

**Revista Facultad  
de Farmacia Universidad  
Central de Venezuela**

Vol. 70 - Nº 2 - 2007 - ISSN: 0041-8307  
Depósito legal: 195902 DF 224  
Caracas/Venezuela  
Indexada en LILACS y Latindex

**Universidad Central de Venezuela**

**Rector**

*Dr. Antonio París*

**Vicerrector Académico**

*Dr. Eleazar Narváez*

**Vicerrectora Administrativa**

*Dra. Elizabeth Marval*

**Secretaria**

*Dra. Cecilia García-Arocha*

**Facultad de Farmacia**

**Decano**

*Dr. Orlando Vizcarrondo Monagas*

**Director**

*Dr. Gerard Haiek*

**Coordinadora Académica**

*Dra. Sofía Gutiérrez*

**Directora del Instituto de Investigaciones**

*Dra. Anita Stern Israel*

**Directora de Postgrado**

*Dra. Miriam Regnault*

**Coordinadora de Extensión**

*Dra. Consuelo Araujo de Vizcarrondo*

**Revista Facultad de Farmacia**

**Editora**

*Dra. Anita Stern Israel*

**Editora Asociada**

*Dra. Fanny Carrillo de Padilla*

**Comité Editorial**

*Dra. María Margarita Salazar Bookaman*

*Dra. Alírica Suárez*

*Dra. María del Rosario Garrido*

*Dr. Jaime Charris*

*Dr. Carlos Ayala*

*Dra. Gisela Ávila*

*Dr. Rafael Mucci*

*Dra. Aracelis Ortega*

*Dra. María Cecilia de Condado*

**Diagramación, composición, montaje e impresión**

Miguel Ángel García e Hijo, S.R.L.

Sur 15, Nº 107 - El Conde - Telf. 576.13.62

Caracas-Venezuela

Tiraje: 500 ejemplares - Abril 2006

**Dirección**

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109

Caracas 1040-A - Venezuela

**Contenido**

EDITORIAL 2  
LUIS JOSÉ VERA

Inmunolocalización del Receptor de Proliferación  
de Peroxisomas Activados subtipo- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )  
en la corteza cerebral de pacientes con  
diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD)  
AYALA-GROSSO, C.A.; CROCKER, S.F.; LESLIE, R.; ROBERTSON, G.S.

Bioinformática: aplicaciones en química medicinal 13  
MARÍA LUISA SERRANO G.

Método analítico por cromatografía líquida de alta  
resolución en fase reversa para la determinación  
de cefadroxilo en suero humano 21  
MARISOL GÓMEZ FERNÁNDEZ, MARITZA GONZÁLEZ DAZA

Secondary metabolites from *Podocalyx*  
*loranthoides* 28  
BETH DÍAZ, REINALDO S. COMPAGNONE, ALÍRICA I. SUÁREZ

Efecto de la Hipoxia Intermitente Crónica 34  
sobre la Nitración y la Fosforilación de las Kinasas  
reguladas por señales extracelulares  
en la Corteza Primaria del Cerebro de la Rata  
DANIELA URRECHEAGA, ALFREDO CSIBI, PATRICK LEVY,  
SERGE BOTTARI Y ANITA ISRAEL

Síntesis del N-aralquilamino-metiladamantano 43  
con posible actividad Dopaminérgica Central  
JORGE E. ÁNGEL GUÍO, ELVIA V. CABRERA, BIAGINA MIGLIORE DE ÁNGEL,  
HEBERTO SUÁREZ-ROCA, JAIME E. CHARRIS, ROBERTO ROSSI,  
ANA SANTIAGO, SIMÓN LÓPEZ, MARÍA M. RAMÍREZ,  
VERÓNICA HERNÁNDEZ, MIGUEL MORALES

Índice de autores 50

Índice de descriptores 51

Normas de Publicación 52

*Esta revista se publica bajo los auspicios  
del Consejo de Desarrollo Científico  
y Humanístico de la UCV*

# Hace cincuenta años

**E**l 31 de julio de 1957 un grupo de estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, prestó juramento ante las máximas autoridades de la institución al recibir de manos del señor Rector el título de Doctor en Farmacia. La mayoría de ellos viven aún, otros desafortunadamente abandonaron la vida sin terminar el cumplimiento de sus tareas profesionales y deberes ciudadanos de acuerdo con las observancias establecidas. Al respecto no he dejado de recordar a mis compañeros, rogando por su descanso eterno y sintiendo el vacío que han dejado algunos de ellos, sobre todo por la estrecha amistad conformada en una larga etapa de confraternidad estudiantil y profesional.

Resaltar la importancia de esta promoción que escogió el nombre del Dr. Rafael A. Martínez para su padrinazgo es algo difícil para un integrante de la misma; sin embargo, me atrevo a resaltar algunos hechos, sin alterar en lo mínimo su verdad histórica.

Comenzamos nuestros estudios de Pregrado en una vieja casona de San Martín en septiembre del año 1953. Allí se iniciaron nuestros esfuerzos, sacrificios, angustias y alegrías en un ambiente familiar y austero por imposición de nuestros profesores, que desde el primer momento demostraron competencia docente y cariño por la profesión; algo que nosotros logramos captar para los años futuros de la carrera y posterior desempeño profesional.

Nos mudaron a la Ciudad Universitaria, ocupando un área de la Facultad de Ingeniería y allí terminamos nuestros estudios de pregrado.

Durante los tres años de permanencia pudimos apreciar los efectos contraproducentes de una dictadura militar que restringía la libre difu-

sión del pensamiento y la manifestación personal y democrática de la comunidad universitaria que pugnaba por obtener las libertades plenas para la formación integral de los futuros profesionales.

En estas condiciones egresamos con mucha fe en nuestro futuro, cargados de ambiciones y los mejores anhelos, con la mirada hacia un ancho y provisor horizonte.

Cada uno pasó a sus ocupaciones profesionales con las responsabilidades establecidas según su área de trabajo. Con el correr del tiempo muchos ocuparon cargos de gran significación en lo docente-académico-profesional y gremial.

De este grupo, catorce pasaron a formar parte de la docencia universitaria, hoy día todos jubilados, y la mayoría con el máximo lugar de escalafón y dedicación exclusiva. Uno de ellos fue Vicerrector Académico, tres fueron Decanos de nuestra Facultad, uno fue Presidente de la Asociación de Profesores, dos fueron Presidentes de la Federación Farmacéutica, dos fueron Presidentes de Colfar Distrito Federal, tres fueron Gerentes de Plantas Farmacéuticas, uno es propietario de un conocido Laboratorio Nacional, uno fue candidato a ocupar puesto de Autoridad superior en la UCV, uno fue Presidente del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y todos los demás han tenido una trayectoria ejemplar desde el punto de vista profesional, demostrando un gran amor por la farmacia y un gran respeto hacia nuestros profesores y agradecimiento a la institución que nos sirvió de albergue para el aprendizaje y formación profesional y ciudadana.

Tuvimos la suerte en la elección de nuestro padrino, Dr. Rafael Ángel Martínez, ex decano de la Facultad, por la cual hizo lo que tuvo a su alcance por lograr, como así lo deseaba, hacer de ella la

mejor de América Latina. Fue elegido padrino por sus dotes de ciudadano ejemplar, por su disciplina en el trabajo, por su constancia, por sus conocimientos, por el respeto que infundía dentro de la comunidad universitaria, por su labor gremial, por la excelencia de su enseñanza, por el amor que profesó a la farmacia, porque dentro de su proceder austero guardaba las maravillosas virtudes de bondad y confraternidad.

En esta fecha aniversaria lo recordamos con inmenso cariño, sintiendo su ausencia material porque siempre estuvo al lado de sus ahijados, atento a mantener lazos de confraternidad como principio fundamental para preservar la unidad en grupos con un quehacer común.

Luego de cincuenta años veo con cierta preocupación y tristeza que los tiempos han cambiado y la conducta de los jóvenes estudiantes y profesionales, en el sentido de poner en práctica los sucesos buenos del pasado, la participación activa en la gestión gremial, el conocimiento de lo útil que ha sido nuestra profesión para la humanidad a través del tiempo y el desempeño profesional deontológico, particularmente en una época que ofrece una de las fases más contradictorias de la vida, como es el interés del hombre a escudriñar los confines del espacio sideral, y su descenso a los más bajos niveles de la moral y la ética.

Por otra parte, la Facultad, apéndice de nuestra ilustre y grande casa de estudios, se mantiene en pie, enfrentada a los viles arponazos del antiuniversitario, que una vez más acecha con poder pero sin razón, la elocuente historia de propósitos, la dedicación y el talento de un selecto grupo gremial, heredero en gran parte de la formación y trayectoria de elevada significación profesional, moldeadores del mejor perfil farmacéutico.

Las anécdotas, sucesos y acontecimientos en 54 años de vida estudiantil y profesional llenan numerosas páginas, pero no es mi interés desmenuzar el arsenal histórico de nuestro acontecer; más importante, por ahora, es exteriorizar el orgullo de ser farmacéutico egresado de la Universidad Central de Venezuela, tener la seguridad de haber cumplido una labor de utilidad social, mantener el respeto y admiración hacia mis profesores, defender mi profesión de los ataques arteros de mercantilistas transgresores de la ley, propender a la confraternidad con mis compañeros de curso, recordar con nostalgia y cariño a los fallecidos y dar gracias al Señor por haberme concedido la dicha de la vida con su larga expectativa.

**LUIS JOSÉ VERA**

# Immunolocalización del Receptor de Proliferación de Peroxisomas Activados subtipo- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) en la corteza cerebral de pacientes con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD)

C.A. AYALA-GROSSO<sup>1</sup>, S.F. CROCKER<sup>2</sup>, R. LESLIE<sup>3</sup>, G.S. ROBERTSON<sup>2</sup>

## Resumen

El receptor nuclear de proliferación de peroxisomas activados (PPAR- $\gamma$ ) se ha asociado al control de la diferenciación de los adipositos, la inflamación, la muerte celular programada y la sensibilidad a la insulina. En este trabajo, mediante el uso de un anticuerpo que reconoce al receptor nuclear de proliferación de peroxisomas activados, se ha establecido su distribución y se ha estimado la densidad relativa de las células inmunopositivas en secciones de la corteza cerebral de individuos control y de sujetos con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). La inmunorreactividad del PPAR- $\gamma$  se observó en neuronas de la corteza cerebral y en astrocitos distribuidos de manera heterogénea en las láminas de la I a la V de la corteza cerebral. La densidad relativa de neuronas y astrocitos inmunopositivos fue significativamente mayor respecto al control en el giro frontal inferior y temporal superior de individuos con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Las células inmunopositivas para la proteína ácida fibrilar glial se observaron organizadas en «coronas», clásicamente descritas rodeando las placas neuríticas. El incremento de la expresión del receptor de PPAR- $\gamma$  podría indicar una respuesta citoprotectora de las células a la inflamación y deficiencia del metabolismo de la glucosa al reto promovido por la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide en la patología de la enfermedad de Alzheimer.

**Palabras clave:** neurodegeneración, inflamación,  $\beta$ -amiloide, demencia senil, receptor nuclear de proliferación de peroxisomas activados, enfermedad de Alzheimer.

## Abstract

Nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) signaling has been implicated in the control of adipocyte differentiation, inflammation, programmed cell death, and insulin sensitivity. Using an antibody which selectively recognizes human PPAR $\gamma$ , we have compared its distribution and the number of cells that display PPAR $\gamma$  immunoreactivity in cortical brain sections from patients diagnosed with Alzheimers disease (AD) and age-matched controls. PPAR $\gamma$  immunoreactivity was observed in both cortical neurons and astrocytes (glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunopositive cells) distributed sparsely throughout laminae I to V of AD and age-matched control brains. The numbers of PPAR $\gamma$  immunopositive neurons and astrocytes were significantly greater in the inferior frontal and temporal gyri of AD patients compared to age-matched controls. Within the brains of AD patients, there were more PPAR $\gamma$  immunopositive cells in the superior temporal cortex relative to the inferior frontal aspect of the neocortex. GFAP-positive cells were organized in classically described «crowns» of astroglial cells surrounding neuritic plaques. Given that PPAR $\gamma$  agonists improve insulin sensitivity and decrease immune cell activity; these results suggest that elevated PPAR $\gamma$  immunoreactivity may reflect an attempt of the astrocytes and neurons to compensate the disturbances in central glucose metabolism and to reduce inflammatory processes associated with AD.

**Key words:** neurodegeneration, imflamation,  $\beta$ -amyloid, senile dementia, nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , Alzheimers disease.

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apdo. Postal 40109 Nueva Granada, Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Psychiatry.

<sup>3</sup> Department of Anatomy and Neurobiology, School of Medicine, Dalhousie University, Nova Scotia, B3H 1X5, Canada

## Introducción

El receptor nuclear de proliferación de los peroxisomas activados, subtipo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), representa un blanco común en las vías de señalización asociadas a la reproducción, el metabolismo, el desarrollo (Barak y col., 1999) y la respuesta inmune (Ricote y col., 1999; Jiang y col., 1999; Cunard y col., 2002; Daynes y col., 2002). Pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares, que son proteínas con capacidad de enlazamiento al ácido desoxirribonucleico (ADN), estructuralmente relacionadas con la familia de los receptores de esteroides, glucocorticoides, mineralocorticoides, receptores de la vitamina D y del ácido retinoico (Kielian y Drew, 2003). Su función en la modulación de la transcripción de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa y los lípidos, lo promueve como un elemento crucial en la expresión de ciertas disfunciones metabólicas como la obesidad (Evans y col., 2004).

La modulación de la expresión de las diversas respuestas fisiológicas mediante la activación de los receptores PPAR $\gamma$  involucra una interacción compleja que implica, ya sea la formación de heterodímeros con el receptor de ácido retinoico (Tugwood y col., 1992), la regulación de la transcripción de elementos promotores secuencia-específicos denominados «elementos de respuesta del proliferador de peroxisomas» (Sastre y col., 2006), así como la inhibición de la expresión de los genes involucrados en la respuesta inmune por un mecanismo no completamente dilucidado, denominado «transrepresión dependiente de receptor» (Kerppola y col., 1993; Li y col., 2000; Kielian y Drew, 2003). La existencia de estos mecanismos sugiere que la función del ligando natural del receptor, la prostaglandina 15d-PGJ<sub>2</sub>, es de un orden de complejidad que involucra múltiples elementos de interacción.

El receptor PPAR $\gamma$  se constituye como un blanco farmacológico de los agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), lo que ha sido apreciado recientemente a raíz de la información epidemiológica que ha establecido que los NSAIDs son eficaces en reducir la incidencia y el riesgo de la enfermedad de Alzheimer, así como de retrasar significativamente su progresión (Jenkinson y col., 1989; Breitner y col., 1994; Andersen y col., 1995; McGeer y col., 1996). Sin embargo, el mecanismo por el cual los NSAIDs reducen la evolución de esta patología e incrementan la sobrevivencia de los individuos tratados no ha sido establecido hasta el momento.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por un deterioro progresivo de la función cognitiva y la pérdida de la memoria, que ocurre asociada con la pro-

gresión de la muerte neuronal de poblaciones específicas de diversas áreas del cerebro. La histopatología típica involucra la acumulación extracelular del péptido  $\beta$ -amiloide que constituye la placa senil, la cual perturba la citoarquitectura columnar típica de la corteza cerebral; así como la formación intraneuronal de los haces neurofibrilares a consecuencia de una fosforilación anómala de la proteína *Tau* asociada a los microtúbulos, que se acumulan principalmente en el soma de la neurona y se propagan posteriormente hacia el axón y las neuritas. Ambos elementos se encuentran acompañados por una pérdida extensa de sinapsis y neuronas en diversas áreas del cerebro (Yankner y Mesulam, 1991; Hardy y Allsop, 1991; Joachim y Selkoe, 1991; Selkoe, 1994; Grundke-Ikbal y col., 1986; Goedert y col., 1993).

La deposición extracelular de las fibras del péptido  $\beta$ -amiloide se encuentra en una asociación estrecha con las células microgliales y astrogiales. La microglía activada promueve, a su vez, un complejo local proinflamatorio con la secreción de una variedad de productos que pueden promover la muerte celular (McGeer y McGeer, 1997; Akiya y col., 2000; Hull y col., 2002). En consecuencia, una microglía hiperactiva podría contribuir a la pérdida neuronal progresiva de un cerebro afectado con la enfermedad de Alzheimer. La aparición de productos inflamatorios en el cerebro de individuos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer se ha interpretado como evidencia de un componente inflamatorio crónico en el proceso de la enfermedad y ha guiado a evaluar si la administración de agentes antiinflamatorios podría modificar la incidencia de la demencia asociada a esta patología.

La degeneración neuronal como un elemento característico de la enfermedad de Alzheimer, asociada además a proliferación de la microglía y astrocitos, sugiere que esta patología es de naturaleza neuroinflamatoria. Estudios recientes han demostrado un incremento notable en la expresión diferencial de los genes de interleucina 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , ciclooxigenasa-2, NF-KB1 y otros mediadores del sistema inmune e inflamatorio (Kamboh y col., 1995; Papassotiropoulos y col., 1999; McCusker y col., 2001; Perry y col., 2001; Wyss-Coray, 2006). El incremento en la vía metabólica del ácido araquidónico, como la de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y de las funciones de la ciclooxigenasa (COX), pueden contribuir adicionalmente a la degeneración neuronal.

La actividad de la enzima COX, también conocida como sintasa de la prostaglandina G/H (PGHS), genera prostaglandina (PG) H<sub>2</sub> a partir del ácido araquidónico. La PGH<sub>2</sub> es metabolizada adicionalmente

a prostaglandinas funcionales activas como la PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub>, y PGI<sub>2</sub>. Al menos dos isoformas de la COX, una del tipo constitutivo (COX-1) y otra del tipo inducible (COX-2), han sido descritas. Recientemente se ha reportado una expresión exacerbada de la COX-1 y COX-2 en cerebros de individuos con la enfermedad de Alzheimer, aunque las causas inmediatas de estos cambios no han sido establecidas (Oka y col., 1997; Adams y col., 1996; Ho y col., 1999; Pasinetti y Aisen, 1998; Montine y col., 1999). La administración de NSAIDs, tales como indometacina o ibuprofeno, no sólo inhiben la actividad enzimática de la COX-2 sino que modulan su expresión a través de la interacción con el receptor de PPAR- $\gamma$  (Lehman y col., 1977); al mismo tiempo los agonistas del receptor, como las tiazolidindionas, troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona reducen la expresión de COX-2, IL-6, la óxido nítrico sintasa inducible, y el daño neuronal (Heneka y col., 2000; Ogawa y col., 2000; Combs y col., 2000).

Aunque estos estudios muestran la activación del sistema inmune y de las vías inflamatorias en la enfermedad de Alzheimer, ninguno de estos estudios han establecido si estos cambios ocurren en los estadios iniciales de la patología, la promueven o son una reacción compensadora al proceso degenerativo. En consecuencia, es importante tener en consideración que los factores inflamatorios e inmunes son multifuncionales y pueden tener efectos pro y antiinflamatorios, por lo que su presencia no son predictivos de ser beneficiosos o perniciosos (Sastre y col., 2006).

Un incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  en muestras de enfermos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer con respecto a controles sanos apareados por edad, además de su localización en poblaciones discretas neuronales o no-neuronales podría sugerir la respuesta del tejido nervioso al reto resultante de la toxicidad de las fibras del péptido  $\beta$ -amiloide. En contraste, una disminución implicaría una reducción del efecto transrepressor, entonces una facilitación de la expresión de la beta-secretasa y en consecuencia un concomitante aumento en la concentración del péptido  $\beta$ -amiloide (Sastre y col., 2006).

En este estudio se determina la distribución y la densidad de PPAR $\gamma$  en muestras obtenidas por autopsia de la corteza cerebral de individuos controles apareados por edad y con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

## Materiales y Métodos

### MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL HUMANO

El tejido cerebral se obtuvo por autopsia de la

corteza frontal inferior (IFG) y temporal superior (STG) de 18 sujetos, 9 clínicamente con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, con una edad promedio  $\pm$  E.S.M. de  $83,66 \pm 1,43$  años, y un tiempo promedio *postmortem* para la toma de la muestra de  $3,88 \pm 1,28$  h; y 9 sujetos controles sanos de edad similar, con una edad promedio  $\pm$  E.S.M. de  $79,88 \pm 1,29$  años y un tiempo promedio *postmortem* para la toma de la muestra de  $2,35 \pm 0,11$  h (Tabla I). El tejido usado en este estudio se adquirió de Sun Health Research Institute (Sun City, Arizona, Estados Unidos de Norteamérica).

### ANTICUERPOS

Para la determinación del receptor  $\gamma$  de proliferación de peroxisomas activados (PPAR $\gamma$ ) se utilizó un anticuerpo policlonal generado en conejo que reconoce al receptor (Serotec, Reino Unido), preparado en una dilución 1:200. Además se utilizó un anticuerpo monoclonal generado en ratón que reconoce la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) (Sigma, Mo, USA), preparado en una dilución de 1:1000. Para visualizar los receptores PPAR $\gamma$ , así como las células inmunopositivas para la GFAP se utilizaron los kits de diaminobenzidina y de la fosfatasa alcalina (Enhanced Vectastain ABC Elite y ABC alkaline phosphatase), respectivamente, adquiridos de Laboratorios Vector (Burlingame, California, Estados Unidos de Norteamérica).

### INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de cerebro fueron seccionadas en el criostato a  $-15$  °C en rebanadas de 10 micrómetros de espesor y las secciones colectadas en portaobjetos (superfrost) y almacenadas a  $-80$  °C hasta el momento de su tinción. Las secciones de los tejidos fueron lavadas con solución tampón fosfato salino 0,01 M (PBS), luego tratadas con peróxido de hidrógeno al 0,3% en 100% metanol por 15 min. a temperatura ambiente y posteriormente permeabilizadas con una solución de PBS que contenía Tritón X-100 al 0,1% por 30 min. a temperatura ambiente.

Rutinariamente las secciones se incubaron por 30 min. con una solución de PBS que contenía 15% de suero normal de la especie en la que fue generado el anticuerpo secundario. Luego, se incubaron a 4 °C por al menos 12 horas con cualquiera de los anticuerpos: Anticuerpo policlonal generado en conejo que reconoce el receptor  $\gamma$  de proliferación de peroxisomas activados (PPAR $\gamma$ ) preparado en una dilución 1:200. El anticuerpo monoclonal generado en ratón que reconoce la proteína fibrilar ácida

Tabla I  
**Información demográfica de individuos controles de edad similar y con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer**

Paciente	Edad	Sexo	PMI (h)	ApoE Braak	Índice	Diagnóstico neuropatológico
C1-9710	79	M	2.00	3/3	I	Control
C2-9714	76	M	2.50	3/3	I	Control
C3-9717	78	M	2.66	3/3	I	Control
C4-9639	73	F	2.50	3/3	I	Control
C5-9702	81	M	2.75	3/3	I	Control
C6-9833	82	F	2.00	3/3	I	Control
C7-9914	86	M	2.50	3/3	I	Control/pequeño número de placas seniles y haces neurofibrilares
C8-9613	85	F	2.75	3/3	II	Control/disfonía espasmódica
C9-9745	79	F	2.00	3/3	II	Control
C10-9751	84	M	3.00	3/3	III	Enfermedad de Alzheimer temprana
C11-9818	91	F	2.16	3/3	III	Enfermedad de Alzheimer temprana
AD1-9605	87	F	2.00	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD2-9609	75	M	2.50	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer /Angiopatia amiloide cerebral
AD3-9626	85	M	3.25	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer /convulsiones
AD4-9642	85	M	14.66	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD5-9707	87	F	2.50	2/2	V	Enfermedad de Alzheimer
AD6-9725	88	M	1.75	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD7-9727	77	F	4.00	2/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD8-9733	85	M	2.33	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD9-9805	88	M	4.00	3/3	V	Enfermedad de Alzheimer
AD10-9828	84	F	2.00	3/3	VI	Enfermedad de Alzheimer

glial (GFAP) preparado en una dilución 1:1000. Posteriormente las secciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a biotina (Vector labs) en una dilución 1:200 (v/v) por 1 h, a temperatura ambiente (RT, 25 °C). La inmunoreactividad se visualizó mediante la formación de un precipitado marrón de diaminobenzidina (DAB) o rojo, producto de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (AP), ambos productos a partir de un *kit* de tinción (Vector Labs).

Para el marcaje inmunohistoquímico de las cortezas frontal, temporal y parietal, se examinaron al menos 2 a 3 secciones por cerebro. En el IFG y el STG,

el número de neuronas que fueron inmunorreactivas para el receptor de PPAR $\gamma$  se contaron en una región definida por una grátula del ocular con un área de 350  $\mu\text{m}$  x 280  $\mu\text{m}$ . En cada capa cortical la grátula se desplazó hacia una región adyacente, evitando la superposición de los bordes, hasta completar 10 fotografías, con el objeto de estimar el número de células inmunorreactivas. El número relativo de células por sección y región del cerebro se obtuvo para comparar el número de relativo de neuronas corticales inmunopositivas para el receptor PPAR $\gamma$  en sujetos de edad similar sanos, con respecto a los que tenían diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Las imágenes se colectaron mediante un microscopio Zeiss Axioplan 2 acoplado a una cámara de video a color Sony 3 CCD DXC-950 adaptada a un sistema de registro CMA-D2 como interfase a un computador personal. Las imágenes se analizaron mediante un programa producido por Empix Imaging, Inc. (Mississauga, Ontario, Canadá).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número relativo de células se estimó en las cortezas frontal y temporal de sujetos sanos y con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Se generó un índice relativo por densidad que presentó una varianza no homogénea, por lo que se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), no paramétrico (Kruskal-Wallis), de diseño mixto (dos factores-dentro (área de la corteza) y un factor entre (sujeto normal vs enfermo) para comparar la densidad media de las células PPAR $\gamma$  inmunopositivas en las regiones de la corteza cerebral de interés en sujetos sanos o enfermos (U de Mann-Whitney). La prueba estadística fue considerada significativa para un valor de probabilidad  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Prisma (Versión 4.0, 2003).

#### Resultados

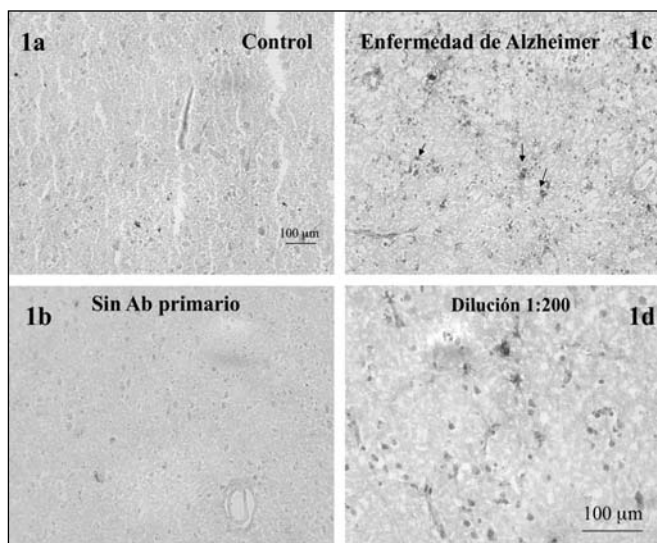
En este estudio se demuestra la presencia de inmunorreactividad de PPAR $\gamma$  en secciones de la corteza frontal y temporal superior de sujetos controles de edad similar y en sujetos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer.

El anticuerpo generado para el receptor de PPAR $\gamma$  reconoce una proteína de aproximadamente 110 kDa, tal como ha sido demostrado en líneas celulares y fracciones particuladas de homogenados de autopsias de cerebro de sujetos controles; y en muestras obtenidas de enfermos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (Kitamura y col., 1999).

Como se muestra en la figura 1, se encontró un incremento significativo de la expresión del receptor de PPAR $\gamma$  en el sistema nervioso de sujetos con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Así se observa, en las secciones de tejido cerebral, que en ausencia del anticuerpo primario (control negativo de tinción) no hay ninguna señal característica (Fig. 1a). En las secciones de individuos controles, en presencia del anticuerpo primario, se observa una señal inmunopositiva débil y poco frecuente, que se caracterizó por un marcaje de neuritas en el neuropilo cerebral (Fig. 2b). En contraste, cuando el anticuerpo se aplicó a secciones de tejido de individuos

con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, se encontró inmunorreactividad significativamente mayor cuando se compara con la observada en las secciones de individuos controles. En los tejidos provenientes de los individuos con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se observó que la inmunorreactividad se encuentra distribuida heterogéneamente (Figs. 1c y 1d) y asociada tanto a neuronas aisladas como a células gliales agrupadas en arreglos circulares formando coronas (Figs. 2c y 2d); además en neuritas dispersas en el neuropilo. En los tejidos de cerebros provenientes de pacientes con enfermedad de Alzheimer, los elementos inmunopositivos se observaron principalmente en la periferia de las placas difusas y seniles (de núcleo denso) y asociadas con neuritas distróficas. Adicionalmente, el receptor de PPAR $\gamma$  se observó en neuronas y en células gliales con morfología de astrocitos (Figs 2c y 2d).

La cuantificación de la densidad de células inmunopositivas para el receptor PPAR $\gamma$  mostró un incremento significativo en las muestras de los sujetos diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (Fig. 3). Para cada una de las dos regiones corticales



**Figura 1.** Inmunocolocalización del receptor de proliferación de peroxisomas activados  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) en secciones de corteza cerebral (giro frontal superior (IFG) y temporal superior (STG)) de controles sanos de edad similar e individuos con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

En secciones de tejido cerebral, en ausencia del anticuerpo primario (control negativo de tinción) no se observó ninguna señal característica en controles ni en sujetos con diagnóstico de Alzheimer (Figs. 1a y 1c). En secciones de individuos controles, en presencia del anticuerpo para el receptor de PPAR $\gamma$ , se observó una señal inmunopositiva débil y poco frecuente. En secciones de tejido de individuos con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se encontró una inmunorreactividad significativamente mayor respecto a las secciones de individuos controles (Figs. 1b y 1d). El anticuerpo PPAR $\gamma$  permitió evidenciar cuerpos celulares dispersos (Fig. 1d, flechas).



con reportes previos en los que se determinó un incremento en la expresión de este receptor en la fracción citosólica de homogenizados de la corteza temporal de sujetos con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Kitamura y col., 1999).

En los sujetos con diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, las células inmunorreactivas para el marcador PPAR $\gamma$  se distribuyeron heterogéneamente en todas las capas de la corteza cerebral, encontrándose asociados a zonas en las que la citoarquitectura se observaba perturbada a consecuencia de una aparente acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide. Esto permite sugerir que el incremento en la concentración de este péptido en el espacio extracelular podría desencadenar una respuesta típica de migración celular hacia las zonas en donde él se acumula. Lo que coincide con un incremento de PPAR $\gamma$  en la región perinuclear de neuronas y células gliales, a pesar que no se ha observado al receptor colocalizado con las placas neuríticas (Sastre y col., 2006).

En el sistema nervioso central, varios tipos celulares son capaces de producir citoquinas y prostaglandinas. La microglía y la astrogliá producen interleuquina- $\gamma$ , sin embargo esta citoquina también se ha descrito en neuronas. Adicionalmente, estos tres tipos celulares en el sistema nervioso central también pueden sintetizar ciclooxigenasa-2 (Hirst y col., 1999). En consecuencia, la expresión de los receptores PPAR $\gamma$  en diversos tipos celulares, neuronas y células gliales (resultados presentes) podría constituir una respuesta que involucra, por una parte, a las neuronas que responden incrementando la expresión del receptor PPAR $\gamma$ , en apariencia como un fenómeno singular y discreto; y por otra, la acumulación en la astrogliá podría implicar un estado activo generado por la liberación de citoquinas al espacio extracelular a consecuencia de la muerte de las células ante el reto generado por la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide.

Nuestros resultados permiten sugerir que a consecuencia de la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide se produce una migración de células, posiblemente inmunopositivas para la proteína ácida glial, que actuarían como barrera para disminuir la difusión de citoquinas proinflamatorias. La evidencia de la presencia de inmunoreactividad de PPAR $\gamma$  asociada con las neuronas piramidales en el IFG y STG de cerebros con diagnóstico de EA, así como en células inmunopositivas para la proteína ácida glial, es indicativo que durante la progresión de la patología de la EA, la activación de PPAR $\gamma$  puede ocurrir como parte de una interacción dinámica entre las neuronas y las células astrogliales. La función de la familia

de receptores de PPAR $\gamma$  en el tejido neural no ha sido establecida hasta el momento. La activación del receptor podría además regular negativamente la activación de los macrófagos y la expresión de citoquinas mediante una función antagonica o de transrepresión, lo que ocurre mediante la inhibición de la actividad de factores de transcripción NF $\kappa$ B, AP-1 y STAT, sin involucrar su función de enlazamiento al receptor de PPAR $\gamma$  propiamente dicho (Li y col., 2000). Adicionalmente, el receptor de PPAR $\gamma$  podría ser activado por el agonista endógeno PGJ2 (15d-PGJ2) y sus metabolitos inmediatos, así como por la indometacina, otros NSAIDs y agentes antidiabéticos de la clase de las tiazolidinadionas (Combs y col., 2000; Sastre y col., 2006).

En una propuesta de interacción de los tres componentes celulares se ha sugerido que la microglía activada como resultado de la acumulación de A $\beta$  fibrilar, podría liberar citoquinas (PGE/J2 e IL-1/6), las cuales a su vez activarían tirosina quinasas que fosforilan a las quinasas de proteínas asociadas, p38 o *tau*, para inducir la migración de las células gliales, que en un circuito amplificado puede promover la muerte de la neurona. Como una consecuencia favorable, la activación de PPAR $\gamma$  podría resultar en una reducción en la liberación de citoquinas, como se mencionó anteriormente, y del procesamiento anómalo de la proteína precursora del péptido amiloide (APP) (Sastre y col., 2003; D'Abrahamo y col., 2005).

Nuestra evidencia soporta la hipótesis de Terry (2000), según la cual una incidencia diferencial en el daño cognitivo en la EA ocurre como un resultado de distintos procesos patológicos que conducen a la pérdida de sinapsis y de somas neuronales. Esta propuesta se basa en la detección de la inmunoreactividad de PPAR $\gamma$  en neuronas, en neuritis distróficas, así como en células inmunopositivas para GFAP no asociadas con las placas seniles.

La demostración de la acumulación extensiva de PPAR $\gamma$  en las neuronas y en la glía de cerebros provenientes de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, indica una respuesta celular en asociación con eventos patológicos locales. El papel de las células gliales en la patología de la enfermedad de Alzheimer se sustenta por los estudios en donde se describe un incremento en la expresión del antígeno Fas (CD95) en los astrocitos y en la subpoblación de células inmunopositivas para GFAP en cerebros con diagnóstico de EA (Nishimira y col., 1995). Adicionalmente se ha demostrado una regulación hacia arriba de la proteína supresora de tumores p53 en las células gliales de cerebros con diagnóstico de EA (Kitamura y col., 1997).

Nosotros concluimos que la acumulación de PPAR $\gamma$  ocurre en múltiples componentes celulares durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el orden temporal de eventos que implican la activación de PPAR $\gamma$  espera ser establecido.

## Agradecimientos

Resultados parciales de este trabajo fueron presentados en el Congreso anual de la Sociedad de Neurociencia en San Diego, California, 2004, financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

## Referencias

- ADAMS J, COLLAÇO-MORAES Y, DE BELLEROCHE J. 1996. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem*. 66:6-13.
- AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, BRADT B, BAUER J, COLE GM, COOPER NR, EIKELENBOOM P, EMMERLING M, FIEBICH BL, FINCH CE, FRAUTSCHY S, GRIFFIN WS, HAMPEL H, HULL M, LANDRETH G, LUE L, MRAK R, MACKENZIE IR, MCGEER PL, O'BANION MK, PACHTER J, PASINETTI G, PLATA-SALAMAN C, ROGERS J, RYDEL R, SHEN Y, STREIT W, STROHMEYER R, TOYOYAMA I, VAN MUISWINKEL FL, VEERHUIS R, WALKER D, WEBSTER S, WEGRZYNIAK B, WENK G, WYSS-CORAY T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21:383-421.
- BARAK Y, NELSON MC, ONG ES, JONES YZ, RUIZ-LOZANO P, CHIEN KR, KODER A, EVANS RM. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 4:585-595.
- BREITNER JC, GAU BA, WELSH KA, PLASSMAN BL, McDONALD WM, HELMS MJ, ANTHONY JC. 1994. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology*. 44:227-232.
- COMBS CK, JOHNSON DE, KARLO JC, CANNADY SB, LANDRETH GE. 2000. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci*. 20(2):558-67.
- CUNARD R, RICOTE M, DiCAMPLI D, ARCHER DC, KAHN DA, GLASS CK, KELLY CJ. 2002. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol*. 168:2795-2802.
- DAYNES RA, JONES DC. 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2:748-59.
- D'ABRAMO C, MASSONE S, ZINGG JM, PIZZUTI A, MARAMBAUD P, DALLA PICCOLA B, AZZI A, MARINARI UM, PRONZATO MA, RICCIARELLI R. 2005. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in amyloid precursor protein processing and amyloid beta-mediated cell death. *Biochem J*. 1;391(Pt 3):693-8.
- EVANS RM, BARISH GD, WANG YX. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 10:355-361.
- GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K, TUNG YC, QUINLAN M, WISNIEWSKI HM, BINDER LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:4913-4917.
- HARDY J, ALLSOP D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 12:383-388.
- HENEKA MT, KLOCKGETHER T, FEINSTEIN DL. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci*. 20:6862-6867.
- HIRST WD, YOUNG KA, NEWTON R, ALLPORT VC, MARRIOTT DR, WILKIN GP. 1999. Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 13(1):57-68.
- HO L, PIERONI C, WINGER D, PUROHIT DP, AISEN PS, PASINETTI GM. 1999. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 57:295-303.
- HÜLL M, LIEB K, FIEBICH BL. 2002. Pathways of inflammatory activation in Alzheimer's disease: potential targets for disease modifying drugs. *Curr Med Chem*. 9:83-88.
- JIANG C, TING AT, SEED B. 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 391:82-86.
- JOACHIM C, GAMES D, MORRIS J, WARD P, FRENKEL D, SELKOE D. 1991. Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques. *Am J Pathol*. 138:373-384.
- JONES DC, MANNING BM, DAYNES RA. 2002. A role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in T-cell physiology and ageing immunobiology. *Proc Nutr Soc*. 61:363-369.
- KAMBOH MI, DEKOSKY ST. 1995. Apolipoprotein E genotyping in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 38:967-970.
- KAMBOH MI, EVANS RW, ASTON CE. 1995. Genetic effect of apolipoprotein(a) and apolipoprotein E polymorphisms on plasma quantitative risk factors for coronary heart disease in American black women. *Atherosclerosis* 117:73-81.
- KAMBOH MI. 1995. Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum Biol*. 67: 195-215.
- KIELIAN T, DREW PD. 2003. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res*. 71:315-325.
- KITAMURA Y, SHIMOHAMA S, KOIKE H, KAKIMURA J, MATSUOKA Y, NOMURA Y, GEBICKE-HAERTER PJ, TANIGUCHI T. 1999. Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun*. 254:582-586.

- LEHMANN JM, LENHARD JM, OLIVER BB, RINGOLD GM, KLIEWER SA. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 272:3406-3410.
- LI AC, BROWN KK, SILVESTRE MJ, WILLSON TM, PALINSKI W, GLASS CK. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 106(4):523-31.
- LI M, PASCUAL G, GLASS CK. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol.* 20:4699-4707.
- MCGEER EG, MCGEER PL. 1997. The role of the immune system in neurodegenerative disorders. *Mov Disord.* 12: 855-858.
- MCGEER PL, SCHULZER M, MCGEER EG. 1996 Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology.* 47:425-432.
- MONTINE TJ, SIDELL KR, CREWS BC, MARKESBERY WR, MARNETT LJ, ROBERTS LJ, MORROW JD. 1999. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology.* 53:1495-1498.
- OGAWA O, UMEGAKI H, SUMI D, HAYASHI T, NAKAMURA A, THAKUR NK, YOSHIMURA J, ENDO H, IGUCHI A. 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression by indomethacin or ibuprofen in beta-amyloid protein-stimulated J774 cells. *Eur J Pharmacol.* 408:137-141.
- OKA A, TAKASHIMA S. 1997. Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurones and axons. *Neuroreport.* 8:1161-1164.
- PAPASSOTIROPOULOS A, BAGLI M, JESSEN F, BAYER TA, MAIER W, RAO ML, HEUN R. 1999. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 45:666-668.
- PASINETTI GM, AISEN PS. 1998. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience.* 87:319-324.
- RICOTE M, HUANG JT, WELCH JS, GLASS CK. 1999. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol.* 66:733-739.
- SASTRE M, DEWACHTER I, LANDRETH GE, WILLSON TM, KLOCKGETHER T, VAN LEUVEN F, HENKA MT. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci.* 23 (30):9796-804.
- SASTRE M, DEWACHTER I, ROSSNER S, BOGDANOVIC N, ROSEN E, BORGHGRAEF P, EVERT BO, DUMITRESCU-OZIMEK L, THAL DR, LANDRETH G, WALTER J, KLOCKGETHER T, VAN LEUVEN F, HENKA MT. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:443-448.
- SASTRE M, KLOCKGETHER T, HENKA MT. 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* 24:167-176.
- SELKOE DJ. 1994. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53:438-447.
- TUGWOOD JD, ISSEMAN I, ANDERSON RG, BUNDELL KR, MCPHEAT WL, GREEN S. 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11:433-439.
- WYSS-CORAY, T. 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 12:1005-1015.
- YANKNER BA, MESULAM MM. 1991. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Beta-Amyloid and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 325: 1849-1857.

# Bioinformática: aplicaciones en química medicinal

MARÍA LUISA SERRANO G.\*

## Resumen

La sinergia entre los métodos biológicos experimentales y la bioinformática ha proporcionado grandes beneficios a diferentes áreas de las ciencias biológicas, en particular a la química medicinal. En este trabajo se mostrara algunos ejemplos que sirven para ilustrar la utilidad de los métodos informáticos en el análisis de la estructura de las proteínas, y algunas de sus aplicaciones en modelado molecular que proporcionan información relevante acerca de sistemas de interés biomédico.

**Palabras clave:** bioinformática, modelado molecular.

## Abstract

The synergy between experimental biology and bioinformatics has greatly benefited many different areas of the life sciences, especially medicinal chemistry. This work will describe a few examples of highlighting the effectiveness computational methods in protein structural analysis and some applications in molecular modeling that could provide relevant information about systems of biomedical interest.

**Key words:** bioinformatics, molecular modeling.

## Introducción

Ha transcurrido más de un lustro desde que se completó la primera secuencia del genoma humano. A partir de ese momento, los Proyectos Genoma han impulsado grandes inversiones en biotecnología (IHGSC, 2004; Lander, 2001 y Venter, 2001) y aumentado la atención hacia la bioinformática, una disciplina emergente que puede ser ampliamente definida como la interfase entre dos ciencias, la biología y la computación, y una de las áreas de mayor crecimiento en la ciencia.

El desafío de esta disciplina es el facilitar la colección y organización de la información que se desprenden de los Proyectos Genoma, así como también desarrollar las herramientas mediante las cuales los investigadores puedan realizar el análisis e interpretación de varios tipos de datos, incluyendo secuencias de nucleótidos y aminoácidos, dominios y estructura de proteínas.

La primera industria que comprendió el impacto de la bioinformática fue la industria farmacéutica, que la utiliza para el diseño de nuevos fármacos a

partir de la detección de potenciales dianas o blancos terapéuticos. El trabajo multidisciplinario y el empleo de métodos informáticos permiten también estudiar la estructura y función de proteínas, evaluar sus interacciones con compuestos líderes, e inclusive estudiar interacciones entre proteínas, como las interacciones antígeno-anticuerpo, importantes para el desarrollo de vacunas.

A pesar de lo anteriormente mencionado, cabe preguntarse: ¿cuántos de los fármacos disponibles hoy en día se han descubierto gracias a la biología molecular computacional y al empleo de métodos informáticos para el diseño de fármacos? La realidad es que el uso de las herramientas computacionales ha permeado todos los aspectos del descubrimiento de nuevos fármacos. Muchos programas de investigación comienzan con la identificación de una diana molecular, de potencial valor terapéutico, a través del análisis computacional de los datos disponibles, análisis de secuencias, predicción de estructura de proteínas y búsquedas en bases de datos de la estructura, aunque su desarrollo como blanco

\* Unidad de Química Medicinal, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 1041-A, Venezuela.

terapéutico se alcance luego de extensos estudios biológicos. Posteriormente, el esfuerzo se dirige hacia el descubrimiento de compuestos líderes de manera experimental, empleando el cribado masivo, que luego se mejoran con el uso de métodos informáticos como la evaluación *in silico* de librerías moleculares. Eventualmente, se puede determinar la estructura de complejos cristalinos de algunos compuestos con la diana molecular. Esto permite mejorarlos eficientemente empleando algunos de los diferentes métodos de diseño de fármacos.

En la literatura se encuentran excelentes artículos que ilustran las posibilidades de combinar el trabajo experimental y las aproximaciones computacionales (Tramontano, 2006; Chen, 2005; Fauman, 2003; Jorgensen, 2004 y Nielsen, 2005), así como también los logros alcanzados con métodos de diseño de fármacos basados en la estructura del receptor (SBDD) (Hardy, 2003 y Maryanoff, 2004) que han contribuido con unos cincuenta compuestos que se encuentran en pruebas clínicas y en la aprobación de numerosos fármacos.

Las aplicaciones de biología molecular computacional datan de los años 90, cuando se impulsa el desarrollo de métodos informáticos que utilizan la estructura del receptor o diana farmacológica, debido al incremento exponencial del número de estructuras cristalinas disponibles en las bases de datos públicas. Las bondades de emplear la estructura de las proteínas para desarrollar modelos de Relación Estructura Química-Actividad Biológica, puede ilustrarse con numerosos ejemplos de la literatura.

Los métodos indirectos que se basan en la estructura de los ligandos permiten generar una hipótesis de farmacóforo 3D (un arreglo único tridimensional de los grupos funcionales comunes a la mayoría de los ligandos del receptor). En muchos casos, cuando los ligandos no son estructuralmente muy diferentes y se cuenta con un compuesto rígido desde el punto de vista conformacional, se puede obtener un farmacóforo razonable por métodos tanto automáticos como semiautomáticos.

Los métodos directos, por el contrario, requieren del conocimiento previo de la estructura tridimensional del receptor o diana farmacológica, y cuentan con algoritmos capaces de estudiar el posicionamiento molecular de los ligandos en el sitio activo. Ha resultado muy atractivo poder combinar la precisión de la información disponible en los complejos ligando-receptor con la eficiencia computacional de los métodos informáticos indirectos. Con esta aproximación, la alineación de los ligandos, para desarrollar una hipótesis de farmacóforo y establecer un

modelo cuantitativo de relación estructura actividad química-actividad biológica (QSAR), se realiza tomando como plantilla la orientación del ligando en el sitio activo bajo estudio. Esta estrategia había sido empleada de manera exitosa por Waller y colaboradores con 59 inhibidores de la HIV proteasa (Waller, 1993).

Nosotros empleamos esta aproximación conjuntamente con el método CoMFA para obtener un farmacóforo tridimensional QSAR de 60 inhibidores, estructuralmente diferentes, de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Cho y col., 1996). La inhibición de esta enzima se consideraba como una de las estrategias prometedoras para el tratamiento del mal de Alzheimer (Hakansson, 1993) y con posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (Sirvio, 1992). Durante años habían sido sintetizados cientos de inhibidores, algunos con aplicaciones clínicas, pero de estructura química muy diversa y no había sido posible establecer un farmacóforo común a todos ellos. La estructura química de estos inhibidores es variada, desde compuestos bicuaternarios como el decametanium (DMC) hasta compuestos monocatiónicos simples como el edromorfium (EDR), y formalmente neutros como la tacrina (THA). En ese momento fue reportado el análisis por cristalografía de rayos-X de la AChE de *Torpedo californica* (EC 3.1.1.7) y seguidamente las estructuras cristalinas de tres complejos de la enzima con tres inhibidores estructuralmente diferentes, EDR, THA y DMC (Harel, 1993) que proporcionaron información, no sólo acerca de la conformación bioactiva de los ligandos, sino también de la orientación relativa de ellos en el sitio activo de la enzima. Esta aproximación permitió desarrollar un modelo CoMFA de alto valor predictivo ( $q^2$  de 0.734) para los 60 inhibidores de la AChE.

En otros casos, además de utilizar la estructura cristalina de los complejos enzima/inhibidor para obtener la conformación bioactiva, se pueden obtener datos adicionales que de alguna manera contribuyan a establecer un modelo QSAR que correlacione la actividad biológica con algunos parámetros fisicoquímicos. Nuestro grupo ha utilizado esta estrategia recientemente en un estudio QSAR realizado para una serie de análogos de celecoxib (sulfonamidas del tipo diarilpirazoles, diarilimidazoles y diarilpirroles), inhibidores selectivos de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Gómez, González y Serrano, 2006). Debido al reciente interés de estos compuestos como anticancerígenos, las investigaciones en cuanto al desarrollo de este tipo de fármacos antiinflamatorios continúan, aun cuando varios de estos medicamentos han sido eliminados por la FDA del

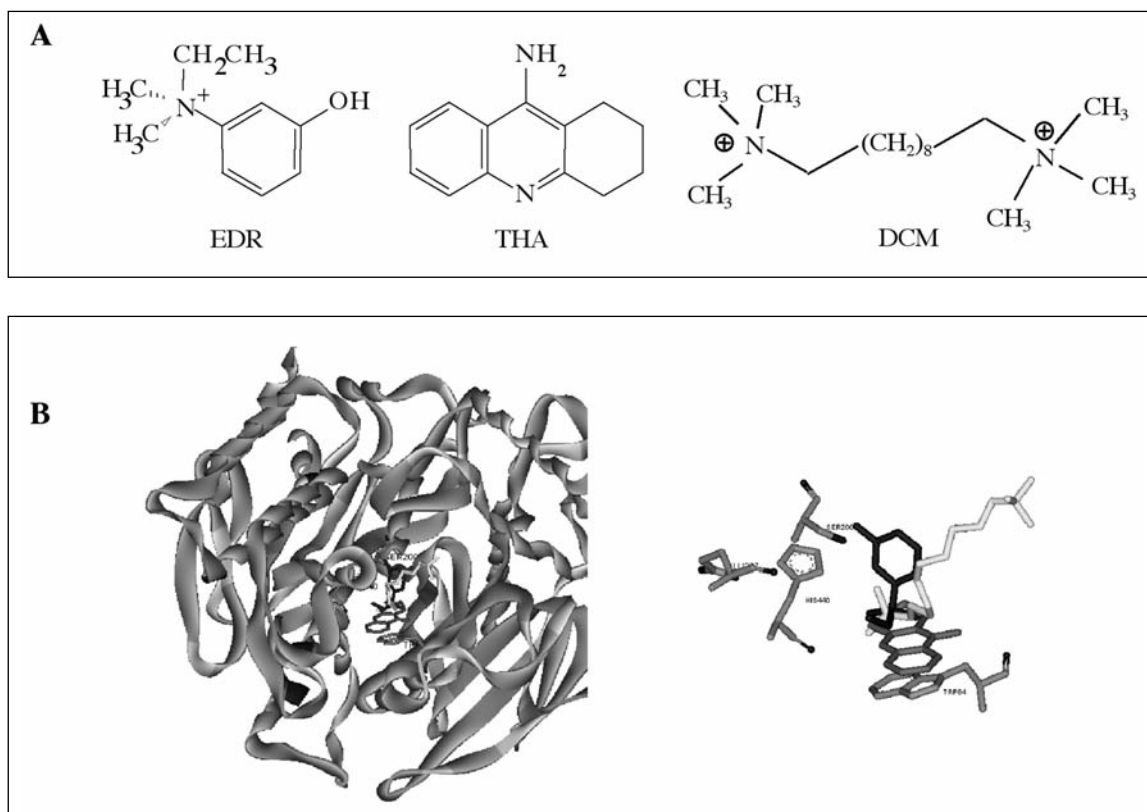


Figura 1

**A.** Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) presentes en las estructuras cristalinas. **B.** Superposición de los tres complejos cristalinos EDR/AChE, THA/AChE y DCM/AChE. En la ampliación se observa la orientación relativa en el sitio catalítico de la enzima de los tres inhibidores.

mercado farmacéutico por generar problemas a nivel cardíaco (Dogne, 2005). Algunos estudios demuestran que la COX-2 se encuentra sobre-expresada en numerosos tejidos cancerígenos humanos (Baptiste, 2006).

Si bien hoy en día estas aproximaciones siguen siendo de utilidad, los avances más recientes en el área de diseño de nuevos ligandos van dirigidos en su mayoría hacia el Cribado de Librerías de Compuestos y el diseño *de Novo*. En la etapa que corresponde a la generación de nuevos ligandos, el Cribado Altamente Eficiente (High Throughput Screening, HTS) requiere de una librería de compuestos y de los correspondientes ensayos de actividad (Herzberg, 2000); esta aproximación, que muchas veces es poco exitosa y muy costosa, se ha colocado en desventaja frente al Cribado Virtual. Este último puede realizarse sobre librerías de compuestos conocidos, o teóricos, y sólo requiere de los datos de actividad para algunos de los compuestos o de la estructura del blanco terapéutico. En este sentido, a pesar de haber notables avances en las diferentes aproximaciones de Cribado Virtual, el estudio de las interacciones ligando-receptor es actualmente una de las aproximaciones más populares con métodos como

el Docking de Alta Eficiencia (High-Throughput Docking (HTD), que permite evaluar el posicionamiento molecular en el sitio activo de una diana farmacológica, con bases de datos de cientos o miles de compuestos, con el propósito de identificar prototipos novedosos que presenten la actividad biológica deseada (Wang, 2001). Estos compuestos se sintetizan, modifican y, en combinación con estudios teóricos de propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) se puede reducir el número de compuestos que se somete a la evaluación biológica final (Shoicket, 2002).

Por otra parte, el diseño *de Novo* permite generar nuevos inhibidores en el sitio activo conocido del blanco terapéutico (Taylor, 2002). Los programas de Docking pueden utilizarse con este propósito cuando están acoplados con un generador automático de estructuras. Actualmente hay programas especializados que han sido desarrollados para construir posibles ligandos en el sitio activo de una diana, usualmente colocando y conectando fragmentos moleculares o conectando los fragmentos a un núcleo. Entre las primeras alternativas se puede mencionar a programas como LUDI (Böhm, 1992) y SPROUT (Gillet, 1994) y entre las más recientes se

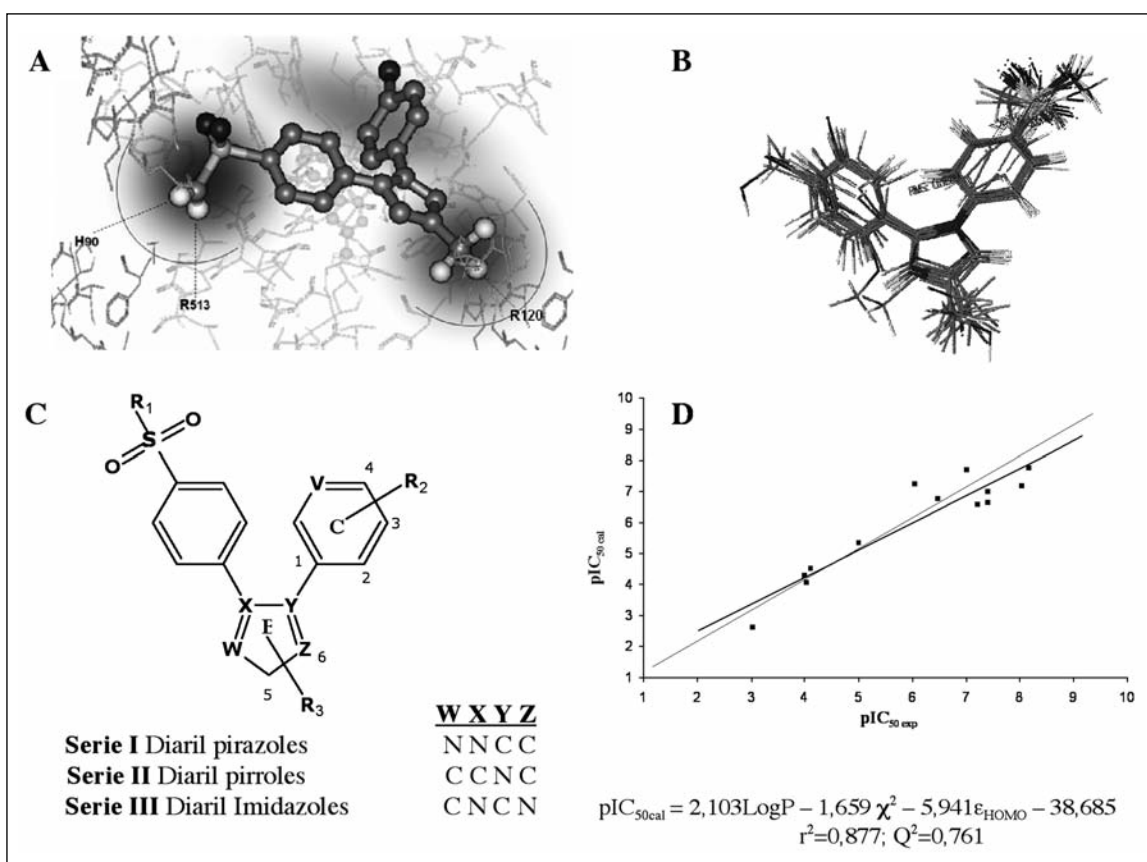


Figura 2

A. Complejo cristalino de SC-558/COX-2 donde se muestra las interacciones de puente de hidrógeno con los residuos H<sub>90</sub> y R<sub>513</sub> y el grupo sulfonamido, así como las del grupo trifluorometil con el residuo R<sub>120</sub>. B. Superposición de las moléculas estudiadas. C. Inhibidores de la COX-2. D. Cálculo y evaluación de la ecuación de regresión lineal.

encuentra BOMB (Biochemical and Organic Model Builder) (Jorgensen, 2004), que puede utilizarse para construir estructuras individuales o una librería combinatoria.

La contribución de la bioinformática al desarrollo de vacunas (fármacos de naturaleza peptídica) es aun más importante, especialmente porque los prototipos son proteínas y por ello la bioinformática, la genómica y la proteómica han revolucionado la investigación en el área de diagnóstico, terapéutica y desarrollo de vacunas. Tradicionalmente, las vacunas se desarrollaban según los principios de Pasteur, aislando, inactivando e inyectando el agente causativo de una enfermedad infecciosa. Sin embargo, al disponer del genoma completo de diversos microorganismos, la aproximación se puede realizar a través de un proceso denominado *vaccinología reversa* (Rappuoli, 2000). Es un proceso que se inicia con el análisis de la información genómica que finalmente conduce, luego del análisis *in silico*, a la predicción de antígenos con posibilidades para ser desarrollados como vacunas. El nuevo

reto para este campo será combinar la vaccinología con la biología estructural.

El desarrollo de vacunas y otros compuestos de interés biológico necesita de la comprensión del papel fisiológico y funcional de las proteínas involucradas en esos procesos. Esta tarea se facilita cuando se dispone de la estructura tridimensional de las proteínas. En la actualidad, a pesar de la abundante cantidad de secuencias que se encuentra disponible en las bases de datos especializadas, como SWISS-PROT y trEMBL (Bairoch, 2004 y Boeckmann, 2005), sólo una pequeña parte de ellas tiene una estructura tridimensional conocida. La estructura 3D de una proteína, que es en definitiva el aspecto determinante para su función biológica, puede ser determinada experimentalmente, ya sea por cristalografía de rayos-X o por RMN. Sin embargo, esto no siempre es posible y, por esta razón, la determinación estructural de proteínas, empleando métodos *in silico*, ha realizado un aporte cada vez mayor gracias a los avances realizados en los programas de modelado molecular (Sali, 1997, Tramontano, 1998; Bystroff, 1997 y Jones, 2003).

Las estructuras tridimensionales así determinadas y el uso de programas diseñados para la predicción de péptidos antigénicos (Tramontano, 1998) han permitido aproximarse al desarrollo de vacunas empleando péptidos sintéticos que simulen una región de la proteína nativa.

Aunque hasta la fecha no existen protocolos o programas que conduzcan a la identificación efectiva de secuencias antigénicas, hay varios métodos que se basan en algunas de las propiedades fisicoquímicas que presentan epítopos que han sido determinados experimentalmente, tales como flexibilidad, hidrofobicidad y accesibilidad. Entre los programas para la predicción de péptidos antigénicos se encuentran: Preditop (Pellequer, 1993), Antigenic Index (Jameson, 1988), Antigenic (Kolaskar, 1990) y Antheprot (Deleage, 2001).

En el área de la parasitología molecular, la bioinformática ha producido un gran impacto, especialmente en el caso de algunas enfermedades parasitarias como la malaria, debido a que el dramático incremento de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos y a las medidas de control vectorial, ha creado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para atacar la enfermedad. Entre ellas el desarrollo de vacunas antimaláricas tiene, hoy en día, altísima prioridad.

El ciclo de vida del *Plasmodium* es extraordinariamente complejo, requiere de la expresión de proteínas especializadas para sobrevivir en el ambiente de sus huéspedes (el mosquito y el hombre), para la vida intracelular y extracelular, para la invasión de diferentes tipos de células y para evadir la respuesta inmune del huésped. Las estrategias para atacar esta enfermedad, ya sea con vacunas o nuevos fármacos, será mas efectiva si van dirigidas hacia un blanco o diana específica en el ciclo de vida del parásito y/o hacia proteínas que se expresan en estas etapas. Los genomas de *P. falciparum* y *P. yoelli* están completos, y actualmente se realizan estudios de secuenciación del genoma de *P. vivax* en el TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville MD), y permitirán a corto plazo identificar nuevos blancos o dianas que puedan emplearse para desarrollar vacunas y nuevos fármacos.

Nuestro interés en esta área se ha centrado fundamentalmente en *P. vivax*, que el parásito de mayor incidencia en Venezuela (boletines del MSDS, 2003). El objetivo de los estudios que hemos venido realizando ha sido desarrollar y utilizar los modelos tridimensionales de algunas proteínas de este parásito para definir posibles epítopos y proceder a la síntesis de péptidos con potenciales propiedades anti-génicas.

Hasta el presente se ha identificado y caracterizado inmunológicamente varios antígenos de *P. vivax* del estadio asexual del parásito, muchos de ellos homólogos de *P. falciparum*, y algunos de ellos están siendo evaluados en ensayos pre-clínicos de vacunación. Entre ellos, la Proteína 1 de Superficie del Merozoito de *P. vivax* (PvMSP-1), una proteína altamente antigénica y un fuerte candidato a vacuna (Collins, 1999; Yang, 1999). Dado que el fragmento C-terminal de esta proteína es el más inmunogénico (Soares, 1997) y en vista de que hasta la fecha no ha sido reportada la estructura cristalina de este fragmento para *P. vivax*, se construyó un modelo por homología a partir de las estructuras cristalinas de otras especies de *Plasmodium* (Serrano, Pérez y Medina, 2006).

Los datos estructurales así obtenidos permitieron realizar la comparación entre el modelo para la PvMSP-1<sub>19</sub> y las estructuras cristalinas previamente reportadas para otras especies del parásito. De igual forma permitió la identificación de una cavidad en el primer dominio de la proteína adecuada para interacciones proteína-proteína (Figura 3).

Empleando el modelo se planificó una estrategia para la selección de los péptidos a sintetizar, usando de manera conjunta algoritmos matemáticos de predicción de epítopos como ANTHEPROT 4.0 y el método de Hoops y Woods para el análisis

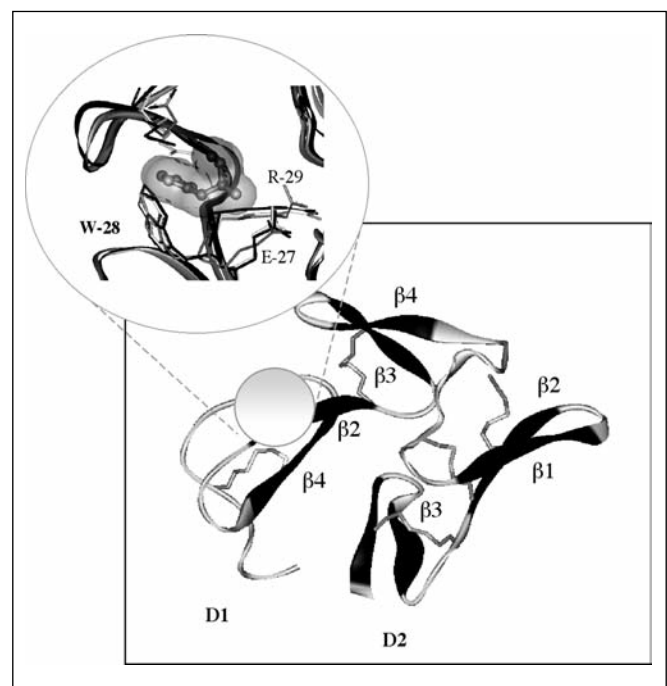


Figura 3

Modelo final de la PvMSP-1<sub>19</sub>. La representación en cinta incluye los enlaces disulfuro, muestra la cadena C? y las láminas antiparalelas ? en cada uno de los dominios EGF. Detalle donde se muestra la cavidad ubicada en el primer dominio de la proteína y se compara el modelo PvMSP-1<sub>19</sub> con las estructuras cristalinas de PmMSP-1<sub>19</sub> y PkMSP-1<sub>19</sub>.

de las regiones hidrofílicas de la proteína (Hoop, 1981). Los péptidos fueron evaluados frente al plasma de individuos con anticuerpos a *P. vivax* y varios de ellos resultaron altamente reactivos (Serrano, 2004). Actualmente nuestro grupo continúa trabajando en este sentido y pensamos extendernos hacia el estudio de otras proteínas.

El conocimiento, aunque sea aproximado, de la estructura tridimensional de las proteínas es esencial para conocer los detalles de su función molecular y proporciona información valiosa para el desarrollo de estrategias racionales que permitan identificar dianas farmacológicas, estudiar el posicionamiento molecular de nuevos ligandos, plantear mejores modelos teóricos de relación estructura química-actividad biológica (QSAR) y finalmente diseñar nuevos fármacos y vacunas.

Los ejemplos que hemos mencionado sólo describen una pequeña muestra de las enormes posibilidades de las aplicaciones de la bioinformática y de la gran diversidad de métodos informáticos que de ella se nutren.

## Referencias bibliográficas

- BAIROCH A, BOECKMANN B, FERRO S, GASTEIGER E. 2004. Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. *Brief Bioinform.* 5:39-55.  
<http://www.expasy.org/sprot/>
- BOECKMANN B, BLATTER MC, FAMIGLIETTI L, HINZ U, LANE L, ROECHERT B, BAIROCH A. 2005. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context *Comptes Rendus Biologies* 328:882-99.
- BÖHM HJ. 1992. The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 6: 61.
- BYSTROFF C, BAKER D. 1997. Blind predictions of local protein structure in CASP2 targets using the I-sites library. *Proteins, Suppl.* 1: 167-171.
- CHEN I, NEAMATI N, MACKERELL A. 2002. Structure-based inhibitor design targeting HIV-1 integrase. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2: 217-234.
- CHO SJ, SERRANO ML, BIER J, TROPSHA A. 1996. Structure-Based Alignment and Comparative Molecular Field Analysis of Acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* 39: 5064-5071.
- COLLINS WE, KASLOW DC, SULLIVAN JS, MORRIS CL, GALLAND GG, YANG C, SAEKHO AM, XIAO L, LAL AA. 1999. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19) of *Plasmodium vivax* in *Saimiri boliviensis* monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 60: 350-356.
- DELEAGE G, COMBET C, BLANCHET C, GEURJON C. 2001. ANTHE-PROT: An integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Computers Biol Med* 31: 259-267.
- FAUMAN E, HOPKINS A, GROOM C. 2003. Structural bioinformatics in drug discovery. *Methods Biochem Anal* 44: 477-497.
- FLORENS L, WASHBURN MP, RAINE JD, ANTHONY RM, GRAINGER M, HAYNES JD, MOCH JK, MUSTER N, SACCI JB, TABB DL, WITNEY AA, WOLTERS D, WU Y, GARDNER MJ, HOLDER AA, SINDEN RE, YATES JR, CARUCCI DJ. 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419: 520-526.
- GILLET VJ, NEWELL W, MATA P, MYATT G, SIKE S, ZSOLDOS Z, JOHNSON AP. 1994. SPROUT: recent developments in the de novo design of molecules. *J Chem Inf Comput Sci* 34: 207-17.
- HAKANSSON L. 1993. Mechanism of Action of Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 149, 7-9.
- HARDY LW, MALIKAYIL A. 2003. The impact of structure-guided drug design on clinical agents. *Curr Drug Discov* 15: 15-20.
- HAREL M, SCHALK I, EHRET-SABATIER L, BOUET F, GOELDNER M, HIRTH C, AXELSEN PH, SILMAN I, SUSSMAN JL. 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9031-9035.
- HERZBERG RP, POPE AJ. 2000. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol* 4: 445-451.
- HOOP TP, WOODS, KR. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad* 78: 3824-3828.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.
- JAMESON BA, WOLF H. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci.* 41:181-186.
- JONES DT, MCGUFFIN LJ. 2003. Assembling novel protein folds from supersecondary structural fragments. *Proteins* 5, Suppl. 6: 480-485.
- JORGENSEN W. 2004. The many roles of computation in drug discovery. *Science* 303: 1813-1818.
- KOLASKAR AS, TONGAONKAR PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276: 172-174.
- LANDER ES, LINTO LM, BIRREN B, NUSBAUM C, ZODY MC, BALDWIN J, DEVON K, DEWAR K, DOYLE M, FITZHUGH W, FUNKE R, GAGE D, HARRIS K, HEAFORD A, HOWLAND J, KANN L, LEHOCZKY J, LEVINE R, MCEWAN P, MCKERNAN K, MELDRIM J, MESIROV JP, MIRANDA C, MORRIS W, NAYLOR J, RAYMOND C, ROSETTI M, SANTOS R, SHERIDAN A, SOUGNEZ C, STANGE-THOMANN N, STOJANOVIC N, SUBRAMANIAN A, WYMAN D, ROGERS J, SULSTON J, AINSCOUGH R, BECK S, BENTLEY D, BURTON J, CLEE C, CARTER, N,

- COULSON A, DEADMAN R, DELOUKAS P, DUNHAM A, DUNHAM I, DURBIN R, FRENCH L, GRAFHAM D, GREGORY S, HUBBARD T, HUMPHRAY S, HUNT A, JONES M, LLOYD C, MCMURRAY A, MATTHEWS L, MERCER S, MILNE S, MULLIKIN JC, MUNGALL A, PLUMB R, ROSS M, SHOWNKEEN R, SIMS S, WATERSTON RH, WILSON RK, HILLIER LW, MCPHERSON JD, MARRA MA, MARDIS ER, FULTON LA, CHINWALLA AT, PEPIN KH, GISH WR, CHISSOE SL, WENDL MC, DELEHAUNTY KD, MINER TL, DELEHAUNTY A, KRAMER JB, COOK LL, FULTON RS, JOHNSON DL, MINX PJ, CLIFTON SW, HAWKINS T, BRANSCOMB E, PREDKI P, RICHARDSON P, WENNING S, SLEZAK T, DOGGETT N, CHENG JF, OLSEN A, LUCAS S, ELKIN C, UBERBACHER E, FRAZIER M, GIBBS RA, MUZYNY DM, SCHERER SE, BOUCK JB, SODERGREN EJ, WORLEY KC, RIVES CM, GORRELL JH, METZKER ML, NAYLOR SL, KUCHERLAPATI RS, NELSON DL, WEINSTOCK GM, SAKAKI Y, FUJIYAMA A, HATTORI M, YADA T, TOYODA A, ITOH T, KAWAGOE C, WATANABE H, TOTOKI Y, TAYLOR T, WEISSENBAACH J, HEILIG R, SAURIN W, ARTIGUENAVE F, BROTTIER P, BRULS T, PELLETIER E, ROBERT C, WINCKER P, SMITH DR, DOUCETTE-STAMM L, RUBENFIELD M, WEINSTOCK K, LEE HM, DUBOIS J, ROSENTHAL, A, PLATZER M, NYAKATURA G, TAUDIEN S, RUMP A, YANG H, YU J, WANG J, HUANG G, GU J, HOOD L, ROWEN L, MADAN A, QIN S, DAVIS RW, FEDERSPIEL NA, ABOLA AP, PROCTOR MJ, MYERS RM, SCHMUTZ J, DICKSON M, GRIMWOOD J, COX DR, OLSON MV, KAUL R, RAYMOND C, SHIMIZU N, KAWASAKI K, MINOSHIMA S, EVANS GA, ATHANASIOU M, SCHULTZ R, ROE BA, CHEN F, PAN H, RAMSER J, LEHRACH H, REINHARDT R, MCCOMBIE WR, DE LA BASTIDE M, DEDHIA N, BLÖCKER H, HORNISCHER K, NORDSIEK G, AGARWALA R, ARAVIND L, BAILEY JA, BATEMAN A, BATZOGLOU S, BIRNEY E, BORK P, BROWN DG, BURGE CB, CERUTTI L, CHEN HC, CHURCH D, CLAMP M, COPLEY RR, DOERKS T, EDDY SR, EICHLER EE, FUREY TS, GALAGAN J, GILBERT JG, HARMON C, HAYASHIZAKI Y, HAUSSLER D, HERMJAKOB H, HOKAMP K, JANG W, JOHNSON LS, JONES TA, KASIF S, KASPRYZK A, KENNEDY S, KENT WJ, KITTS P, KOONIN EV, KORF I, KULP D, LANCET D, LOWE TM, MCLYSAGHT A, MIKKELSEN T, MORAN JV, MULDER N, POLLARA VJ, PONTING CP, SCHULER G, SCHULTZ J, SLATER G, SMIT AF, STUPKA E, SZUSTAKOWSKI J, THIERRY-MIEG D, THIERRY-MIEG J, WAGNER L, WALLIS J, WHEELER R, WILLIAMS A, WOLF YI, WOLFE KH, YANG SP, YEH RF, COLLINS F, GUYER MS, PETERSON J, FELSENFELD A, WETTERSTRAND KA, PATRINOS A, MORGAN MJ, DE JONG P, CATANESE JJ, OSOEGAWA K, SHIZUYA H, CHOI S, CHEN YJ; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- MARYANOFF BE. 2004. Inhibitors of Serine Proteases as Potential Therapeutic Agents: The Road from Thrombin to Trypsin to Cathepsin G. *J Med Chem* 47: 769-787.
- NIELSEN U, SCHOEBERL B. 2005. Using computational modeling to drive the development of targeted therapeutics. *Drugs* 8: 822-826.
- PELLEQUER JL, WESTHOF E. 1993. PREDITOP: a program for antigenicity prediction. *J Mol Graph.* 11:204-10, 191-192.
- Plasmodium vivax Genome Project. The Institute for Genomic Research (TIGR) <http://www.tigr.org>
- PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE LA MALARIA. Boletines del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (2003). República Bolivariana de Venezuela.
- RAPPUOLI R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* 3: 445-450.
- SÁNCHEZ R, SALI A. 1997. Advances in comparative protein-structure modeling. *Curr Opin Struct Biol* 7: 206-214.
- SERRANO ML. 2004. Determinación de la Estructura Tridimensional de Moléculas Peptídicas a Través de Modelado Molecular. Aplicación a la Porción C-terminal de la MSP-1 de *Plasmodium vivax*. Selección y Síntesis de Péptidos con Posible Actividad Antigénica. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela.
- SERRANO ML, PÉREZ HA, MEDINA JD. 2006. Structure of C-terminal fragment of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium vivax* determined by homology modeling and molecular dynamics refinement, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 8359-8365.
- SHOICKET BK, MCGOVERN SL, WEI B, IRWIN JJ. 2002. Lead discovery using molecular docking. *Curr Opin Chem Biol* 6: 439.
- SIRVIO J, RIEKKINEN PJ. 1992. Brain and Cerebrospinal Fluid Cholinesterases in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Aging. A Critical Review of Clinical and Experimental Studies. *J. Neural Transm.: Parkinson's. Dis Dementia Sect.* 4: 337-358.
- SOARES IS, LEVITUS G, SOUSA JM, DEL PORTILLO HA, RODRIGUES MM. 1997. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein I in individuals exposed to malaria. *Infect Immun* 65: 1606-1614.
- TAYLOR RD, JEWSEBURY PJ, ESSEX JW. 2002. A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des* 16: 151-166.
- TRAMONTANO A. 1998. Homology modelling with low sequence identity. *Methods (San Diego, CA)* 14: 293-300.
- TRAMONTANO A. 2006. The role of molecular modeling in biomedical research. *FEBS Lett* 2928-2934.
- VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW, LI PW, MURAL RJ, SUTTON GG, SMITH HO, YANDELL M, EVANS CA, HOLT RA, GOCAYNE JD, AMANATIDES P, BALLEW RM, HUSON DH, WORTMAN JR, ZHANG Q, KODIRA CD, ZHENG XH, CHEN L, SKUPSKI M, SUBRAMANIAN G, THOMAS PD, ZHANG J, GABOR MIKLOS GL, NELSON C, BRODER S, CLARK AG, NADEAU J, MCKUSICK VA, ZINDER N, LEVINE AJ, ROBERTS RJ, SIMON M, SLAYMAN C, HUNKAPILLER M, BOLANOS R, DELCHER A, DEW I, FASULO D, FLANIGAN M, FLOREA L, HALPERN A, HANNENHALLI S, KRAVITZ S, LEVY S, MOBARRY C, REINERT K, REMINGTON K, ABU-THREIDEH J, BEASLEY E, BIDDICK K, BONAZZI V, BRANDON R, CARGILL M, CHANDRAMOULISWARAN I, CHARLAB R, CHATURVEDI K, DENG Z, DI FRANCESCO V, DUNN P, EILBECK K, EVANGELISTA C, GABRIELIAN AE, GAN W, GE W, GONG F, GU Z, GUAN P, HEIMAN TJ, HIGGINS ME, JI RR, KE Z, KETCHUM KA, LAI Z, LEI Y, LI Z, LI J, LIANG Y, LIN X, LU F, MERKULOV GV, MILSHINA N, MOORE HM, NAIK AK, NARAYAN VA, NEELAM B, NUSSKERN D, RUSCH DB, SALZBERG S, SHAO W, SHUE B, SUN J, WANG Z, WANG A, WANG X, WANG J, WEI M, WIDES R, XIAO C, YAN C, YAO A, YE J, ZHAN M, ZHANG W, ZHANG H, ZHAO Q, ZHENG L, ZHONG F,

- ZHONG W, ZHU S, ZHAO S, GILBERT D, BAUMHUETER S, SPIER G, CARTER C, CRAVCHIK A, WOODAGE T, ALI F, AN H, AWE A, BALDWIN D, BADEN H, BARNSTEAD M, BARROW I, BEESON K, BUSAM D, CARVER A, CENTER A, CHENG ML, CURRY L, DANAHER S, DAVENPORT L, DESILETS R, DIETZ S, DODSON K, DOUP L, FERRIERA S, GARG N, GLUECKSMANN A, HART B, HAYNES J, HAYNES C, HEINER C, HLADUN S, HOSTIN D, HOUCK J, HOWLAND T, IBEGWAM C, JOHNSON J, KALUSH F, KLINE L, KODURU S, LOVE A, MANN F, MAY D, MCCAWLEY S, MCINTOSH T, McMULLEN I, MOY M, MOY L, MURPHY B, NELSON K, PFANNKUCH C, PRATTS E, PURI V, QURESHI H, REARDON M, RODRIGUEZ R, ROGERS YH, ROMBLAD D, RUHFEL B, SCOTT R, SITTER C, SMALLWOOD M, STEWART E, STRONG R, SUH E, THOMAS R, TINT NN, TSE S, VECH C, WANG G, WETTER J, WILLIAMS S, WILLIAMS M, WINDSOR S, WINN-DEEN E, WOLFE K, ZAVERI J, ZAVERI K, ABRIL JF, GUIGO R, CAMPBELL MJ, SJOLANDER KV, KARLAK B, KEJARIWAL A, MI H, LAZAREVA B, HATTON T, NARECHANIA A, DIEMER K, MURUGANUJAN A, GUO N, SATO S, BAFNA V, ISTRAIL S, LIPPERT R, SCHWARTZ R, WALENZ B, YOOSEPH S, ALLEN D, BASU A, BAXENDALE J, BLICK L, CAMINHA M, CARNES-STINE J, CAULK P, CHIANG YH, COYNE M, DAHLKE C, MAYS A, DOMBROSKI M, DONNELLY M, ELY D, ESPARHAM S, FOSLER C, GIRE H, GLANOWSKI S, GLASSER K, GLODEK A, GOROKHOV M, GRAHAM K, GROPMAN B, HARRIS M, HEIL J, HENDERSON S, HOOVER J, JENNINGS D, JORDAN C, JORDAN J, KASHA J, KAGAN L, KRAFT C, LEVITSKY A, LEWIS M, LIU X, LOPEZ J, MA D, MAJOROS W, MCDANIEL J, MURPHY S, NEWMAN M, NGUYEN T, NGUYEN N, NODELL M, PAN S, PECK J, PETERSON M, ROWE W, SANDERS R, SCOTT J, SIMPSON M, SMITH T, SPRAGUE A, STOCKWELL T, TURNER R, VENTER E, WANG M, WEN M, WU D, WU M, XIA A, ZANDIEH A, ZHU X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- WALLER CL, OPREA TI, GIOLITTI A, MARSHALL GR. 1993. Three-Dimensional QSAR of Human Immunodeficiency Virus (I) Protease Inhibitors. 1. A CoMFA Study Employing Experimentally-Determined Alignment Rules. *J. Med. Chem.* 36: 4152-4160.
- WANG R, WANG S. 2001. How does consensus scoring work for virtual library screening? An idealized computer experiment. *J Chem Inf Comput Sci* 41: 1422-1426.
- WELLING GW, WIEJER WJ, VAN DER ZEE R, WELLING-WEBSTER S. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Letters* 188: 215-218.
- WHO, 2001. Informe de la Situación de los Programas Regionales en las Américas.
- YANG C, COLLINS WE, SULLIVAN JS, KASLOW DC, XIAO L, LAL AA. (1999). Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect Immun* 67: 342-349.

# Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la determinación de cefadroxilo en suero humano

MARISOL GÓMEZ FERNÁNDEZ\*, MARITZA GONZÁLEZ DAZA

## Resumen

Se desarrolló un método analítico exacto, preciso, reproducible y sensible por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa para la determinación de cefadroxilo (CEF) en las muestras de suero humano. La fase móvil consistió en una mezcla de buffer acetato pH 4,0: metanol HPLC (85:15). La velocidad de flujo fue 1,4 mL/min, y la detección se realizó empleando un detector ultravioleta a la longitud de onda de 264 nm. Para la precipitación de las proteínas en el suero humano fue utilizado el ácido perclórico al 30%v/v. Se empleó como estándar interno hidrocortizida (HCT) (6-cloro-3,4-dihidro-7 sulfanil-2H-1,2,4-benzotiadiazina-1-1-dioxido) a la concentración de 0,8 µg/mL. El análisis resultó ser exacto y preciso en un rango de concentraciones de 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; y 5,0 µg/mL para el CEF. La desviación estándar relativa promedio de los ensayos intradiarios para el CEF fue 1,78% y la desviación estándar relativa promedio para los ensayos interdiarios para el CEF fue 1,98%. El límite de detección para CEF fue de 0,10 µg/mL y el límite de cuantificación fue de 0,30 µg/mL.

**Palabras claves:** Cefadroxilo, suero humano.

## Abstract

It was developed an accurate, precise, reproducible and sensitive reversed-phase high performance liquid chromatography method for the quantitative determination of Cefadroxil (CEF) in human serum. The mobile phase consisted of a mixture of acetate buffer pH 4.0: methanol HPLC (85:15). Analysis was run at a flow-rate of 1.4 mL/min, and detection was performed using an ultraviolet detector at the wavelength of 264 nm. For the precipitation of proteins in human serum 30%v/v perchloric acid was used. Hydrochlorothiazide (HCT) (6-chloro-3,4-dihydro-7 sulfanyl-2H-1,2,4-benzothiadiazine-1-1-dioxide) was used as an internal standard at a concentration of 0.8 µg/mL. The analysis turned out to be accurate and precise in the range of concentrations 0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL; 2.0 µg/mL; 2.5 µg/mL; and 5.0 µg/mL for Cefadroxil. The relative standard deviation of the within-day assays for the CEF was: 1.78% and the relative standard deviation of the day-to-day assays for the CEF was: 1.98%. The limit of detection was 0.10 µg/mL and the limit of quantification was 0.30 µg/mL.

**Key words:** Cefadroxil, human serum.

## Introducción

El cefadroxilo (CEF) 7-(D-(-)-α-amino-α-(4-hidroxi-fenil) acetamido)-3-metil-3-cefem-4-ácido carboxílico (figura 1) (Valassis y col., 1999) es una cefalosporina semisintética de primera generación, que posee actividad antimicrobiana contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella species* y *Staphylococcus aureus* re-

sistentes a la penicilina (Buck y col., 1977; Pfeiffer y col., 1977).

El antibiótico es rápida y completamente absorbido en el tracto gastrointestinal. Presenta la ventaja de tener una vida media larga y solamente se administra dos veces al día, a diferencia de otras cefalosporinas orales que deben administrarse tres o cuatro veces al día. Su mayor solubilidad lipídica facilita

\* Cátedra de Análisis Farmacéutico, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. [mgomezfernandez@hotmail.com](mailto:mgomezfernandez@hotmail.com)

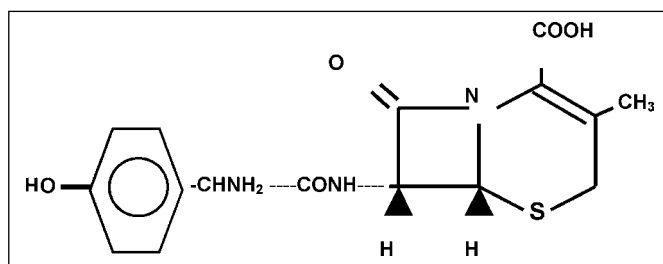


Figura 1  
Estructura química del cefadroxilo

una mayor penetración dentro de los tejidos y los fluidos corporales, encontrándose altas concentraciones de CEF en las amígdalas, los pulmones, los huesos, los músculos, la cápsula sinovial, la próstata, los tejidos ginecológicos, la piel y los fluidos corporales, incluyendo el fluido pleural, el humor acuoso; además atraviesa la placenta y se excreta en la leche materna (Drug Information Handbook, 2005).

Su uso está indicado en pacientes con faringitis, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones biliares, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones genitourinarias, infecciones óseas, infecciones en quemaduras, otitis media aguda y sinusitis (Garrigues y col., 1991; Drug Information Handbook, 2005).

Existen numerosas situaciones en donde se requiere el análisis cuantitativo de cefadroxilo. Los análisis durante la elaboración de las formulaciones farmacéuticas son obligatorios; muchos estudios farmacológicos requieren de determinaciones cuantitativas para establecer las cantidades en la dosificación, la toxicidad y las respuestas alérgicas, así como la deducción de los mecanismos de resistencia de las cepas bacterianas.

Para la cuantificación del cefadroxilo se han empleado diferentes métodos analíticos; los ensayos microbiológicos están disponibles, pero no son específicos para un antibiótico en particular. A fin de lograr esta especificidad muchos métodos químicos emplean sistemas de separación, como cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis capilar (Farag, 1998).

Estos métodos descritos anteriormente presentan como ventaja la separación de CEF del fluido biológico para su posterior análisis; pero tienen la desventaja de emplear un proceso previo a la extracción para separar las proteínas y de esta manera poder cuantificar el CEF, lo que conlleva a una pérdida parcial de la muestra, además de extender el tiempo del análisis encareciendo asimismo el método analítico. En el trabajo de Lindgren y col. puede notarse que el tiempo de corrida de cada inyección es de 11 minutos.

El objetivo del presente proyecto es desarrollar un método analítico exacto, preciso, reproducible, sensible y económico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa, con detección ultravioleta, utilizando previamente un proceso de separación simple y confiable, que permita la determinación del *cefadroxilo* en el suero humano, a diferencia de los métodos previamente publicados donde se requiere un proceso de extracción previa mucho más complejo.

## Materiales y métodos

### REACTIVOS Y MATERIALES

Acetato de Sodio Trihidratado, Ácido Acético, Ácido perclórico, Ácido tricloroacético, todos son grado reactivo marca Riedel-De Haën AG, Seelze-Hannover. Buffer acetato de sodio pH 4,00. Metanol grado HPLC marca Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Cefadroxilo monohidrato BP lote 043034 100%p/p, suministrado por Meyer Productos Terapéuticos. Hidroclorotiazida (HCT) 99,57% p/p suministrado por Laboratorios Leti. Las muestras de suero provienen de sujetos sanos libres del Virus de Inmunodeficiencia Humana, libres de cefadroxilo y del estándar interno, donadas por el Laboratorio de la Unidad de Detección de Medicamentos y Química Clínica del Instituto de Medicina Experimental (UNIDEME) de la Universidad Central de Venezuela.

### EQUIPOS

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca Waters, equipado con un inyector manual modelo U6K, una bomba de distribución de solventes modelo 510, un detector ultravioleta modelo 484, un módulo de datos modelo 745B, una columna Lichrosorb® RP-18 de 30 cms de longitud y 10µm de tamaño de partícula. La fase móvil se filtró utilizando un equipo de filtración Millipore® con un filtro sostenedor Parte #4 (Filter Holder Part #4) que utiliza los filtros Millipore tipo HA 0,45 µm (Estados Unidos). Las muestras de suero fueron almacenadas en un Frizer Ultra-Low de rango de temperatura de 0 a -60 °C y centrifugadas en una Centrífuga Refrigerada de Alta Velocidad marca Sorvall® RC-5B Du-Pont Instruments.

### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Atenuación: 4.

Ancho de pico (PW): 2

Longitud de onda de absorción: 264 nm.

Sensibilidad del detector: 0,02 AUFS.

Tiempo de corrida: 8 minutos.

Velocidad de flujo: 1,4 mL/minuto.

Velocidad del papel: 0,5 cm/minuto.

Volumen de inyección: 20 mL.

#### PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

La fase móvil se preparó mezclando una solución de buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 4,00) y metanol grado HPLC en una proporción de (85:15). Esta solución fue filtrada a través de un equipo de filtración Millipore® Filter Holder Part #4 equipado con filtros Millipore tipo HA 0,45 µm, desgasificada por aplicación de vacío y agitación magnética durante 5 minutos seguida por ultrasonido por 10 minutos.

#### SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se prepararon diariamente las soluciones patrones de trabajo a las concentraciones finales de 0,5, 1,0, 2,0, 2,5 y 5 µg/mL, a partir de una solución madre de CEF de concentración final 50 µg/mL.

Se preparó diariamente la solución de trabajo del estándar interno a una concentración final de 0,8 µg/mL, a partir de una solución madre de concentración 40 µg/mL.

Las muestras de la mezcla combinada de suero humano de varios voluntarios sanos, fueron recolectadas en tubos de vidrio con tapa y congeladas a una temperatura de -20 °C hasta el momento de ser analizadas. A dichas muestras se les adicionó la solución madre de CEF de 50 µg/mL hasta obtener las concentraciones finales de 0,5, 1,0, 2,0, 2,5 y 5,0 µg/mL.

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO HUMANO

Se ensayaron dos técnicas de precipitación de proteínas:

- a) empleando una solución de ácido perclórico al 30% v/v; y
- b) utilizando una solución de ácido tricloroacético al 6% p/v.

El CEF y HCT (estándar interno) fueron separados de la mezcla combinada de suero humano por una técnica de precipitación de proteínas. En 2 tubos de centrifuga Eppendorf® de polipropileno de 1,5 mL de capacidad, previamente rotulados, fueron adicionados 50 µL de la mezcla combinada de suero humano. En ambos tubos se añadieron cantidades adecuadas de la solución patrón de CEF de 50 µg/mL (de acuerdo con la concentración de CEF a preparar

para el posterior análisis) y 100 µL de la solución de HCT de 40 µg/mL. Al tubo 1 se agregó 100 µL de la solución precipitante de ácido perclórico al 30% v/v, mientras que al tubo 2 se adicionó igual cantidad pero de la solución precipitante de ácido tricloroacético al 6% p/v. Posteriormente, fue adicionada a ambos tubos agua desionizada en cantidad suficiente para 1 mL; se agitaron en un vórtex durante 15 segundos y centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 revoluciones por minuto a una temperatura de 10 °C.

Transcurrido el tiempo se procedió a transferir una alícuota de 200 µL del sobrenadante y 800 µL de la fase móvil a un vial de vidrio de 3 mL de capacidad con tapa; posteriormente la mezcla fue sometida a agitación en el vórtex durante 15 segundos. Una alícuota de 20 µL de esta última solución fue inyectada en el cromatógrafo líquido.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE CEFADROXILO EN SUERO.  
RANGO DE CONCENTRACIONES DE 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL Y 5,0 µg/mL

En 6 tubos de centrifuga Eppendorf® de polipropileno de 1,5 mL de capacidad, previamente rotulados, fueron agregados 50 µL de la mezcla combinada de suero humano. En los tubos 1, 2, 3, 4 y 5 se añadieron 50 µL, 100 µL, 200 µL, 250 µL y 500 µL, respectivamente de la solución patrón de CEF de concentración 50 µg/mL y 100 µL de la solución de HCT de concentración 40 µg/mL a cada uno de los tubos. En el tubo 6, rotulado como blanco, se omitió la adición de las soluciones de CEF y HCT. Estos seis (6) tubos se agitaron en el vórtex por 15 segundos y posteriormente se procedió según el método de preparación de la muestra de suero e inyección en el cromatógrafo líquido, previamente descrito. Las soluciones resultantes se conservaron a -20 °C hasta ser empleadas en el estudio de linealidad, precisión y exactitud del método.

#### EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La precisión intradiaria (repetibilidad) del método fue expresada como la desviación estándar relativa de cuatro curvas de calibración de CEF idénticas (rango de concentración: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL y 5,0 µg/mL), las cuales se prepararon e inyectaron por triplicado en el cromatógrafo líquido en un mismo día.

La precisión interdiaria (reproducibilidad) del método se expresó como la desviación estándar relativa de tres curvas de calibración de CEF idénticas (rango de concentración: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL;

2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL y 5,0 µg/mL), las cuales se prepararon e inyectaron en el cromatógrafo líquido por triplicado durante tres días consecutivos.

La exactitud del método fue expresada como el porcentaje de recuperación obtenido en las muestras durante los ensayos de precisión intradiaria e interdiaria.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas para el análisis y se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse de manera experimental, inyectando por triplicado una muestra del analito que produzca una respuesta con respecto al blanco, cuya relación señal/ruido sea igual a 3:1 o 2:1. Para llevar a cabo esta determinación experimental se procedió a preparar 5 soluciones de concentración 0,4 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,1 µg/mL y 0,08 µg/mL de CEF según el método de preparación de la muestra de suero e inyección en el cromatógrafo líquido, previamente descrito. Estas soluciones fueron preparadas e inyectadas en el cromatógrafo por triplicado durante 3 días consecutivos.

El límite de detección puede así mismo determinarse de manera matemática, empleando para ello la fórmula enunciada por la International Conference on Harmonisation (ICH).

#### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación se define como la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud bajo las condiciones establecidas para el análisis y se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse de manera experimental, inyectando por triplicado una muestra del analito que produzca una respuesta, con respecto al blanco, cuya relación señal/ruido sea igual a 10:1. Para su determinación se emplearon las soluciones preparadas en la determinación de límite de detección previamente descrita.

Así mismo, el límite de cuantificación puede determinarse de manera matemática empleando para ello la fórmula enunciada por la International Conference on Harmonisation (ICH).

## Resultados y discusión

#### CROMATOGRAFÍA

Se obtuvo una separación bien definida entre el CEF, HCT y los compuestos endógenos del suero em-

pleando un sistema HPLC en fase reversa y la fase móvil constituida por buffer acetato a pH 4,00: metanol (85:15). La velocidad de flujo de 1,4 mL/min de la fase móvil resultó en un tiempo de análisis de siete minutos que es menor al reportado en la literatura (Lindgren, 1987).

#### TRATAMIENTO DEL SUERO

Para minimizar la interferencia de los compuestos endógenos del suero se utilizó la técnica de precipitación de proteínas en el suero con una solución de ácido perclórico al 30% v/v. La selección de dicho agente precipitante se basó en lograr una buena separación entre el Cefadroxilo, el estándar interno y los compuestos endógenos del suero humano, obteniéndose una recuperación relativa del cefadroxilo superior a 90% mientras que, con el agente precipitante ácido tricloroacético no se obtuvo una separación adecuada entre los componentes mencionados y la recuperación relativa del cefadroxilo fue inferior a 70%. El esquema de la figura 2 muestra el procedimiento que fue seleccionado para determinar y cuantificar CEF en el fluido biológico.

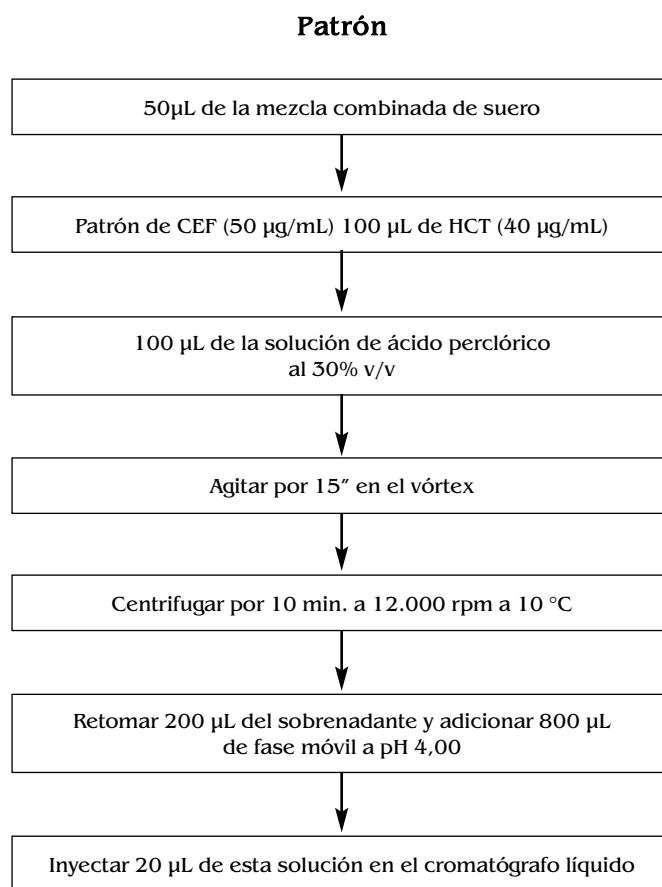


Figura 2  
Esquema de la técnica de precipitación de proteínas en el suero humano

Puede observarse en el mismo que CEF y HCT son extraídos del suero por un proceso simple. En la figura 3 se muestra el cromatograma obtenido después de la inyección del blanco de la mezcla combinada de suero humano preparada como fue descrito previamente, e inyectada en el cromatógrafo líquido. En la figura 4 se puede observar el cromatograma obtenido con la inyección de la solución patrón de CEF (concentración 2,0 µg/mL) y el patrón interno HCT (concentración 0,8 µg/mL) en la mezcla combinada de suero humano. Los tiempos de retención fueron: 3,66 minutos y 5,99 minutos, respectivamente.

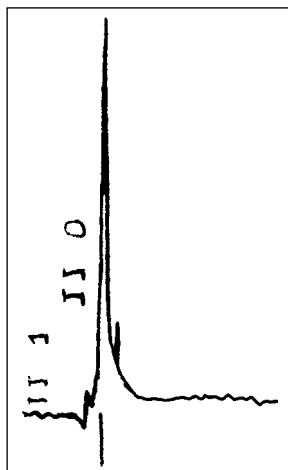


Figura 3  
Cromatograma correspondiente a la inyección del blanco de la mezcla combinada de suero humano

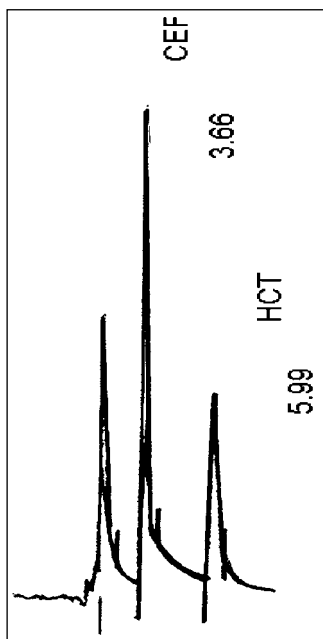


Figura 4  
Cromatograma correspondiente a la inyección de una solución patrón de CEF (concentración 2,0 µg/mL) y HCT (patrón interno, concentración 0,8 µg/mL) en la mezcla combinada de suero humano

#### LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO

El estudio de linealidad del método en la mezcla combinada de suero humano se realizó mediante la construcción de la curva de calibración en la que se representa, en el eje de las ordenadas, la relación área de los picos CEF/HCT contra la concentración sérica de CEF en el eje de las abscisas.

La curva corregida por el método de regresión de los mínimos cuadrados resultó en la siguiente ecuación:  $Y = 0,5568 X - 0,04235$ ; con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0,99977 (Figura 5).

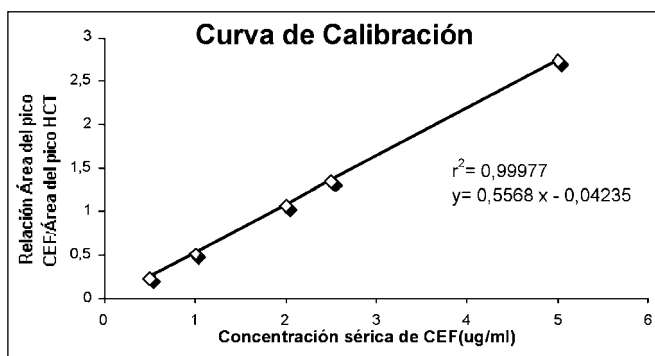


Figura 5  
Curva de calibración de cefadroxilo en suero humano. Rango de concentraciones: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; y 5,0 µg/mL.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección fue calculado siguiendo las técnicas descritas en la sección de materiales y métodos. Mediante el empleo de la fórmula matemática, el valor correspondiente al límite de detección fue 0,10 µg/mL de CEF. De igual manera, con el cromatograma de la concentración de CEF 0,10 µg/mL se obtuvo la relación señal/ruido 3:1 (establecido en la literatura como Límite de Detección (ICH)).

El límite de cuantificación se determinó siguiendo las técnicas descritas en la sección de materiales y métodos. Mediante el empleo de la fórmula matemática, el valor correspondiente al límite de cuantificación fue 0,30 µg/mL de CEF; del mismo modo, con el cromatograma de la concentración de CEF 0,3 µg/mL se obtuvo la relación señal/ruido 10:1 (establecido en la literatura como Límite de Cuantificación (ICH)), cuyo valor se corresponde con el obtenido matemáticamente.

#### EXACTITUD Y PRECISIÓN

Nuestros resultados demuestran una desviación estándar inferior a la reportada en la literatura (Quanyun y col., 1999; Samanidou y col., 2003). En efecto, la desviación estándar relativa promedio para CEF en los ensayos intradiarios fue 1,78% (Tabla I). De igual modo, la desviación estándar relativa promedio para CEF en los ensayos interdiarios fue 1,98% (Tabla II) y representó una desviación inferior a la reportada en la literatura (Samanidou y col., 2003). Finalmente, el porcentaje de recuperación obtenido en el ensayo de precisión intradiaria osciló entre 95,80% y 97,27%; mientras que el porcentaje

Tabla I  
Precisión y exactitud intradiaria de cefadroxilo en las muestras de la mezcla combinada de suero humano a cinco niveles de concentración

Concentración de CEF µg/mL	% Promedio de recuperación	% DER <sup>a</sup>	Número de muestras
0,5	97,27	1,84	4
1,0	96,85	1,27	4
2,0	96,64	1,88	4
2,5	96,02	1,99	4
5,0	95,80	1,46	4
% de desviación estándar relativa promedio:		<b>1,78%</b>	

Se realizaron cuatro curvas de calibración independientes, preparadas en el mismo rango de concentración e inyectadas por triplicado durante el mismo día. a= Desviación estándar relativa.

Tabla II  
Precisión y exactitud interdiaria de cefadroxilo en las muestras de la mezcla combinada de suero humano a cinco niveles de concentración.

Concentración de CEF µg/mL	% Promedio de recuperación	% DER <sup>a</sup>	Número de muestras
0,5	96,63	1,90	9
1,0	96,20	2,14	9
2,0	97,89	1,67	9
2,5	94,38	2,34	9
5,0	95,25	1,69	9
% de desviación estándar relativa promedio:		<b>1,98%</b>	

Se realizaron tres curvas de calibración independientes, preparadas diariamente en el mismo rango de concentración e inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos. a= Desviación estándar relativa.

de recuperación obtenido en el ensayo de precisión interdiaria osciló entre 94,38% y 97,89%.

## Conclusiones

En resumen, el método de análisis por HPLC con detección ultravioleta para la determinación de cefadroxilo en el suero humano requiere pequeñas cantidades de muestra; es un método reproducible, sensible, selectivo, exacto y preciso, con un límite de detección de 0,10 µg/mL y de cuantificación de 0,30 µg/mL de CEF.

La determinación de la concentración de anti -

bióticos en fluidos biológicos tales como el suero es importante para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos y la realización de los estudios de biodisponibilidad, por lo que consideramos que este método analítico tiene aplicación para estos fines.

## Agradecimientos

A la Unidad de Detección de Medicamentos y Química Clínica del Instituto de Medicina Experimental (UNIDEME) de la Universidad Central de Venezuela por la colaboración brindada. Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Proyecto N° IIF.03/2003 al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

## Referencias bibliográficas

- AKIMOTO Y, KOMIYA M, KANEKO K, FUJII A. 1994. Cefadroxil concentrations in human serum, gingiva, and mandibular bone following a single oral administration. *J Oral Maxillofac Surg*, 52:397-400; discussion 400-1.
- BARBHAIYA R. 1996. A pharmacokinetic comparison of cefadroxil and cephalexin after administration of 250, 500 and 1000 mg solution doses. *Biopharm Drug Dispos*, 17:319-330.
- BOULANGER B, CHIAP P, DEWE W, CROMMEN J, HUBERT P. 2003. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations. *J Pharm Biomed Anal*, 32:753-765.
- BRISSEON A, FOURTILLAN J. 1981. Determination of cephalosporins in biological material by reversed-phase liquid column chromatography. *J Chromatogr*, 223:393-399.
- BUCK R, PRICE K. 1977. Cefadroxil a new-broad spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 11:324-30.
- DRUG INFORMATION HANDBOOK. 2005. (13<sup>th</sup> Edition). Editorial Advisory Panel. Páginas 272-273.
- FARAG S. 1998. Simultaneous Liquid chromatographic analysis of the beta-lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalexin, ampicillin and cephradine in solution. *J AOAC Int*, 81:381-385.
- GARRIGUES T, MARTIN U, PERIS-RIBERA J, PRESCOTT L. 1991. Dose-dependent absorption and elimination of cefadroxil in man. *Eu J Clin Pharmacol*, 41: 179-183.
- GUSTAFERRO C, STECKELBERG J. 1991. Cephalosporin antimicrobial agents and related compounds. *Mayo Clin Proc*, 66: 1064-1073.
- ICH TOPIC Q2B NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY 1996. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, Step 4, Consensus Guideline.
- LINDGREN K. 1987. Determination of cefadroxil in serum by high-performance liquid chromatography with cephradine as internal standard. *J Chromatogr* 413: 347-350.
- MANDELL G, PETRI W. 1996. Fármacos antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (J.G., Hardman, L.E. Limbird., Molinoff, P.B., Ruddon, A. Goodman Gilman, Eds.). (novena edición). Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Editores, S.A. de C.V. de México. Capítulo: 31, páginas 1141-1172.
- OLIVEIRA C, SALMON J, SUCUPIRA M, ILHA J, DE NUCCI G. 2000. Comparative bioavailability of two cefadroxil formulations in healthy human volunteers after a single-dose administration. *Biopharm Drug Dispos*, 21:243-247.
- PFEFFER M, JACKSON A, XIMENES J, PERCHE J. 1977. Comparative Human Oral Clinical Pharmacology of Cefadroxil, Cephalexin, and Cephradine. *Antimicrob. Agents Chemother*, 11:331-338.
- QUANYUN AX, LAWRENCE A, TRISSEL H. 1999. Stability- Indicating HPLC Methods for Drug Analysis.
- VALASSIS, I, PARISSI-POULOU M, MACHERAS P. 1999. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 721:249-55.
- SAMANIDOU V, HAPESHI E, PAPADOYANNIS I. 2003. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 788:147-158.

# Secondary metabolites from *Podocalyx loranthoides*

## Metabolitos secundarios de *Podocalyx loranthoides*

BETH DÍAZ<sup>1</sup>, REINALDO S. COMPAGNONE<sup>2</sup>, ALÍRICA I. SUÁREZ<sup>1\*</sup>

### Resumen

La investigación química de los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *Podocalyx loranthoides*, condujo al aislamiento de dos biflavonoides: *putraflavona* y *podocarpus flavona* A. Los triterpenos, 3-hidroxi- $\beta$ -amirina, friedelina, pachinosol, friedelinol y stigmasterol fueron igualmente identificados, y adicionalmente una serie de hidrocarburos alifáticos tales como: tetradecano, octadecano, nonadecano y hexadecano. Se proponen las estructuras de todos los compuestos a partir de su data espectroscópica de RMN en 1D y 2D, IR, EM y por comparación con datos de la literatura.

**Palabras clave:** *Podocalyx loranthoides*, *Euphorbiaceae*, *triterpenoides*, *biflavonoides*.

### Abstract

Chemical investigation of organic extracts from the leaves and stems of *Podocalyx loranthoides*, resulted in the isolation of two biflavonoids: putraflavone, and podocarpus flavone A. The triterpenes, 3-hydroxy- $\beta$ -amirin, friedelin, pachynsol, friedelinol and stigmasterol were also isolated and, additionally a series of aliphatic hydrocarbons such as: tetradecane, octadecane, nonadecane, hexadecane. The structures of all compounds were proposed from their spectral data (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC, IR and MS) and comparison with those reported in the literature.

**Key words:** *Podocalyx loranthoides*, *Euphorbiaceae*, *triterpenoids*, *biflavonoids*

### Introduction

The family Euphorbiaceae, with more of 320 genera and 8500 species is one of the largest in the tropical and subtropical area of the world (Webster et al., 1999). The Euphorbiaceae has been source of several interesting compounds showing a wide spectra of pharmacological properties such as: antihypertensive (Silva et al., 2005); cytotoxic (Roengsumran et al., 2001; Pettit et al., 2002); antiinflammatory (Hohman et al., 1997, Vaisberg et al., 1989); antinociceptive (Santos et al., 1995).

We were, therefore, interested in examining the plant *Podocalyx loranthoides* Klotzsch belongs to the Euphorbiaceae family, selected as part of an ongoing research where we study the chemistry and pharmacology of the euphorbiaceae plants of Venezuela

(Suárez et al., 2003, 2004, 2005, 2006). *Podocalyx loranthoides* grows as small tree in warm regions of Brasil, Colombia, Peru and, in the south part of Venezuela (Steyermark et al., 1999). Locally is known as «palo de agua dulce» and «reventillo». It was considered the only specie classified under the genus *Podocalyx*. No report on the chemical constituents of *P. loranthoides* was found except the work where we describe the isolation of the biflavones, *Podocarpus flavone* A and *Putraflavone* (Suárez et al., 2003).

### Materials and Methods

#### PLANT MATERIAL

The leaves and stems of *Podocalyx loranthoides* were collected where of Sipapo river converge with

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apartado 40109, Caracas, Venezuela

<sup>2</sup> Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Cuaio river at Amazonas state, Venezuela in June 2000. Its identity was confirmed by Dr. Anibal Castillo, and a voucher specimen (AC2710) has been deposited in the National Herbarium of the Botanical Garden of Caracas.

#### EXTRACTION AND ISOLATION

Dried and powdered leaves (595.50 g) of *P. loranthoides* were extracted via Soxhlet with solvents of increasing polarity, hexane, dichloromethane, and ethyl acetate. Evaporation of the solvents under reduced pressure furnished 18.7 g, 9.2 g and 7.0 g respectively, of crude extracts. One portion of each extract was chromatographed separately over silica gel and eluted with hexane, gradually increasing the polarity with dichloromethane, ethyl acetate and then methanol. From the column chromatography of part of hexane extract (1.7), 100 fractions were collected and monitored by TLC, similar fractions were combined and purified by successive column chromatography to furnishing a series of aliphatic hydrocarbons such as: tetradecane, octadecane, nonadecane, hexadecane, which were characterized by mass spectrometry. From the dichloromethane extract (1.8 g) which was subjected to column chromatography over

silica gel eluted with ( $\text{CHCl}_3$ : EtOAc 1:1 until 1:9 MeOH:EtOAc, were collected 25 fractions. After evaporation of the solvent and precipitation in methanol, one of the subfractions gave putraflavone (**1**) (43.0 mg) (Suárez et al., 2003). By similar procedure with different fractions of the described column chromatography, podocarpusflavone A (**2**) (50.4 mg) was isolated. The EtOAc extract (0.50 g) was subjected to a chromatography using RP-18 eluted with MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) to gave also as the major components, putraflavone (**1**) (12.3 mg) (Harborne., 1986) and podocarpusflavone A (**2**) (39.1 mg).

Similar procedure was carried out with the stem extracts (560 g), the fractionation of the hexane extract (2.40 g) submitted to column chromatography afforded the triterpenes, 3-hydroxy- $\beta$ -amirine (**3**) (15 mg) (Mahato and Kundu, 1994), and friedelin (**4**) (Gotlieb et al., 1985). From the EtOAc extract, the following compounds were isolated, pachynosol (**5**) (9.2 mg) (Mahato and Kundu, 1994), friedelinol (**6**) (Queiroga et al., 2000) and the steroid stigmasterol (**7**) (Holland et al., 1978). The structures of all compounds were proposed from their spectral data ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC, HMBC, IR and MS) and comparison with those reported in the literature.

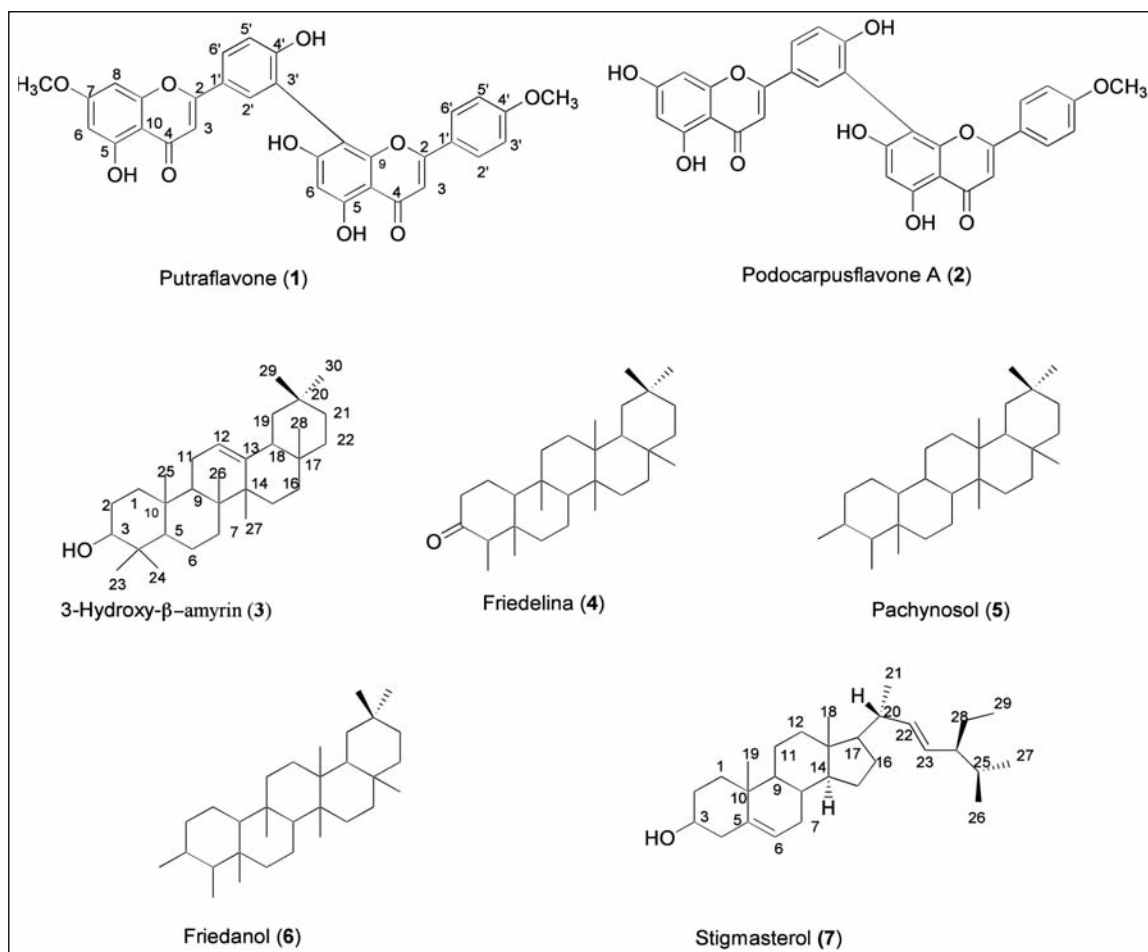


Figura 1  
Chemical structures of isolated compounds from *Podocalyx loranthoides*

## GENERAL PROCEDURES

The IR spectra were recorded on a SHIDMAZU 470 spectrometer. Melting points were determined on a Fisher-Johns melting point apparatus and are uncorrected. NMR spectra were recorded with a JEOL Eclipse 270 spectrometer operating at 270 MHz and a Bruker DRX-500 with CDCl<sub>3</sub>, DMSO, and acetone-d<sub>6</sub> as solvent and TMS as internal standard. Low-resolution mass spectra were measured in a VARIAN Saturn 2000 and high resolution mass spectra (HRMS-Cl) were measured on a JEOL JMS-AX505WA. Optical rotations were measured in a Lynos Photonics Type SR6, Spannung. TLC analyses were carried out on precoated silica gel G<sub>254</sub> (Merck) plates and the spots were visualized by UV (254 nm) irradiation and reaction with p-anisaldehyde/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HOAc reagent. For column chromatography, silica gel 60 (Merk 100-200 mesh) and RP-18 silica gel were used.

**Putraflavone (1)**. Yellow solid, mp 240-243 °C; IR (KBr)  $\gamma_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3300 (OH), 1660, 1657; RMN <sup>1</sup>H (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 3.74 (s, 1H, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3.81 (s, 1H, 7-OCH<sub>3</sub>); 6.34 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-6); 6.42 (1H, s, H-6); 6.76 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-8); 6.88 (1H, s, H-3); 6.89 (1H, s, H-3); 6.92 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-3', H-5'); 7.16 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5); 7.66 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-2', H-6); 7.99 (1H, da, H-6'); 8.05 (1H, da, H-2'); 12.97 (1H, s, 5-OH); 13.07 (1H, s, 5-OH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 56.1 (4'-OCH<sub>3</sub>); 56.6 (7-OCH<sub>3</sub>); 93.2 (C-8); 98.6 (C-6); 99.2 (C-6); 103.7 (C-3); 103.8 (C-3); 104.2 (C-8); 104.5 (C-10); 105.2 (C-10); 115.1 (C-3', C-5'); 116.7 (C-5'); 120.5 (C-3'); 121.4 (C-1'); 123.5 (C-1'); 128.5 (C-6', C-2', C-6'); 131.9 (C-2'); 155.1 (C-9); 157.8 (C-9); 160.2 (C-4'); 160.8 (C-5); 161.1 (C-5); 162.4 (C-7); 162.8 (C-4'); 163.8 (C-2); 164.6 (C-2); 165.6 (C-7); 182.5 (C-4); 182.7 (C-4).

**Podocarpusflavona A (2)** Yellow solid, mp 228-230 °C; IR (KBr)  $\gamma_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3500 (OH), 1660, 1659; RMN <sup>1</sup>H (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 3.75 (1H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 6.18 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-6); 6.42 (1H, s, H-6); 6.46 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H-8); 6.82 (1H, s, H-3); 6.83 (1H, s, H-3); 6.93 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-3', H-5'); 7.15 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5'); 7.67 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-2', H-6); 7.97 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz; 2,4 Hz, H-6'); 8.01 (1H, d, H-2'); 12.95 (1H, s, 5-OH); 13.05 (1H, s, 5-OH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 56.1 (4'-OCH<sub>3</sub>); 94.6 (C-8); 99.2 (C-6); 99.3 (C-6); 103.5 (C-3); 103.8 (C-10); 104.2 (C-3, C-10); 104.4 (C-8); 115.0 (C-3', C-5'); 116.3 (C-5'); 120.5 (C-1', C-3'); 123.5 (C-1'); 128.5 (C-2', C-2', C-6'); 131.9 (C-6'); 155.0 (C-9), 158.0 (C-9); 160.0 (C-4'); 161.9

(C-5); 162.5 (C-4'); 162.8 (C-5); 163.0 (C-2); 164.6 (C-2); 165.0 (C-7); 166.0 (C-7); 182.2 (C-4); 182.7 (C-4).

**3-Hydroxy- $\beta$ -amirin (3)**, white solid, 196-198 °C, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$ :

0.73-1.88 (23H, m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-18, H-19, H-18, H-21, H-22); 0.76 (3H, s, H-24); 0.81 (3H, s, H-25); 0.92 (3H, s, H-23); 0.96 (s, 3H, H-30); 1.02 (3H, s, H-29); 1.18 (3H, s, H-28); 1.20 (3H, s, H-26); 1.23 (3H, s, H-27); 3.34 (1H, m, H-3); 5.15 (1H, sa, H-12). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 15.3 (C-25); 16.8 (C-26); 18.0 (C-6); 22.4 (C-24); 23.5 (C-11); 23.7 (C-30); 26.1 (C-15); 26.2 (C-27); 27.0 (C-2); 27,4 (C-16); 28.3 (C-23); 28.4 (C-28); 31.1 (C-20); 32.5 (C-7, C-17); 33.4 (C-29); 34,8 (C-21); 37.0 (C-8); 37.2 (C-1, C-22); 37.4 (C-10); 40.0 (C-4); 41.8 (C-14); 46.6 (C-19); 47.2 (C-9); 47.4 (C-18); 48.9 (C-5); 76.3 (C-3); 121.8 (C-12); 145.2 (C-13).

**Friedelin (4)**, white solid, mp 260-262 °C, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>); 1.26-2.40 (m, 25H, H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22); 0,70 (3H, s, H-24); 0.84 (3H, s, H-25); 0.87 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, H-23); 0.93 (3H, s, H-30); 0.98 (3H, s, H-29); 1.03 (3H, s, H-26); 1.16 (3H, s, H-27); 1.23 (3H, s, H-28); 2.20-2.28 (1H, m, H-4). 6.9 (C-23); 14.7 (C-24); 18.0 (C-25); 18.3 (C-7); 18.7 (C-27); 20.3 (C-26); 22.3 (C-1); 28.2 (C-20); 30.1 (C-17); 30.6 (C-12); 31.8 (C-29); 32.2 (C-28); 32.5 (C-15); 32.9 (C-21); 35.1 (C-30); 35.4 (C-19); 35.7 (C-11); 36.1 (C-16); 37.5 (C-9); 38.4 (C-14); 39.3 (C-22); 39.8 (C-13); 41.4 (C-6); 41.6 (C-2); 42.2 (C-5); 42.9 (C-18); 53.2 (C-8); 58.3 (C-4); 59.6 (C-10); 213.2 (C-3).

**Pachynsol (5)**, white solid, 196-198 °C, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$ : 0.70(3H, s, H-24); 0.88 (3H, s, H-25); 0.93 (3H, s, H-30); 0.95 (3H, s, H-29); 0.98(3H, s, H-26); 1.01(3H, H-27); 1.16 (3H, H-28); 3.61 (1H, sa, H-16); 1.15 -2.80 (m, H-1, H-2, H-6, H-7, H-18, H-19, H-21, H-22). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>); d 22.5 (C-1), 41.3 (C-2), 55.6 (C-3), 42.8 (C-4), 41.2 (C-5), 18.7 (C-6), 53.2 (C-7), 37.5 (C-8), 37.5 (C-9), 56.6 (C-10), 35.4 (C-11), 29.3 (C-12), 39.7 (C-13), 39.7 (C-14), 43.5 (C-15), 75.1 (C-16), 32.4 (C-17), 42.3 (C-18), 35.5 (C-19), 28.2 (C-20), 33.9 (C-21), 36.0 (C-22), 6.7 (C-23), 14.8 (C-24), 19.0 (C-25), 20.3 (C-26), 32.2 (C-27), 28.2 (C-28), 31.8 (C-29), 35.1 (C-30).

**Friedanol (6)**, white solid, 196-198 °C, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$ : 0.68 (3H, s, H-24); 0.84 (3H, s,

H-**23**); 0.86 (3H, s, H-**25**); 0.87 (3H, s, H-**30**); 0.96 (3H, s, H-**29**); 0.98 (3H, H-**26**); 1.02 (3H, H-**27**); 1.26 (3H, H-**28**).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  17.0 (C-**1**), 31.8 (C-**2**), 77.5 (C-**3**), 55.0 (C-**4**), 37.5 (C-**5**), 41.0 (C-**6**), 22.5 (C-**7**), 52.9 (C-**8**), 35.6 (C-**9**), 61.0 (C-**10**), 35.4 (C-**11**), 29.7 (C-**12**), 37.5 (C-**13**), 38.9 (C-**14**), 30.5 (C-**15**), 35.5 (C-**16**), 30.0 (C-**17**), 42.0 (C-**18**), 35.4 (C-**19**), 28.2 (C-**20**), 32.5 (C-**21**), 40.6 (C-**22**), 11.0 (C-**23**), 14.2 (C-**24**), 18.4 (C-**25**), 18.6 (C-**26**), 20.3 (C-**27**), 31.8 (C-**28**), 35.1 (C-**29**), 32.2 (C-**30**).

**Stigmasterol (7)**. White solid, 127-130 °C,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ : 0.66 (3H, s, H-**18**); 1.48 (1H, s, H-**2a**); 1.50 (1H, m, H-**24**); 1.51 (1H, m, H-**7a**); 1.83 (1H, m, H-**2b**); 1.98 (1H, m, H-**7b**); 2.00 (1H, m, H-**20**); 2.26 (1H, m, H-**4**); 3.50 (1H, m, H-**3**); 4.99 (1H, dd, 8.60, 15.20 Hz, H-**23**); 5.13 (1H, dd, 8.60, 15.20 Hz, H-**22**); 5.32 (brs, H-**6**).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  37.3 (C-**1**), 31.1 (C-**2**), 71.9 (C-**3**), 42.4 (C-**4**), 140.8 (C-**5**), 121.8 (C-**6**), 31.9 (C-**7**), 36.2 (C-**8**), 50.2 (C-**9**), 36.6 (C-**10**), 21.1 (C-**11**), 39.8 (C-**12**), 42.3 (C-**13**), 56.9 (C-**14**), 24.4 (C-**15**), 28.9 (C-**16**), 56.0 (C-**17**), 12.3 (C-**18**), 19.4 (C-**19**), 40.6 (C-**20**), 19.9 (C-**21**), 138.4 (C-**22**), 129.3 (C-**23**), 51.3 (C-**24**), 29.2 (C-**25**), 19.0 (C-**26**), 21.3 (C-**27**), 25.5 (C-**28**), 12.1 (C-**29**).

## Results and discussion

A total of eleven compounds were isolated from the organic extracts of the stems and leaves of *Podocalyx loranthoides* by repeated chromatographic separation over silica gel. The structures of the isolated compounds were deduced by extensive NMR and mass spectral analyses. The EI mass spectra of compound **4** gave an ion peak at  $m/z$  426 corresponding to a molecular formula  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ . The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum displayed a total of 30 carbons signals. The DEPT NMR experiment, indicated that 7 carbons are quaternary ones, including a ketone group; and the rest of 23 carbons were classified as 8 methyls, 11 methylenes, 4 methines and 7 quaternary carbons. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** showed 7 three proton singlets at  $\delta$  0.70, 0.84, 0.87, 0.93, 0.98, 1.03, 1.16 and a doublet ( $J = 6.4$  Hz) centered at  $\delta$  0.87. These were attributed to methyl groups present in a triterpene type friedelane. On the basis of the above spectral features, compound **4** was characterized as friedelin, the identity of which was further substantiated by comparison of its spectroscopic data with published values (Gottlieb et al., 1985). This is the first report of occurrence of friedelin from *P. loranthoides*. The compounds **3**, **5**, **6**, **7** were characterized by comparison of their  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data with published one as well as by

co-TLC with authentic samples. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of three compounds showed signals due to hydroxyl group and tetracyclic triterpenes; detailed analysis of the NMR spectra with the aid of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , and long range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , suggested that they were well known structures identified as: 3-hydroxy-, -amirin (**3**), pachynosol (**5**), and friedanol (**6**).

The known natural steroid **7**, was identified by analysis of their spectral data and comparison with literature values, mainly  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts described for stigmasterol (**7**).

Podocarpusflavone A (**2**) was identified mainly by analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and specially HMQC and HMBC experiments. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum showed signals typical of a flavonoid structure. Two chelated hydroxyl groups were observed at  $\delta$  12.95 and 13.05 ppm.

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** showed 31 signals, showing two carbonyl groups at  $\delta$  182.2 and 182.7 ppm. Among the aromatic carbons, one methoxyl group was also found at  $\delta$  56.1 ppm. The presence of two carbonyls, suggesting a flavonoid dimer, which contain two flavone units. The analysis of HMBC spectrum data was very important to identify the linkage between the flavonoid units. The cumulated data from the HMBC experiment indicated characteristic correlations which defined the position of each aromatic ring. The data of NMR spectra related to splitting pattern and coupling constants also suggested a pentasubstituted aromatic ring with a 5,7-dioxigenation pattern for the A ring of one flavone. Finally carefully comparison of our data with those published for podocarpusflavone A, indicated that the compound **2** has the same structure. Additionally the position of the methoxyl group was done by UV spectral analysis using  $\text{AlCl}_3$  reagent.

The compound **1** was analyzed under the same criteria used for podocarpusflavone A (**2**). The major difference between this compound and the previous described, was the presence of two methoxyl groups. Comparison with the literature data indicated that the compound **1** is the well known biflavone putraflavone (**1**) (Suárez et al., 2003). Unequivocal assignments of NMR signals were obtained by long-range correlations. The location of the OMe on positions 7 and 4' was established by Difference NOE experiments between H-6/H-8 and OMe-7 ( $\delta$  3.82), and between H-3'/H-5' and OMe-4 ( $\delta$  3.76), respectively.

The structure of aliphatic compounds tetradecane, octadecane, nonadecane and hexadecane were established by mass spectroscopic. All the compounds herein described are reported as the principal metabolites found in the first phytochemical analysis of the plant *Podocalyx loranthoides*.

## Conclusión

The latest revision of the Euphorbiaceae, which reported 320 genera, lists only the species *Podocalyx loranthoides* Klotzsch under the genus *Podocalyx* (Steyermark et al., 1999). Many species under the big family Euphorbiaceae are particularly rich in terpenoids, specially diterpenes and triterpenes (Lima et al., 2003; Merrit and Ley, 1992, Rocha Barbosa et al., 2003, Salatino et al., 2007), several genus are also reported with high concentrations of biflavonoids as principal constituents, making this class of compounds valuable chemotaxonomic markers under the spurge family (Canelón et al., 2005; Del Rayo-Camacho et al., 2000; Hnatyszyn et al., 1987). The results herein reported, showed that the triterpenes and, biflavones, principal constituents founds in the aerials parts of *P. loranthoides*, are compounds which have been previously isolated in the Euphorbiaceae family. This finding, the presence of the previously described compounds in *Podocalyx loranthoides*, strongly supports the placement of the genus *Podocalyx* under the Euphorbiaceae. All the constituents are in agreement with the assignment of this genus under the spurge family. However, interestingly, after finish this research we found recently in the literature, a new classification for this species, now *Podocalyx loranthoides* is included under the Malpighiales family (APG II, 2003), but our results, like we describe previously in this paper, strongly support the chemical characterization of the *Podocalyx* under the Euphorbiaceae.

## References

- AGRAWAL PK. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, Amsterdam.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Bot J Linnean Soc 141, 399.
- BARBOSA PR, FASCIO M, MARTINS D, GUEDES MLS, ROQUE NF. 2003. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). Biochem Sist Ecol 31, 307.
- CANELÓN D, COMPAGNONE RS, CASTILLO A, SUÁREZ AI. 2005. Chemical constituents from *Senefelderopsis chiribiquetensis*. Biochem Sist Ecol 33, 1303.
- DE PASCUAL J, URONES T, BASAME P, SEXMERO M<sup>A</sup> J, FERNÁNDEZ R. 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*, Phytochemistry, 26, 1767.
- DEL RAYO CAMACHO M, MATA R, CASTANEDA P, KIRRY GC, WHARSHURST DC, CROFF SL. 2000. Bioactive Compounds from *Celaenodendron mexicanum*. Planta Medica, 66: 463.
- GOTTLIEB H, RAMAIAH P, LAVIE D. 1985. <sup>13</sup>C NMR signal assignment of friedelin and 3-hydroxyfriedelan-2-one. Magn. Reson. Chem. 23, 616.
- HARBONE JB. 1986. The Flavonoids. Advances in Research. Chapman ? Hall/CRC, Boca Ratón.
- HNATYSZYN O, FERRARO G, COUSSIO JD. 1987. A Biflavonoid from *Phyllanthus sellowianus* J. Nat. Prod. 50: 1156-1157.
- HOLLAND HL, DIAKOW RP, TAYLOR GJ. 1978. <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of some C-19-hidroxy, C-5,6 epoxy, C-24 ethyl, and C-19 norsteroids. Can. J. Chem. 56, 3121.
- HOHMANN J, VASAS A, GÜNTHER G, MÁTHÉ I, EVANICS F, DOMBI Gy. and JERKOVICH, Gy. 1997. Macrocyclic Diterpene Polyesters of the Jatrophone Type from *Euphorbia esula*. J. Nat. Prod. 60: 331-335.
- MAHATO SB, KUNDU AP. 1994. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic Triterpenoids. A compilation of some salient features. Phytochemistry, 37, 1517.
- MARKHAM K, SHEPPARD C, GEIGER H. 1987. <sup>13</sup>C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. Phytochemistry, 26: 3335.
- MERRIT AT, LEY SV. 1992. Clerodane diterpenoids. Nat. Prod. Rep. 9, 243.
- PETTIT GR, SCHAUFELBERGER D, NIEMAN R, DUFRESNE C. and SAENZ-RENAULD, J. 1990. Antineoplastic Agents, 177. Isolation and Structure of Phyllanthostatin 6. J. Nat. Prod., 53: 1406-1413.
- QUEIROGA CL, SILVA GF, DIAS PC, POSSENTI A, DE CARVALHO JE. 2000. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3,-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). J. Ethnopharmacol. 72, 465.
- ROCHA BARBOSA P, FASCIO M, MARTINS D, SILVA GUEDES ML, FRANCA ROQUE ML. 2003. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae) Biochem. Sist. Ecol. 31, 307.
- ROENGSUMRAN S, LUANGDILOK W, PETSOM A, PRARUGGAMO S. and PENGPRECHA, S. 1982. Structure of Swassin a New Furanoid Diterpene. J. Nat. Prod. 45: 772-773.
- SALATINO A, FARIA-SALATINO ML, NEGRI G. 2007. Tradicional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal Brazilian Chemical Society, 18: 11-33.
- SANTOS A, NIERO R, FILHO V, YUNES R, PIZZOLATTI M, DELLE MONACHE F. and CALIXTO J. 1995. Antinociceptive Properties of Steroids Isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in Mice. Planta Med. 61: 329-332.
- SUÁREZ AI, DÍAZ B, DELLE MONACHE F, COMPAGNONE RS. 2003. Biflavonoids from *Podocalyx loranthoides*. Fitoterapia, 74, 473.
- SUÁREZ AI, MANZANO M, VÁSQUEZ L COMPAGNONE RS. 2005. Essential Oil Composition Of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* Growing In Venezuela. Flavour and Fragrance, 20, 611.
- SUÁREZ AI, BLANCO Z, DELLE MONACHE F, COMPAGNONE RS. 2004.

- Three New Glutarimide Alkaloids From *Croton cuneatus*. *Natural Product Research*, 18, 421.
- SUÁREZ AI, TAPIAS E, TILLET S; COMPAGNONE RS; DÍAZ B; CANELÓN D; BLANCO Z. 2005. Chemical Constituents from *Croton huberi*. *Revista Facultad de Farmacia*, 68, 14.
- SUÁREZ AI, TOMASSI A, VÁSQUEZ L, COMPAGNONE RS. 2006. Essential oil composition of *Croton huberi* *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9: 75-80.
- STEYERMANK P, BERRY K, YATSKIEVYCH AND HOLST, B. 1999. St. Louis: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Missouri Botanical Garden Press, 5: 211-212.
- VAISBERG A, MILLA M, PLANAS M, CORDOVA J, ROSAS DE AGUSTI E, FERREYRA R, MUSTIGA M, CARLIN L AND HAMMOND G. 1989. Taspine is the Cicatrizant Principles in Sangre de Grado Extracted from *Croton lechleri*. *Plant. Med.*, 55: 140-143.
- WEBSTER GL, BERRY PE, ARMBRUSTER WS, ESSER H-J, GILLESPIE LJ, HAYDEN WJ, LEVIN GA, SECCO R and HEALD SV. 1999. *Euphorbiaceae*. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. J. Steyermark, P. Berry, K. Yatskievych and B. Holst. St. Louis: Eds. Missouri Botanical Garden Press. V 5. pp. 72, 224-225.

# Efecto de la Hipoxia Intermitente Crónica sobre la Nitración y la Fosforilación de las Kinasas reguladas por señales extracelulares en la Corteza Primaria del Cerebro de la Rata

DANIELA URRECHEAGA<sup>1,2</sup>, ALFREDO CSIBI<sup>2</sup>, PATRICK LEVY<sup>2</sup>,  
SERGE BOTTARI<sup>2</sup> Y ANITA ISRAEL<sup>1\*</sup>

## Resumen

La hipoxia intermitente crónica (HIC) emerge como un problema de salud pública de alta prevalencia y constituye una de las principales causas de las alteraciones sustanciales de tipo neuroconductual y cardiovasculares en pacientes adultos y en desarrollo. En el presente trabajo evaluamos el efecto que ejerce la HIC sobre la señalización de las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) en la corteza cerebral de la rata. Demostramos, por primera vez, que la HIC induce nitración y activación de las ERK 1/2 en la corteza cerebral de la rata. El pretratamiento *in vivo* con candesartan inhibió la nitración y la fosforilación de las ERK1/2 inducidas por la HIC en la corteza cerebral. Nuestros hallazgos apuntan hacia un papel de la nitración en la vía de señalización de las MAPK cerebrales durante la HIC, e indican que estos efectos están mediados a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II.

**Palabras clave:** Hipoxia intermitente crónica, ERK1/2, angiotensina II, nitración, fosforilación.

## Abstract

Chronic intermittent hypoxia (CIH) has emerged as a significant and highly prevalent public health problem that imposes substantial neurobehavioral and cardiovascular morbidities in both adult and developing patients. We evaluated the effect of CIH on the extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling in rat brain cortex. Our present results demonstrate, for the first time, that CIH induces nitration and activation of ERK 1/2. ERK 1/2 nitration and phosphorylation was inhibited by candesartan *in vivo* pre-treatment. Our results support a role of nitration in brain MAPK signaling pathway during CIH and they indicate that brain AT<sub>1</sub> receptor are involved in ERK 1/2 activation.

**Key words:** Chronic intermittent hypoxia, ERK1/2, angiotensin II, nitration, phosphorylation.

## Introducción

El síndrome de apnea obstructiva del sueño es una condición clínica que se manifiesta por la ocurrencia de episodios repetidos de obstrucción del flujo de aire en las vías aéreas superiores, de forma parcial o completa, durante el sueño (Yamauchi y col., 2005). Este síndrome afecta entre el 2 y 4% de la población adulta, encontrándose implicado en la patogénesis de varias enfermedades cardiovasculares incluyendo la hipertensión sistémica y pulmonar, la insuficiencia cardíaca congestiva, las arritmias car-

díacas y la aterosclerosis (Yamauchi y col., 2005). Los pacientes que sufren de este síndrome presentan hipoxia intermitente, hipercapnea intermitente, cambios en la presión intratorácica, activación del sistema simpático y fragmentación del sueño durante la noche. De manera que la hipoxia intermitente crónica (HIC) es un síndrome que causa situaciones fisiopatológicas serias y podría considerarse como uno de los principales mecanismos que causa alteraciones cardiovasculares y neurocognitivas en estos pacientes.

1 Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

2 Laboratoire d'Hypoxie: Physiopathologies-Respiratoires et Cardio-vasculaires Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, Francia.

Correspondencia a: Anita Israel. Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A. Caracas Venezuela. e-mail: [astern88@hotmail.com](mailto:astern88@hotmail.com)

Se ha demostrado que la hipertensión arterial causada por la hipoxia en pacientes que sufren de apnea obstructiva del sueño se debe principalmente a un incremento de la actividad del sistema simpático, a la generación de estrés oxidativo y a un incremento de la actividad del sistema renina angiotensina (SRA) (Nanduri y col., 2001; Manukhina y col., 2006; Sica y col., 2000; Fletcher, 2001; Yuan y col., 2004). Existe una asociación entre la hipoxia intermitente crónica y la estimulación de los quimorreceptores periféricos. Aún más, en ratas carentes de quimorreceptores periféricos por la desnervación de los cuerpos carotídeos, se ha observado una inhibición del incremento de la actividad simpática y de la presión arterial inducida por la HIC (Fletcher y col., 1992).

Aunado a la activación del sistema simpático, se ha sugerido que la HIC induce la facilitación de la liberación de renina, a través de la estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos renales. Estos hallazgos apoyan el concepto de que la HIC induce el aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina. Así, se ha demostrado que la elevación de la presión arterial inducida por la HIC es inhibida por la administración de antagonistas del receptor  $AT_1$  de angiotensina II (Fletcher y col., 2002).

Existe evidencia que demuestra que la HIC causa daño de la región cortico-hipocámpal, lo cual se asocia a alteraciones neurocognitivas, respiratorias y cardiovasculares. Así, se ha demostrado pérdida de sustancia gris en regiones cerebrales relevantes en la función cognitiva en humanos (Macey y col., 2002); y en modelos animales se ha demostrado un incremento de la muerte de las neuronas corticales cerebrales asociadas a la HIC (Xu y col., 2004). Estas acciones deletéreas podrían estar relacionadas a las acciones de la HIC en el sistema nervioso central, como lo son el deterioro del metabolismo lipídico cerebral, cambios en la actividad de enzimas metabólicas (Wasicko y col., 1990), de los niveles endógenos de angiotensina II (ANG) (Maktabi y col., 1995); generación de especies reactivas de oxígeno así como alteraciones del sistema de neurotransmisores en diferentes áreas del cerebro (Neubauer, 2001). El hipocampo, la corteza cerebral y el hipotálamo son particularmente susceptibles a la hipoxia (Morrell y col., 2003; Macey y col., 2002; Bartlett y col., 2004), especialmente desde que la exposición a HIC resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en dichas áreas cerebrales, tanto en ratas como en ratones (Ramanathan y col., 2005; Turko y Murad, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno han emergido como moléculas críticas en la señalización (Turko y Murad, 2002). El término especies reactivas de oxí-

geno (ROS) engloba un gran rango de moléculas que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), entre otros. El anión superóxido reacciona con el óxido nítrico para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es un agente nitrante de los residuos de tirosina de las proteínas. La nitración de los residuos de tirosina de las proteínas es una modificación postranslacional que puede afectar la estructura y función de la misma (Turko y Murad, 2002; Ischiropoulos, 2003). Se ha observado que la nitración de los residuos de tirosina puede prevenir la subsecuente fosforilación de los mismos, o también puede estimular su posterior fosforilación (Ischiropoulos, 2003).

Varios sistemas enzimáticos producen ROS, incluyendo la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, el citocromo P-450, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa y los peroxisomas; y su producción es regulada por varias citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo la angiotensina II (Fruehauf y Meyskens, 2007). La angiotensina II incrementa la producción del anión superóxido por activación de la NAD(P)H oxidasa; este incremento de las ROS ha sido implicado en la hipertensión inducida por la angiotensina II (Laplante y Champlain, 2006). El mecanismo mediante el cual el estrés oxidativo produce hipertensión parece estar asociado con los efectos mitogénicos de ROS, los cuales son mediados en parte, vía la activación de la familia de kinasas reguladas por señales extracelulares: ERK1/2, y p38 y JN Kinasas. De igual forma, la producción de las ROS y la propagación del estrés oxidativo constituye uno de los mecanismos implicados en la apoptosis neuronal cortical y la disfunción neurocognitiva inducida por la HIC (Xu y col., 2004).

Ahora bien, desde que se ha reportado que en las células del músculo liso vascular de la rata la angiotensina II induce nitración y activación de las ERK1/2 (Pinzar y col., 2005), en el presente trabajo quisimos determinar si en la corteza del cerebro de la rata, la hipoxia intermitente crónica es capaz de inducir nitración de las ERK 1/2 y por ende su activación. Igualmente, evaluamos el papel de los receptores  $AT_1$  en la nitración y activación de las ERK1/2 inducida por la HIC, mediante el uso del antagonista selectivo, el candesartan.

## Materiales y métodos

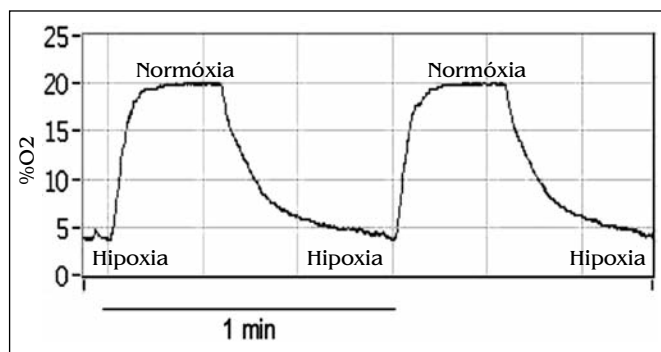
### ANIMALES

Los experimentos de hipoxia intermitente crónica fueron realizados con ratas machos de la cepa

Wistar, con un peso comprendido entre 330 y 400g, con acceso libre al agua y la comida. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por la Dirección de Servicios Veterinarios del Isère, Francia, conforme con las normativas francesas y del Comité de Ética local para la investigación animal.

#### PROTOCOLO DE HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA

Las ratas fueron expuestas a hipoxia intermitente (HI), como previamente ha sido descrito (Beguin, 2005). Las ratas fueron colocadas en un aparato de hipoxia el cual está compuesto por varias cajas cilíndricas de plexiglás idénticas (28 cm de largo, 10 cm de diámetro y un volumen de 2.2 litros). Estas cajas fueron conectadas a una válvula de selenio que permite la distribución de nitrógeno puro a un flujo que fue ajustado para reducir la fracción de oxígeno inspirado ( $F_{IO_2}$ ) en el ambiente a un 5% durante 40 segundos. Seguido de la entrada de aire comprimido, para retornar gradualmente a un ambiente de aire con una  $F_{IO_2}$  de 21% (normoxia) durante 20 segundos, las ratas sometidas a este protocolo son las hipoxicas. Estos animales fueron expuestos a un 5% de oxígeno porque se corresponde con la desaturación de oxígeno observada en los pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño. Este ciclo de un minuto fue repartido durante ocho horas diarias por 14 días (ver figura). Paralelo a la entrada de nitrógeno a las cajas hipoxicas, fue distribuido sólo aire comprimido a la misma tasa de flujo del nitrógeno en las cajas normoxicas (21% de  $F_{IO_2}$ ). El nivel de oxígeno en cada una de las cajas durante el protocolo de HI fue controlado con un analizador de gas (modelo ML206, AD Instruments).



Variación de la proporción de  $O_2$  en el interior de las cajas (21 a 5%) durante ciclos de un minuto de hipoxia intermitente.

Para determinar el efecto del candesartan en la nitración y fosforilación de las proteínas ERK 1/2 en la corteza cerebral de las ratas, éstas fueron divididas en los siguientes grupos experimentales: 1. ratas normoxicas (N); 2. ratas expuestas a hipoxia

intermitente (HI) tratadas con vehículo, por vía oral una hora antes de la exposición a la normoxia y a la hipoxia durante 14 días (N=2 por grupo); 3. ratas normoxicas (Nc) tratadas con candesartan-celextetil (1 mg/kg/día, p.o.); y 4. ratas expuestas a hipoxia intermitente (HIC), tratadas con candesartan-celextetil (1 mg/kg/día, p.o.) una hora antes de la exposición a la normoxia y a la hipoxia durante 14 días (N=2 por grupo).

#### EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS

Finalizado el protocolo de hipoxia intermitente crónica se procedió a la extracción de los tejidos; para ello los animales fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados por decapitación. Se extrajo la corteza primaria del cerebro, y disecó bajo microscopía quirúrgica, en frío. Los tejidos fueron homogeneizados en hielo con 100 a 300  $\mu$ l de buffer de lisis (50  $\mu$ M Trisma base, 5 mM EDTA, 1  $\mu$ M NaF, 1  $\mu$ M  $Na_3VO_4$ , mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A, AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina y E-64, a pH 7.4, Tritón X-100 al 1%), usando un homogeneizador de tejido. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C, 10.000 rpm por 10 minutos, para obtener el sobrenadante. Las proteínas fueron determinadas mediante el método de Biuret en medio alcalino con utilización del BCA (ácido bicinónico), Protein Assay Reagent Kit de Pierce®.

#### ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Para el análisis de Western blot, las muestras de corteza primaria (100  $\mu$ g de proteína/muestra) fueron separadas en geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno). Posteriormente se procedió a bloquear las membranas con una solución de TBS/Tween 0,1% + 5% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunoblots se realizaron mediante la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios antifosfo-p44/42-MAPK, y anti-MAPK durante toda la noche a 4 °C, seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes anti-IgG conjugados con sustrato HRP (*horseradish peroxidase*), durante una hora a temperatura ambiente. El revelado de las membranas se realizó utilizando el kit de revelador SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate y el análisis desintométrico con Scion Image Software.

#### PROTOCOLO DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Para la inmunoprecipitación, 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-nitrotirosina fueron unidos a la proteína A-agarosa e incubados con 100  $\mu$ g de proteínas totales de

las muestras homogenizadas de corteza primaria, durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Luego de la incubación las muestras inmunoprecipitadas fueron lavadas 5 veces con 1 ml de buffer de fosfato de sodio 0,1 M a pH=7, para ser sometidas al protocolo de Western blot antes descrito.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media ± E.S.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de P<0,05 fue considerado significativo.

**Resultados**

**1. EVIDENCIA DE NITRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA**

El análisis de Western blot para las proteínas nitradas en la corteza cerebral de la rata inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-nitrotirosina muestra varias bandas de proteínas en el rango del peso molecular correspondiente a 37-50 KDa, tanto en el grupo de ratas expuesta a normoxia como a hipoxia intermitente (figura 1). En el peso molecular de 44 y 42 KDa se observan dos bandas de proteínas nitradas en ambos grupos de ratas, éstas parecen pertenecer a las proteínas ERK-1 y ERK-2.

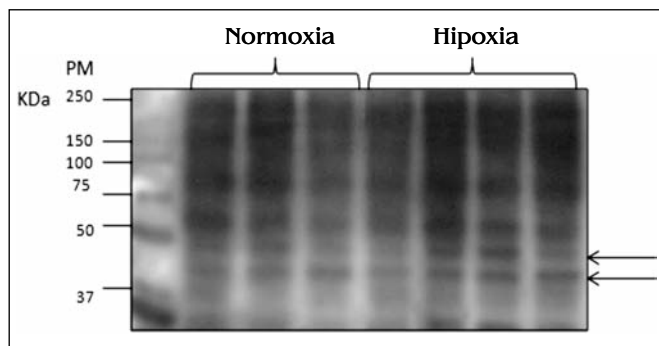


Figura 1

Inmunoprecipitación de las proteínas nitradas de homogeneizado de la corteza primaria del cerebro de la rata expuesta a normoxia y a hipoxia intermitente crónica. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE, transferidas a las membranas e incubadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina. Las flechas indican las bandas de proteínas en el rango del peso molecular de las proteínas ERK 1 y ERK 2, respectivamente. N= 3 para el grupo de ratas normóxicas y N= 4 para el grupo de ratas hipóxicas.

**2. EFECTO DE LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK1/2 EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

El análisis de Western blot muestra que las proteínas ERK1 y ERK2, así como las proteínas fosforila-

das se expresan en la corteza cerebral de las ratas controles (ratas normóxicas) y en las expuestas a hipoxia intermitente crónica. En la figura 2B se puede observar que la cantidad de proteínas totales ERK 1/2 no difieren entre el grupo de ratas hipóxicas y el grupo normóxico, mientras que con respecto a la cantidad de proteína fosforilada ERK 1/2, se observa un incremento en la densidad óptica de las bandas de las muestras provenientes de las ratas hipóxicas, al compararla con las ratas normóxicas (figura 2A). La cuantificación densitométrica indica un incremento significativo de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica con respecto a la fosforilación observada en las ratas normóxicas, expresadas como la relación fosfo-ERK/ERK (figura 2C).

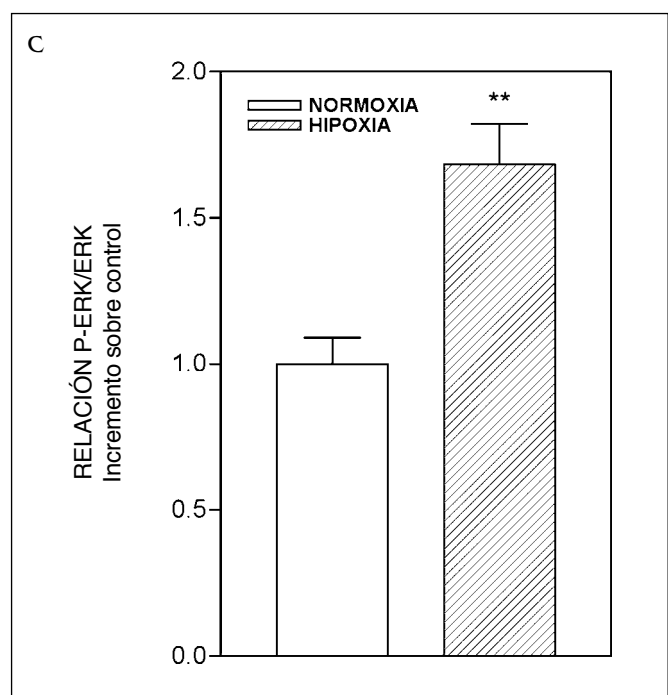
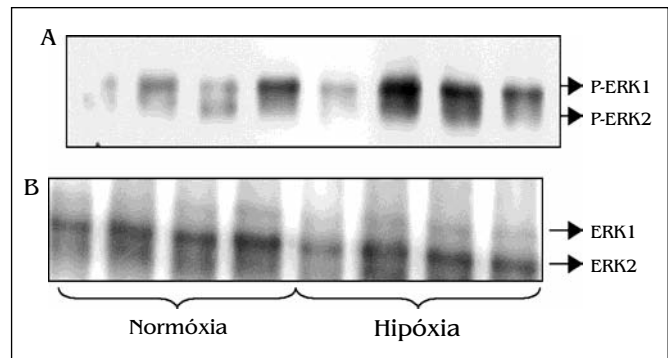


Figura 2

Western blot de las proteínas fosforiladas ERK 1/2 (A) y las proteínas totales ERK 1/2 (B) en homogeneizado de la corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia. (C) El nivel relativo de activación de ERK 1/2 fue determinado por escaneo densitométrico de las bandas de fosfo-ERK y normalizado con las bandas de ERK. N=4 ratas por cada grupo de exposición. \*\*p<0.01.

**3. EFECTO DE LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA SOBRE LA NITRACIÓN DE LAS ERK1/2 EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

Las muestras de corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE y transferidas a la membrana e incubadas con el anticuerpo primario anti-ERK 1/2 (anti-MAPK). En el análisis de Western blot se pueden observar dos bandas de proteínas nitradas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2 respectivamente, y confirma los resultados obtenidos en la figura 1. En la figura 3A y 3B se observa que la hipoxia produce un incremento de la nitración de las proteínas ERK de forma significativa con respecto a las ratas expuestas a normoxia.

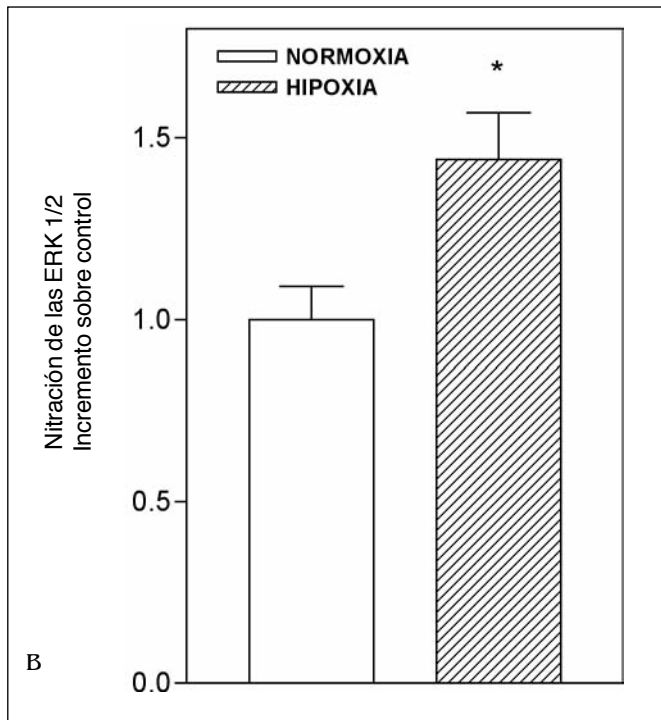
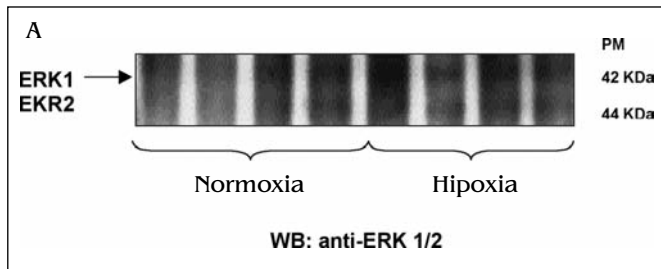


Figura 3

Inmunoprecipitación de las proteínas nitradas de homogenizado de la corteza primaria del cerebro de la rata, expuesta a normoxia y a hipoxia intermitente crónica. Se observan las bandas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2, respectivamente (A). La cuantificación fue realizada por análisis densitométrico de las bandas de ERK 1/2 (B). N=4 ratas por cada grupo de exposición. \*p<0.05.

**4. EFECTO DEL BLOQUEO *IN VIVO* DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> CON CANDESARTAN SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ERK1/2 INDUCIDA POR LA HIC, EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

En la figura 4B se puede observar la cantidad de proteínas totales ERK 1/2, las cuales son similares en densidad en el grupo de ratas hipóxicas y normóxicas tratadas con candesartan y el grupo de ratas hipóxicas y normóxicas no tratadas (control). Por otra parte, en la figura 4A se observa un incremento de la densidad óptica con respecto a la cantidad de proteínas fosforiladas ERK 1/2 en las ratas sometidas a HIC y este incremento es inhibido por el candesartan. La cuantificación de los resultados expresados como relación fosfo-ERK/ERK (figura 4C) demuestra clara-

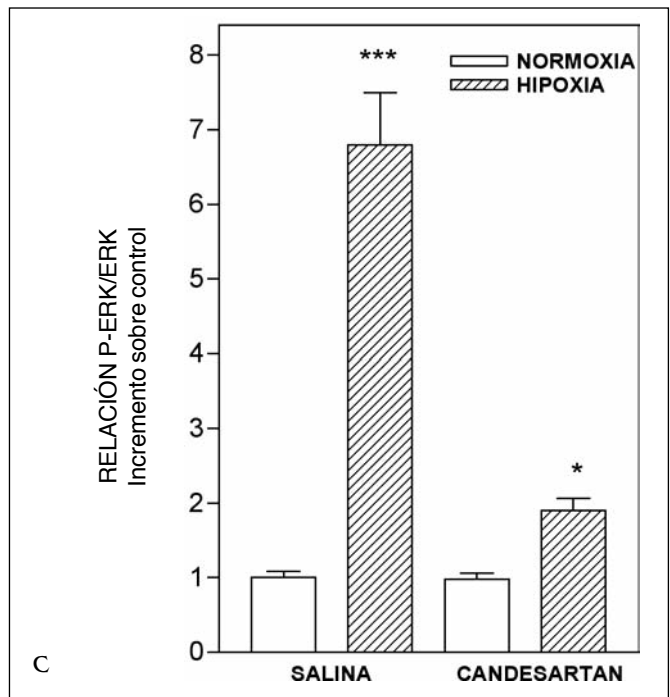
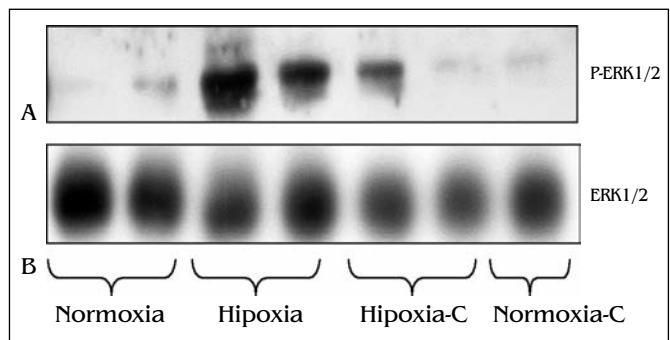


Figura 4

Western blot de las proteínas fosforiladas ERK 1/2 (A) y las proteínas totales ERK 1/2 (B) en muestras de la corteza primaria homogeneizada proveniente de ratas normoxicas o expuestas a hipoxia intermitente crónica tratadas, o no, con candesartan. Análisis densitométrico de la activación de ERK 1/2 (C). El nivel relativo de activación de ERK fue determinado por escaneo densitométrico de las bandas de fosfo-ERK y normalizado con las bandas de ERK. N=2 ratas por cada grupo de exposición. \*\*\*p<0.001; \*p<0.05.

mente que la HIC incrementa la fosforilación de las ERK1/2 y que el candesartan inhibe de forma significativa la activación de las proteínas ERK 1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica. El candesartan no afectó por sí mismo la fosforilación de ERK en las ratas normóxicas.

##### 5. EFECTO DEL CANDESARTAN *IN VIVO* SOBRE LA NITRACIÓN DE LAS ERK1/2 INDUCIDA POR LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA

Las muestras de corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia, tratadas o no con candesartan, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE y transferidas a la membrana e

incubadas con el anticuerpo primario anti-ERK 1/2 (anti-MAPK). En la figura 5A se observa que la hipoxia produce un incremento de la nitración de las proteínas ERK 1/2 de forma significativa con respecto a las ratas expuesta a normoxia y este incremento es inhibido por el candesartan. La cuantificación de los resultados expresados como nitración de ERK1/2 (figura 5B) demuestra claramente que la HIC incrementa la nitración de las ERK1/2 y que el candesartan inhibe de forma significativa la nitración de las proteínas ERK 1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y también en las ratas normoxicas.

### Discusión

El posible mecanismo mediante el cual la apnea del sueño contribuye al incremento de la presión arterial no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo, la evidencia apunta hacia un papel fundamental del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina (Fletcher y col., 1992 y 1999). En modelos animales de HIC, el aumento de la actividad simpática es requisito primordial para el desarrollo de la elevación de la presión arterial sostenida (Greenberg y col., 1999; Fletcher y col., 1992). De igual forma, existe evidencia que indica que el sistema SRA circulante y el tisular se encuentran activados durante la hipoxia crónica (Fletcher y col., 1999).

Ahora bien, los efectos deletéreos de la HIC podrían estar mediados por el sistema nervioso central. Al respecto se ha demostrado un incremento, dependiente del tiempo, de la apoptosis en el área hipocámpal CA1 y el neocórtex, en ratas sometidas a HIC en magnitud similar a la experimentada en los pacientes con apnea del sueño (Gozal y col., 2001). De igual manera, en un modelo de apnea del sueño en ratones se ha demostrado apoptosis neuronal cortical y disfunción neurocognitiva inducida por la HIC (Xu y col., 2004).

Se ha propuesto que los daños neuronales inducidos por la hipoxia podrían ser el resultado del estrés oxidativo, el cual se asocia con una producción aumentada de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y de iones superóxido ( $O_2^-$ ). En efecto, mediante técnicas de detección de fluorescencia se ha demostrado incrementos significativos de la producción de ROS en la corteza cerebral y en las neuronas corticales de ratones expuestos a HIC. Igualmente, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado aumentos de los marcadores de la respuesta al estrés oxidativo, c-Fos, c-Jun y la NK-kB (Xu y col., 2004). Debido a que estos radicales son extremadamente reactivos, los mismos han sido implicados en la regulación de una gran variedad de actividades enzimáticas.

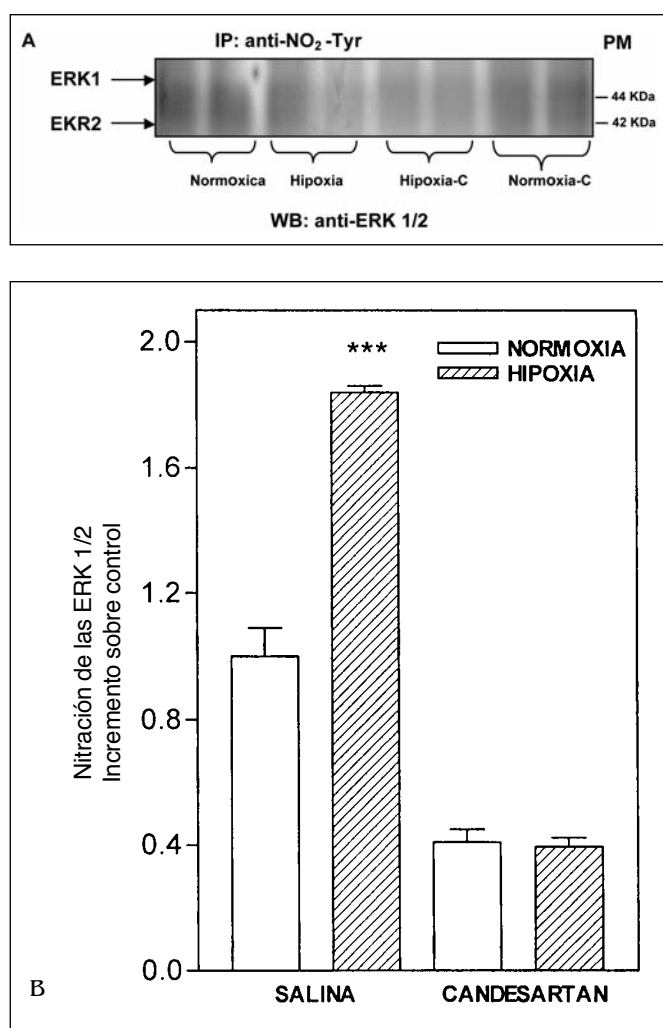


Figura 5

Immunoprecipitación de proteínas nitradas de homogeneizado de la corteza primaria del cerebro de las ratas expuestas a normoxia o a hipoxia intermitente crónica y tratadas, o no, con candesartan. En el Western blot se pueden observar unas bandas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2 respectivamente (A). La cuantificación fue realizada por análisis densitométrico de las bandas de ERK 1/2 (B). N=2 ratas por cada grupo de exposición. \* $p < 0.05$ .

Adicionalmente se ha demostrado que el óxido nítrico, un conocido neurotransmisor, participa en la regulación de la homeostasis cardiovascular y la respuesta cardiorrespiratoria a la hipoxia, actuando tanto a nivel central como periférico (Li y col., 2002; Gozal y col., 1996). Varias líneas de evidencia indican que la biosíntesis del NO podría constituir un factor clave en la respuesta fisiopatológica del cerebro durante la hipoxia. Así, se sabe que la HIC incrementa la expresión del ARNm y de la proteína de la iNOS, así como la actividad NOS, la formación de residuos de nitrotirosina y la producción de nitratos y nitritos (Li y col., 2004). Igualmente, se ha demostrado que la hipoxia hipobárica aguda aumenta la expresión de la nNOS en la corteza cerebral (Castro-Blanco y col., 2003), así como en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Luo y col., 2000).

Debido a que el SRA se encuentra activado durante la HIC, la angiotensina II como hormona multifuncional resulta la candidata ideal para mediar las acciones centrales de este síndrome. La ANG es capaz de activar a diferentes niveles a la vía de las MAPK (Touyz y Schiffrin, 2000; Bottari y col., 1993). La ANG induce la fosforilación de las principales familias de MAPKs: la ERK1/2, JNK, y p38 en células de músculo liso vascular en cultivo y en el SNC (Touyz y Schiffrin, 2000; Bottari y col., 1993; Griendling y col., 2000, Chan y col., 2005). La ANG aumenta el estrés oxidativo a través de la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa que produce  $O_2^-$ . Estos iones superóxido producen probablemente la activación de los MAPK (Griendling y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que la ANG induce la activación de las MAPK a través de la generación de ONOO<sup>-</sup> y su nitración (Pinzar y col., 2005).

La nitración de los residuos de tirosina también ocurre en áreas del cerebro posterior a la isquemia y otras condiciones patológicas (Wang y Zweier, 1996), tales como en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Smith y col., 1997). La nitración de los residuos de tirosina en el SNC podría alterar la señalización dependiente de la fosforilación de la tirosina, bien sea en forma positiva como negativa (Turko y Murad, 2002). Al respecto, nuestros resultados demuestran por primera vez, que la hipoxia intermitente crónica induce la nitración, así como la fosforilación de las ERK1/2 en la corteza cerebral de la rata.

Existe evidencia que indica que la nitración de las ERK1/2 se asocia con su activación. Así, en varias líneas celulares la nitración de las ERK producida por el ONOO<sup>-</sup> parece que activa directamente a la enzima o indirectamente a través de la fosforilación

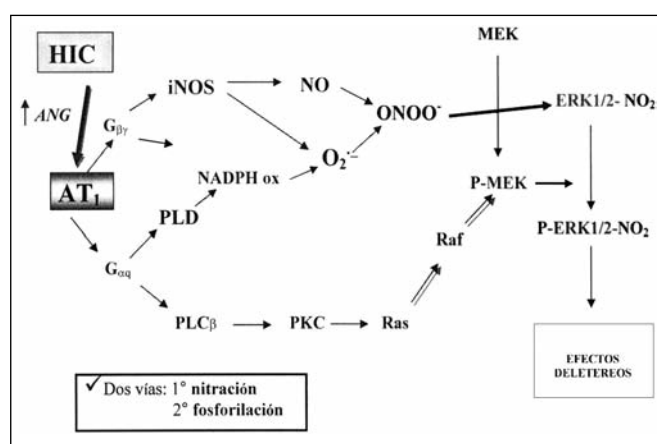


Figura 6  
Representación de las posibles vías de señalización que se activan durante la hipoxia intermitente crónica.

de la EGFR, o de la activación directa de las Raf y MEK (Schieke y col., 1999; Nabeyrat y col., 2003; Zhang y col., 2000) (figura 6). En efecto, se ha demostrado en células del músculo liso vascular, que la ANG induce *in vitro* la nitración y fosforilación de las ERK 1/2 a través de la producción de las ROS y la activación de la vía Raf-MEK-ERK (figura 6) (Pinzar y col., 2006).

Es posible que la HIC, a través de la liberación de ANG, produzca la activación de las ERK en respuesta a un mecanismo que implica la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> localizado en neuronas cuyos terminales nerviosos se proyectan hacia la corteza cerebral. En apoyo al papel del receptor AT<sub>1</sub> se encuentran los resultados reportados en la región rostro ventrolateral del bulbo raquídeo (RVLM) (Chan y col., 2005). En los mismo se demuestra que la angiotensina II produce una respuesta presora a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK, mediante la fosforilación de la p38 MAPK y ERK1/2, y este efecto es dependiente del receptor AT<sub>1</sub> y la NAD(P)H oxidasa (Chan y col., 2005). Nuestros resultados muestran claramente que el pretratamiento *in vivo* con candesartan, un antagonista selectivo del receptor AT<sub>1</sub>, inhibe tanto la fosforilación como la nitración de la ERK1/2 inducida por la HIC en la corteza primaria cerebral estos hallazgos demuestran la mediación del receptor AT<sub>1</sub> en la activación de las ERK 1/2 durante la HIC, aportan evidencia acerca de la participación del SRA cerebral en este síndrome.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la activación del SRA cerebral inducido por la hipoxia intermitente crónica, a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub>, desencadena mecanismos de señalización que implican la producción de NO y ONOO<sup>-</sup>, la nitración de las ERK1/2 y la activación directa o indirecta de las ERK1/2 (figura 6). Esta secuencia de eventos podría ser la responsable del incremento

de la presión arterial y las manifestaciones fisiopatológicas asociadas a la hipoxia intermitente crónica como los desórdenes neurocognitivos. Sin embargo, son aún necesarios estudios adicionales para establecer con certeza el efecto de la nitración sobre la regulación de las kinasas "aguas arriba" en la cascada de señalización de las MAPK activadas durante la HIC.

## Referencias Bibliográficas

- BARTLETT DJ, RAE C, THOMPSON CH, BYTH K, JOFFE DA, ENRIGHT T, GRUNSTEIN RR. 2004. Hippocampal area metabolites relate to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 6: 593-596.
- BEGUIN PC, JOYEUX-FAURE M, GODIN-RIBUOT D, LEVY P, RIBUOT C. 2005. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol.* 99: 1064-1069.
- BOTTARI SP, DE GASPARO M, STECKELINGS U, LEVENS N. 1993. Angiotensin II receptor subtypes: characterisation, signalling mechanism, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.* 4:123-171.
- CASTRO-BLANCO S, ENCINAS JM, SERRANO J, ALONSO D, GÓMEZ MB, SÁNCHEZ J, RÍOS-TEJADA F, FERNÁNDEZ-VIZARRA P, FERNÁNDEZ AP, MARTÍNEZ-MURILLO R, RODRIGO J. 2003. Expression of nitric oxide synthase and protein nitration in adult rat brains submitted to acute hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide.* 8:182-201.
- CHAN SH, HSU KS, HUANG CC, WANG LL, OU CC, CHAN JY. 2005. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res.* 14:772-780.
- FLETCHER EC, LESSKE J, CULMAN J, MILLER CC, and UNGER T. 1992. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation episodic hypoxia. *Hypertension.* 20:612-619.
- FLETCHER EC, LI R, BAO G. 1999. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension.* 34:309-314.
- FLETCHER EC, OROFINOVA N, BADER M. 2002. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J Appl Physiol.* 92: 627-633.
- FLETCHER EC. 2001. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol.* 90: 1600-1605.
- FRUEHAUF JP, MEYSKENS F. 2007. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death. *Clin Cancer Res.* 13: 789-794.
- GREENBERG HE, SICA A, BATSON D, SCHARF SM. (1999). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol.* 86:298-305.
- GRIENGLING KK, SORESKU D, LASSEGUE B, USHIO-FUKAI M. 2000. Modulation of protein kinase activity and gene expression by ROS and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2175-2183.
- GOZAL D, TORRES JE, GOZAL YM, LITWIN SM. 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J Appl Physiol.* 81: 2068-2077.
- GOZAL D, DANIEL JM, DOHANICH GP. 2001. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci.* 21:2442-2450.
- ISCHIROPOULOS H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 305: 776-783.
- LAPLANTE MA, CHAMPLAIN J. 2006. The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:21-28.
- LI YF, ROY SK, CHANNON KM, ZUCKER IH, PATEL KP. 2002. Effect of in vivo gene transfer of nNOS in the PVN on renal nerve discharge in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H594-H601.
- LI R, ROW BW, KHEIRANDISH L, BRITTIAN KR, GOZAL E, GUO SZ, SACHLEBEN LR JR, GOZAL D. 2004. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol Dis* 17: 44-53.
- LUO Y, KAUR C, LING EA. 2000. Hypobaric hypoxia induces fos and neuronal nitric oxide synthase expression in the paraventricular and supraoptic nucleus in rats. *Neurosci Lett.* 22:145-148.
- MACEY P, HENDERSON L, MACEY K, ALGER J. 2002. Brain Morphology Associated With Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 1382-1387.
- MAKTABI MA, TODD M, STACHOVIC G. 1995. Angiotensin II Contributes to Cerebral Vasodilatation During Hypoxia in the Rabbit. *Stroke.* 26: 1871-1976.
- MANUKHINA EB, DOWNEY F, MALLET R. 2006. Role of Nitric in Cardiovascular Adaptation to Intermittent Hypoxia. *Exp Biol Med.* 231: 343-365.
- MORRELL M, McROBBIE D, QUEST RA, CUMMIN A, GHIASSI R, CORFIELD DR. 2003. Change in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine.* 4: 451-454.
- NABEYRAT E, JONES GE, FENWICK PS, BARNES PJ, DONNELLY LE. 2003. Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L1112-L1120.
- NANDURI RP. 2001. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* 90: 1986-1994.
- NANDURI RP, FIELDS DR, BAKER T, FLETCHER EC. 2001. Intermittent hypoxia: cell to system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L524-L528.

- NEUBAUER JA. 2001. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 90: 1593-1599.
- PINZAR E, WANG T, GARRIDO M R, XU W, LEVY P, BOTTARI SP. 2005. Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters.* 579: 5100-5104.
- RAMANATHAN L, GOZAL D, SIEGEL JM. 2005. Antioxidant responses to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons. *J Neurochem.* 93: 47-52.
- SCHIEKE, BRIVIBA K, KLOTZ LO, SIES H. 1999. Activation pattern of mitogen-activated protein kinase elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation, *FEBS Lett.* 448: 301-303.
- SICA AL, GREENBERG HE, RUGGIERO DA, SCHARF SM. 2000. Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. *Resp Physiol.* 121:173-184.
- SMITH MA, RICHEY HARRIS PL, SAYRE LM, BECKMAN JS, PERRY G. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17: 2653-2657.
- TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. 2000. Signal transduction mechanism mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharm Rev.* 52:639-672.
- TURKO IV, MURAD F. 2002. Protein nitration in cardiocascular diseases, *Pharm. Rev.* 54:619-634.
- WANG P, ZWEIER JL. 1996. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 271: 29223-29230.
- XU W, CHI L, ROW BW, XU R, KE Y, XU B, LUO C, KHEIRANDISH L, GOZAL D, LIU R. 2004. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neurosci* 126: 313-323.
- WASICKO MJ, MELTON JE, NEUBAUER JA, KRAWCIW N and EDELMAN NH. 1990. Cervical sympathetic and phrenic nerve responses to progressive brain hypoxia. *J Appl Physiol.* 68: 53-58.
- YAMAUCHI M, NAKANO H, MAEKAWA J, OKAMOTO Y, OHNISHI Y, SUGI T, KIMURA H. 2005. Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea. *CHEST.* 127:1674-1679.
- YUAN ZM, CHEN BY, WANG PX, LI SY, CHEN YL AND DONG LX. 2004. Changes of angiotensin II and its receptor during the development of chronic intermittent hypoxia-induced hypertension in rats. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 27: 577-580.
- ZHANG P, WANG YZ, KAGAN YZ, BONNER JC. 2000. Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem.* 275: 22479-22486.

# Síntesis del N-aralquilamino-metiladamantano con posible actividad Dopaminérgica Central

## *Synthesis of the N-aralkylamine-methyladamantane with possible Central Dopaminergic activity*

JORGE E. ÁNGEL GUÍO<sup>1\*</sup>, ELVIA V. CABRERA<sup>1</sup>, BIAGINA MIGLIORE DE ÁNGEL<sup>2</sup>,  
HEBERTO SUÁREZ-ROCA<sup>2</sup>, JAIME E. CHARRIS<sup>3</sup>, ROBERTO ROSSI<sup>4</sup>, ANA SANTIAGO<sup>4</sup>,  
SIMÓN LÓPEZ<sup>5</sup>, MARÍA M. RAMÍREZ<sup>1</sup>, VERÓNICA HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, MIGUEL MORALES<sup>1</sup>

### Resumen

En las últimas décadas son muchos los compuestos con actividad dopaminérgica central que se han diseñado, sintetizado y evaluado farmacológicamente, incluyendo a los análogos N-sustituídos del 2-aminoindano y de las 2-aminotetralinas. A pesar de ello, no se ha logrado obtener un fármaco capaz de mejorar o curar las patologías que involucran la regulación dopaminérgica en el sistema nervioso central, tales como el mal de Parkinson y la esquizofrenia, entre otras. En el presente trabajo se planteó el diseño y síntesis de un nuevo compuesto basado en el sistema N-aralquilamino-metiladamantano no reportado en la literatura y aplicando como paso clave la reacción de sustitución nucleofílica radicalaria unimolecular ( $S_{RN}1$ ). Asimismo, se evaluó el perfil de su acción dopaminérgica mediante la determinación de parámetros conductuales en ratas. Los resultados de la evaluación farmacológica preliminar muestran que el compuesto **9** se comporta como un agonista dopaminérgico central.

**Palabras clave:** Dopamina, agonista dopaminérgico central, sustitución nucleofílica radicalaria unimolecular ( $S_{RN}1$ ), N-aralquilamino-metiladamantano.

### Abstract

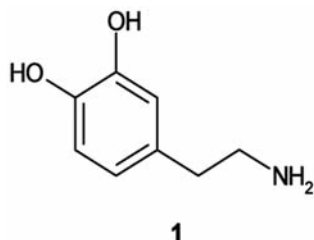
In the last decades, many central dopaminergic compounds have been designed, synthesized and pharmacologically evaluated, including N-substituted analogues of 2-aminoindane and 2-aminotetraline. Despite these efforts, it has not been obtained a drug capable to improve the treatment of pathologies which involve central nervous system dopaminergic regulation, such as Parkinson disease and schizophrenia, among others. The following work describes the design and synthesis of a new group of compounds based on the N-aralkylamine-methyladamantane **9** which is not been reported previously in the literature, using a nucleophilic radical unimolecular substitution reaction ( $S_{RN}1$ ) as the key step for their preparation. The dopaminergic profile was also evaluated through the assessment of their effect on rat behaviour. The results on the preliminary pharmacological evaluation showed that compound **9** is a central dopaminergic agonist.

**Key words:** Dopamine, central dopaminergic agonist, nucleophilic radical unimolecular substitution reaction ( $S_{RN}1$ ), N-aralkylamine-methyladamantane.

- 1 Laboratorio de Síntesis Orgánica y Diseño de Fármacos. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.
  - 2 Sección de Farmacología. Instituto de Investigaciones Clínicas «Dr. Américo Negrette». Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
  - 3 Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
  - 4 INFIQC. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria 5000, Córdoba-Argentina.
  - 5 Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos. Departamento de Química. Universidad Simón Bolívar.
- \* E-mail: [janjel@luz.edu.ve](mailto:janjel@luz.edu.ve), [janjel63@yahoo.com](mailto:janjel63@yahoo.com), [janjel63@hotmail.com](mailto:janjel63@hotmail.com).

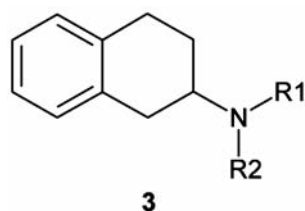
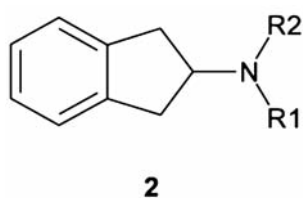
## Introducción

La dopamina **1** (DA) participa en la biosíntesis de las catecolaminas y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) (Avedaño, 1993). El sistema dopaminérgico cerebral se encuentra relacionado con los desórdenes neurodegenerativos, tales como la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson y otras patologías relacionadas con la regulación dopaminérgica central (Haadsma Svensson y col., 2001).



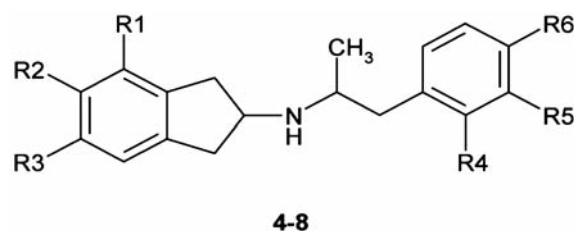
De todas las enfermedades neurológicas, el mal de Parkinson y la esquizofrenia han sido de las más estudiadas desde los puntos de vista de la química medicinal y de la farmacología. El mal de Parkinson es una enfermedad degenerativa de las vías dopaminérgicas nigroestriadas, que causa una deficiencia de la dopamina en el cerebro, y origina así desórdenes neuromotores tales como temblor en reposo, rigidez muscular, bradikinesia y/o akinesia y dificultad para detener el movimiento (Van Vliet y col., 2000). Entre las enfermedades neurológicas más frecuentes, el mal de Parkinson ocupa el segundo lugar y se sabe que la incidencia de este mal aumenta con la edad, lo cual afecta a uno por ciento de los adultos mayores de 65 años en todo el mundo y usualmente se manifiesta después de los 55 años (Rodman y col., 1981; Goodman y col., 1991). En cambio la esquizofrenia se relaciona con un exceso de la actividad neuronal dopaminérgica central. Esta patología es contrarrestada con medicación antipsicótica al bloquear los receptores dopaminérgicos centrales y reducir, por tanto, la transmisión dopaminérgica (Mach y col., 2001).

En las últimas décadas se han diseñado, sintetizado y evaluado numerosos compuestos con actividad dopaminérgica central, así como también una gran cantidad de los análogos N-sustituídos y no sustituidos del 2-aminoindano (**2**) y las 2-aminotetralinas (**3**), a las cuales se les ha detectado actividad



sobre el sistema nervioso periférico y central como agonistas dopaminérgicos (Cannon y col., 1981, 1972, 1980).

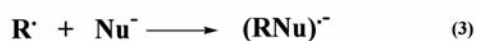
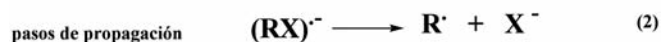
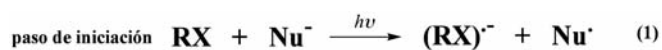
De acuerdo con los estudios de la relación entre la estructura química y la actividad biológica para los agonistas dopaminérgicos (Cannon y col., 1981; Wikstrom y col., 1992), los compuestos **4-8** contienen el fragmento total o parcial del farmacóforo dopaminérgico (*m*-hidroxi-fenil-etil-amino) necesario para interactuar con su receptor. En vista de que estos compuestos presentan rotación libre sobre el fragmento aralquíl y el 2-aminoindano conserva la disposición farmacofórica del receptor dopaminérgico, los compuestos **4-8** han mostrado actividad sobre los receptores dopaminérgicos centrales (Ángel y col., 2001, 2003 y 2004).



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
4	OH	H	H	H	H	H
5	H	OH	H	H	H	H
6	H	H	H	Cl	H	Cl
7	OH	OH	H	H	OH	OH
8	H	OH	OH	H	H	H

A pesar de que son numerosos los compuestos que se han diseñado, sintetizado y evaluado farmacológicamente, aún no se ha logrado obtener un fármaco capaz de detener o controlar eficazmente las enfermedades del mal de Parkinson, la esquizofrenia, la diskinesia tardía, la Corea de Huntington y otras patologías relacionadas con la regulación dopaminérgica. A la luz de estas evidencias se diseñó y sintetizó un nuevo compuesto análogo del N-aralquilamino-metiladamantano no reportado en la literatura. Esta síntesis se inició con la reacción entre el iodoadamantano (**10**), el anión del nitrometano, el anión de la acetona (reactivo de encarrilamiento), terbutóxido de potasio y el dimetil-sulfóxido (DMSO) bajo irradiación de luz ultravioleta, siguiendo las condiciones de la reacción de sustitución nucleofílica radicalaria unimolecular ( $S_{RN}1$ ) para obtener el intermediario clave (**11**) (Rossi y col., 1990). La posterior reducción catalítica produjo la amina (**12**). El compuesto final (**9**) se obtuvo a través de una reacción de aminación reductiva (Ángel y col., 2004) entre la acetona (**13**) (Knoevenagel y col., 1904;

Hass y col., 1943; Hoover y col., 1947) y la amina (12) (esquema 1).



Esquema 1  
Ruta de síntesis del compuesto 9

## Materiales Y Métodos

### SECCIÓN FARMACOLÓGICA

**Animales:** se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 250 a 300 g., mantenidas bajo períodos alternativos de luz y oscuridad, con libre acceso al agua y alimento estándar (Ratarina®, Protinal).

**Reactivos:** para las pruebas de estereotipia se utilizó apomorfina HCl (SANDOZ S.A., BASEL, Suiza) disuelta en solución salina, inyectada intraperitonealmente (ip) a una dosis de 1mg/kg de peso corporal. El compuesto 9 fue disuelto en solución isotónica de NaCl e inyectado vía intracerebroventricular (ICV) (Ángel y col., 2001, 2003 y 2004) a la dosis de 10µg/5µl.

**Metodología:** cinco días antes del experimento se les implantó a las ratas una cánula metálica en el ventrículo lateral-derecho, bajo anestesia con cilizina (Setton® al 2%) (1 mg/kg., i.p) y relajación con ketamina, según las coordenadas: antero-posterior -0,40 mm del Bregma; 1,2 mm lateral y 3 mm ventral, mediante el uso de un aparato estereotáxico. Las cánulas, de un largo inferior a 4 mm, se realizaron utilizando jeringas 20G, selladas con silicona y fijadas al cráneo mediante cemento acrílico (Ángel y col., 2001; Ángel y col., 2004; Rodríguez y col., 2003). La inyección ICV se realizó utilizando una inyectadora Hamilton de 10µl, provista de un tope para aplicación precisa de los compuestos.

Se evaluó la capacidad de los compuestos de inducir conducta estereotipada en las ratas, es decir, una actividad motora repetitiva y sin propósito. Las observaciones de esta conducta (lamidas, roídas, olfateo y acicalamiento) se realizaron introduciendo el animal en una caja de observación de acrílico transparente de 32x28x28 cm. de dimensión. Los datos recolectados se registraron empleando una computadora dotada de un software para contar el número de movimientos estereotipados. Las observaciones se realizaron durante un período de 60 minutos, divididos en 10 intervalos de 6 minutos ca-

da uno. Se utilizaron grupos de 4 animales para cada una de las evaluaciones. Los datos se analizaron mediante el análisis de variancia (ANOVA) de una y dos vías, seguidas de la prueba de Newman-Keul y los resultados se expresaron como promedio ± EEM.

Antes de la medición de la conducta estereotipada, los animales fueron introducidos en una caja de observación y se dejaron por un período de 15 minutos para que se habituaran a la misma. Cada uno de los compuestos fue inyectado solo. Los compuestos se evaluaron de acuerdo con los siguientes criterios: 1) En caso de resultar agonista, el compuesto fue comparado frente a haloperidol (0,2mg/kg, i.p.), un antagonista de los receptores dopaminérgicos. Para esto se procedió a inyectar el haloperidol 15 minutos antes de la administración (ICV) del compuesto evaluado; 2) en caso de resultar antagonista, el compuesto fue comparado con la apomorfina (1mg/kg, i.p.), un agonista de los receptores dopaminérgicos. Para ello se procedió a inyectar el animal (ICV) con el compuesto evaluado como antagonista y 15 minutos después se administró la apomorfina i.p.

### SECCIÓN QUÍMICA

Los puntos de fusión no fueron corregidos y se determinaron mediante el uso de un aparato «Thomas Hoover Capillary Melting Point». Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados a través de un espectrómetro marca Brucker Avance a 300 MHz para <sup>1</sup>H y de 500 MHz para <sup>13</sup>C, siendo reportados en ppm (%) la señal del TMS como estándar interno a campo bajo. La pureza de todos los compuestos fue determinada por cromatografía de capa fina usando solvente con distinta polaridad. Todos los solventes fueron destilados y secados del modo usual.

### SÍNTESIS DEL 1-NITROMETILADAMANTANO (11)

En un balón de tres bocas de 250 ml, equipado con flujo de nitrógeno y agitador magnético, se colocaron 100 ml de DMSO seco y desgasificado y se añadió nitrometano (3 mmol) y propanona (2 mmol), luego de 15 min. se adicionó a la solución el compuesto 10 (1 mmol) y la mezcla de reacción fue irradiada en un reactor equipado con dos lámparas UV de 400-W durante 360 minutos. Luego, la reacción fue detenida adicionando un exceso de nitrato de amonio. El residuo se disolvió en 300 mL de agua y se extrajo con 100 mL de éter etílico. El residuo se purificó por cromatografía de columna en sílica gel, eluyendo con éter de petróleo - éter etílico (98:2) obteniéndose un aceite amarillo en un 27% de rendimiento (Rossi y col., 1990). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm): 1.70 - 2.50 (m, 15H, Ad), 4.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

### SÍNTESIS DEL CLORHIDRATO AMINO-METILADAMANTANO (12)

Se colocó en un envase especial para hidrogenar 0,47 g (2,41 mmol) del compuesto **11** sobre una mezcla de 0,21 g de Pd-C 10% en 1,2 mL de HCl concentrado y 40 mL de etanol absoluto, a temperatura ambiente y una presión inicial de 10 psi. Después de absorbida la cantidad calculada de hidrógeno, el catalizador fue removido por filtración y el filtrado fue rotaevaporado obteniéndose un aceite amarillo claro que al ser disuelto en 1 mL de éter y luego ser tratado con una mezcla recién preparada de éter-HCl produjo la amina clorhidrato como un sólido de color crema 0,31 g (64% de rendimiento), con un punto de fusión de 195 °C. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm): 1.57 – 2.01 (m, 15H, Ad), 2.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm): 27.82, 32.11, 36.25, 39.55 (CH y CH<sub>2</sub> Ad), 51.11 (CH<sub>2</sub>-Ad).

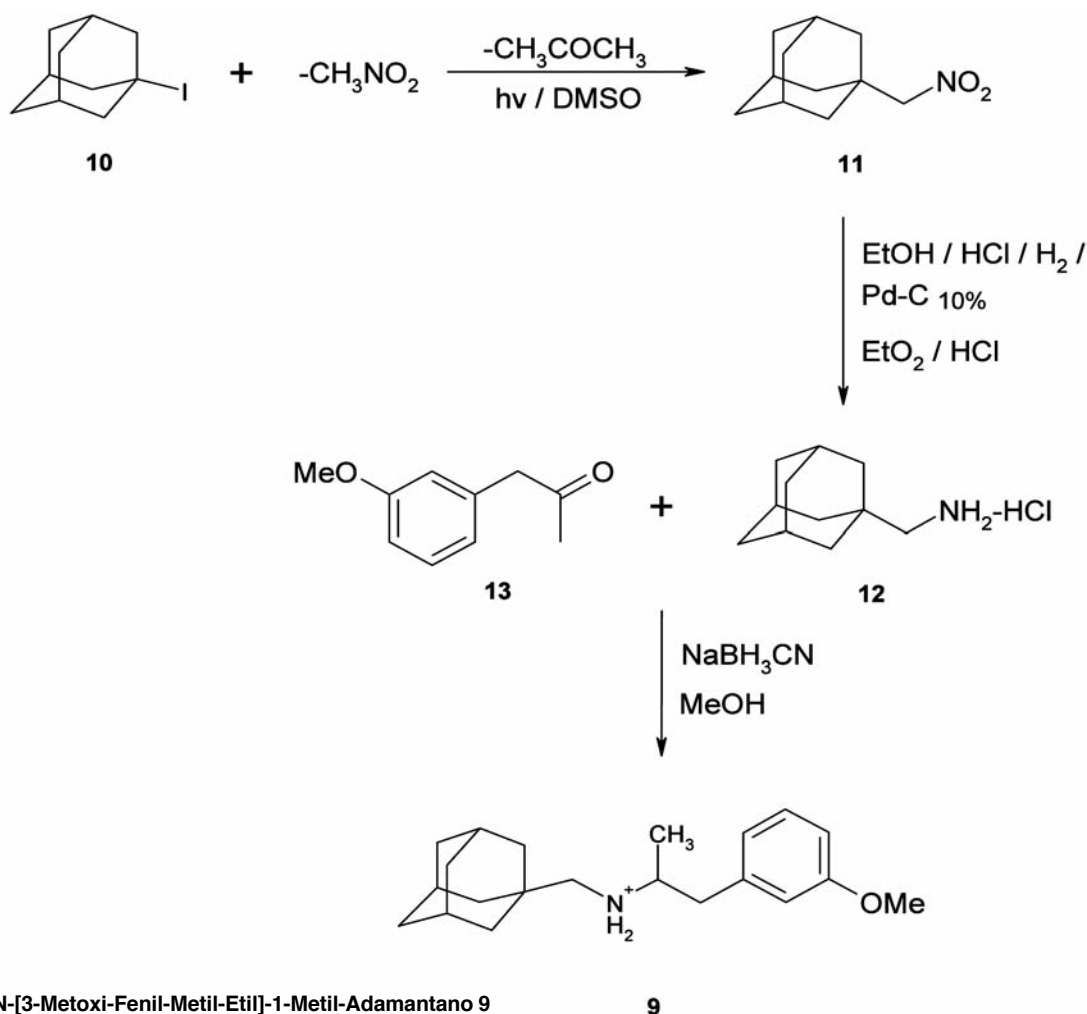
### SÍNTESIS DEL N-((3-METOXI-FENIL)-METIL-ETIL)-1-METIL-ADAMANTANO (9)

En un balón de una boca se adicionó 0,15 g (0,75 mmol) del compuesto **12** disuelto en 30 mL de metanol, 0,15 g de la 3-metoxifenilacetona (**13**) y se sometió a reflujo por cinco horas. Posteriormente se añadió 0,04 g (0,6 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación por 72 horas, finalizado el tiempo se trató con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se añadió 20 mL de agua y se extrajo con éter etílico. Se separaron las capas y la fase acuosa se llevó a pH 10 adicionando una solución de hidróxido de sodio al 30%, se extrajo con éter etílico y los extractos etéreos se combinaron y se lavaron con agua. Finalmente la capa etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. El aceite obtenido fue disuelto en éter y posteriormente fue tratado con una solución recién preparada de éter-HCl (1:1) dando un sólido blanco, se purificó a través de cromatografía de columna, usando sílicagel y una mezcla diclorometano-metanol 1:1 como eluyente (65%; pf: 242 °C) (Ángel y col., 2004). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm): 1.12 - 1.14 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.55 - 2.03 (m, 15H, CH y CH<sub>2</sub> Ad), 2.41 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Ad), 2.72 - 2.81 (d, d, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.78 - 4.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 6.75 (d, d, 1H, H-6, J= (1,5; 6)), 6.90 (d, d, 1H, H-2, J= (3; 3)), 6.99 (d, 1H, H-4, J= (1,8; 7,2)), 7.16 (d, d, 1H, H-5, J= (6; 9)). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm): 21.46 (CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 28.08 (-CH Ad), 36.21, 38.95 (-CH<sub>2</sub> Ad), 45.21 (-CH<sub>2</sub>-Ar), 50.81 (CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 54.17 (OCH<sub>3</sub>), 68.29 (-CH<sub>2</sub>-Ad), 111.07, 114.65, 121.32, 128.70, 140.23, 159.65 (carbonos aromáticos).

## Resultados y discusión

Para la síntesis del compuesto **9**, un análogo del N-aralquilamino-metiladamantano, lo más relevante y como herramienta principal dentro de su ruta sintética (Esquema 1) fue la reacción de sustitución nucleofílica radicalaria unimolecular (S<sub>RN</sub><sup>1</sup>) para la obtención del compuesto **11**. Esta reacción consta de un mecanismo en cadena (Esquema 2), formado por los radicales del halogenuro de arilo o alquilo y los aniones radicales. Estos radicales son formados por transferencia electrónica T.E (Ec1). Para que un compuesto sufra sustitución por T.E se pueden seguir varios métodos, como son: los electroquímicos, los térmicos a partir de un agente donador (generalmente es un nucleófilo cargado), o por fotoestimulación en presencia de un nucleófilo. En el caso de los procesos térmicos o fotoestimulados son favorecidos con nucleófilos donadores de electrones y sustratos aceptores de electrones. Después de la T.E ocurre un paso concertado disociativo capaz de proporcionar los radicales y el anión de un grupo saliente (Ec2). Otra posibilidad consiste en la formación del anión radical del sustrato. Este anión radical (RX<sup>-•</sup>) sufre una ruptura en el paso siguiente en R<sup>•</sup> y X<sup>-</sup> (Ec2). El radical (R<sup>•</sup>) reacciona con el Nu<sup>-</sup> para dar el intermediario RNu<sup>-•</sup> (Ec3). Finalmente, el proceso genera un compuesto producto de una reacción de sustitución nucleofílica (Ec4). También existen pasos de terminación y dependen del RX (sustrato) y del Nu<sup>-</sup> (nucleófilo) bajo condiciones experimentales (Rossi y col., 1990).

La evaluación farmacológica preliminar del compuesto **9**, administrado intracerebroventricularmente (ICV) (Figura 1) a la dosis de 10 mg/5ml en ratas machos, mostró que es capaz de inducir conductas estereotipadas como lamidas y olfateos, las cuales fueron significativamente mayores que la producida por la solución salina en el grupo control en ambos casos, y superior al de apomorfina en el caso de las lamidas; siendo ambas conductas estereotipadas inhibidas por el haloperidol. Estos hallazgos indican que el compuesto **9** es capaz de inducir conducta estereotipada a través de un mecanismo dopaminérgico central. Es interesante mencionar que la estereotipia es un componente importante de numerosos desórdenes psiquiátricos, incluyendo el autismo infantil o la esquizofrenia (Hutt y col., 1970; Jones y col., 1965). Está bien establecido que el comportamiento estereotipado en ratas incluye la conducta de oler y roer y que dependen de la acción de la dopamina (Costall y col., 1977). Se ha demostrado que el sustrato neural del comportamiento estereotipado inducido por la apomorfina en animales incluye las proyecciones dopaminérgicas centrales hacia



Esquema 2

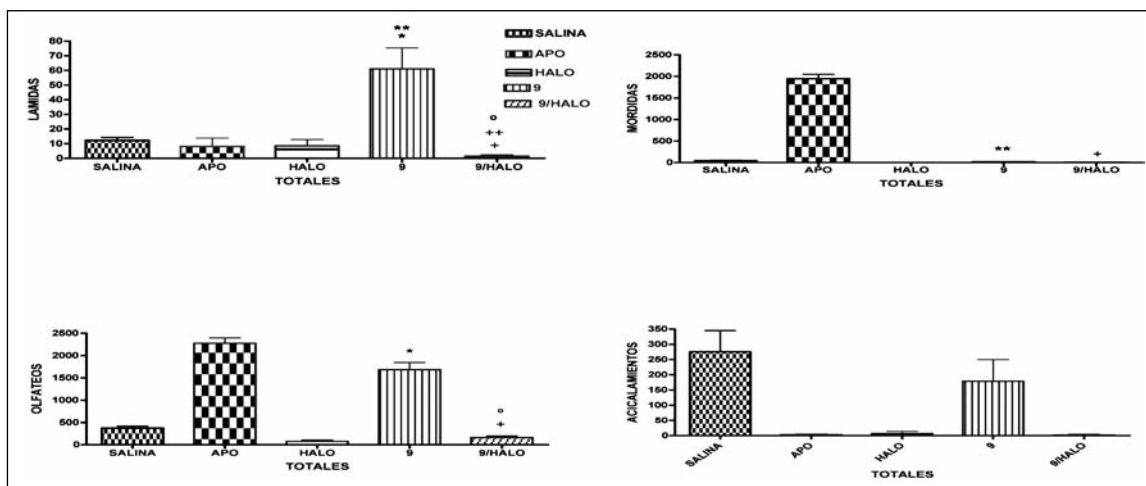
Síntesis del N-[3-Metoxi-Fenil-Metil-Etil]-1-Metil-Adamantano 9

la región del caudado-putamen (Greese y col., 1975). Ahora bien, nuestros hallazgos no nos permiten establecer el subtipo de receptor involucrado en la acción del compuesto **9**. Se sabe al respecto que la apomorfina es un agonista mixto de los receptores  $D_1/D_2$  dopaminérgicos (Costall y col., 1977; Greese y col., 1975; Roitman y col., 1997), y la activación de los receptores  $D_1/D_2$  a nivel del cuerpo estriado se expresa como la respuesta de un comportamiento excesivo y repetitivo (estereotipia). Aún más, se conoce que en ratas adultas y neonatas, lesionadas con 6-hidroxidopamina (6OH-DA), el comportamiento estereotipado es el producto de la activación de ambos subtipos de receptores. También se ha reportado al receptor  $D_1$  como responsable de la iniciación del comportamiento estereotipado, mientras que la participación del receptor  $D_2$  involucra el mantenimiento de dicha acción, pero no así el proceso de iniciación. Es por ello que la acción combinada de los antagonistas  $D_1/D_2$  bloquea la estereotipia de manera más efectiva que el bloqueo selectivo mediante un antagonista selectivo del receptor  $D_1$  (Chartoff y col., 2001). Al mismo tiempo, no se cono-

ce con certeza la función del receptor  $D_3$ ; sin embargo los agonistas  $D_3$  parecen tener una acción inhibitoria sobre los efectos de los agonistas  $D_2$  en relación a los efectos motores activantes. El receptor  $D_3$  está distribuido sobre el sistema límbico y se asocia con las funciones cognitivas, afectivas y emocionales. Esta distribución apunta al desarrollo de un gran número de ligandos selectivos con el propósito de combatir los desórdenes neurológicos y psiquiátricos ligados al sistema dopaminérgico. Por otro lado el receptor  $D_4$  está presente en todo el hipocampo y en la corteza frontal, con poca expresión en las áreas ricas del receptor  $D_2$ , incluyendo el núcleo estriado y el cerebro medio. La función del receptor  $D_4$  se asocia con el funcionamiento de la actividad motora, ya sea el inicio e inhibición del comportamiento como también con los mecanismos de memorización. Los estudios clínicos genéticos asocian a este receptor con el desorden de déficit de atención e hiperactividad (Zhang y col., 2006).

Una primera aproximación químico-medicinal de acuerdo con las actividades mostradas por el compuesto **9** indica que este compuesto es un híbrido

Figura 1  
Efecto del compuesto 9 (10 µg/µl) sobre la conducta estereotipada en ratas



**EFFECTO DEL COMPUESTO 9 (10 µg/5µl) SOBRE LA CONDUCTA ESTEREOTIPADA EN RATAS.** En las ordenadas, la sumatoria de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos evaluados. Las observaciones se realizaron durante un periodo de 1 hora. Los resultados se expresaron como promedio ± EEM de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante el análisis de variancia (ANOVA) de una y dos vías y la prueba de Newman Keul. \* $p < 0.01$ , sal vs 9; \*\* $p < 0.01$ , apomorfina (APO) vs 9; + $p < 0.01$  APO vs 9/HALO; ++ $p < 0.01$  haloperidol (HALO) vs 9/HALO; \* $p < 0.01$  9 vs 9/HALO

en el que se involucran el fragmento aralquil ampliamente estudiado por nosotros (Ángel y col., 2001, 2003 y 2004) y la molécula del aminometiladamantano. El fragmento aminometiladamantano no ha sido estudiado a nivel del SNC específicamente sobre el sistema dopaminérgico, pero sin embargo el núcleo adamantano ha mostrado una alta contribución en cuanto a los estudios de la relación estructura química-actividad biológica. Es bien conocido que la adamantadina (1-aminoadamantano) (**14**) ha mostrado actividades como antiviral (en la profilaxis del virus influenza), hipoglicemiante, antiarrítmico, antidepresivo, en algunos casos como agente antitumoral y es comúnmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los compuestos que actualmente están en estudio y poseen el fragmento del adamantano proporcionan la conformación de «jaula» dentro de los agentes medicinales cuyo enfoque es viable para el diseño de nuevos fármacos capaces de atravesar la membrana lipofílica de la célula o poseer fácil transporte a través de la barrera hematoencefálica, lo cual sería de gran importancia para el diseño de fármacos que actúen sobre el sistema nervioso central (Jasys y col., 2000).



14

En nuestro diseño nos preocupamos en explorar el fragmento aminometiladamantano asociado al

fragmento aralquil. El primer fragmento tendría rotación libre, proporcionada por el grupo metil ubicado entre la jaula y el grupo amino con el propósito de buscar selectividad hacia los receptores del sistema dopaminérgico central, mientras que, en el segundo, el fragmento aralquil posee dentro de su estructura el farmacóforo parcial feniletilamino del receptor dopaminérgico. Esto explica la actividad mostrada en el ensayo preliminar farmacológico y lo acertado en la aproximación químico-medicinal realizada en el diseño de la estructura estudiada, en donde se guardaron los requisitos básicos necesarios para obtener la actividad como agonista a través de la participación de los mecanismos dopaminérgicos centrales.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en la aproximación químico-medicinal realizada en el diseño de la estructura del fragmento aminometiladamantano asociado al fragmento aralquil, apoyados por la evaluación farmacológica preliminar sobre la conducta estereotipada, demuestran que el compuesto 9 se comporta como un agonista dopaminérgico central.

## Agradecimiento

Este trabajo fue subvencionado por el CONDES-LUZ a través del proyecto de investigación (CC-0681-04) y (CC-0158-06).

## Referencias Bibliográficas

- ÁNGEL GUÍO JE, CHARRIS JE, ISRAEL A, MIGLIORE DE ÁNGEL B, SUÁREZ-ROCA H, GARRIDO MR, LÓPEZ SE, DÍAZ E, FERRER R, MICHELENA DE BÁEZ E, RODRÍGUEZ LJ, SILVA J, MORONTA A, ESPINOZA G, QUINTERO L. 2004. Perfil dopaminérgico del compuesto 2-aminoindano-N-aralquil sustituido. *Arc Venezol Terap Farmacol* 23: 136-142.
- ÁNGEL GUÍO JE, RODRÍGUEZ LJ, MEDINA Y, SUÁREZ-ROCA H, MIGLIORE DE ÁNGEL B, ISRAEL A, CHARRIS JE, LÓPEZ SE, CALDERA JA. 2003. Conformational theoretical study of substituted and non-substituted N-aralkyl-2-aminoindans and its relation with dopaminergic activity. *Theochem* 636: 1-8.
- ÁNGEL GUÍO JE. 2001. Diseño, Síntesis, Estudio Teórico y Evaluación Farmacológica de Compuestos con Actividad Dopaminérgica. *Arch Venezol Farmacol Ter* 20: 86-90.
- AVENDAÑO-LÓPEZ MC. 2001. Introducción a la Química Farmacéutica. Segunda edición. Editorial Interamericana Mac Graw Hill. España, p. 383.
- AO ZHANG, NEUMEYER JL, ROSS J, BALDESSARINI. 2006. Chemical Reviews. Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders.
- CANNON JG, LONG JP, BHATNAGAR R. 1981. Future directions in dopaminergic nervous system and dopaminergic agonists. *Rev J Med Chem* 24: 1113-1118.
- CANNON JG, KIM JC, ALEEM M.A. 1972. Centrally acting emetics. 6. Derivatives of beta-naphthylamine and 2-indanamine. *J Med Chem* 15: 348-350.
- CANNON JG, PÉREZ JA, BHATNAGER RK, LONG J.P, SHARABI F.M. 1980. Conformationally restricted congeners of dopamine derived from 2-aminoindan. *J Med Chem* 25: 1442-1446.
- COSTALL B, NAYLOR RJ, CANNON JG, LEET. 1977. Differentiation of dopamine mechanisms mediating stereotyped behaviors and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *J Pharma Pharmacol* 29: 337-342.
- CHARTOFF EH, MARCK BT, MATSUMOTO AM, DORSA DM, PALMITER RD. 2001. Induction of stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D<sub>1</sub> receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18: 10451-10456.
- GREESE L, IVERSEN SD. 1975. The pharmacological and anatomical substrate of the amphetamine response in the brain. *Brain Res* 83: 419-436.
- GOODMAN Y GILMAN, CEDAR-BAUM, JM, SCHLEIFFER LS. 2003. Bases farmacológicas de la terapéutica. Décima edición. Editorial Médica Panamericana. México. I: 557.
- HAADSMAN-SVENSSON SR, CLEEK KA, DINH DM, DUNCAN JN, HEBERT CL, HUFF RM, LAJINESS ME, NICHOLS NF, SMITH MW, SVENSSON KA, ZAYA MJ, CARLSSON A, LIN CH. H. 2001. Dopamine D<sub>3</sub> Receptor Antagonists. 1. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 5,6-Dimethoxy-N-alkyl- and N-Alkylaryl-Substituted 2-Aminoindans. *J Med Chem* 44: 4716-4732.
- HASS HG, RILEY EF. 1943. The Nitroparaffins. *Chem Rev* 32: 373-430.
- HOOVER HASS HG. 1947. Synthesis of pargirine and related compounds. *J Org Chem* 12: 501-505.
- HUTT C, HUTT SJ. 1970. Stereotypies and their relation to arousal. A study of autistic children. In: Hutt, S.J.; Hutt, C. (Eds), *Behaviour Studies in Psychiatry*. Pergamon Oxford, pp. 175-200.
- JASYS VJ, LOMBARDO F, APPLETON TA, BORDNER J, ZILIOX M, VOLKMAN RA. 2000. Preparation of Fluoroadamantane Acids and Amines: Impact of Bridgehead Fluorine Substitution on the Solution- and Solid-State Properties of Functionalized Adamantanes. *J Am Chem Soc* 122: 466-473.
- JONES IH. 1965. Observations on Schizophrenia stereotypes. *Comp. Psychiat.* 6: 323-335.
- KNOEVENAGEL E. and WALTER LEONHARD. 1904. Condensation aliphatischer Nitrokörper mit Aromatischen Aldehyden durch organische Basen *Ber* 37: 4502-4510.
- MACH H, YUNSHENG H, LUEDTKE RR, FREEMAN R, WU L. 2001. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Naphthamides as Dopamine D<sub>3</sub> Receptor Ligands. *J Med Chem* 44: 1815-1826.
- RODMAN MJ. 1981. *Cómo y porqué de la Farmacoterapia*. Ediciones P.L.M. S.A. San Bernardino N17, México DF., p. 33.
- ROITMAN MF, SHAFER GE, THIELE TE, BERSTEIN IL. 1997. Dopamine and sodium appetite: antagonists suppress sham drinking of NaCl solutions in the rat. *Behav Neurosci* 111: 606-611.
- ROSSI RA, PIERINI AB, PALACIOS SM. 1990. Nucleophilic Substitution by the S<sub>RN</sub><sup>1</sup> Mechanism on Alkyl Halides. *Adv Free Rad Chem* 1: 193.
- VAN VLIET LA, NIENKE R, HAKAN W, PUGSLEY TA, SERPA KA, MELTZER LT, HEFFNER TG, LAWRENCE D, WISEMARY E, LAJINESS HUFF RM, SVENSSON K, GUIDO RM, M HAENEN, BAST A. 2000. Thiazoloindans and Thiazolobenzopyrans: A Novel Class of Orally Active Central Dopamine (Partial) Agonists. *J Med Chem* 43: 3549-3557.
- WIKSTROM H. 1992. Centrally acting dopamine D<sub>2</sub> receptor ligands: agonists. *Prog Med Chem Rev* 29: 185-216.
- ZHANG AO, JOHN NEUMAN y ROSS BALDESSARINI. 2007. Recent progress in development of dopamine receptors subtype selective agents: Potential therapeutics for neurological and Psychiatric disorders. *Chem Rev* 107: 274-302.

Recibido: 31 de julio de 2007  
Aceptado: 19 de septiembre de 2007

---

# ÍNDICE DE AUTORES

Vol. 70 - Nº 2 - 2007

---

## A

Ángel Guío, Jorge E.  
Ayala-Grosso, C.A.

## B

Bottari, Serge

## C

Cabrera, Elvia V.  
Charris, Jaime E.  
Compagnone, Reinaldo S.  
Crocker, S.F.  
Csibi, Alfredo

## D

Díaz, Beth

## G

Gómez Fernández, Marisol  
González Daza, Maritza

## H

Hernández, Verónica

## I

Israel, Anita

## L

Leslie, R.  
Levy, Patrick  
López, Simón

## M

Migliore de Ángel, Biagina  
Morales, Miguel

## R

Ramírez, María M.  
Robertson, G.S.  
Rossi, Roberto

## S

Santiago, Ana  
Serrano G., María Luisa  
Suárez, Alírica I.  
Suárez-Roca, Heberto

## U

Urrecheaga, Daniela

## V

Vera, Luís José

# ÍNDICE DE DESCRIPTORES

Vol. 70 - Nº 2 - 2007

Agonista Dopaminérgico Central . . . . .	43
Angiotensina II . . . . .	34
$\beta$ -Amiloide . . . . .	4
Biflavonoides . . . . .	28
Bioinformática . . . . .	13
Cefadroxilo . . . . .	21
Demencia senil . . . . .	4
Dopamina . . . . .	43
Enfermedad de Alzheimer . . . . .	4
ERK1/2 . . . . .	34
<i>Euphorbiaceae</i> . . . . .	28
Fosforilación . . . . .	34
Hipoxia intermitente crónica . . . . .	34
Inflamación . . . . .	4
Modelado molecular . . . . .	13
N-aralquilamino-metiladamantano . . . . .	43
Neurodegeneración . . . . .	4
Nitración . . . . .	34
<i>Podocalyx loranthoides</i> . . . . .	28
Receptor nuclear de proliferación de peroxisomas activados . . . . .	4
Suero Humano . . . . .	21
Sustitución nucleofílica radicalaria unimolecular ( $S_{RN}1$ ) . . . . .	43
Triterpenoides . . . . .	28

# Normas de Publicación

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, ensayo, 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 Revisión o Cartas al Editor. 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* (2003). 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 en original y dos copias impresas dentro de un sobre de papel grueso, incluyendo copias fotográficas y figuras entre cartones para evitar que se doblen, con una versión en diskette o CD-ROM. Los manuscritos deberán ser enviados al Editor-Director, a la Dirección de la Revista, en el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos, Apartado Postal 40109, Nueva Granada, Caracas, Venezuela.

Los manuscritos deben estar escritos a doble espacio, en papel Bond blanco tamaño carta, por una cara,

sin borrones ni tachaduras y con márgenes de 2,5 cm. 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 20 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:

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los) autor(es) y su filiación institucional.
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos.
- e. Referencias bibliográficas.
- f. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título y llamadas al pie de la tabla.
- g. Figuras: cada una en página aparte con su título.
- h. Leyenda de las figuras.

La página del título deberá contener:

1. 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 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 someramente 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: 3-10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que pueda publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático (Medical Subject Heading (Mesh)) del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados y discusión. La **introducción** debe aparecer después del resumen,

debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los **materiales y métodos** deben contener una descripción breve y clara que permita la comprensión y 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.

4. Las **referencias bibliográficas**: Las mencionadas en el texto deben citarse escribiendo entre paréntesis el apellido y año. Ejemplo: (Ávila, 1983); (Brenes y Rodríguez, 1961); (Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias Bibliográficas» y su ordenamiento será según el orden alfabético manteniendo la estructura siguiente: Autor(es): Apellido(os), inicial del nombre, año, título del artículo, Revista (abreviatura aceptada), Vol. Número, páginas (en el caso de artículos científicos). No se aceptarán trabajos que no se ajusten a las normas presentes.

#### **Ejemplos:**

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 *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 769-774.

En el caso de que se trate de referencias de libros debe contener:

Nombre(es) de autor(es), capítulo del libro, En: título de libro, número de la edición (excepto si es la primera),

editorial, lugar de la edición, año de publicación y páginas.

#### **Ejemplo:**

Decampo R, Moreno SNJ. Free radicals intermediates in the antiparasitic action of drugs and fugacitic cells. En: *Free radicals in Biology*. Eds: WA-Pryors Academic Press, 1984. p. 243-288.

5. **Tablas**: Las tablas deben presentarse en hojas separadas, a doble espacio, 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 y error estándar de la media; cite cada tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

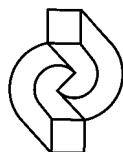
6. **Figuras**: Las figuras deben ser de buena calidad, en papel con fondo blanco. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de tratarse de fotos en colores, los gastos de su impresión correrán a cargo del autor del trabajo.

Todas las figuras deben ser identificadas en el reverso de la hoja, indicando número de la figura, apellidos y nombres de los autores (Ejemplo: Fig. 1; Fig. 2; etc).

En caso de fotografía de personas, evite que el sujeto sea identificable o acompañe la autorización escrita de la misma.

Las leyendas de las figuras deberán presentarse a doble espacio en página aparte y usar el número que corresponde a cada figura. 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.

**Fórmulas y ecuaciones**: Éstas deben presentarse claramente para su reproducción.



**CDCH-UCV**  
**1958 - 2008**

**50** AÑOS

fomentando, financiando  
y promocionando  
la investigación, la formación  
de recursos humanos  
y la difusión  
del quehacer científico

## **PUBLICACIONES 2007**

Altez, Yara

**LA PARTICIPACIÓN POPULAR Y LA REPRODUCCIÓN DE LA DESIGUALDAD**  
(2ª. Edición)

Arenas, Nelly y Luis Gómez Calcaño

**POPULISMO AUTORITARIO: TRANSICIÓN POLÍTICA EN VENEZUELA 1999-2005**  
Coedición con el CENDES

Blanco, Carlos Eduardo

**EN RESUMEN: DISCURSO Y CONOCIMIENTO EN LA INVESTIGACIÓN EDUCATIVA**  
Coedición con el Vicerrectorado Académico

Calvo Albizu, Azier

**VENEZUELA Y EL PROBLEMA DE SU IDENTIDAD ARQUITECTÓNICA**  
Coedición con la Facultad de Arquitectura y Urbanismo

Cerrolaza, Miguel

**EL MÉTODO DE LOS ELEMENTOS FINITOS PARA INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS**

Espinoza, Martha

**LA ANATOMÍA ORIENTADA EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO  
DE LAS COMPLICACIONES LOCALES EN CIRUGÍA BUCAL**

Pacheco, José Germán

**AGRICULTURA, MODERNIZACIÓN Y CIENCIAS AGRÍCOLAS EN VENEZUELA.  
DE LA ILUSTRACIÓN BORBÓNICA A LOS ILUSTRADOS DEL GOMECISMO 1770-1935**

Paz Yanastasio, Francisco

**LAS ECONOMÍAS DE OPCIÓN COMO INSTRUMENTOS DE CONTROL DE RIESGO FISCAL**

Nuestras publicaciones pueden ser adquiridas en el Departamento de Relaciones y Publicaciones

del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico,  
ubicado en la Av. Principal de La Floresta, Quinta Silenia, La Floresta, Caracas.

Teléfonos: 286.8648 (Directo) 284.7077 – 286.7666

Fax: Ext. 244

E-mail: [publicac@movistar.net.ve](mailto:publicac@movistar.net.ve)

Igualmente, están a la venta en la librería de la Biblioteca Central, PB. Ciudad Universitaria, UCV.

Toda la información inherente al Programa de Publicaciones puede ser consultada en: [www.cdch-ucv.org.ve](http://www.cdch-ucv.org.ve)



**REVISTA FACULTAD DE FARMACIA N° 70-2**

Se imprimió en los talleres tipográficos de Miguel Ángel García e Hijo, s.r.l.  
en la Ciudad de Caracas  
Sur 15 • N° 107 - El Conde • Teléfono: 576.13.62

Tiraje: 500 ejemplares