangherotti Franco⁶, Enrique López-Loyo⁷

RESUMEN

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son muy efectivos para controlar la inflamación y el dolor, pero son lesivos en la mucosa gástrica y en promover el sangrado. En la búsqueda de una alternativa terapéutica mediante el uso de enzimas proteolíticas y antiinflamatorias, en este estudio se evaluó el efecto antiinflamatorio de la serrapeptasa (serratiopeptidasa) versus AINES. Se presenta un estudio experimental, comparativo, transversal, de casos y controles. La muestra está constituida por 10 ratas

de la cepa Sprague-Dawley, a las cuales se les realizó liposucción en el dorso y se le administró tratamiento antiinflamatorio, evaluando y comparando tolerancia, edema local, tiempos de coagulación, características histológicas y estrés oxidativo y nitrosativo. Un grupo fue tratado con la enzima proteolítica y otro con antiinflamatorios no esteroideos. Los resultados demuestran que en el grupo con AINES se produjo una prolongación de los tiempos de coagulación, la inflamación es intersticial, la fibrosis es leve y en cuanto al metabolismo celular, no logra retornar a su estado normal o de reposo; en cambio; en el grupo con serrapeptasa, no hubo prolongación de los tiempos de coagulación, la inflamación es perianaxial, lo que induce una reparación fisiológica, la fibrosis

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2023.131.3.10>

ORCID: 0005-0005-3780-9692¹
ORCID: 0009-0006-7027-2425²
ORCID: 0009-0001-2387-0012³
ORCID: 0009-0003-6974-2969⁴
ORCID: 0009-0003-9211-5437⁵
ORCID: 0000-0003-3760-8645⁶
ORCID: 0000-0002-3455-5894⁷

¹Cirujano plástico, reconstructivo y posbariátrico. Directora de la Unidad de Cirugía Plástica y Posbariátrica. Caracas, Venezuela.

²Cirujano plástico, reconstructivo posbariátrico. Adjunto de la Unidad de Cirugía Posbariátrica. Caracas, Venezuela.

³Cirujano plástico, reconstructivo y posbariátrico. Subdirectora de la Unidad de Cirugía Posbariátrica. Caracas, Venezuela.

⁴Cirujano plástico, reconstructivo posbariátrico. Adjunto de la Unidad de Cirugía Plástica y Posbariátrica. Caracas, Venezuela.

⁵Cirujano plástico, reconstructivo posbariátrico. Adjunto de la Unidad de Cirugía Plástica y Posbariátrica. Caracas, Venezuela.

⁶Farmacéutico. Doctor en Ciencias. Laboratorio de Neuropeptidos, Jefe del Departamento de Ciencias Biológicas y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

⁷Médico Patólogo, Doctor en Ciencias Médicas, Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Urológico San Román, Caracas. Venezuela.

Correspondencia: Linda Rincón-Rubio. Unidad de Cirugía Plástica y Posbariátrica. Caracas, Venezuela. E-mail: plasticabariatrica@gmail.com

Recibido: 19 de agosto 2023
Aceptado: 23 de agosto 2023

es moderada asegurando promoción del colágeno y en cuanto al metabolismo celular, se logra en menor tiempo que retorne a su estado normal o de reposo. Nuestros hallazgos indican que la serrapeptasa tiene características antiinflamatorias y de analgesia. Realiza una reparación fisiológica a nivel celular, con promoción del colágeno controlando la inflamación, logrando un equilibrio de homeostasis entre el estrés oxidativo y nitrosativo, convirtiéndolo en un cicatrizante natural.

Palabras clave: *Liposucción, agentes anti-inflamatorios, estrés oxidativo, estrés nitrosativo.*

SUMMARY

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are very effective in controlling inflammation and pain, but they are harmful to the gastric mucosa and promote bleeding. In the search for a therapeutic alternative using proteolytic and anti-edematous enzymes, in this study, the anti-inflammatory effect of serrapeptase (Serratia peptidase) versus NSAIDs was evaluated. An experimental, comparative, cross-sectional, case-control study is presented. The sample consisted of 10 rats of the Sprague-Dawley strain, to which liposuction was performed on the back and anti-inflammatory treatment was administered, evaluating and comparing tolerance, local edema, coagulation times, histological characteristics, and oxidative and nitrosative stress. One group was treated with the proteolytic enzyme and the other with non-steroidal anti-inflammatory drugs. Our results demonstrate that in the group with NSAIDs, there was a prolongation of the coagulation times, the inflammation is interstitial, the fibrosis is mild and in terms of cellular metabolism, it cannot return to its normal or resting state; instead; in the group with serrapeptase, there was no prolongation of coagulation times, inflammation is periadnexal, which induces physiological repair, fibrosis is moderate, ensuring promotion of collagen and in terms of cell metabolism, it is achieved in less time than return to its normal or resting state. Our results indicate that serrapeptase has anti-inflammatory and analgesic characteristics. It performs physiological repair at the cellular level, promoting collagen, controlling inflammation, and achieving a balance of homeostasis between oxidative and nitrosative stress, making it a natural healing agent.

Keywords: *Liposuction, anti-inflammatory agents, oxidative stress, nitrosative stress.*

INTRODUCCIÓN

Todo traumatismo ejercido sobre los tejidos genera diferentes tipos de mecanismos que biológicamente el organismo activa para intentar contener y reparar el daño. Existe el traumatismo accidental y también el traumatismo o trauma quirúrgico. Podemos clasificar los traumatismos en: mecánicos tales como contusiones, heridas, fracturas y cirugías, en físicos como el calor, frío, electricidad y radiaciones) y los traumatismos químicos. Una vez que el agente traumático se manifiesta, la energía que produce en el sitio activa una respuesta local que se traduce en “inflamación” por los diversos mediadores bioquímicos locales que se activan. Dependiendo del tipo e intensidad del trauma, la respuesta puede ser sistémica y presentarse entonces manifestaciones clínicas diversas (1).

La inflamación aguda constituye una respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca. Luego de una lesión celular, comienza una cascada compleja de interacciones bioquímicas y celulares, mediadas por la actividad de múltiples agentes bioquímicos, que provocan cambios en la microvasculatura, así como un aumento de leucocitos en la zona de la lesión, y finalmente los signos de la respuesta inflamatoria aguda. Un mediador importante que aparece en el sitio lesionado es el óxido nítrico (NO), liberado en este caso por células endoteliales en respuesta al estímulo lesivo. Su acción principal es la vasodilatación a través de la relajación del músculo liso vascular. Además de las células endoteliales es también producido por neuronas específicas y macrófagos. El NO se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y otros cofactores, por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS endotelial es activada rápidamente por el aumento del calcio citosólico (2).

Los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) son moléculas muy reactivas que pueden reaccionar con las macromoléculas de la célula y provocarle un daño irreversible. Cuando en la célula ocurre un desequilibrio entre agentes prooxidantes y

sistemas antioxidantes, se genera un proceso conocido como estrés oxidativo y estrés nitrosativo, que se distingue por exceso de especies reactivas llamadas radicales libres (principalmente derivadas del oxígeno y del nitrógeno), o por la disminución en los mecanismos de eliminación de radicales libres, llamados antioxidantes. El estrés oxidativo mediante la reducción de moléculas antioxidantes o por la modificación de la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa, puede detectarse en la célula a través de la cuantificación de los productos de las reacciones oxidativas que tienen los radicales libres con las macromoléculas como son los lípidos, las proteínas, los ácidos grasos, los carbohidratos y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), que son capaces de dañar su estructura y su función biológica (3). La peroxidación lipídica ocurre en las membranas biológicas, como las membranas celulares, las mitocondriales y el retículo endoplásmico. Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas biológicas son especialmente vulnerables a la oxidación debido a que tienen en su estructura dobles enlaces de tipo C=C, lo que hace que sean extremadamente sensibles a la agresión de los radicales libres derivados del oxígeno y las especies reactivas no radicales. El proceso que resulta del ataque a los lípidos de membrana por parte de los radicales libres derivados del oxígeno se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación y tiene como producto final al malondialdehído (MDA). Durante el estrés oxidativo la catalasa estará disminuida y la peroxidación lipídica aumentada (2).

La acción oxidativa del óxido nítrico y el hecho que puede formar un oxidante altamente poderoso como el peroxinitrito (ONOO^-) al unirse con el radical O_2^- , se ha vinculado invariablemente al estrés oxidativo con el estrés nitrosativo, que es un término que denota el exceso de radicales libres derivados del nitrógeno. Debido a que los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno se originan naturalmente durante los procesos metabólicos de la célula; ésta ha desarrollado diversos mecanismos de protección que previenen su formación o promueven la detoxificación como los antioxidantes. Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por interacción y estabilización de especies reactivas o por la

transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida. Los antioxidantes representan un grupo variado de elementos que tienen una función homeostática de gran importancia, como es el control de las concentraciones fisiológicas de radicales libres, manteniéndolos por debajo de sus umbrales citotóxicos. Los antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grandes grupos de moléculas: a) las que tienen una estructura compleja y elevado peso molecular, que constituyen el grupo de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales actúan en sincronización para reducir o eliminar eficientemente a los radicales libres y transformarlos en agua y oxígeno mediante la peroxidación; y b) antioxidantes de menor tamaño y peso molecular, entre los que se encuentran: vitaminas E y C, glutatión reducido (GSH), ácido úrico, carotenos, compuestos fenólicos, entre otros (2,3).

El método de Griess es una prueba química que detecta la presencia de nitritos orgánicos (óxido nítrico). El nitrito es detectado de una muestra que contenga NO_2^- (ion nitrito) con el reactivo de Griess. Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio y cuando se agrega la α -naftilamina, se desarrolla un color rosado siendo positiva la prueba (4). El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa que usa una curva de calibración de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer. Consiste en dos reacciones: 1. Reacción de Biuret: formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) siendo la reacción bastante específica y la turbidimetría mide la turbidez resultante de la precipitación de las proteínas. Se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo, en suero). 2. Reacción de Folin: característica de los grupos $-\text{OH}$ reductores de los aminoácidos tirosina y triptófano que, junto con los complejos Cu^{+2} , reducen el reactivo de Folin generando un color azul (5). Una de las técnicas para determinar

la actividad enzimática de la catalasa (CAT) es la espectrofotométrica. El método de Aebi se fundamenta en la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por la enzima catalasa en buffer fosfato 50 mM pH 7,0 a 240 nm durante 1 minuto, expresada en: U CAT/mg proteína. Para determinar la actividad de la enzima se cuantifica en base a las diferencias en la disminución de la absorbancia por unidad de tiempo, debido a la disminución de H_2O_2 con respecto a una muestra con blanco (6,7).

Cuando ejercemos un trauma quirúrgico tratamos de minimizar las consecuencias tanto locales como sistémicas, sin embargo, siempre aparecerán efectos adversos que deben ser tratados durante el periodo trans y post operatorio. Durante la cirugía se puede controlar la respuesta local y sistémica con una dosis única de esteroides y durante el post operatorio se utilizan comúnmente medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Los AINES son muy efectivos para controlar la inflamación y el dolor, pero el mismo mecanismo de acción que los hace potentes, los hace lesivos en la mucosa gástrica y en promover el sangrado. El mecanismo de acción de los AINES consiste en bloquear varias enzimas que son responsables de producir "prostaglandinas" y las prostaglandinas justamente se producen como respuesta biológica ante el trauma. Al bloquear todas las enzimas (COX, COX-1 y COX-2), se bloquean las prostaglandinas que promueven el dolor, la fiebre y la inflamación, pero también se bloquean las prostaglandinas que protegen la mucosa gástrica y las plaquetas (enzima COX-1). Por ello su uso puede ocasionar lesión de la mucosa gástrica y sangramiento (8).

En cirugía plástica cuando se ejerce un trauma quirúrgico a través de heridas, es posible controlar a visión directa la coagulación, se puede preservar estructuras selectivamente, por ejemplo; la fascia y así preservar los linfáticos y favorecer el drenaje local. Igualmente se pueden enfriar los tejidos con soluciones frías y se puede usar puntas no conductoras para disminuir el calor que emite la punta de electrocauterio. Todo ello puede favorecer y controlar al agente traumático. Sin embargo, ante un trauma cerrado, como lo es la liposucción, donde sin tener un campo quirúrgico abierto, se ejerce energía traumática no controlada, se hace más difícil minimizar el efecto local de respuesta. Existen métodos diversos para

realizar la lipoescultura que minimizan la energía traumática, sin embargo, en menor o mayor grado la inflamación, las equimosis y los hematomas, aparecen. El uso de AINES para controlar esos síntomas en este tipo de trauma asociado a lipoescultura no es tan efectivo. Sumando los posibles efectos adversos, nos pueden resultar más perjudiciales que beneficiosos (9). Por otro lado, el uso de esteroides como antiinflamatorio en el post operatorio de manera sistemática, traería también más efectos adversos que sumarían más complicaciones en el paciente. En la búsqueda de alternativas terapéuticas, se encontró que existen enzimas proteolíticas y antiedematosas, provenientes del gusano de seda, para uso médico en cirugías maxilofaciales, otorrinolaringología y traumatología, principalmente en Europa y China desde los años 70 (10,11). La serrapeptasa o serratia peptidasa, es una proteasa con función de enzima proteolítica, obtenida de enterobacterias no patógenas del género *Serratia*, familia Enterobacteriaceae. Es una proteína y endopeptidasa natural, con un peso molecular de 60 daltons. La serrapeptasa modula proteínas específicas de la fase aguda del proceso inflamatorio, actuando sobre tejido dañado o muerto no sobre tejido sano (12).

El mecanismo de acción es reducir la respuesta de C3 y C4 del complemento, incrementar la opsonización de las proteínas (alfa-H5-glicoproteína), reduciendo las concentraciones de haptoglobina, que es una proteína captadora que inhibe la proteasa lisosómica. Se une a las macroglobulinas plasmáticas para transportarse hacia la zona donde exista el proceso de daño tisular y disminuye los procesos locales que generan "inflamación", sin afectar tejido sano. Otra importante característica de la serratia peptidasa es su efecto sobre el dolor, la enzima actúa inhibiendo la liberación de aminas inductoras de dolor, como la bradicinina del tejido inflamado (10,11). Por lo tanto, puede ofrecer ventajas importantes que nos pueden aportar beneficios en el manejo post quirúrgico del dolor y la inflamación. Esta peptidasa induce fragmentación de agregados de fibrina y reduce la viscosidad de los exudados, facilitando así el drenaje de estos productos de la respuesta inflamatoria y promoviendo así el proceso de reparación de tejidos, con una resolución rápida del proceso inflamatorio (11,13,14).

Es importante ofrecerle al paciente un postoperatorio adecuado en cuanto a las variables que podamos controlar. El edema posterior al trauma quirúrgico después de liposucción trae como consecuencia diversos grados de respuesta inflamatoria como mecanismos biológicos normales que debemos ayudar a minimizar para una mejor y más rápida recuperación del paciente. Por lo tanto, en el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia y tolerabilidad de la Serratia Peptidasa (serrapeptasa) comparada con el uso de antiinflamatorios no esteroideos y con controles, en el tratamiento de procesos inflamatorios posterior a la realización de liposucción, en un modelo experimental con ratas de la cepa *Sprague-Dawley*. Para ello se procedió a 1. Observar la tolerancia en el uso por vía oral, de la serrapeptasa, de antiinflamatorios no esteroideos y controles en la simulación de un proceso inflamatorio quirúrgico, en modelos experimentales; Medir el desarrollo del edema local, evaluando el cambio de volumen y peso en los tres grupos experimentales, 3. Evaluar y comparar los tiempos de coagulación de los 3 grupos experimentales; 4. Analizar las características histológicas de los grupos; 5. Evaluar el estrés oxidativo y estrés nitrosativo mediante la cuantificación de marcadores bioquímicos en los 3 grupos experimentales.

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO Y MUESTRAS

Se trata de un estudio experimental, comparativo, transversal, de casos y controles. La muestra está compuesta por 10 ratas de la cepa *Sprague-Dawley* con peso entre 300 y 650 g, a las cuales se realiza liposucción en el dorso y se les administra tratamiento antiinflamatorio, dividiendo la muestra en 3 grupos: grupo 1 control, grupo 2 tratados con AINES y grupo 3 tratados con serrapeptasa. Este estudio fue realizado en el Instituto de Cirugía Experimental del Instituto Anatómico José Izquierdo en la Universidad Central de Venezuela, entre enero y diciembre 2020.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 11 ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, 8 experimentales y 2 control basal, las cuales fueron colocadas individualmente en jaulas de ratas, y recibieron alimento aglutinado de pastillas medianas para perros (Figura 1).

Se emplearon tablas quirúrgicas, envoplast, material médico-quirúrgico, cánulas #1,8, caja



Figura 1. Disposición de los animales de experimentación.

de instrumental de cirugía menor, solución fisiológica, cefarcaína al 1%, pentotal sódico 5 mg, hojillas de bisturí #15, yodopovidona, suturas no absorbibles de nylon 3-0, inyectoras

descartables de 3 mL, agujas 21G y 23G, punch miltex #3 mm, urolab, nevera, estufa (marca Memmert GmbH + Co. KG®, Büchenbach, Germany).

SERRAPEPTASA COMO COADYUVANTE ANTI-INFLAMATORIO

Lo analgésicos usados fueron:

Diclofenac sódico (suspensión 1,8mg/mL) (0,5 mg/kg BID):

$$1.1. 0,5 \text{ mg} \times 300 \text{ g} / 1000 \text{ g} = 0,2 \text{ mg}.$$

1.2. $0,2 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} / 1,8 \text{ mg} = 0,1 \text{ mL BID OD}$ por 10 días.

- Serrapeptasa conservada a 22°C (suspensión 200 mg/20 000 UI–1 mg/100 UI). 2 concentraciones:

2.1: (5 mg/kg):

$$a. 100 \text{ UI} \times 5 \text{ mg} / 1 \text{ mg} = 500 \text{ UI/kg}.$$

b. $0,300 \text{ kg} \times 500 \text{ UI} / 1 \text{ kg} = 0,5 \text{ mL} / 150 \text{ UI OD}$ por 10 días.

2.2: (10 mg/kg):

$$a. 100 \text{ UI} \times 10 \text{ mg} / 1 \text{ mg} = 1 000 \text{ UI/Kg}.$$

b. $0,300 \text{ kg} \times 1 000 \text{ UI} / 1 \text{ kg} = 1 \text{ mL} / 300 \text{ UI OD}$ por 10 días.

PROCEDIMIENTO

Ratas *Sprague-Dawley* fueron sometidas a simulación de liposucción con 200 pasadas de la cánula, conectada a inyectoras de 20 mL con tranca, en el dorso de estas. Posteriormente se procedió a la administración de antiinflamatorios dividido en 3 grupos:

Grupo 1: control - 2 ratas sin administración de antiinflamatorios (1 C y 2 C).

Grupo 2: 2 ratas a las cuales se le administró Diclofenac Sódico, vía oral, a dosis de 0,2 mL OD x 10 días (3 D y 4 D).

Grupo 3: 6 ratas a las cuales se les administró Serrapeptasa vía oral, subdividido en grupo 2 grupos: S5 y S10. El grupo 3 S5 consta de 3 ratas con dosis de 150 UI OD (0,5 mL) por 10 días (5 S5, 6 S5, 7 S5) y el grupo 3 S10 consta de 3 ratas con dosis de 300 UI OD (1 mL) por 10 días (8 S10, 9 S10, 10 S10). La rata número 11 es usada para la biopsia control de tejido sin trauma ni tratamiento alguno.

El estudio se lleva a cabo en IV etapas:

Etapa I: Día cero.

Se pesaron las 10 ratas (Figura 2) y se midió la circunferencia abdominal pre y postoperatoria con cinta métrica a 8 cm de distancia desde la región retroauricular (Figura 3).

Previo anestesia por vía intraperitoneal con pentotal sódico con una dosis calculada a 0,1 mg/100 g (Figura 4), se rasuró el dorso de las ratas 4 cm horizontal x 3 cm vertical siendo ésta el área quirúrgica en donde se realizó la liposucción (Figura 5).

Bajo medidas de asepsia y antisepsia con yodopovidona, en las 10 ratas se infiltró 4 mL de solución fisiológica con 0,1 de lidocaína al 1%, se esperó 5 minutos, luego se procedió a realizar la liposucción del dorso con cánula #1,8, mediante 200 pasadas de la cánula (50 por cuadrante) y cierre con sutura nylon 3.0 no absorbible (Figura 6). En la rata número 11 (control basal) se tomó una muestra en el dorso para estudio histológico sin trauma. Finalmente, a las 10 ratas de la muestra se les realizó biopsia con punch 3mm (Íntegra®-Miltex®, Fisher Scientific Lab, USA) del tejido post-trauma inmediato (liposucción) (Figura 7).



Figura 2. Proceso obtención del peso.

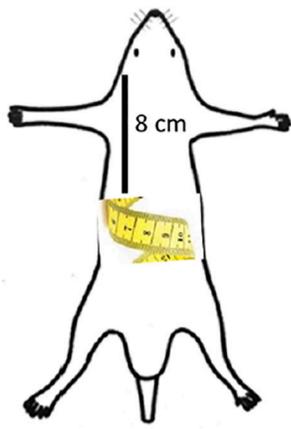


Figura 3. Medición de circunferencia abdominal.



Figura 4. Administración de anestesia por vía intraperitoneal.

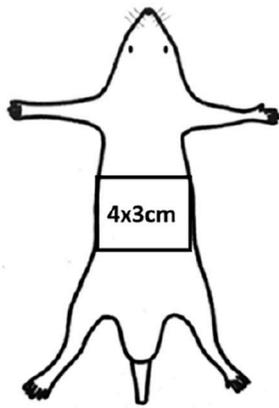


Figura 5. Rasurado del dorso de las ratas.

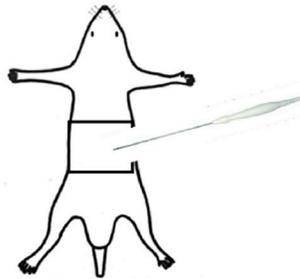


Figura 6. Pasadas de la cánula.

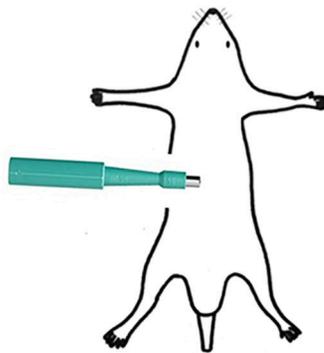


Figura 7. Biopsia con punch 3 mm.

Luego las 10 ratas fueron llevadas al Laboratorio de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia, UCV, para realizarle las pruebas de coagulación. Para ello, se calentaron las ratas (de 2 en 2) a 50°C por 5 a 10 minutos en estufa, para la vasodilatación. Se les extrajo sangre de la cola y se colocó la primera gota en una lámina y se manipuló con una aguja de insulina tomando los minutos hasta la visualización de formación de coágulo. Luego se llenó de sangre los microtainer heparinizados (marca Bio-rad®, California, USA), y se centrifugó usando una centrifuga marca Thermo IEC MicroCL 17R®, USA, se colocaron todas las muestras en hielo, manteniéndolas a una temperatura de 4°C, hasta la cuantificación de los biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo, mediante la peroxidación lipídica y sus marcadores. Inmediatamente se colocaron las ratas en un área de recuperación para la administración del tratamiento antiinflamatorio.

Etapa II

Los animales experimentales se mantuvieron por un período de 10 días con hidratación y alimentación con la aplicación del tratamiento antiinflamatorio según el protocolo. Se vigiló y registró diariamente el estado general de los animales. El día 5 y 10 se cuantifican los parámetros de peso, medición de circunferencia, la prueba del coágulo y la toma de sangre de la cola para medición de estrés oxidativo, manteniendo las muestras a 4°C.

Etapa III

El día 10 se le realizó biopsia definitiva con punch #3 a las 10 ratas con estudio histopatológico con hematoxilina-eosina y visualización microscópica en 20X y 40X, en el Servicio de Patología del Urológico San Román en Caracas, Venezuela.

Etapa IV

Las muestras de plasma fueron sometidas a centrifugación en una centrifuga marca Thermo IEC MicroCL 17R®, USA, a 13 000 rpm por 10 minutos. Se realizaron las pruebas de

estrés oxidativo y el nitrosativo, cuantificando marcadores como malondialdehído, óxido nítrico y catalasa. Se determinó la concentración de proteínas tisulares totales mediante el método de Lowry.

El método de Lowry 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. Brevemente, se prepara una mezcla de reacción que consta de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2 % en hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M; pentahidrato de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) al 1 % y tartrato sódico-potásico al 2 %, en relación 100:1:1. En un tubo se añaden 190 μL de agua destilada, 10 μL del plasma y se agita suavemente. Luego se añade 2mL de la mezcla de reacción, se agita y se mantiene en oscuridad por 10 minutos. Una vez culminado el tiempo, se agregan 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en agua destilada, preparado en el momento), se esperan 30 minutos para la formación del color y se lee a 660 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia de las muestras se interpola en una curva estándar de albúmina (0-100 μg). Los resultados se expresan como mg de proteína.

El malondialdehído (MDA) es un dialdehído de 3 carbonos altamente reactivo producido a partir de los hidroperóxidos lipídicos, por lo que constituye un indicador importante de peroxidación lipídica. El método se fundamenta en la reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico a un pH entre 2 y 3. El aducto formado exhibe una absorción primaria máxima a 532-535 nm y una secundaria más leve a 245 y 305 nm. Brevemente, 0,2 mL de plasma se le añadió 0,2 mL de sulfato dodecil sódico (SDS) al 8,1%, 1,5 mL de ácido acético al 20 % ajustando a pH 3,5 con hidróxido de sodio (NaOH), y 1,5 mL de solución de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % y se completa con 4 mL con agua destilada. Se somete a calentamiento a 95°C en estufa (Memmert®, Alemania) durante 60 minutos. Al finalizar la incubación, las muestras se enfrían en agua-hielo, luego se le agrega 1 mL de agua destilada y 5 mL de una mezcla de n-butanol/piridina a razón de 15:1, luego se mezcla en el vortex-genie 2® (Scientific Industries, USA) centrifugando a 4 000 rpm por 10 minutos. El pigmento rojizo resultante de la reacción se lee

a 532 nm en un espectrofotómetro (Bio-rad®, Microplate Reader, Benchmark, USA).

Para la determinación de óxido nítrico (NO) presente en plasma se empleó el método de Griess. Las muestras fueron desproteinizadas con sulfato de zinc ($ZnSO_4$), añadiendo $50\mu l$ por cada $200\mu l$ de dilución estandarizada, se mezcla y deja actuar por 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 4 000 rpm por 6 minutos, y se separa el sobrenadante. En una microplaca de 96 pozos, se sembraron $100\mu l$ de la muestra en cada pozo, se añadieron $100\mu l$ de una solución de sulfanilamida al 1% en ácido acético al 50 %, y se dejó reaccionar por 20 minutos, hasta la formación de la sal de diazonio. Luego se añadió $100\mu l$ de una solución de n-(1-naftil)-etilendiamina al 1% en ácido acético al 50 % y se esperó 20 minutos. El diazo-compuesto formado bajo las condiciones de la reacción de Griess se cuantificó espectrofotométricamente (Bio-Rad Laboratories, Microplate Reader, Benchmark, USA) a 540 nm. Este sistema detecta dióxido de nitrógeno (NO_2^-) en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales. Los niveles de óxido nítrico (NO) se determinan indirectamente por la conversión en nitritos, principal producto de la degradación de NO que es estable. Para el cálculo se realizó la interpolación sobre una curva patrón de nitrito de sodio (0,1 a $40\mu M$). Los resultados se expresaron en μg de NO/mg de proteína presente en la muestra (n=10).

La catalasa se determinó mediante el método de Aebi, que se basa en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a 230 nm, debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra. La actividad de la catalasa se mide por la diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo. Esta enzima ejerce dos funciones: 1) actividad catalítica: descomposición de H_2O_2 para producir agua y oxígeno (H_2O y O_2), y 2) actividad peroxídica: la oxidación de los donantes de hidrogeniones H^+ , por ejemplo, metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido. Brevemente, en una celda de cuarzo se colocó $25\mu L$ de plasma y se adicionó $725\mu L$ de H_2O_2 30 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: $k = (1/t) (2,3 \times \log A1 / A2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A1 y A2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t1 y t2. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm E.E.M.$). Los datos fueron analizados con el programa Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) o la prueba de t de Student, seguidas por las comparaciones múltiples de la prueba de Bonferroni. Los resultados con valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Etapa I y II

Se observó una buena tolerancia de la administración oral de ambos medicamentos antiinflamatorios (AINES y serrapeptasa al 50 % y 100 %)

En el día 0 se realizó el procedimiento de liposucción en el dorso de las 10 ratas. El tiempo quirúrgico fue de 10,2 minutos de media (5-15 min). El día 0, y los 5 y 10 del procedimiento, se pesaron las ratas y se les midió la circunferencia abdominal con cinta métrica. Los resultados se muestran en el Cuadro 1.

En la rata 1 y 2 (controles) no se produce variación en el peso, pero en la circunferencia abdominal se observa un aumento en ambos controles de 2,75 cm de media (2,5-3 cm) desde el día 0 al día 10.

En la rata 3 y 4 tratadas diclofenac por vía oral, como antiinflamatorio, se observa un incremento del peso de 22,5 gr de media (rango 20-25 g) y un aumento de la circunferencia abdominal de 3cm de media (rango 2,5-3,5 cm) desde el día 0 al día 10.

En la rata 5, 6 y 7 tratadas con serrapeptasa 50 %, se observa que no hay cambio en el peso, pero la circunferencia abdominal aumenta 2,5 cm de media (rango 2-3 cm) desde el día 0 al día 10.

SERRAPEPTASA COMO COADYUVANTE ANTI-INFLAMATORIO

Cuadro 1. Peso y circunferencia abdominal día 0, 5 y 10

Ratas	1 C	2 C	3 D	4 D	5 S5	6 S5	7 S5	8 S10	9 S10	10 S10
Día 0										
Peso	650 g	350 g	350 g	300 g	450 g	350 h	350 g	250 g	300	300 g
Circ. Pre	18 cm	16 cm	16 cm	14 cm	18 cm	14 cm	16 cm	16 cm	14,5 cm	14,5 cm
Circ.Post	18 cm	15 cm	15,5 cm	14 cm	18 cm	13,5 cm	16,5 cm	16 cm	14 cm	14 cm
Día 5										
Peso	500 g	350 g	350 g	300 g	450 g	250 g	350 g	350 g	250 g	300 g
Circ.	20,5 cm	17 cm	16,5 cm	15 g	18,5 cm	14,5 cm	17 cm	18 cm	15,5	16 cm
Día 10										
Peso	500 g	370 g	370 g	325 g	480 g	296 g	380 g	400 g	310 g	340 g
Circ.	20,5 cm	19 cm	18 cm	17,5 cm	20 cm	16 cm	19,5 cm	19 cm	18,5 cm	18 cm

En la rata 8, 9 y 10 tratadas con serrapeptasa 100 % por vía oral, se observa un aumento del peso de 66,6 gr de media (rango 10-150 gr) y un aumento en la circunferencia abdominal de 3,33 cm de media (rango 3-4 cm) desde el día 0 al día 10.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del tiempo de coagulación, expresados en segundos, de la sangre tomada de la cola de las ratas.

Cuadro 2. Tiempo de coagulación: día 0, 5 y 10.

Ratas	1 C	2 C	3 D	4 D	5 S5	6 S5	7 S5	8 S10	9 S10	10 S10
TC seg. Día 0	2,52	2,05	1,35	1,19	1,33	1,48	1,21	1,38	2,35	1,59
TC seg. Día 5	1,30	2,34	2	1,27	2,17	4	0,07	0,26	1,54	1,11
TC seg. Día 10	2,05	1,38	1,57	1,26	0,52	0,52	1,12	1,36	0,43	1,42

En la rata 1 y 2 (controles) en el patrón del tiempo de coagulación presentó una disminución de la formación del coágulo al día 10 de 0,57 seg de media (rango 0,47-0,67 seg). En la rata 3 y 4 (diclofenac) se observa una prolongación del tiempo de coagulación al día 5 de 0,365 seg de media (rango 0,08-0,65seg) y al día 10 de 0,145 seg de media (rango 0,07-0,22 seg).

En la rata 5, 6 y 7 (serrapeptasa 50 %) se evidencia una disminución del tiempo de coagulación al día 10 de 0,62 seg de media (rango 0,09-0,96 seg). En la rata 8, 9 y 10 (serrapeptasa 100 %) hay disminución del tiempo

de coagulación al día 10 de 0,70 seg de media (rango 0,02-1,92 seg).

Etapas III

El día 0 se realiza la biopsia base y al día 10 del posoperatorio se le realiza biopsia definitiva con punch #3 a las 10 ratas para estudio histopatológico con hematoxilina-eosina y visualización microscópica en 20X y 40X.

La biopsia base es el caso sin cirugía, en la cual no se evidencian lesiones histológicas, se identifica el revestimiento de la piel con cambios

de paraqueratosis y presencia de aislados anexos subcutáneos (Figura 8).



Figura 8. Caso control (sin cirugía): sin lesiones histológicas, identificando el revestimiento de piel con cambios de paraqueratosis y presencia de aislados anexos subcutáneos. HE. 20X.

En los estudios histológicos (biopsias) del día 10 de la muestra, se evidencia que no hubo cambios en la piel (epitelio) en el 100 % de la muestra. Las ratas control presentaron inflamación severa (>50 %) en un 100 % y las que recibieron vía oral antiinflamatorio diclofenac presentaron inflamación leve intersticial (<25 %) en un 100 % (Figura 9). Las ratas que recibieron vía oral antiinflamatorio serrapeptasa, el 67 % (#4 ratas) presentaron inflamación leve perianexial y el 33 % (#2 ratas) presentaron inflamación moderada intersticial y perianexial (25 %-50 %).

Las ratas control y a las que se les administró diclofenac presentan fibrosis leve en un 100 %. Las ratas del grupo de serrapeptasa, el 83% (#5 ratas) presentaron fibrosis moderada y el 17 % (#1 rata) fibrosis leve (Figura 10). El 100 % presentó edema papilar de la dermis. Ninguna presentó lesiones de tejido adiposo ni muscular.

En el grupo de ratas a las cuales se les administró la serrapeptasa por vía oral se evidencia histológicamente una estandarización importante de la fibrosis moderada con promoción de tejido de colágeno en fase de reparación (Figura 11).

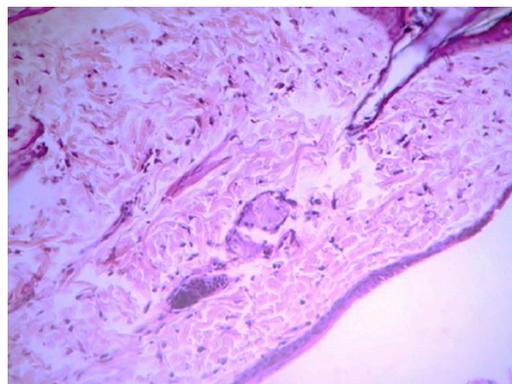


Figura 9. Diclofenac: se identifica inflamación linfocitaria leve del estroma y fibrosis leve, sin otras alteraciones. HE. 20X.

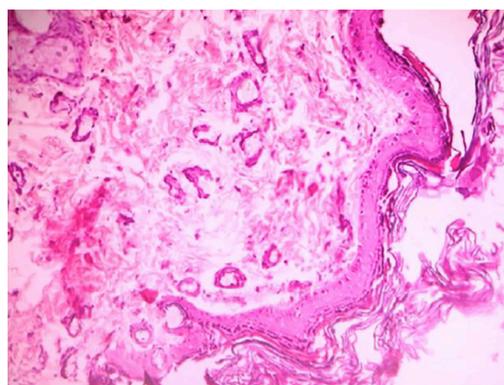


Figura 10. Serrapeptasa. Inflamación leve intersticial, fibrosis y edema moderado del intersticio. HE. 20X.

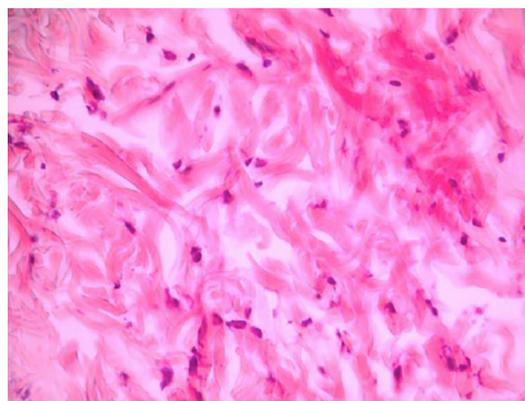


Figura 11. Serrapeptasa: se identifica la proliferación de las fibras colágenas como expresión de cambios reparativos. HE. 40X.

Etapa IV

Peroxidación lipídica mediante la determinación de malondialdehído (MDA) a las 2 horas, semana 1 y semana 2

A las 2 horas del procedimiento y la administración de la primera dosis de tratamiento, en el grupo quirúrgico sin tratamiento, con dosis

de diclofenac y con dosis de serrapeptasa al 50 % aumentó el daño oxidativo demostrado mediante la peroxidación lipídica del malondialdehído. En el grupo de las ratas a las que se les administró serrapeptasa al 100 % a hay una reversión completa, estadísticamente significativa, de la oxidación que fomenta la cirugía, igualándose al grupo basal (sin cirugía) (Figura 12).

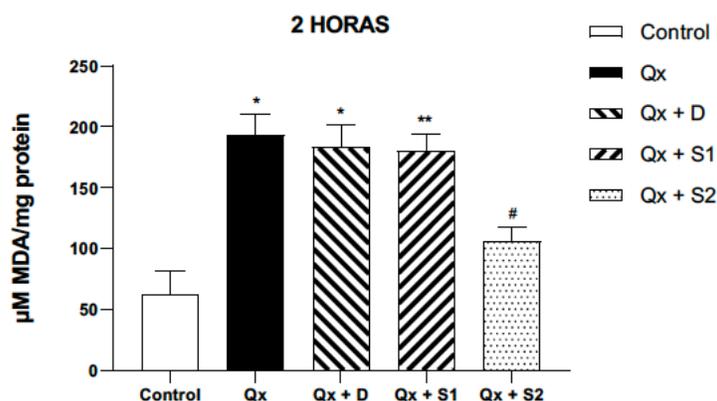


Figura 12. Peroxidación Lipídica (determinación MDA): 2 horas. **p<0,01 y *p<0,05 en relación con el grupo control (base). # p < 0,05 en relación con el grupo quirúrgico.

A la semana 1 en el grupo quirúrgico sin tratamiento se mantiene el daño oxidativo mientras que en los grupos diclofenac y

serrapeptasa, a ambas dosis, el daño oxidativo disminuye (Figura 13).

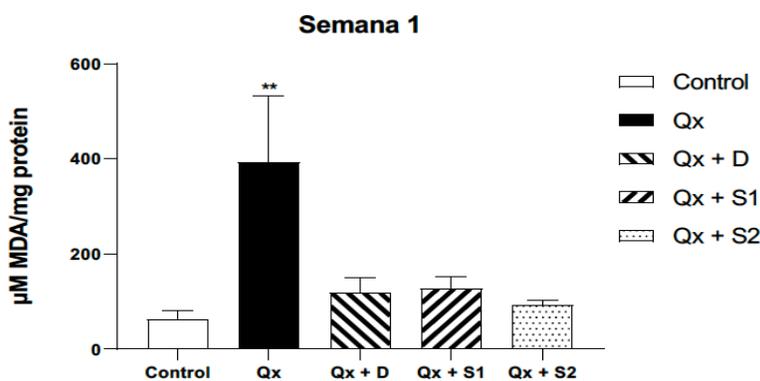


Figura 13. Peroxidación Lipídica (determinación MDA): Semana 1
** p<0,01 en relación con el grupo control

A la semana 2, sigue existiendo estrés oxidativo en el grupo quirúrgico sin tratamiento y en el grupo diclofenac se iguala al basal pero no revierte la oxidación de la cirugía. En cambio, en el grupo de serrapeptasa al 50 % es diferente al basal, pero,

sin embargo, si revierte el daño oxidativo de la cirugía y en el grupo de serrapeptasa al 100 % se revierte completamente el daño oxidativo de cirugía y se iguala al basal (Figura 14).

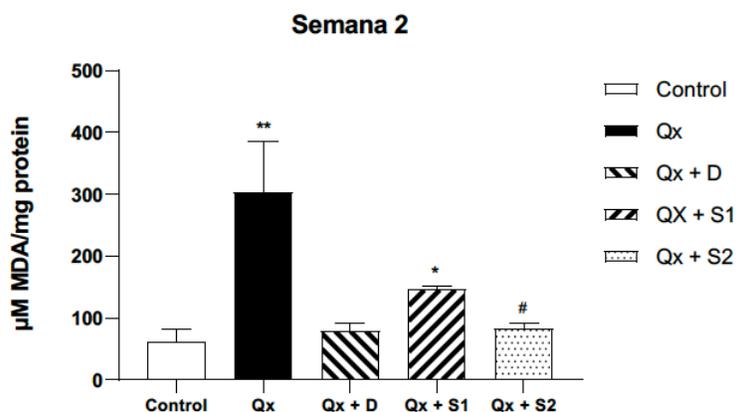


Figura 14. Peroxidación Lipídica (determinación MDA): Semana 2.

** p< 0,01 y *p< 0,05 en relación con el grupo control. # p< 0,05 en relación al grupo Quirúrgico.

Determinación de óxido nítrico expresados nitritos (NO/mg) a las 2 horas, semana 1 y semana 2

A las 2 horas del procedimiento y la administración de la primera dosis de tratamiento, en el grupo quirúrgico sin tratamiento y ambos

grupos de serrapeptasa los nitritos disminuyeron con respecto al control (basal). En el grupo de las ratas a las que se les administró diclofenac se mantuvo igual al grupo basal (sin cirugía) (Figura 15).

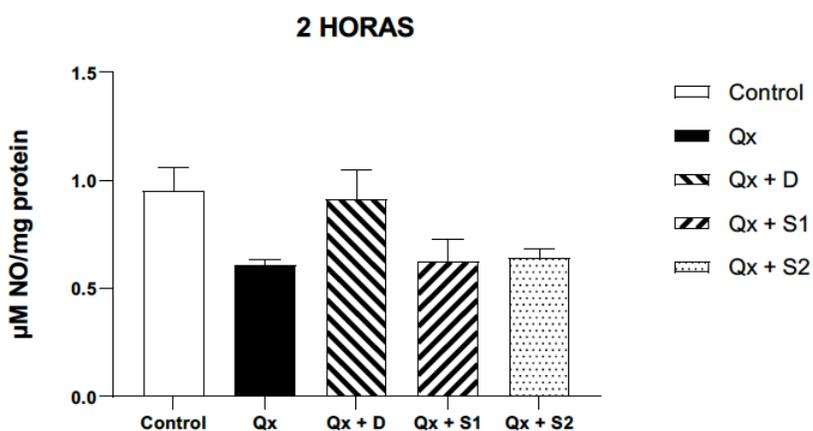


Figura 15. Determinación de nitritos (NO): 2 horas.

A la semana 1, el óxido nítrico en todos los grupos está disminuido con respecto al control basal (Figura 16).

A la semana 2, sigue disminuido el estrés nitrosativo en el grupo quirúrgico sin tratamiento.

En el grupo diclofenac y serrapeptasa al 50 % aumentan los nitritos superando al control basal. En cambio, en el grupo de serrapeptasa al 100 % se revierte completamente el daño nitrosativo de cirugía y se iguala al control basal (Figura 17).

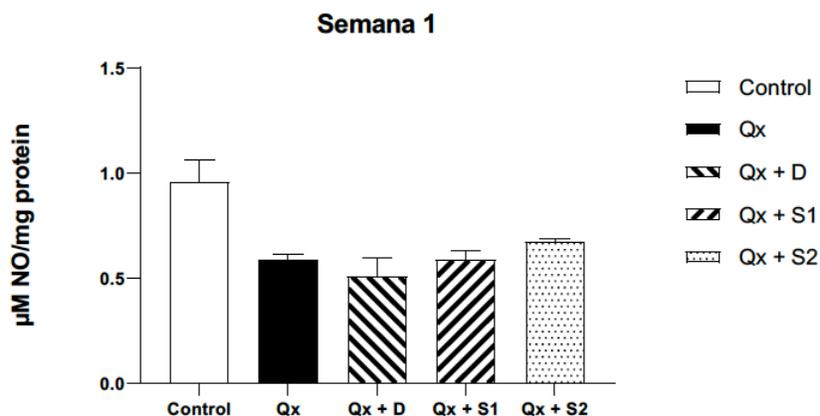


Figura 16. Determinación de nitritos (NO): Semana 1.

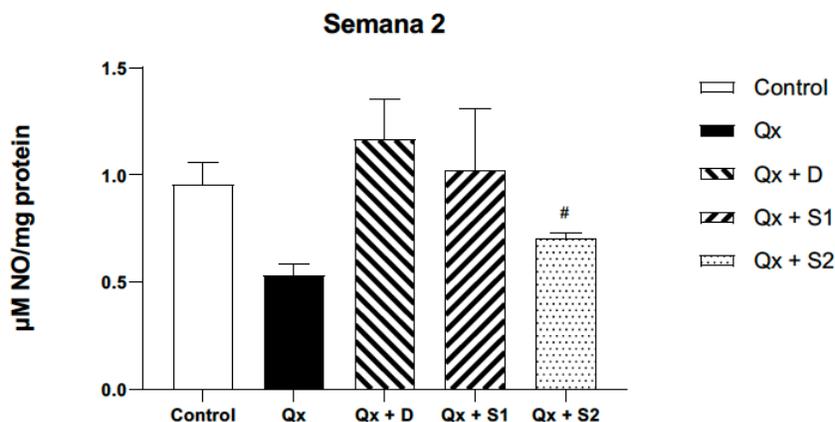


Figura 17. Determinación de nitritos (NO): Semana 2.
p < 0,05 en relación al grupo Quirúrgico.

Determinación de la actividad de la catalasa en plasma (CAT KU/L) a las 2 horas, semana 1 y semana 2

A las 2 horas del procedimiento y la administración de la primera dosis de tratamiento,

en todos los grupos se evidencia una tendencia al aumento, no significativo, de la actividad de la catalasa, comparándolo con el control basal (Figura 18).

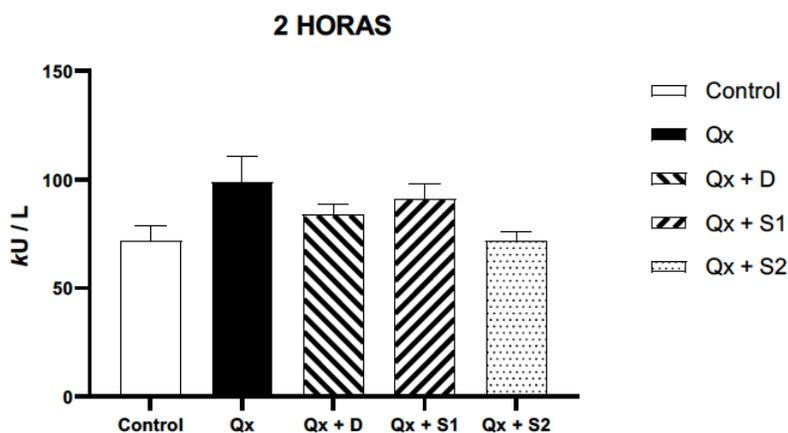


Figura 18. Determinación de actividad de la catalasa (CAT): 2 horas.

A la semana 1, en los grupos de cirugía sin tratamiento, con diclofenac y con serrapeptasa al 50 % se evidencia aumento, no significativo, de la actividad de la catalasa. En el grupo

con serrapeptasa al 100 % se evidencia una disminución de la actividad enzimática de la catalasa (Figura 19).

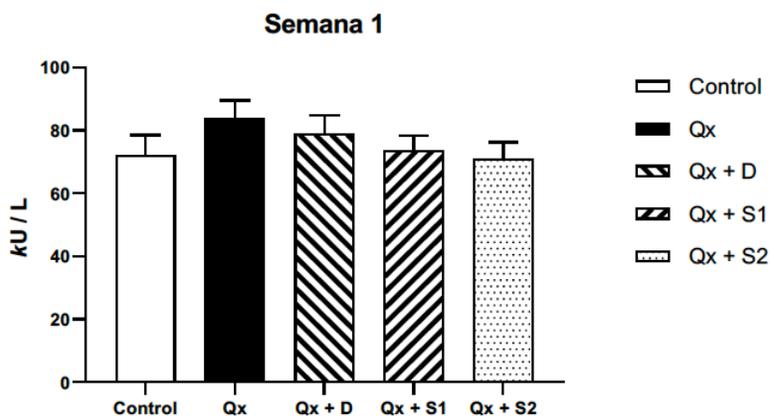


Figura 19. Determinación de actividad de la catalasa (CAT): Semana 1.

A la semana 2, en los grupos de cirugía sin tratamiento, con diclofenac y con serrapeptasa al 50 % se evidencia disminución de la actividad de

la catalasa. En el grupo con serrapeptasa al 100 % se evidencia que la actividad enzimática de la catalasa se iguala al control basal (Figura 20).

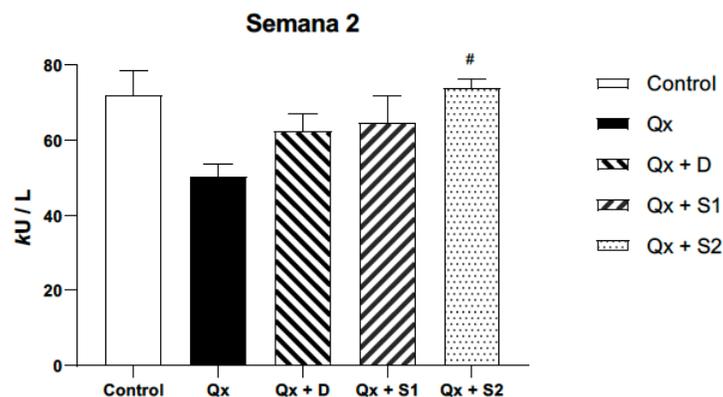


Figura 20. Determinación de actividad de la catalasa (CAT): Semana 2.
$p < 0,05$ en relación con el grupo Quirúrgico

DISCUSIÓN

Cohnheim (1839-1884) utilizó el microscopio para observar las alteraciones iniciales del flujo sanguíneo, el edema posterior al incremento de la permeabilidad vascular y la migración leucocitaria posterior al trauma. Metchnikoff y Paul Ehrlich descubrieron en 1882 que los factores celulares (fagocitos) como los factores séricos (anticuerpos) son imprescindibles para la defensa del cuerpo. Sir Thomas Lewis, estableció el concepto de que diversas sustancias químicas son inducidas localmente por el estímulo de una lesión, llamándolos factores mediadores de la inflamación. Este concepto de mediadores químicos de la inflamación es fundamental, dándonos la posibilidad de utilizar fármacos antiinflamatorios (2). La respuesta inmune ocurre cuando las células inmunológicamente competentes se activan en respuesta a organismos extraños o sustancias antigénicas liberadas durante la respuesta inflamatoria aguda o crónica. El resultado de la respuesta inmunitaria del huésped puede ser perjudicial si conduce a una inflamación crónica sin resolución del proceso lesivo subyacente, lo que implica la liberación de múltiples citocinas y quimiocinas, además de una interacción muy compleja de células inmunoactivas (9).

Durante la inflamación, la estimulación de las membranas de los neutrófilos produce radicales libres derivados del oxígeno y otras moléculas reactivas como el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos (9). En la formación de radicales libres por agentes exógenos o endógenos mediante reacciones metabólicas, el organismo tiende a equilibrar la balanza para evitar el estrés oxidativo mediante la acción de los antioxidantes, como la enzima catalasa (6). Los macrófagos y neutrófilos producen NO y agentes oxidantes en el proceso de inflamación, para regularlo (3).

Los objetivos principales para el tratamiento en el proceso de inflamación son aliviar los síntomas y detener el proceso de daño tisular (9). El uso prolongado de medicamentos antiinflamatorios a menudo conduce a intolerancia gástrica, depresión de la médula ósea y problemas de coagulación. Aunque los fármacos antiinflamatorios no esteroideos actuales, tienen un perfil de seguridad favorable en comparación con los grupos más antiguos, todavía se escapa una solución completamente satisfactoria. La serratiopeptidasa o serrapeptasa, es una enzima proteolítica con propiedades antiinflamatorias, anti-edema y con efectos analgésicos. Algunos autores sugieren que también posee efectos anti-ateroscleróticos, debido a sus propiedades fibrinolíticas y caseinolíticas. La propiedad antiinflamatoria reduce el edema facilitando el drenaje de líquido

de los tejidos. La actividad enzimática disuelve el tejido muerto que rodea la zona lesionada para que la cicatrización se acelere, modificando las moléculas de adhesión que guían a las células inflamatorias a su sitio objetivo de inflamación. La propiedad de analgesia alivia el dolor al inhibir la liberación de aminas que provocan dolor y la propiedad fibrinolítica/caseinolítica descompone la fibrina permitiendo la disolución de coágulos de sangre y placas ateroscleróticas (16). Por lo tanto, fue de interés comparar el efecto antiinflamatorio de la serrapeptasa con el diclofenaco sódico, en 10 animales experimentales a los que se les realiza liposucción (15).

Los hallazgos muestran que no hubo variación en el peso de las ratas controles o tratadas con serrapeptasa al 50 %, desde el día 0 hasta el día 10, mientras que se observó en la tratadas con diclofenac y con serrapeptasa al 100 %, un aumento de peso de 22,5 g y 66,6 g, respectivamente. Por su parte, la circunferencia abdominal en los 4 grupos experimentales (controles, diclofenac y serrapeptasa dosis 50 % y 100 %) mostró un aumento de 2,75 cm, 3 cm, 2,5 cm y 3,33 cm, respectivamente. Estos resultados no arrojaron valores estadísticamente significativos, posiblemente por la dificultad en controlar la cantidad y frecuencia con que el animal se alimenta.

La determinación del tiempo de coagulación, en los controles y ambos grupos de serrapeptasa (50 % y 100 %), mostró una disminución de 0,57 seg, 0,62 seg y 0,70 seg, respectivamente. Mientras que los animales tratados diclofenac como antiinflamatorio se observó prolongación del tiempo de coagulación al día 5 de 0,365 seg al día 10 de 0,145 seg. Esto concuerda con el concepto que el uso de antiinflamatorios no esteroides puede tener afectar con los factores de coagulación, prolongando sus tiempos (8, 9,15).

Nuestros hallazgos muestran en las biopsias del día 10 en las ratas control (sin tratamiento) inflamación severa, mientras que los tratados con diclofenac evidenciaron inflamación intersticial, en tanto los tratados con serrapeptasa la inflamación fue perianexial. Se evidencia con estos resultados el efecto antiinflamatorio eficiente y eficaz de ambos medicamentos reportado previamente en la literatura (9,13,15). La diferencia en la actividad antiinflamatoria

entre los tratamientos (AINES y serrapeptasa), es que la inflamación evidenciada en los grupos con serrapeptasa es perianexial, lo que significa que a nivel celular utiliza los vasos existentes induciendo una reparación fisiológica. En relación con la presencia de fibrosis, las ratas control y a las que se les administró diclofenac presentaron fibrosis leve en un 100 %, mientras que las ratas del grupo de serrapeptasa el 83% presentaron fibrosis moderada y el 17 % fibrosis leve, indicando que la serrapeptasa demuestra que su calidad se debe a la función reparativa que presenta. La estandarización moderada de la fibrosis asegura que exista una promoción del colágeno en fase de reparación, controlando la inflamación. Promueve la fibrosis estándar de manera eficiente, sin crear fibroesclerosis, lo que convierte a la serrapeptasa en un cicatrizante natural, además de su naturaleza antiinflamatoria.

Durante el proceso de inflamación ocurre un aumento del estrés oxidativo (2,3). Nuestros hallazgos apoyan esta posibilidad ya que se observa un aumento de la peroxidación lipídica, determinada por los niveles de MDA, en el grupo de cirugía sin tratamiento antiinflamatorio. Por el contrario, el tratamiento con diclofenac produjo a las 2 horas un aumento del estrés oxidativo, seguido de una disminución hasta igualarse a los valores basales sin llegar a revertir la oxidación de la cirugía. El tratamiento con serrapeptasa al 50 %, produjo efectos similares al diclofenac, sin embargo, si logró revertir la oxidación de la cirugía. Finalmente, el grupo tratado con serrapeptasa al 100 %, se observó una disminución de la oxidación a las 2 horas y revirtiendo completamente el daño oxidativo de la cirugía, lo que significa que tiene un efecto protector sobre la oxidación, logrando en menor tiempo que el metabolismo celular retorne a su estado normal o de reposo.

Durante la inflamación se produce una disminución del estrés nitrosativo. Esto se debe a que el óxido nítrico está en el endotelio vascular y se libera luego de la injuria, disminuyendo rápidamente debido a las reacciones interactivas con las especies reactivas del oxígeno (2,3). Nuestros hallazgos apoyan este concepto, ya que a las 2 horas y la semana 1 del procedimiento y la administración del tratamiento, se observa que los nitritos disminuyeron con respecto al control (basal) en todos los grupos experimentales.

Por su parte, a la semana 2, sigue disminuido el estrés nitrosativo en el grupo quirúrgico sin tratamiento, mientras que los grupos tratados con diclofenac y serrapeptasa al 50 % se observa un aumento de los nitritos superando al control basal, sin lograr control del estrés nitrosativo. Sin embargo, el grupo tratado con serrapeptasa al 100 % se revierte completamente el daño nitrosativo de cirugía y se iguala al control basal, regulando así estrés quirúrgico y el metabolismo celular. El estrés oxidativo y el estrés nitrosativo son contraregulatorios químicamente. Cuando el anión superóxido y el óxido nítrico se encuentran en el medio, reaccionan rápidamente y se convierten en peroxinitrito, por lo tanto, el aumento de uno disminuye el otro (3). Eso explica porque en nuestro estudio ocurre un aumento del estrés oxidativo y una disminución del estrés nitrosativo contrarregulando la injuria.

Cuando hay un daño oxidativo de manera aguda, normalmente la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa), reparan ese estrés oxidativo aumentando su actividad; a su vez cuando el estrés oxidativo disminuye, disminuyen las enzimas, y luego pasan a estado basal, esto mediante la inhibición de la síntesis de la proteína o de la expresión de manera competitiva, alostérica, por receptor o por alguna sustancia endógena como el óxido nítrico (3,17). Esto concuerda con nuestros hallazgos en los que se demuestra que de la actividad catalasa en los cuatro grupos experimentales, indicando que en este tiempo el estrés oxidativo está aumentado. A la semana 1, nuevamente los grupos cirugía sin tratamiento, o tratados con diclofenac y con serrapeptasa al 50 % mantienen el aumento de la actividad de la catalasa, pero en el grupo tratado con serrapeptasa al 100 % se evidencia una disminución de la actividad enzimática de la catalasa; posiblemente al efecto regulatorio del estrés nitrosativo. La enzima catalasa tiene en su centro activo una coenzima (grupo prostético), que tiene un metal (hierro). El óxido nítrico es muy fácil de unirse mediante enlaces químicos con metales, nitrosilando el centro activo de la catalasa disminuyendo su actividad, de manera que ya se sabe que el óxido nítrico endógeno es un regulador de la actividad antioxidante de la enzima (16,17). Finalmente, a la semana 2, en todos los grupos experimentales se evidencia disminución de la actividad de la catalasa,

llegando el grupo tratado con serrapeptasa al 100 % a igualar a los valores del control basal, lo que demuestra la regulación y el equilibrio entre el estrés oxidativo y el estrés nitrosativo.

Es conocido que la lesión tisular induce la inflamación y la respuesta al estrés quirúrgico, que llevan no solo a la recuperación sino también al posible deterioro después de la cirugía. Se forman especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que acompañan a la respuesta inflamatoria y desencadenan vías separadas pero integradas de óxido-reducción que conducen al estrés oxidativo y/o nitrosativo. Un estudio exploratorio de un solo centro investigó los efectos de la cirugía mayor sobre el estrés oxidativo y/o nitrosativo y el estado redox sistémico y sus posibles asociaciones con la morbilidad posoperatoria. Se observó en pacientes sometidos a cirugía mayor hepatobiliar, que el estrés oxidativo y nitrosativo intraoperatorio aumentó, con una elevación concomitante en la capacidad reductora. La formación/metabolismo de óxido nítrico se midió usando monofosfato de guanosina cíclico, nitrito, nitrato y especies nitroso-totales. Concluyeron que el nitrato inicial se asoció inversamente con la morbilidad posoperatoria, y las características de un mal resultado posoperatorio incluyen cambios tanto en el estrés oxidativo como en el metabolismo del óxido nítrico (18).

Estudios como el que se presenta forman parte de investigaciones progresivas que se realizan constantemente para tratar de caracterizar estos fenómenos de tejidos sometidos a cambios estructurales. Recientemente se ha realizado un estudio con nobiletina, medicamento que inhibe el estrés oxidativo/nitrosativo y que además actúa previniendo la neurodegeneración expresada en acumulación de alfa amiloide y déficit cognitivo, por lo cual está dirigido a la Enfermedad de Alzheimer. Se demostró su potencial neuroprotector y antidemencia que se le atribuye en parte a su propiedad antioxidante, antinitrosativa y antiinflamatoria. Esto confirma que este tipo de ensayos forman parte de los retos de la comunidad científica (19).

CONCLUSIÓN

El uso de la serrapeptasa como antiinflamatorio es una opción segura y eficiente. La serrapeptasa

modula proteínas específicas de la fase aguda del proceso inflamatorio, mediante la reducción de la respuesta del complemento y las concentraciones de haptoglobina, transportándose hacia la zona donde exista el proceso de daño tisular y disminuyendo los procesos locales que generan “inflamación”, sin afectar tejido sano. Otra importante característica de la serratina peptidasa es su efecto analgésico, inhibiendo la liberación de aminas inductoras de dolor. Por lo tanto, puede ofrecer ventajas importantes que pueden aportar beneficios en el manejo post quirúrgico del dolor y la inflamación.

Aunado a las características antiinflamatorias y de analgesia de la serrapeptasa, se demuestra que realiza una reparación fisiológica a nivel celular utilizando los vasos existentes, con una promoción del colágeno controlando la inflamación, así como logrando un equilibrio de homeostasis entre el estrés oxidativo y nitrosativo, convirtiéndolo en un cicatrizante natural. Presentamos este estudio piloto que consideramos podría ser ampliado para superar las limitaciones del número de animales de experimentación utilizados tanto en la fase experimental como en el número de controles a fin de consolidar estos hallazgos para luego considerar su aplicabilidad en humanos, siguiendo estrictamente los protocolos de ensayos clínicos ya conocidos.

Financiamiento

El presente trabajo fue autofinanciado por los autores.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Concepto y clasificación de los traumatismos. Contusiones. Síndrome de la onda expansiva. Síndrome de aplastamiento. Disponible en: <https://listadesalud.com/concepto-y-clasificacion-de-los-traumatismos-contusiones-sindrome-de-la-onda-expansiva-sindrome-de-aplastamiento/>
2. Leon Regal ML, Alvarado Borges A, de Armas García JO, Miranda Alvarado L, Varens Cedeño JA, Cuesta del Sol JA. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Rev Finlay*. 2015;5(1):47-62.
3. Brown GC. Department of Biochemistry, University of Cambridge, England. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem*. 1995;232:188-191.
4. Prueba de Griess. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_de_Griess
5. Métodos para el análisis de proteínas. Disponible en: <http://www4.ujaen.es/~esiles/TEMA3PROTEINASalumno.pdf>
6. Huet Breña C. Trabajo de Grado: Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas. Facultad de Farmacia Universidad Complutense. Madrid. 2017:1-20.
7. Díaz A. La Estructura de las Catalasas. *REB*. 2003;22(2):76-84.
8. Oscanoa-Espinoza T, Lizaraso-Soto F. Antiinflamatorios no esteroides: seguridad gastrointestinal, cardiovascular y renal. *Rev Gastroenterol*. 2015;35(1).
9. Katzung BG, Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, and drugs Used in Gout. 13th edition. Lange. McGraw-Hill Education, 2007;36.
10. Joshi KK, Nerurkar RP. Anti-inflammatory effect of the serratiopeptidase rationale or fashionable: A study in rat paw oedema model induced by the carrageenan. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2012;56(4):367-374.
11. Mazzone A, Catalani M, Costanzo M, Drusian A, Mandoli A, Russo S, et al. Evaluation of Serratin peptidase in acute or chronic inflammation of otorhinolaryngology pathology: A multicentre, double-blind, randomized trial versus placebo. *J Int Med Res*. 1990;18(5):379-388.
12. Tiwari M. The role of serratiopeptidase in the resolution of inflammation. *Asian J Pharm Sci*. 2017;12(3):209-215.
13. Jadhav SB, Shah N, Rathi A, Rathi V, Rathi A. Serratiopeptidase: Insights into the therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020;28:e00544.
14. Yamasaki H, Tsuji H, Saeki K. Anti-inflammatory action of a protease, TSP, produced by Serratin. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1967;63(4):302-314.
15. Jadav SP, Patel NH, Shah TG, Gajera MV, Trivedi HR, Shah BK. Comparison of anti-inflammatory activity of serratiopeptidase and diclofenac in albino rats. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):116-117.
16. Bhagat S, Agarwal M, Roy V. Serratiopeptidase: A systematic review of the existing evidence. *Int J Surg*. 2013;11(3):209-217.

SERRAPEPTASA COMO COADYUVANTE ANTI-INFLAMATORIO

17. Purwar N, McGarry JM, Kostera J, Pacheco AA, Schmidt M. Interaction of nitric oxide with catalase: structural and kinetic analysis. *Biochemistry*. 2011;50(21):4491-4503.
18. Stevens JL, McKenna HT, Filipe H, Lau L, Fernandez BO, Murray AJ, et al. Perioperative redox changes in patients undergoing hepatic-pancreatic-biliary cancer surgery. *Perioper Med (Lond)*. 2023;12(1):35.
19. Ghasemi-Tarie R, Kiasalari Z, Fakour M, Khorasani M, Keshtkar S, Baluchnejadmojarad T, et al. Nobiletin prevents amyloid β 1-40-induced cognitive impairment via inhibition of neuroinflammation and oxidative/nitrosative stress. *Metab Brain Dis*. 2022;37(5):1337-1349.