

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

Vol. 71 - Nº 2 - 2008 - ISSN: 0041-8307

Depósito legal: 195902 DF 224  
Caracas/Venezuela

Indexada en LILACS y Latindex

**Universidad Central de Venezuela**

**Rectora**

*Dra. Cecilia García-Arocha*

**Vicerrector Académico**

*Dr. Nicolás Bianco*

**Vicerrector Administrativo**

*Dr. Bernardo Méndez*

**Secretario**

*Dr. Amalio Belmonte*

**Facultad de Farmacia**

**Decana**

*Dra. Margarita Salazar Bookaman*

**Director**

*Dr. David De Souza*

**Coordinadora Académica**

*Dra. Mariella Rincón*

**Directora del Instituto de Investigaciones**

*Dra. Alírica Suárez*

**Directora de Postgrado**

*Dra. Miriam Regnault*

**Coordinadora de Extensión**

*Dra. Suria Elnezer*

**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. Isabel Andueza*

*Dr. David De Souza*

*Dra. Miriam Regnault*

*Dra. Anna Alfieri*

*Dra. María Stella Medina*

**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

**Dirección**

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109

Caracas 1040-A - Venezuela

**Contenido**

EVOLUCIÓN DE LA ENSEÑANZA DE LA TOXICOLOGÍA 2  
EN LOS ESTUDIOS DE FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
**BEATRIZ HELENA GUEVARA, MARY ISABEL AMARO  
y GLADYS ROMERO DE GALÍ**

PROPIEDADES DE FLUJO 11  
DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSA  
EN FORMULACIONES OPTÁLMICAS  
**ISABEL C ANDUEZA, GISELA S ÁVILA, DORIS ATTÍAS**

REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDROMINERAL 19  
POR EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL:  
PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO  
**MAIDER VARELA, JORGE ARZOLA, S DE JESÚS Y ANITA ISRAEL**

EFFECTO DE LA CEDRELA ODORATA SOBRE INDICADORES 27  
DE ESTABILIDAD FÍSICA EN DISPERSIONES  
DE LIPOESFERAS  
**MÓNICA J BUONANNO R, GISELA ÁVILA DE A, DORIS ATTÍAS DE G**

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y COMPUESTOS 33  
QUÍMICOS AISLADOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO  
DE LAS HOJAS DE *SYNEDRELLA NODIFLORA* (L.) GAERTN  
**NERY PÉREZ, BALBINA NOGUERA, MARIELLA PASTOLLERO,  
GERARDO HAIK, ANITA ISRAEL Y JOSÉ D MEDINA**

POSIBLE NITRACIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL 40  
DURANTE LA HIPOXIA/RE-OXIGENACIÓN  
**DANIELA URRECHEAGA SILVA**

ÍNDICE DE DESCRIPTORES 56

ÍNDICE DE AUTORES 57

NORMAS DE PUBLICACIÓN 58

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

# Evolución de la enseñanza de la toxicología en los estudios de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela

## Evolution of toxicology teaching in Pharmacy studies at the Central University of Venezuela

BEATRIZ HELENA GUEVARA<sup>1,2</sup>, MARY ISABEL AMARO<sup>1,3</sup> Y GLADYS ROMERO DE GALÍ<sup>1</sup>

### Resumen

La enseñanza de la Toxicología en los estudios de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, desde su creación en 1894, ha experimentado cambios sustanciales, modernizado conceptos y contenidos relacionados a estudios de toxicidad «*in vitro* e *in vivo*», carcinogénesis química, toxicología industrial, ambiental, alimenticia, evaluación de riesgos, neurotoxicología, inmunotoxicología, toxicogenética y toxicología molecular, abriendo nuevos campos en áreas de investigación en nuestra Facultad. Actualmente, la Toxicología continúa formando parte del pensum como asignatura obligatoria de los estudios de Farmacia. Además, se forman recursos humanos de cuarto nivel, como Especialistas o Magíster Scientiarum desde hace 22 y 6 años, respectivamente.

**Palabras clave:** Toxicología, enseñanza, especialización y maestría.

### Abstract

Since 1894, the education in toxicology has experienced changes in the School of Pharmacy, Central University of Venezuela. They are related to studies of toxicity «*in vitro* e *in vivo*», chemical carcinogenesis, environmental, food, industrial toxicology, risk evaluation, neurotoxicology, immunotoxicology, toxicogenetic and frontiers in Molecular Toxicology which made possible new fields in research. Nowadays, Toxicology forms a part of the pensum as obligatory subject of career of Pharmacy and Postgraduate school. In addition, new human resources in Toxicology are formed at the level of Specialist or Magister Scientiarum, since 22 and 6 years ago, respectively.

**Key words:** Toxicology, education, Specialist, Magister Scientiarum.

### Introducción

La historia de la Toxicología es tan antigua como la humanidad misma, y en la búsqueda de datos antiguos encontramos, en el Papiro de Ebers (1500 a.C.), citas que se pueden relacionar con tóxicos de origen natural; y aún referencias más antiguas se hacen en papiros egipcios que datan de 1700 a.C., se advierte el uso de *Cannabis indicus* y de *Papaver somniferum*, y aun se hace referencia a intoxicaciones por el elemento plomo. En la medicina hindú sobresale Veda (900 a.C.); en la griega Hipócrates

(400 a.C.); quienes ya mencionaron varios venenos en sus escritos y Theophrastus (370-286 a.C.) estudia los venenos vegetales.

La historia de la humanidad contempla casos como los de Sócrates, que utiliza sus conocimientos sobre la cicuta, y el de Cleopatra, que se vale de una serpiente cobra para poner fin a sus vidas en forma menos tormentosa.

En la Edad Media se abre el primer centro de que se tenga conocimiento para atender exclusivamente

Postgrado de Toxicología<sup>1</sup>. Unidad de Neurofarmacología y Farmacología Clínica<sup>2</sup> y Unidad de Química Medicinal<sup>3</sup>. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas. [guevara.beatriz@gmail.com](mailto:guevara.beatriz@gmail.com)

a pacientes intoxicados, por la célebre epidemia de ergotismo que se presenta al sur de Francia y estará a cargo de la orden religiosa de los hermanos Antonisti. Además, en esta época la historia del veneno constituye en cierta forma la savia de la vida política y cortesana durante largas etapas. La «pócima» fue factor determinante en la elección y deceso de algunos gobernantes. Aparecen nombres de mujeres tan famosas como madame Toffana, Lucrecia Borgia, Catalina de Médicis, y otras, quienes han pasado a la historia de la Toxicología por su profesión de envenenadoras (Delgado García, 1991; Repetto, 2004; Suárez Escandón, 2007).

En 1493 nace Felipe Aureolo Teofrasto Bombast de Hohenheim, posteriormente llamado Paracelso, médico alemán profesor de la Universidad de Basilea importante estudioso de la Toxicología y quien expresó la famosa sentencia: «Todo es veneno y nada es veneno; la dosis sola hace el veneno», lo cual es incontrovertible aún en el siglo XXI (Suárez Escandón, 2007).

En el siglo XVIII con la revolución científica, y en el siglo XIX con la revolución industrial aparece Mateo Emanuel Orfila (1787-1853), médico español quien inicia profundos estudios sobre los métodos de la identificación y dosificación de los principales tóxicos de la época. Fundador del Museo de Anatomía de París, escribió su *Tratado de los venenos de los reinos Mineral, Vegetal y Animal o Toxicología General considerada sobre los fundamentos de la Fisiología, la Patología y la Medicina Legal*, por lo cual se le reconoce como el padre de la Toxicología.

Bernardo Rammazzini inicia el estudio de la patología que en el ejercicio profesional puede causarse, por lo que puede considerársele el padre de la Medicina del Trabajo, dibujando con admirable precisión descripciones clínicas y patológicas aún vigentes hoy. De él se conoce su frase famosa y necesaria, que cita en sus capítulos de intoxicación por plomo: «Cuando llegues a la cabecera de tu paciente, pregúntale en qué trabaja, para ver si en la búsqueda de su sustento no radica la causa de su mal» (Suárez Escandón, 2007).

La Toxicología se ha desarrollado rápidamente en los últimos cien años, pero su crecimiento exponencial data de la era de la posguerra (después de la II Guerra Mundial) cuando se dispara la producción de moléculas orgánicas tales como drogas, pesticidas y sustancias químicas de uso industrial. Hacia 1955: el toxicólogo estadounidense Arnold Lehman escribió otro adagio que haría historia en la toxicología «Usted también puede ser un toxicólogo en dos sencillas lecciones, cada una de 10 años».

Lehman y colaboradores formalizaron el programa experimental de evaluación de seguridad de alimentos, drogas y cosméticos de los Estados Unidos en 1955. Este programa se mantuvo vigente hasta 1982 cuando fue actualizado por la Oficina de Administración de Drogas Alimentos de ese país (Food and Drug Administration, FDA). La primera revista científica sobre toxicología (*Toxicology and Applied Pharmacology*) fue creada por Coulston, Lehman y Hayes en los Estados Unidos de América.

En América Latina hay que destacar a Emilio Astolfi (1930-1995), médico argentino considerado padre de la Toxicología en nuestro continente. Se formó en la escuela francesa y fue el pionero, fundador y formador de la primera Cátedra de Toxicología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Argentina), donde se ofrecen cursos a nivel de pregrado y postgrado de especialización y maestrías desde hace muchos años. Fue maestro, consejero y formador del ilustre profesor de Toxicología Darío Córdoba, de la Universidad de Antioquia (Colombia).

Waldemar Almeida, médico brasileiro pionero de la Toxicología en Brasil, fallecido en 1996, hizo grandes aportes en el campo de la investigación y creó la Cátedra de Toxicología y el Centro de Estudios Toxicológicos en el Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro (Suárez Escandón, 2007).

El paso del tiempo y el propio desarrollo de la humanidad trajeron aparejada la necesidad de incluir en la docencia la ciencia de la Toxicología, pues se debía entrenar a los médicos en el conocimiento de estos eventos para poder dar respuesta a los fenómenos y enfermedades que otras ciencias no podían. En general, la enseñanza de la Toxicología era un apéndice de otras disciplinas, normalmente de Medicina Legal o de Farmacia, y se impartió siempre en estas facultades y con muy breve espacio en los estudios de Medicina (González Pérez y Sainz de la Peña, 1982).

La Revolución científico-técnica ha provocado un incremento significativo en el uso de sustancias químicas, estimándose que unas noventa mil son comercializadas en la actualidad. A pesar de los indudables beneficios que reportan al hombre, cada vez existe una mayor preocupación acerca de sus efectos perjudiciales sobre la salud humana y el medio ambiente, lo cual resalta la trascendencia de los aspectos toxicológicos (González Pérez y Sainz de la Peña, 1982; Pratt, 1991). Los avances alcanzados en estos últimos tiempos, sobre todo por la utilización de las más modernas técnicas analíticas y los problemas originados en Salud Pública por numerosos

agentes químicos como consecuencia del desarrollo industrial y tecnológico, han permitido que la Toxicología adquiriera un contenido y fin propio, específico y diferente a otras disciplinas médicas, al que no se le puede negar el carácter de ciencia individual, constituyendo ya una auténtica especialidad (Hernández Jerez A., 2002).

### **La enseñanza de la Toxicología en diferentes países del mundo**

En 1834 se creó, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de París, una Cátedra de Toxicología, considerada la primera en el mundo, en 1894 la Facultad de Farmacia de Buenos Aires contó con la primera Cátedra Independiente de Toxicología y en 1901 la Escuela de Farmacia de Sao Paulo, Brasil, fue la primera en incluir la docencia de Toxicología en su programa, la formación en Toxicología durante el siglo XX, no estuvo exenta de dificultades, como se puso de manifiesto en la reunión de la Federación Mundial de Asociaciones de Centros de Toxicología Clínica y de Centros Antitóxicos que se celebró en la sede de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, los días 18 y 19 de mayo de 1982 (*La enseñanza de la Toxicología del siglo XXI*, 2001).

En general, la docencia en Toxicología, es un apéndice de otras disciplinas, normalmente de Medicina Legal y de Farmacia, situación esta que ha sido abordada por diferentes autores. El profesor español Manuel Repetto ha insistido desde 1983, en que los programas de pregrado de todas las carreras científicas o experimentales, y también en las carreras técnicas en las que se manejen o estudien sustancias químicas y sus efectos (Biología, Bioquímica, Medicina, Farmacia etc.), deben incluir como mínimo un curso de iniciación a la Toxicología, que no debe consistir en el estudio de compuestos tóxicos ni en el aprendizaje de métodos analíticos, sino proporcionar una base de conocimientos de la Toxicología General, primariamente útiles, con fines preventivos y posteriormente aplicables a cualquier fenómeno, en el cual el factor tóxico esté involucrado a corto o a largo plazo (Repetto, 2001; Texeira López, 2001). En 1975 en la Universidad de Salamanca y en 1977 en las de Sevilla y Barcelona, España, se desglosó una asignatura con el nombre de Ampliación de Toxicología, que permitió un abordaje más general de la materia. En 1984 un real decreto estableció un catálogo de las Áreas de conocimientos a impartir en las universidades españolas y en él aparecía Toxicología y Legislación Sanitaria, que por resolución de fecha 28 de noviembre de 1996 pasa a denominarse, por fin, y gracias a los incesantes des-

velos de la Asociación Española de Toxicología, «Área de Toxicología», sin más apéndices, lo que permitiría una mejor implantación de esta materia en las distintas especialidades. Así, los nuevos planes de estudio en este país contemplan lo siguiente: en la Especialidad de Farmacia, una asignatura de Toxicología General de 6 créditos, obligatoria para todos los alumnos de pregrado, que incluye 40 horas de teoría y 20 de práctica; en la Facultad de Medicina, junto a Medicina Legal se incluye Toxicología Forense y Docencia en Toxicología General y Clínica. Se ofrece como asignatura optativa en Pregrado y en los programas de Postgrado, cursos sobre Drogadicción, Toxicología de los Medicamentos, Toxicología de Plaguicidas, Evaluación de Riesgo, Ecotoxicología y otras (*La enseñanza de la Toxicología del siglo XXI*, 2001). El American Board of Toxicology, organización independiente que radica en Washington, tiene un sistema de exámenes y certificados para acreditar suficientes conocimientos en Toxicología: En Europa, durante los años 90, las asociaciones de toxicología han establecido los registros de toxicólogos mediante exámenes o cursos, que son publicados en listas, a su vez recogidas por la Asociación Internacional EUROTOX; el proyecto actual es la reunificación en una relación mundial de las distintas naciones y continentes. Después de varios años de preparación, en el año 2001 ha comenzado a funcionar el Registro Español de Toxicólogos, que ya ha publicado sus listas incluidas en EUROTOX (*La enseñanza de la Toxicología del siglo XXI*, 2001). En la Universidad de Concepción, Chile, se imparte Toxicología en las licenciaturas de Farmacia y Medicina, existiendo maestrías en Toxicología Alimentaria y Ecotoxicología para graduados en Ciencias Farmacéuticas; en Montevideo, Uruguay, existe una amplia experiencia ya que está presente como entidad propia a nivel de pregrado en la Licenciatura de Medicina desde 1980 y como curso de postgrado de tres años de duración. En Rosario, Colombia, además de Toxicología General en la Licenciatura de Medicina, existe un curso de Especialización en Toxicología Clínica y dos cursos de especialización en Neurotoxicología y de Urgencias Toxicológicas; recientemente se ha ofrecido una revisión muy interesante sobre la evolución, situación y perspectivas de la enseñanza de la Toxicología en Europa, Latinoamérica, Japón y Estados Unidos, donde se puede señalar que por Europa han colaborado toxicólogos de Alemania, Holanda, Italia, Portugal y Reino Unido (Suárez Escandón, 2007).

En Alemania, la Toxicología es una disciplina establecida en los 23 estudios de Medicina, Farmacia y Veterinaria, donde los estudiantes de Química

tienen un curso de Toxicología y los de Biología deben superar materias de Toxicología y de Ecotoxicología; en Holanda existe formación de Toxicología Clínica pero no de Forense; en Italia, la enseñanza de esta especialidad está integrada en los programas de Farmacología, estando presente en las licenciaturas de Farmacia, Medicina, Veterinaria, así como materia opcional en Ciencias Biológicas; en Portugal se ha producido un gran desarrollo de la Toxicología, que refleja la función importante y creciente que tiene la misma en la sociedad, contabilizándose 16 disciplinas de Toxicología integradas en formación universitaria y Pre grado y destacándose entre ellas la existencia de una rotación por Toxicología Ambiental de carácter obligatorio en la Licenciatura de Biología, existen 11 cursos para Master en postgrado con formación en Toxicología, reconociéndose la escasez de Doctorados en esta especialidad; los estudios de pregrado en el Reino Unido, Inglaterra, conducen a un bachillerato en Toxicología y en Farmacología; a nivel de postgrado se ofertan cursos de Master de uno o dos años en Toxicología, Toxicología Experimental, Toxicología Molecular, Genética, Forense, Toxicología Ocupacional etcétera, y en muchos hospitales se imparten cursos de Toxicología Clínica (Repetto, 2001; Texeira López, 2001).

### **La enseñanza de la Toxicología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela**

La Toxicología, en la actualidad, está alcanzando una gran trascendencia social debido al gran número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental, lo cual ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos (Toxicología reguladora). Por otro lado, está dirigiendo también su atención hacia los efectos crónicos por exposición a bajas concentraciones de sustancias químicas, donde la evaluación de los riesgos tóxicos tiene especial relevancia en términos de monitorización biológica y epidemiología molecular (Toxicología preventiva). En tercer lugar, la Toxicología se ha beneficiado en gran medida de los avances en Biología molecular y celular, lo que le ha permitido profundizar más en los mecanismos de acción tóxica y relacionarse estrechamente con la patogenia de enfermedades tumorales y neurodegenerativas (Toxicología mecanicista). Por ello adquiere gran relevancia la enseñanza de esta ciencia tanto a nivel de pregrado como de postgrado en la carrera de Farmacia.

En Venezuela, el primer decreto relacionado a la enseñanza de la Toxicología se produce el 24 de

septiembre de 1883 y se refiere a la obligatoriedad de enseñar Toxicología en las facultades de Medicina. Posterior a la creación de las facultades de Farmacia en la Universidad Central de Venezuela (UCV) y la Universidad de los Andes (ULA), en mayo de 1894, gracias al apoyo brindado a través de la Ley para los Estudios de Farmacia, la Toxicología Forense forma parte del pensum de la carrera de Farmacia, hasta el presente.

En el siglo XIX se producen diferentes acontecimientos y se destacaron personalidades dedicadas a la Toxicología, que marcaron el desarrollo incipiente de la misma en Venezuela; las noticias extranjeras publicadas contribuyeron al enriquecimiento científico de los estudiosos de la época. La especialidad se nutre entonces de los adelantos en la Química, Bioquímica, Fisiología e Higiene.

Con el transcurrir del tiempo, los cambios en la enseñanza de la Toxicología en la Facultad de Farmacia de la UCV corren paralelos con el desarrollo del país y las nuevas tecnologías. Así, en abril de 1904 las autoridades de la UCV y la ULA decretan el pase de las facultades de Farmacia a Escuelas, quedando en este período la Toxicología incluida dentro del eje curricular como asignatura obligatoria del tercer año de la carrera de Farmacia. Para 1912 se establece la obligatoriedad de realizar trabajos de laboratorio en toxicología durante seis meses.

En junio de 1915 se establece en la Ley de Instrucción Superior, que las escuelas de Farmacia formen parte de las escuelas que integran las Ciencias Médicas, se mantiene la Toxicología y los trabajos de laboratorio en el pensum y se establece un período de cuatro años para el estudio de la carrera de Farmacia.

En julio de 1940, bajo el gobierno del General López Contreras, se promulga la Ley de Educación y se produce un enorme progreso en los estudios farmacéuticos, que incluyen la ampliación de la enseñanza de la Toxicología desde el punto de vista experimental, con el subsiguiente cambio del nombre de la asignatura obligatoria: *Toxicología y Experticias Toxicológicas*. Esta disposición se ratifica en 1941 con motivo de la reinstalación de las facultades de farmacia y sirve de base para que oficialmente en 1946 se seleccione a la Facultad de Farmacia de la UCV, para encargarse de realizar las experticias toxicológicas legales hasta enero de 1951, fecha a partir de la cual el Cuerpo Técnico de Policía Judicial asume estas funciones.

En el año 1953, la Ley de Universidades incluye entre las facultades universitarias a la Facultad de Farmacia, en lugar de Facultad de Farmacia y Química.

En el Reglamento de la Facultad de Farmacia creado el año 1960 se establece que el pensum de estudio se distribuye en cinco años, confiriéndose el título de Farmacéutico, el de Profesional y el de Doctor en Farmacia, mediante el cumplimiento de los requisitos señalados en dicho Reglamento. Igualmente se establece la creación de las menciones, de las cuales una debe seleccionarse para cursarla como obligatoria. Entre ellas se incluye a la de Toxicología e Higiene Industrial, cuyo funcionamiento se inicia en octubre de 1961. La Higiene Industrial en la Salud Ocupacional y la Salud Pública permite el ejercicio de un nuevo campo al Farmacéutico, quien debe desempeñar un papel de primera línea en la estructuración y ejecución de programas destinados a la prevención de problemas toxicológicos. La Mención incluye asignaturas como la Toxicología Industrial e Higiene Industrial, dictadas por las Cátedras de Higiene Industrial y Toxicología Industrial en el noveno y décimo semestres de la carrera de Farmacia. Todas estas innovaciones permitieron la evolución de la Toxicología en Venezuela.

En el año 1969 se adopta un plan de estudios por semestre, con un total de diez semestres. Es un pensum orientado a preparar a los estudiantes que ejercen en la Facultad de una manera integral. En ese mismo año, los miembros de la Cátedra de Toxicología Industrial desarrollan los métodos para ensayos biológicos de pre-toxicidad a fin de evaluar la inocuidad de productos y materiales de uso humano. Para el año 1979 se crea la Cátedra de Ensayos Biológicos de Cosméticos, y se desarrolla un programa basado en ensayos biológicos aplicables al control de inocuidad de los productos cosméticos. Este programa se ajusta al literal «b» del artículo 80 de las Normas Sanitarias para la Elaboración, Importación, Exportación, Almacenamiento y Expendio de Productos Cosméticos, cuyo cumplimiento es obligatorio para el registro y la autorización de los productos cosméticos.

Nuevos cambios ocurren en el año 2003, el farmacéutico debe formar parte de los programas sociales de prevención y tratamiento de toxicomanías producidas por la adicción a drogas lícitas e ilícitas, y tal motivación logra la creación de la asignatura electiva Sociedad y Drogas. Esta asignatura se crea como parte del convenio UCV-CONACUID, adscrita al Proyecto Programas de Extensión Universitaria. Adicionalmente se incluye en el pensum de la Mención una pasantía de 240 horas, diseñada como un complemento para las asignaturas teóricas y de laboratorio. Se define realizar esta pasantía en laboratorios de toxicología orientados al sector industrial. Es así como la Mención queda conformada por seis materias bási-

cas: 1) Higiene Industrial y 2) Laboratorio de Higiene Industrial, cursadas durante el noveno semestre de la carrera; y la 1) Toxicología Industrial, 2) Laboratorio de Toxicología industrial; 3) Ensayos Biológicos de Cosméticos, 4) Sociedad y Drogas y 5) Pasantías en la Industria, durante el último semestre de la carrera de Farmacia. Estas asignaturas proveen al profesional farmacéutico herramientas útiles para evaluar los riesgos que provocan agentes químicos, físicos, biológicos y ergonómicos que se presentan en fuentes específicas del área de trabajo y conocimientos generales sobre contaminación ambiental con agentes químicos, que pueden incidir en la salud de la población de los diferentes ecosistemas.

Es importante señalar que las asignaturas dictadas en la Mención de Toxicología e Higiene Industrial se apoyan en una base legal, nacional e internacional. Entre las leyes nacionales tenemos la Ley del Trabajo, que define al trabajador y al patrono y establece las responsabilidades que ellos contraen; la Ley Orgánica de Prevención, Condiciones y Medio Ambiente del Trabajo con el correspondiente reglamento, la cual establece las condiciones idóneas del sitio de trabajo para evitar daños a la salud del trabajador; la Ley Orgánica del Ambiente; el Reglamento de las Condiciones de Higiene y Seguridad en el Trabajo y las Normas COVENIN. Con respecto a las normas y lineamientos internacionales, la mención de Toxicología e Higiene Industrial adopta aquellas normativas establecidas en los Estados Unidos por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), por el Departamento de Trabajo de Administración de la Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), y por la Conferencia Americana de Higienistas Industrial Gubernamentales (ACGIH).

### **Docentes destacados en la enseñanza de la Toxicología en los estudios de Farmacia en la Universidad Central de Venezuela**

Fueron diversos los docentes que contribuyeron a la enseñanza de la Toxicología en la Facultad de Farmacia de la UCV. Una descripción cronológica destaca en primer lugar al **Dr. Julio Velasco Castro** quien ingresa a la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la UCV en 1925, desarrollando la docencia hasta su jubilación en 1948. El Dr. Velasco realizó una Especialización en Toxicología en Estrasburgo en 1926. Fue designado Profesor Honorario de la Facultad de Farmacia y Decano durante el período comprendido entre los años 1953 a 1959.

El **Dr. Alfredo Sandoval G.**, de profesión farmacéutico, pionero en la Toxicología venezolana y gre-

mialista, quien entre los años 1944 y 1962, imparte sus conocimientos en el área con gran capacidad didáctica y pedagógica. Participa en la creación de la Mención Toxicología e Higiene Industrial. En enero de 1961 es designado miembro de la Comisión que elabora por primera vez el Régimen de Estudios para la Especialización en Toxicología, junto con el Dr. Julio Velasco C. y el Dr. Solón Suárez. Por primera vez, la Facultad de Farmacia en el período lectivo 1961-1962, realiza este curso de Especialización, con la posibilidad de hacerlo extensivo a nivel de postgrado, en forma exclusiva para farmacéuticos que hayan terminado sus estudios de 4 años. Esta posibilidad no se concreta para la época.

El **Dr. Fernando Asuaje** ingresa a la Cátedra de Toxicología Forense en febrero de 1958, una vez que finaliza su Especialización en Farmacología y Toxicología en 1957 y en el área de Toxicología Sanitario-Industrial en Francia en el año 1958. Su aporte es relevante, ya que en paralelo dirige el Servicio de Toxicología de la Policía Técnica Judicial (PTJ) entre 1958-1960. En 1961 funda la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial y ese mismo año realiza estudios en Toxicología e Higiene Industrial en Investigación en Salud Ocupacional en Cincinnati, EEUU. Se reincorpora como docente de la Cátedra de Toxicología en 1962, fecha a partir de la cual se desempeña como Profesor a Dedicación Exclusiva. En noviembre de 1967 el Dr. Asuaje realiza su año sabático en la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en Washington, EEUU, reincorporándose en noviembre de 1968, año en que asciende a Profesor Titular. Es nombrado Jefe de la Cátedra de Toxicología Industrial el 17 de marzo de 1971.

En junio de 1973, el Dr. Asuaje es designado director del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico Dr. Julio Velasco C. En 1975, se incrementa a tres horas semanales el número de horas de clases de la asignatura Toxicología e Higiene Industrial y el número de créditos de la mención sube de 12 a 14. Tras integrarse a la Facultad posterior a su segundo año sabático, en septiembre de 1977, el Dr. Asuaje asume la jefatura de la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial y se integra a la Comisión de Seguridad e Higiene del Trabajo. La reestructuración del pensum de estudios de la Facultad de Farmacia de la UCV iniciado en 1976, da lugar a modificar la estructura de la Mención de Toxicología e Higiene Industrial. El Dr. Asuaje, jefe de la Cátedra para el momento, tramita la inclusión de nuevas asignaturas a la Mención de Toxicología. En febrero de 1980 el Consejo de Facultad aprueba la inclusión en dicha Mención de las asignaturas de Ecotoxicología, Toxicología Alimentaria y Ensayos Biológicos de

Cosméticos. El 5 de junio de 1980 se designa al Dr. Asuaje miembro del Comité del Proyecto de Sueros Antiofídicos y permanece en dicho cargo hasta marzo de 1983.

El **Dr. Asdrúbal Lárez Albornoz**, ingresa a la Cátedra de Toxicología Forense en septiembre de 1960. Realiza una Especialización en Toxicología Técnica y Sanitaria Industrial en París y a su regreso, sus ideas innovadoras lo llevan a la realización de un proyecto en conjunto con el Dr. Siebert Holz integrante del Departamento de Toxicología y Farmacología, para la creación del primer Centro de Investigaciones de Venenos del país, cuya creación es autorizada por el Consejo Universitario en septiembre de 1964, inaugurándose en mayo de 1971 el Centro de Asesoramiento Toxicológico «Dr. Julio Velasco Castro». En junio de 1980 el Dr. Lárez crea la Unidad de Toxicología Experimental.

La **profesora Gladys Romero de Galí** ingresa a la Cátedra de Toxicología Forense en junio de 1963, bajo la tutoría del Dr. Lárez. En septiembre de ese año realiza pasantías en Carcinogénesis Química en la Universidad de Rennes, Francia. Asume la jefatura de la Cátedra de Toxicología Forense durante el periodo comprendido entre los años 1968 al 1980. Entre los años 1971-1973 dirige el Centro Toxicológico Julio Velasco C. La Prof. Gladys Romero de Galí ingresa como docente a la asignatura de Toxicología Forense en julio de 1971. Coordina el Laboratorio de Análisis del Centro Julio Velasco Castro a partir de junio de 1973 hasta octubre de 1974, cuando se traslada a la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial. Realiza estudios de Toxicología de la Reproducción en 1974. Con el Dr. Manuel Arellano Parra crea el Centro General de Intoxicaciones en el Hospital de Coche, en diciembre de 1976. En junio de 1980 inicia sus estudios de cuarto nivel en el área de Toxicología en Ciencias del Ambiente en la Universidad de Texas en Houston, EE.UU., donde obtiene el título de Magíster Scientiarum; en el área de Toxicología (1983). Una vez incorporada a la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial es designada jefe de la Cátedra. Ejerce la dirección de la Comisión de Estudios de Postgrado en 1987 y jefe de la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial y el Laboratorio de Ecotoxicología en mayo de 1988 hasta su jubilación. Durante el período 1984 a 1994 coordina el Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX) y en el año 1992 junto con la Dra. María Margarita Salazar-Bookaman implementa la Unidad de Cultivo Celular, ubicada en el piso 7 de la Facultad de Farmacia.

La **Dra. Margarita Salazar-Bookaman**, Farmacéutico, egresada de la mención de Toxicología e

Higiene Industrial en 1964. Realizó estudios de cuarto nivel en Farmacología en la Facultad de Farmacia de la UCV entre los años 1966 y 1968 y luego obtuvo el título de Doctor en Farmacología en Ohio State University, Ohio, USA. Asume la jefatura de la Cátedra Toxicología Forense y la Mención de Toxicología e Higiene Industrial una vez se jubila la Prof. Romero de Galí hasta el año 2008, cuando es electa decana de la Facultad de Farmacia.

El **Prof. Diego Piña** ingresa en septiembre de 1975 a la Cátedra de Toxicología Forense. Es designado Jefe de la Cátedra de Toxicología Forense en 1981 hasta su jubilación en marzo de 2004. Desde el año 1996 hasta el año 2004 participa como miembro del Comité de Seguridad Ocupacional de la Facultad de Farmacia.

La **Prof. Magdalena Luizzi** ingresa como personal docente a la Cátedra de Toxicología Forense en enero de 1979. Asume la Jefatura de la Cátedra de Toxicología Forense entre los periodos 1991-1993 y 1997-2000. Realiza su año sabático en la Universidad Di Pavia en Italia. En mayo de 2003 alcanza el rango de Profesor Titular y desde 1996 participa como miembro del Comité de Seguridad Ocupacional de la Facultad de Farmacia, hasta su jubilación en el año 2006.

La **Dra. Luz Orfila** realiza en 1985 estudios de cuarto nivel en la Universidad de París VII, donde obtiene la Maestría en el año 1987. Posteriormente, en el año 1989 obtiene el título de Doctor en Toxicología Fundamental y Aplicada. En el año 1994 ingresa como Investigador-Docente a Dedicación Exclusiva en el área de Toxicología, Unidad de Cultivo Celular adscrita al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia. La Dra. Orfila asume la jefatura de la Cátedra de Toxicología e Higiene Industrial, y la docencia de la asignatura Ensayos Biológicos de Cosméticos en mayo de 2000.

Además de los docentes antes mencionados, cabe destacar el aporte fundamental a la enseñanza de la Toxicología Forense de profesores que ejercieron la docencia en forma temporal, entre los que destacan la médica América Montes (1991-1996), especialista Adelaida Matos (1996-1997), José Luis Campos (1997-2000) y la especialista Marilú Escorche (2001-2006). En la Mención de Toxicología e Higiene Industrial, la especialista, Yanira Rosas, quien se desempeña como docente entre 1992-1995. Posteriormente participan en la docencia las especialistas Ivonne León (1995-1996; 1997-1998 y 2000-2008), Adelaida Matos (1996-1997), David Toring (2005-2007) y Gladys Venegas desde 1998 hasta el presente, quien actualmente es jefe del Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX).

En la actualidad, la Cátedra de Toxicología cuenta con la Especialista Médico Toxicólogo Ligia Peña, quien tiene una amplia experiencia adquirida en el Hospital de Coche; la especialista Daniela Pasqualotto, también Coordinadora del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico; la Farmacéutica Geraldine Guerrero y la Becario Académico María Eugenia Pineda, egresada de la Maestría en el Postgrado de Toxicología.

### **Evolución de la enseñanza de la Toxicología a nivel de Especialización y Maestría**

En el año 1982, a iniciativa de los profesores Dr. Gianni Pinardi, presidente de la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela; Dra. Margarita Salazar, Jefe de Departamento de Asignaturas Biológicas Aplicadas; el Dr. Diego Piña y el Dr. Fernando Asuaje Álvarez de Lugo jefes de las Cátedras de Toxicología Forense y Toxicología e Higiene Industrial; la Dra. Gladys Romero de Galí comienza la construcción del Programa de Especialización en Toxicología, basado en programas internacionales ya existentes y en las necesidades del país. Esta propuesta fue concebida bajo la integración de recursos humanos y materiales de la Universidad Central de Venezuela con base en la infraestructura docente del curso de Postgrado de Farmacología, de Ciencias, Ingeniería y Medicina.

Posteriormente, durante la gestión del Dr. Nelson Ferrigni, Presidente de la Comisión de Estudios de Postgrado, se designa una Comisión bajo la Coordinación de la Prof. Romero de Galí conformada por los profesores Gladys Romero de Galí, Margarita Salazar-Bookaman, Asdrúbal Lárez, Julio Pérez y Rafael Campo. Esta comisión fue encargada del estudio del Anteproyecto del Postgrado de Toxicología y la tramitación ante las autoridades pertinentes en julio de 1984.

En octubre de 1984 se designa a la profesora Galí a formar parte de la Comisión de Estudios de Postgrado y en febrero de 1986, se adscribe a la Unidad de Toxicología Experimental los servicios de Análisis Toxicológicos (SATOX), Despistaje de Drogas de Abuso que servirán de apoyo al curso de Postgrado en Toxicología, y se designa como coordinadora de dicha Unidad a la Prof. Galí.

Luego del estricto cumplimiento de las instancias académicas requeridas por la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, durante la gestión decanal del Dr. Cándido Ordaz fue aprobado el proyecto del «Curso de Especialización en Toxicología» cuya coordinación ejerce la Prof.

Gladys Romero de Galí en conjunto con el primer Comité Académico, conformado por los profesores Gladys Romero de Galí, Margarita Salazar, José Domingo Medina, Anita Stern Israel y Trina Colman. En abril de 1986, durante el ejercicio del Dr. Ferrigni como director de la Comisión de Estudios de Postgrado (1984-1987), y en cumplimiento con los requisitos exigidos por el Consejo de Estudios para Graduados, se aprueba la creación del Postgrado de Toxicología.

Es así como en septiembre de 1986 se abre por primera vez el curso de Especialización en Toxicología con seis alumnos, el cual consta de un programa de 25 unidades de créditos obligatorios y ocho créditos electivos. Esta especialización contribuye a que la Facultad de Farmacia sea pionera en la enseñanza de la Toxicología, permitiendo la formación de profesionales capaces de contribuir a la prevención y resolución de problemas toxicológicos causado por el mal uso de sustancias químicas, influencia de agentes físicos y biológicos que afectan la salud y el medio ambiente, formación de asesores de la comunidad en entidades públicas y privadas, donde participa en la elaboración de medidas de prevención, control de intoxicaciones, investigación epidemiológica y elaboración de análisis toxicológicos; cuya formación le permite a estos especialistas desempeñar cargos como: analista, asesor, investigador, docente y gerente.

Durante los 14 años de coordinación académica de la Prof. Gladys Romero de Galí, se cumple una importante misión en la formación de recursos humanos en el área. Producto del esfuerzo egresan cinco Especialistas en Toxicología: los farmacéuticos Ana Franca Abbinante y Rubén Salas en 1992, Daniela Pasqualatto en 1996, Yanira Rosas y Adelaida Matos en 1997.

En junio de 2001, el Consejo de la Facultad de Farmacia conoce y aprueba el proyecto de Maestría en Toxicología. Ese mismo año, el proyecto es enviado al Consejo de Estudios de Postgrado y Consejo Nacional de Universidades para su consideración. Durante el período de la gestión en la Dirección de Postgrado de la Dra. Yarisma de Barbella, se designa como Coordinadora del Postgrado de Toxicología a la Dra. Luz Orfila y el Comité Académico del Postgrado es conformado por los profesores Jaime Charris, Trina Colman, Ana María Castejón y Gladys Romero de Galí. Se amplía el ingreso a profesionales del área de la salud y además del ingreso de Farmacéuticos, se incorporan Bioanalistas, Médicos, Biólogos, Químicos y Antropólogos. En junio de 2002 la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Farmacia ratifica a la Dra. Orfila como Coordinadora.

En este período egresan la farmacéutica María Isabel Amaro (2000) y los farmacéuticos Jesús Rodríguez y Carmen Villarroel (2001). La especialista Amaro se desempeña como Farmacéutico I en el SIMET e ingresa como docente en la Cátedra de Química de Medicamentos (2005-presente). Jesús Rodríguez se desempeña como docente en la asignatura de la Mención de la Toxicología e Higiene Industrial entre 1996-1998, en la Cátedra de Toxicología Forense entre 2000-2002 y en la asignatura Sociedad y Drogas en 2002.

Durante el año 2002-2003, la Dra. Beatriz H Guevara, farmacéutico con Doctorado en Ciencias, Mención Farmacología, asume la coordinación del Postgrado de Toxicología y se designa el nuevo Comité Académico conformado por los Profs. Jaime Charris, director de Postgrado; Daniela Pasqualatto, Fátima Torrico y Trina Colman. Durante esta gestión se establecen metas importantes como estimular a los estudiantes de la época a culminar sus estudios, continuar con el apoyo pedagógico existente, unir esfuerzos entre diferentes postgrados, continuar ofreciendo asignaturas electivas (Toxicología y Toxicología Ocupacional) y conformar la nueva generación de relevo de docentes en el área. En este período egresan las farmacéuticas Gladys Venegas, Ivonne León y Marilú Escorche, profesoras de Toxicología e Higiene Industrial desde 1997 y año 2000, y de Toxicología Forense, respectivamente, y Carmen Duque, miembro activo de SATOX desde 1999 y actualmente estudiante de la Maestría en Toxicología.

En octubre de 2003 se ratifica a la Dra. Guevara como Coordinadora del Postgrado de Toxicología, quien continúa el procedimiento académico y administrativo hasta lograr la aprobación de creación del Proyecto de Maestría. La aprobación y apertura de la Maestría en Toxicología se logra en marzo de 2004. En efecto, la Dra. Aura Teresa Russa, jefe de la Unidad Técnica del Consultivo Nacional de Universidades recomienda la autorización para la creación y funcionamiento de la Maestría en Toxicología, lo cual es aprobado por el Coordinador Central de Estudios de Postgrado durante la gestión del Dr. José León Ramos.

Es importante destacar que de los 12 egresados, 6 han sido incorporados a la docencia del Postgrado de Toxicología. Este mismo año la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Farmacia y el Consejo de Facultad aprueban modificaciones del Programa de Neurotoxicología, asignatura obligatoria de la Maestría en Toxicología.

Se envía a la Comisión de Estudios de Postgrado las Normas Internas de Procedimiento de los Cursos

de Postgrado de Toxicología en el año 2003. Se incluye la asignatura Farmacología, de pregrado, como requisito de nivelación para cursar el Postgrado de Toxicología. En los años 2001 y 2005 se realizan autoevaluaciones del Postgrado de Toxicología, siguiendo las normativas de la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado, mostrando resultados muy favorables (80,25/100) que lo catalogan como «Muy bueno».

Hasta el momento, la Maestría en Toxicología ha permitido alcanzar los siguientes objetivos: 1) respuesta de profesionales de diferentes ramas del conocimiento universitario para cursar esta Maestría; 2) las políticas de difusión y promoción de la Maestría del postgrado nacional e internacionalmente han dado sus frutos por la respuesta de profesionales del interior y exterior de Venezuela interesados en cursar la Maestría; 3) Optimización de los contenidos programáticos; 4) Crecimiento del número de líneas de Investigación ofrecidas a los estudiantes para sus trabajos de grado; y 5) políticas de control y seguimiento instituidas en referencia a los lapsos académicos establecidos.

Uno de los aportes más importantes en el desarrollo de la Especialización y la Maestría de Toxicología resulta, sin duda, la posibilidad del desarrollo en la Facultad de Farmacia de nuevas líneas de investigación en el área. El postgrado cuenta con las líneas de investigación diversas, en la que destacan el Estudios de Toxinas de venenos de serpientes, escorpiones, arañas y otros especímenes ponzoñosos; la Toxicología cardiovascular, la Neurotoxicología, el estudio de las alteraciones de la Homeostasis por Toxinas, la Toxicología de nuevos compuestos obtenidos por Síntesis, la Clínica de los emponzoñamientos, la Toxicología de Productos Naturales, la Toxicología ocupacional, el Modelado molecular de sustancias tóxicas, la Toxicología de los metales en las poblaciones de Venezuela, la Toxicología de la reproducción y la Toxicología de parásitos.

La reseña expuesta nos permite ser optimistas en las perspectivas de la Toxicología en Venezuela y augura para nuestros egresados del Postgrado un futuro promisorio que les permitirá contribuir al continuo crecimiento y desarrollo de la Toxicología como ciencia en nuestro país.

## Referencias bibliográficas

- Andrade JL, Asuaje F. 2001. Toxicología. Consideraciones históricas, evolución, enseñanza y desarrollo en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca EBUC. Caracas.
- Delgado García G. 1991. Primeras publicaciones *cubanas sobre Toxicología*. Resumed 4(1): 71-72.
- Expedientes de los profesores de la Cátedra de Toxicología. Ubicados en la Dirección, Archivo y correspondencia y SIMET. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- González Pérez J, Sainz de la Peña MV. 1982. La Toxicología Forense. Actualidad en Medicina Legal. 2(3): 4-17.
- Hernández Jerez A. 2002. «La enseñanza de la Toxicología en las ciencias biosanitarias del siglo XXI». Revista Toxicología 19 (1): 23-28.
- La enseñanza de la Toxicología del siglo XXI. Revista Toxicología, 2001; 18 (3): 144-148.
- Pratt I. 1991. Professional opportunities for Toxicologist: The requirement of the public sector for education/teaching. Toxicol Lett 112-113: 379-382.
- Repetto M. 2001. «La formación de toxicólogos, un problema a resolver». Tribuna Médica; 975: 31-35.
- Repetto M. 2004. «Desarrollo y evolución histórica de la Toxicología». En: Repetto M. Toxicología fundamental. 3a. ed. Madrid: Editorial Díaz Santos, pp.1-14.
- Suárez Escandón A. 2007. Tesis Doctoral: Valoración de la Enseñanza de la Toxicología en los Estudios de Medicina en Emergencias, pp. 1-56.
- Texeira López A. 2001. «La enseñanza de la Toxicología en Portugal» En: Repetto M. (Coord.), Evolución, estado actual, retos y tendencias de la Toxicología al comenzar el milenio. Sevilla: Universidad de Sevilla.

# Propiedades de flujo de hidroxipropilmetilcelulosa en formulaciones oftálmicas

## Flow properties of hydroxypropylmethylcellulose for ophthalmic use

ISABEL C ANDUEZA<sup>1\*</sup>, GISELA S ÁVILA<sup>1</sup>, DORIS ATTIAS<sup>1</sup>

### Resumen

La adición de diferentes sustancias poliméricas puede lograr el incremento de la viscosidad en los colirios y mantener por más tiempo el contacto entre la córnea y la dispersión aplicada. La viscosidad y las propiedades de flujo de los vehículos, podría determinar la velocidad de eliminación y la absorción ocular de los fármacos. Algunos polímeros hidrofílicos pueden ayudar con la estabilidad de la película lagrimal, reducir la velocidad de eliminación e incrementar la biodisponibilidad, así como lubricar el ojo y reducir la fricción durante el parpadeo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de soluciones amortiguadoras, isotonzantes y agentes de conservación antimicrobiana sobre la viscosidad y propiedades de flujo de dispersiones salinas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), así como evaluar su estabilidad frente a la esterilización. Para evaluar estos parámetros se empleó un viscosímetro rotacional (Canon LV 2000) con adaptador de muestras pequeñas a 26 °C. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la viscosidad y comportamiento reológico frente a las soluciones amortiguadoras acetato de sodio/citrato de sodio o borato de sodio/ácido bórico. Por otra parte, la adición de dextrosa o manitol modificó la viscosidad de las dispersiones. La formulación que contenía manitol y borato de sodio/ ácido bórico modificó el flujo de Pseudoplástico a Newtoniano. La viscosidad disminuyó significativamente por la esterilización y la adición de los preservativos cloruro de benzalconio asociado con EDTA o perborato de sodio. La distribución uniforme de las formulaciones sobre la superficie ocular se ve favorecida por la viscosidad y el flujo pseudoplástico encontrados. Se sugiere el empleo de cloruro de sodio como isotonzante ya que no modifica los parámetros evaluados. Los agentes de conservación antimicrobiana y el proceso de esterilización no presentaron influencia sobre el tipo de flujo.

**Palabras clave:** Viscosidad, comportamiento reológico, isotonzante, solución amortiguadora.

### Abstract

The addition of different agents could increase the viscosity of the eye drops dispersions and delay the contact time between the cornea and the dispersion. The viscosity and the flow properties of the vehicles could determine the rate of drainage loss and the ocular absorption of drugs. Some hydrophilic polymers, may help to the tear film stability, reduce the elimination rate and increase the bioavailability. They also lubricate the eye and reduce the blinking friction. The objective of this work was to evaluate the viscosity and the flow properties of different ophthalmic hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) formulations, which could be influenced by buffering agents, isotonzants and preservatives, as well as their stability during sterilization process. These parameters were determined by a rotational viscosimeter (Canon LV 2000) for small samples at 26°C. It was observed no significant effect on the viscosity or the rheological properties by the use of buffer sodium acetate/sodium citrate or sodium borate /boric acid. However, the addition of dextrose or mannitol altered the dispersions' viscosity. The formulation containing mannitol and sodium borate/boric acid showed a change from Pseudoplastic to Newtonian flow profiles. The viscosity was decreased significantly by sterilization and preservatives addition, such as benzalkonium chloride with EDTA and sodium perborate. The uniform distributions of formulations in the ocular surface were favored by the viscosity and the pseudoplastic flow. We propose that sodium hydrochloride could be used as isotonic agent because it does not modified the evaluated parameters. Therefore, antimicrobial agents and sterilization process do not have influence about the flow.

**Key words:** Viscosity, rheological properties, isotonzant, buffer.

<sup>1</sup> Dpto. de Tecnología Farmacéutica. Universidad Central de Venezuela.

\* A quién debe dirigir la correspondencia. [isabel.andueza@ucv.ve](mailto:isabel.andueza@ucv.ve).

Auspiciado: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico – UCV

## Introducción

Los medicamentos destinados para el tratamiento de las diferentes afecciones oculares están íntimamente relacionados con los productos de aplicación tópica. Para convertir un fármaco activo en un medicamento oftálmico es necesario, no sólo formular un producto estable, libre de microorganismos y que no sea irritante al ojo, sino también hay que considerar la eficacia del producto. Ésta no solo depende de la actividad del principio activo, sino también de su dosificación, duración en el sitio de aplicación y de su posible absorción. Los productos oftálmicos tradicionales (soluciones, suspensiones y ungüentos) no mantienen el tiempo de contacto suficiente para combatir las distintas enfermedades oculares, debido a que las barreras anatómicas y fisiológicas del ojo hacen que estos productos presenten una baja biodisponibilidad y poca duración de la acción debido a su rápida velocidad de eliminación precorneal, y esto último puede traer como consecuencia efectos secundarios sistémicos (Hughes y Mitra, 1993; Nanjawade y col., 2007).

Los enfoques para el desarrollo de productos oftálmicos deben incorporar estrategias que mejoren la biodisponibilidad y reduzcan la absorción sistémica con base en los aspectos anatómicos, fisiológicos y bioquímicos del ojo (Meqi y Deshpande, 2002).

Las nuevas tendencias tecnológicas van dirigidas al empleo de fármacos específicos formulados bajo sistemas de liberación. De forma general, se podría entender como sistema de liberación, cualquier módulo de administración capaz de aportar un beneficio biofarmacéutico, farmacocinético o terapéutico a un fármaco. Estos beneficios se relacionan con un incremento de la biodisponibilidad del principio activo, una prolongación del tiempo de permanencia en el organismo o un cambio en su biodistribución. En último término, estos beneficios se traducen en una mejora en la eficacia terapéutica del fármaco y una reducción de su toxicidad, garantizando al paciente medicamentos seguros, efectivos y confiables. Una de las maneras de modificar la farmacocinética en los productos oftálmicos tópicos se enfoca principalmente en el empleo de polímeros biodegradables que permitan mantener por más tiempo la concentración de fármaco en el sitio de acción (Urtti, 2006). Un transportador polimérico debe ser capaz de garantizar la dosis terapéutica, liberar el activo de manera controlada, tener poder de penetración y/o permanecer en el sitio de acción por más tiempo. Además, debe ser biocompatible, biodegradable y no tóxico. A su vez, estos polímeros no deben impedir la visión y ser bien tolerados por los pacientes

(Barbu y col., 2006). Existen polímeros biodegradables que son capaces de formar hidrogeles, es decir, se hidratan en agua o en solventes acuosos e inducen una transición de líquido a gel. Esa transformación produce un incremento de la viscosidad de las soluciones, mejorando la retención de los fármacos en la superficie corneal. Existen dos tipos de hidrogeles: los propiamente dichos y los geles *in situ*. Los primeros son aquellos que no sufren modificación de la viscosidad después de su administración ocular. Los últimos son dispersiones fluidas que posterior a su instilación se transforman en gel debido a interacciones fisicoquímicas con el ojo (Nanjawade y col., 2007).

Se han empleado tres métodos para producir la transición de sol a gel: cambios en la temperatura, pH y composición electrolítica (Moorhouse y col., 1981; Miller y Donovan, 1982; Gurny y col., 1985; Nanjawade y col., 2007).

Los polímeros que gelifican por efecto de la temperatura (de interés en este trabajo de investigación) son aquellos que forman dispersiones líquidas a temperaturas entre 20° y 25 °C y tienen la capacidad de transformarse en gel, cuando están en contacto con los fluidos corporales, debido al incremento de la temperatura (35°- 37 °C). Entre ellos se pueden citar los poloxamer, derivados de celulosa (hidroxipropilmetilcelulosa, HPMC) y el xyloglucan (Hoffman y col., 1986; Nanjawade y col., 2007).

Algunos hidrogeles, como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), contribuyen a la estabilidad de la película lagrimal y disminuyen la velocidad de eliminación, incrementando así la biodisponibilidad de los ingredientes activos. Ellos también contribuyen a la lubricación y disminución de la fricción durante el parpadeo; es por ello que son empleados como sustitutos de las lágrimas naturales en la terapia del ojo seco (Maltese y col., 2006).

En trabajos anteriores (Andueza y col., 2006) se ha demostrado que las características de las películas formadas por dispersiones de HPMC a diferentes temperaturas, exhiben películas uniformes y continuas. La presencia de dextrosa mantiene por más tiempo al polímero bajo la forma de gel uniforme, compacto, flexible, con buena adherencia y fácil separación; a su vez, protege a la HPMC de la deshidratación, favoreciendo así la humectación.

Por otra parte, para reducir el traumatismo de los tejidos en aquellos pacientes que son sometidos a cirugía intraocular, se emplean durante la misma, productos conocidos como viscoelásticos, constituidos por derivados de celulosa, como la HPMC, que proporcionan una barrera física protectora entre el

tejido ocular y los instrumentos quirúrgicos empleados durante la intervención (esta técnica recibe el nombre de viscocirugía) (Maltese y col., 2006).

Hui y Robinson (1985) demostraron que la biodisponibilidad ocular puede ser mejorada con polímeros bioadhesivos. Saettone y colaboradores (1989) señalaron que los polímeros solubles mucoadhesivos incrementan la absorción ocular. La bioadhesión (y mucoadhesión) es un proceso en el cual macromoléculas sintéticas y naturales son capaces de adherirse al sistema mucosal del organismo. Si un material con estas características se incorpora en una formulación, podría mejorar la absorción del fármaco o prolongar la liberación en el sitio de aplicación (Woodley, 2001). Se ha demostrado que la HPMC presenta propiedades bioadhesivas (Henriksen y col., 1996; Dyvik y Graffner, 1992), siendo de interés para su estudio en superficies mucosales como el ojo. Este polímero se ha empleado en muchos sistemas de liberación controlada, como es el caso de un inserto nasal con HPMC (McInnes y col., 2005).

Además, Patton y Robinson (1975) llegaron a la conclusión de que las propiedades de flujo de los vehículos y sus viscosidades determinan el efecto sobre el drenaje y la absorción ocular de los fármacos (Edsman y col., 1998). Es por ello que el empleo de polímeros como viscosantes y modificadores reológicos de las formulaciones oftálmicas hidrofílicas puede influir en la distribución de un fármaco oftálmico en la superficie corneal, así como en su patrón de retención y eliminación. Andueza y col. (2000b) han demostrado el comportamiento pseudoplástico de diferentes dispersiones de HPMC al 2% 4000 cps. El comportamiento reológico de las dispersiones oftálmicas no se debe estudiar de forma aislada, y se debe relacionar con los componentes de la fórmula, así como con las interacciones biológicas y químicas en el sitio de aplicación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de soluciones amortiguadoras, isotonzantes y agentes de conservación antimicrobiana sobre la viscosidad y las propiedades de flujo de dispersiones salinas de HPMC, así como su estabilidad frente a la esterilización.

## Materiales y métodos

Las formulaciones oftálmicas se elaboraron por triplicado empleando diferentes concentraciones de HPMC 4000 cps en soluciones acuosas y aplicando el método caliente/frío, recomendado en el ensayo de viscosidad de la HPMC por la USP 30 (2007), y en Andueza y col. (2000a).

### DISPERSIONES DE HPMC AL 2%.

#### FORMULACIÓN PARA VISCOCIRUGÍA

Se procedió a disolver los componentes de las fórmulas números 1 (Tabla I), previamente pesados en una balanza analítica Mettler AJ 150 DL, en orden creciente de solubilidad, en el volumen total de agua recientemente destilada disponible para preparar una dispersión isotónica de HPMC al 2% (Andueza y col., 2006 y 2008). Para la incorporación del polímero, se empleó el método ya reportado (Andueza y col., 2000a, 2002 y 2006). De la misma manera se elaboraron dispersiones de HPMC al 0,5 % y 2% en agua destilada a fin de comparar los resultados.

### DISPERSIONES DE HPMC AL 0,5%.

#### FORMULACIÓN PARA HIPOSECRECIÓN LAGRIMAL

Se elaboraron formulaciones de HPMC al 0,5% con los componentes salinos (cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio), soluciones amortiguadoras (acetato de sodio/citrato de sodio o ácido bórico/borato de sodio) para alcanzar un pH de  $7,2 \pm 0,2$  e isotonzantes (cloruro de sodio, dextrosa o manitol) (Tabla I), fórmulas números 1 y 2 (A, B, C) siguiendo la técnica de Andueza y col., 2006. Posteriormente se elaboraron dos formulaciones de HPMC al 0,5% constituidas por componentes salinos, ácido bórico/borato de sodio, cloruro de sodio y un agente de conservación antimicrobiana (perborato de sodio o cloruro de benzalconio con EDTA) (Tabla I), fórmulas 3A y 3B (Andueza y col., 2006). Estas dos últimas formulaciones se prepararon y se sometieron a esterilización de la siguiente manera:

Se procedió a elaborar dispersiones de HPMC al 2% en agua desmineralizada (dispersión concentrada), siguiendo el método de la USP 30 (2007) para el ensayo de viscosidad de la HPMC, y se esterilizó por autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se prosiguió con la elaboración de las soluciones diluentes estériles, disolviendo cada uno de sus componentes en orden creciente de solubilidad, empleando agua desmineralizada y una balanza analítica Mettler AJ 150 DL. Seguido de ello se realizó una prefiltración con membrana Millipore de 0,5 µm, con posterior filtración esterilizante en membrana Millipore de 0,20 µm y bajo campana de flujo unidireccional horizontal. En esa misma área, y cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura para estos productos, se procedió a mezclar porciones de la dispersión concentrada de HPMC al 2% con cada una de las soluciones diluentes estériles, para obtener dos formulaciones de lágrimas artificiales con la concentración final deseada de HPMC igual al 0,5%. Para finalizar, se envasaron en frascos goteros de vidrio

Tabla I  
Composición cualitativa de las formulaciones de HPMC

Fórmulas Ingredientes	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	2D	3A	3B
Componentes salinos*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acetato de sodio	X	X	X	X						
Citrato de sodio	X	X	X	X						
Ácido bórico					X	X	X	X	X	X
Borato de sodio					X	X	X	X	X	X
Cloruro de sodio	X				X				X	X
Dextrosa anhidra		X				X				
Manitol anhidro			X				X			
Cloruro de benzalconio + EDTA									X	
Perborato de sodio tetrahidratado										X

\* Cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio.

color ámbar de 30 mL, previamente lavados y esterilizados (Andueza y col., 2008).

#### VISCOSIDAD Y COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

A todas las dispersiones en estudio se les determinó la viscosidad y el comportamiento reológico a temperatura ambiente  $26 \pm 1$  °C, en un viscosímetro rotacional Cannon LV 2000, con adaptador de muestras pequeñas. Se emplearon las agujas N° 5 ó 6; las velocidades fueron 0,3-0,6-1,5-3-6-12-30-60 r.p.m. Se realizaron las lecturas en sentido creciente y decreciente y los valores promedio obtenidos se expresaron en fuerza de corte (centipoise por velocidad) o en centipoises (Fresno, 1993). Para la evaluación de los parámetros reológicos es muy importante considerar que todas las determinaciones de las dispersiones no esterilizadas se realizaron 24 horas después de su elaboración (Andueza y col., 2000), mientras que las determinaciones de las dispersiones sometidas al proceso de esterilización fueron después de 72 horas (Andueza y col., 2002).

Las viscosidades de las formulaciones estériles de HPMC al 0,5% se realizaron a diferentes tiempos:  $t_0$  (24 horas después de someterse a esterilización),  $t_1$  (un mes),  $t_2$  (dos meses).

El comportamiento reológico se evaluó según la prueba de t de comparación de pendientes, con un nivel de confianza del 99%.

#### Resultados y discusión

Las dispersiones de HPMC en agua presentaron reogramas correspondientes a flujos pseudoplásticos, donde la viscosidad de las dispersiones disminuye con el incremento de la velocidad de cizalla, como se observa en las figuras 1 y 2. Los valores de viscosidad obtenidos a diferentes velocidades en sentido creciente y decreciente se promediaron, ya que no se observó en ninguno de los reogramas evaluados, diferencia significativa entre ambas curvas. Estas dispersiones presentaron un índice de pseudo-plasticidad cercano a uno, lo que se interpreta como un comportamiento ligeramente pseudoplástico, evidenciándose principalmente en la dispersión de HPMC al 0,5%.

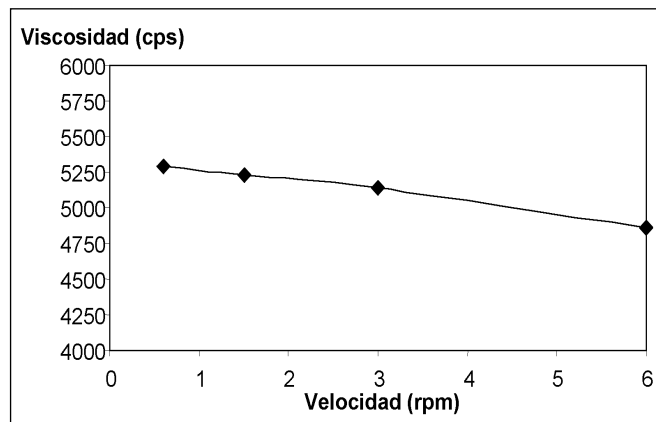


Figura 1. Reograma de la dispersión de HPMC al 2%, a 26 °C

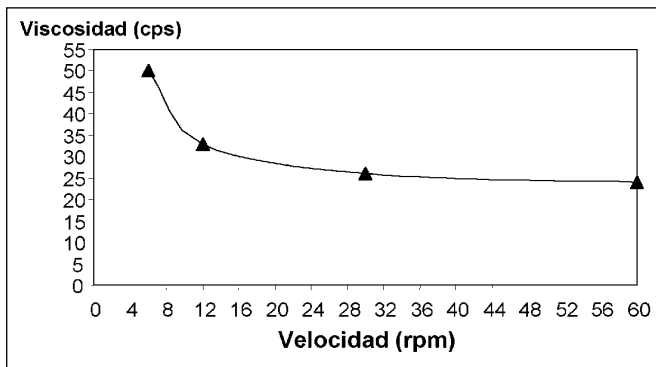


Figura 2. Reograma de la dispersión de HPMC al 0,5%, a 26 °C

Este tipo de flujo facilita la distribución uniforme de la dispersión en la córnea durante el parpadeo, disminuyendo la evaporación de la lágrima, asegurando la completa humectación de toda la superficie y, por lo tanto, una disminución de la reseca ocular.

Por otra parte, para la administración bajo la forma de colirio se recomienda un rango de viscosidad entre 15-25 cps (Ansel y col., 1999), o que no exceda de 50 cps (Desai y Blanchardi, 1995); la concentración de 0,5% de HPMC cumplió con este requisito y es por ello que se seleccionó para la evaluación de la viscosidad y propiedades de flujo de las formulaciones oftálmicas tópicas (Andueza y col., 2006). Este parámetro físico tiene una gran importancia en el estudio de los procesos dinámicos precorneales, así como es un elemento primordial en el desarrollo de nuevas formulaciones tópicas como sistemas de liberación.

En los productos viscoelásticos para cirugía intraocular, la viscosidad es muy superior ( $4000 \pm 2000$  cps) (Fechner, 1985) y su aplicación es por inyección. El comportamiento pseudoplástico de la dispersión de HPMC al 2% favorece su administración ya que, al aplicar una fuerza manual a través del émbolo de la inyectadora, la dispersión se hace más fluida, es decir, disminuye su resistencia a fluir debido a la fuerza aplicada y una vez en reposo en el tejido correspondiente, su viscosidad aumenta nuevamente y ejerce su efecto protector.

La presencia de distintas soluciones amortiguadoras en las dispersiones salinas de HPMC al 0,5%, correspondientes a las fórmulas 1A y 2A, no influyó sobre el flujo pseudoplástico encontrado. Como se puede observar, la pendiente de la recta de fuerza de corte contra velocidad disminuyó con el aumento de la velocidad. Esto se puede interpretar en la Figura 3, donde se graficó un comportamiento newtoniano hipotético para esta dispersión, a fin de visualizar mejor la variación de las pendientes como

consecuencia de la disminución de la viscosidad (viscosidad = Fuerza de corte/rpm), en función del aumento de la velocidad.

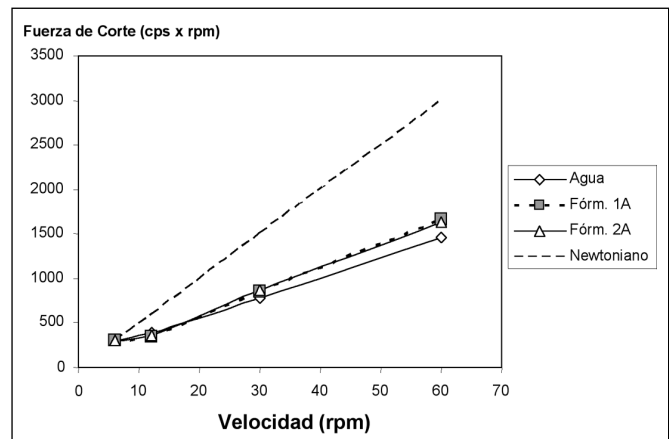


Figura 3. Reogramas de HPMC al 0,5% en agua, fórmulas 1A y 2A, a 26 °C

Como se puede ver en la misma figura, las tres rectas resultantes (fórmulas 1A, 2A y en agua) son similares, por lo que la presencia de los componentes incorporados en esas dispersiones (Tabla I) no afectó la viscosidad ni el comportamiento reológico. Esto nos permite ofrecer alternativas en la incorporación de soluciones reguladoras de pH, tomando en consideración que en estudios anteriores se ha reportado una buena estabilidad en dispersiones viscoelásticas de HPMC al 2% con acetato de sodio/citrato de sodio (fórmula 1A) (Andueza y col., 2004). Estudios futuros permitirán evaluar la capacidad tampón de estas mezclas amortiguadoras para establecer la fórmula de HPMC al 0,5% más adecuada.

Es importante destacar que para la concentración al 2%, la viscosidad que proporciona el polímero, es recomendada en viscocirugías; por otra parte, no se evaluó la solución amortiguadora de ácido bórico/borato de sodio ni los preservantes ya que, éstos no se deben incorporar en dichas preparaciones pues ocasionan efectos tóxicos sobre las células oftálmicas internas.

En cuanto al comportamiento de los agentes isotónicos, la presencia de la dextrosa o manitol proporciona una disminución de la viscosidad de la dispersión de HPMC al 2% en las fórmulas N° 1. Este comportamiento podría relacionarse con la formación de los enlaces isotónico: agua, previo a la hidratación del polímero, ya que como se puede recordar, para esta concentración de HPMC primero se forma una solución con todos los componentes y luego se hidrata el polímero con ella. La interacción de estos azúcares previamente disueltos con el polímero, no permitió que éste alcanzara su total

viscosidad (Martín, 1993) (Figura 4). Es sabido, que los derivados de celulosa tienen como estructura base la molécula de glucosa y el manitol contiene en su estructura grupos polihidroxilados que podrían interactuar con el polímero en el momento de su hidratación (Martin, 1993). Este hallazgo pareciera ser dependiente de la concentración del HPMC y de la técnica de manufactura, ya que en la dispersión al 0,5% no se observó esta disminución de la viscosidad, por el contrario, al hidratar previamente el polímero en agua con posterior dilución al 0,5% en la solución de los componentes, se observó un aumento de la viscosidad en presencia de estos carbohidratos (Figura 5).

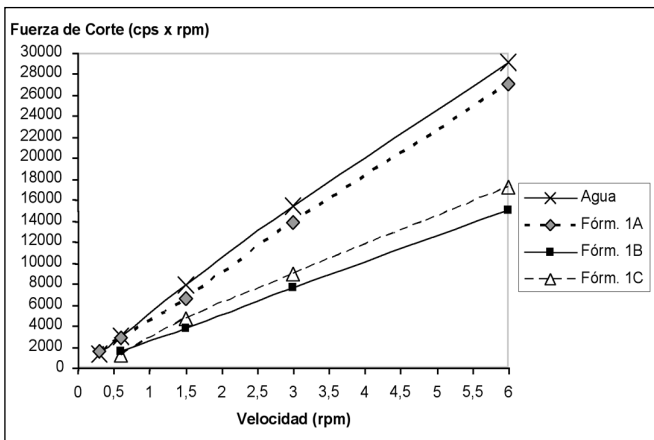


Figura 4. Reogramas de HPMC al 2% en las fórmulas N° 1, a 26 °C

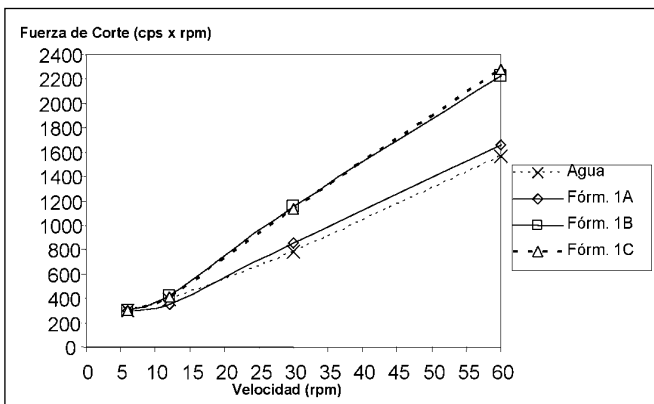


Figura 5. Reogramas de HPMC al 0,5% en la fórmula N° 1, a 26 °C

La influencia de los isotonzantes dextrosa o manitol, sobre la solución de sales con ácido bórico/borato de sodio (fórmulas N° 2), también evidenció un aumento de la viscosidad (Figura 6). La presencia del manitol, adicionalmente, modificó el tipo de flujo de pseudoplástico a newtoniano, puesto que no hubo variación en función de la velocidad aplicada. Este comportamiento no es deseado ya que las lágrimas

mas naturales presentan flujo pseudoplástico, el cual tiene menor resistencia al parpadeo para una mejor distribución sobre la superficie ocular.

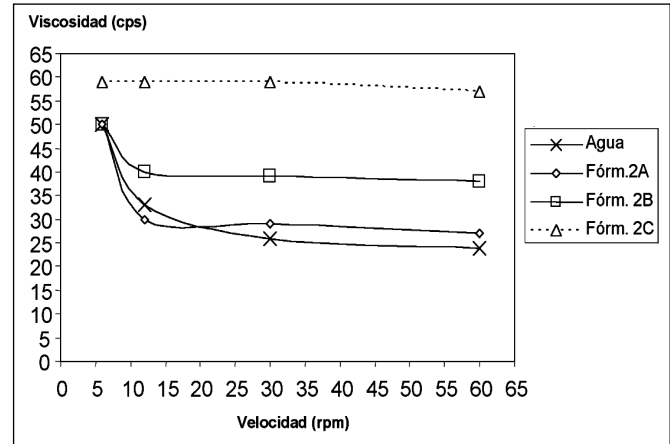


Figura 6. Reogramas de HPMC al 0,5% en las fórmulas N° 2, a 26 °C

La presencia de los agentes de conservación antimicrobiana (fórmulas 3) no modificó el comportamiento reológico de las dispersiones de HPMC al 0,5% (Figura 7). Sin embargo se observó una disminución en los valores de viscosidad (fuerza de corte/rpm), que se ve más pronunciada en presencia de perborato de sodio (fórmula 3B).

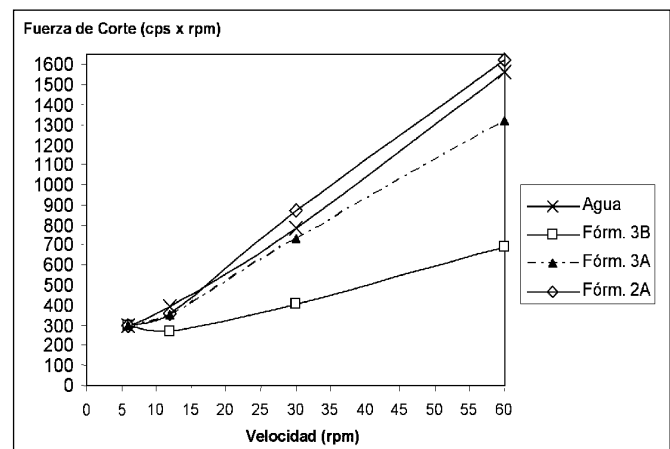


Figura 7. Reogramas de HPMC al 0,5% en las fórmulas 2A, 3A y 3B, a 26 °C

La influencia del proceso de esterilización sobre la HPMC al 0,5% en las fórmulas 3A y 3B, indicó una disminución de la viscosidad en función del tiempo (Figuras 8 y 9), cosa que no ocurrió con la HPMC al 2% en la formulación 1A estéril, la cual mantuvo su completa hidratación, máxima viscosidad y comportamiento pseudoplástico hasta 4 meses después de su esterilización (Andueza y col., 2004).

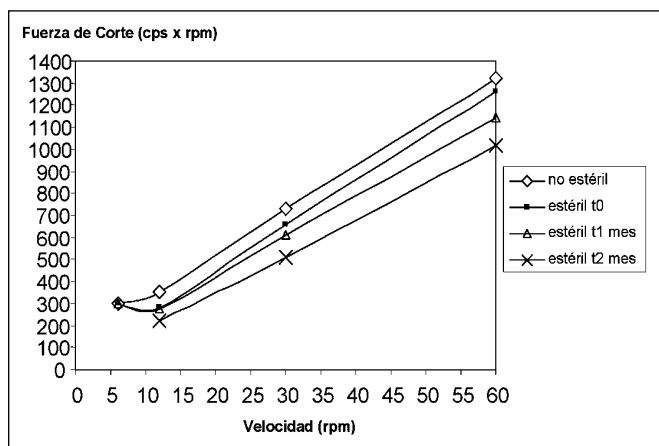


Figura 8. Reogramas de HPMC en las fórmulas 3A (antes y después de esterilizar), a 26 °C y diferentes tiempos

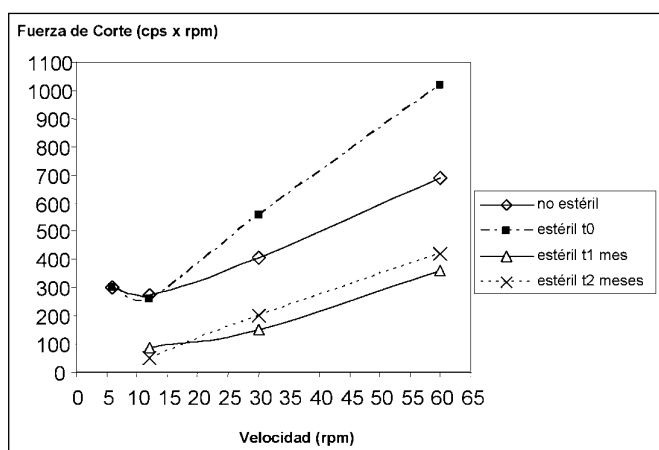


Figura 9. Reograma de HPMC al 0,5% en las fórmulas 3B (antes y después de esterilizar), a 26 °C y diferentes tiempos

Por otra parte, es importante resaltar que las pendientes entre las rectas de cada fórmula evaluada no presentaron diferencias significativas según la aplicación de la prueba de t de comparación de pendientes, con 99% de exactitud, lo que ratifica no variación del flujo pseudoplástico.

## Conclusiones

El reparto uniforme de las formulaciones en el sitio de aplicación se ve favorecido por el flujo pseudoplástico que, junto con la viscosidad, puede influir en la distribución de un fármaco en la superficie ocular, así como en su patrón de retención y eliminación. Se sugiere el empleo de cloruro de sodio como isotonzante ya que no modifica las propiedades de flujo y viscosidad en las dispersiones de HPMC evaluadas. Sin embargo, los agentes de conservación antimicrobiana y el proceso de esterilización empleando una concentración de 0,5% de HPMC afectan la viscosidad, no así el tipo de flujo; por lo que

se sugiere continuar evaluando la influencia de diferentes agentes conservantes, la interacción entre los componentes de la formulación y el proceso de manufactura sobre los parámetros antes evaluados.

## Agradecimientos

A Laboratorios Farma S.A. por su colaboración. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (Proyecto CDCH PG-06-10-5252-2003).

## Referencias bibliográficas

- Andueza I, Ávila G, Attias D. 2000a. «Caracterización física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, Tensión Superficial, Característica de la película». *Rev. Soc Quím Méx* 44(3): 224-228.
- Andueza I, Ávila G, Attias D. 2000b. «Caracterización reológica de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica». *Rev Soc Quím Méx* 44 (3): 229-232.
- Andueza I, Ávila G, Attias D. 2002. «Efecto de la esterilización por calor húmedo sobre algunas propiedades físicas de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa». *Rev Fac Farm UCV* 65(2):46-55.
- Andueza I, Ávila G, Attias D. 2004. «Influencia de la esterilización sobre el comportamiento reológico y pH de una dispersión isotónica de hidroxipropilmetilcelulosa». *Rev Soc Quím Méx* 48: 220-224.
- Andueza I, Ávila G, Attias D. 2006. «Desarrollo y evaluación de parámetros físicos en formulaciones humectantes para pacientes con hiposecreción lagrimal». *Rev Fac Farm UCV*. 69 (1 y 2): 43-53.
- Andueza I, Carvajal A, De Castro N. 2008. «Estudio de seguridad microbiológica, toxicidad y efectividad antimicrobiana en formulaciones oftálmicas de hidroxipropilmetilcelulosa». *Rev Fac Farm UCV*. 71(1): 15-23.
- Ansel H, Popovich N, Allen L. 1999. «Ophthalmic, nasal, otic and oral preparations applied topically». En: *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edición, Ed., Williams and Wilkins, PA-USA, pp. 469-478.
- Barbu E, Verestiuc L, Nevell T, Tsibouklis J. 2006. «Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectives». *J. Mater. Chem*. 16: 3439-3443.
- Desai S, Blanchard J. 1995 «Ocular Drug Formulation and Delivery». En: Swarbrick J, Boylan J, (Ed), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol. 11, Marcel Dekker NY-USA, pp. 43-75.
- Dyvik K, Graffner C. 1992. «Investigation of the applicability of a tensile testing machine for measuring mucoadhesive strength». *Acta Pharm Nord* 4: 79-84.
- Edsman K, Carlfors J, Petersson R. 1998. «Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use». *Eur J Pharm Sci* 6: 105-112.
- Fechner P. 1985. «Preparation of 2% HPMC for viscous surgery». *Am. Intraocular Implant Soc J* 11: 606-607.

- Fresno M, Jiménez M, Selles E. 1993. «Propiedades reológicas y estabilidad tixotrópica de una crema evanescente». *Ciencia Farmacéutica*. 3(2): 81-87.
- Gurny R, Boye T, Ibrahim H. 1985. «Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery». *J Control Release* 2: 353-361.
- Henriksen I, Green K, Smart J, Smistad G, Karlsen J. 1996. «Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vitro study». *Int J Pharm* 145: 231-240.
- Hoffman A, Afrassiabi A, Dong L. 1986. «Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions». *J Control Release* 4: 213-222.
- Hughes P, Mitra A. 1993. Overview of ocular drug delivery and iatrogenic ocular cytopathologies, En: Mitra A. (Ed.), *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, INC, N.Y., p. 1-27.
- Hui H, Robinson JR. 1985. «Ocular delivery of Progesterone using biadhesive polymer». *Int. J. Pharm.* 26:203-213.
- Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, Ambrosio L. 2006. «Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization». *Biomaterials* 27: 5134-5142.
- Martin A. 1993. Colloids, In: George H. Mundorff (Ed). *Physical Pharmacy*. 4<sup>a</sup> ed. Lea & Febiger, PA-USA, pp. 393-418/563-567.
- McInnes F, Thapa P, Baillie A, Welling P, Watson D, Gibson I, Nolan A, Stevens H. 2005. «In vivo evaluation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep». *Int J Pharm* 304: 72-82.
- Meqi S, Deshpande S. 2002. «Ocular drug delivery». En: Jain N.K. (Ed.), *Controlled and novel drug delivery*, CBS Publishers, New Delhi, pp. 82-84.
- Miller S, Donovan M. 1982. «Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits». *Int J Pharm* 12:147-152.
- Moorhouse R, Colegrove G, Sandford P, Baird J, Kang K. 1981. «PS-60: a new gel-forming polysaccharide», En: Brant D.A. (Ed.), *Solution Properties of Polysaccharides*, ACS Symposium series, Washington-DC, p. 111-124.
- Nanjawade B, Manvi F, Manjappa A. 2007. «In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery». *J Control Release* 122: 119-134.
- Patton T, Robinson J. 1975. «Ocular evaluation of polyvinil alcohol. Vehicle in rabbits». *J Pharm Sci* 64: 1312-1316.
- Saettone M, Chetoni P, Torraca M, Burgalassi S, Giannacini B. 1989. «Evaluation of mucoadhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid». *Int. J. Pharm.* 51: 203-212.
- Urtti A. 2006. «Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery». *Adv Drug Del Rev* 58: 1131-1135.
- USP 30-NF 25, Hypromellose En: United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rocville, MD. USA 2007, p.1573.
- Woodley J. 2001. «Bioadhesion. New Possibilities for Drug Administration?» *Clin Pharmacokinet* 40 (2): 77-84.

# Regulación del equilibrio hidromineral por el sistema renina angiotensina cerebral: papel de las especies reactivas de oxígeno

## Renin angiotensin system in the regulation hydromineral metabolism: role of the reactive oxygen species

**MAIDER VARELA, JORGE ARZOLA, SARA DE JESÚS Y ANITA ISRAEL**

### Resumen

La administración central de angiotensina II (ANG II) aumenta la excreción urinaria de sodio y potasio y disminuye el volumen urinario. Se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno (EROs), producto de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa, median las acciones periféricas de la ANG II y forman parte de la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo se conoce poco acerca de su participación en la regulación del balance hidromineral mediada por la ANG II en el sistema nervioso central (SNC). Con el fin de estudiar el papel de las EROs en el metabolismo hidromineral mediado por la ANG II cerebral, se diseñaron experimentos en los que se interrumpe la cascada de señalización de la NAD(P)H oxidasa mediante el uso de antagonistas selectivos. La administración intracerebroventricular (ICV) de ANG II en ratas produjo una disminución del volumen urinario a la hora, y un aumento en la excreción urinaria de sodio y potasio durante el período de las seis horas de recolección. La administración de un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina (APO), de un mimético de la superóxido dismutasa, el tempol (TEM), y de un inhibidor de la proteína quinasa C, la cheleritrina (CHE), revirtieron el efecto natriurético y kaliurético de la ANG II-ICV y no afectaron significativamente la antidiuresis. Estos resultados proporcionan evidencia que apoya el concepto de la participación de las EROs en la señalización de la ANG II en la función de la regulación del balance hidromineral central.

**Palabras clave:** Angiotensina II, natriuresis, apocinina, cheleritrina, tempol.

### Abstract

Central administration of angiotensin II (Ang II) is known to reduce urinary volume and to increase sodium and potassium excretion. Recently, a novel signaling mechanism for Ang II in the periphery has been shown to involve NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species (ROS), which are important intracellular messengers of many physiological and pathological effects of circulating Ang II, and are best known for their role in the pathogenesis of primary neurodegenerative diseases. However, the precise pathways and signaling mechanisms used by Ang II in the brain are incompletely understood. In order to establish the involvement of ROS in central Ang II-dependent antidiuresis, natriuresis and kaliuresis, we examined the effect of a selective NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin, the SOD mimetic, tempol, and the protein kinase C (PKC) inhibitor, chelerythrine. Intracerebroventricular administration of Ang II to conscious hydrated rats resulted in a significant decrease in urinary volume; and an increased sodium and potassium excretion during the 6-hour period of urine collection. Interference with the NAD(P)H oxidase signaling by central administration of apocynin, tempol or chelerythrine, blunted the natriuretic and kaliuretic effect induced by central administration of Ang II, without affecting its antidiuretic action. These studies demonstrate that increases of urinary sodium and potassium excretion elicited by IVT-Ang II are mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide and PKC activation.

**Key words:** Angiotensin II, natriuresis, apocynin, chelerythrine, tempol.

## Introducción

El sistema renina-angiotensina (SRA) ejerce un papel importante en la regulación de la actividad simpática, la presión arterial y el balance hidromineral (Averill y col., 2000; Seltzer y col., 2004). La administración central de angiotensina II (ANG II) produce aumento de la presión arterial, de la liberación de vasopresina, de la ingesta de agua y sal, de la excreción urinaria de sodio y potasio, y disminuye el volumen urinario y los niveles plasmáticos de sodio.

El mecanismo de señalización de la ANG II en el cerebro no ha sido esclarecido hasta el presente; sin embargo se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) son mediadores celulares importantes en muchos de sus efectos fisiológicos y patológicos. Las EROs, tales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, son moléculas derivadas de la reducción del oxígeno que, en oportunidades, actúan como segundos mensajeros en diversos tipos celulares, entre las que se encuentran las células cardiovasculares. Las EROs tienen varios orígenes, aparte de la síntesis mitocondrial, son producidas por enzimas tales como la xantina oxidasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la sintasa del óxido nítrico y la NAD(P)H oxidasa.

El metabolismo de las EROs está coordinado por diversas enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa que, mediante la dismutación de dos moléculas de superóxido, produce peróxido de hidrógeno, una ERO más estable, y que a su vez es convertido en agua por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Las EROs son producidas como respuesta a múltiples estímulos tales como hormonas, citokinas, cambios en la osmolaridad, factores de crecimiento, entre otros, mediante la estimulación de diversos receptores de membrana capaces de activar quinasas intracelulares promoviendo respuestas como la inflamación, la diferenciación y el crecimiento. Siendo consideradas mensajeros intracelulares, activan factores de transcripción que tienen múltiples funciones en la fisiología y fisiopatología de las células vasculares.

La evidencia reciente establece una relación entre la ANG II y la producción de EROs en diferentes patologías de tipo cardiovascular. Así, estudios en células de aorta aisladas de ratas Sprague-Dawley revelan que las EROs provenientes de la NAD(P)H oxidasa median la hipertrofia del músculo liso vascular y la hipertensión arterial inducida por ANG II. De igual forma, la infusión de ANG II causa disfunción endotelial, por el incremento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y con el consiguiente aumento de la producción del anión superóxido. El mecanismo

por el cual la ANG II ejerce estos efectos no se encuentra claro, sin embargo se sabe que la activación de la proteína quinasa C, de la tirosina quinasa y la producción de fosfatidilinositol-3-quinasa se encuentran involucradas. Igualmente, se ha demostrado que la ANG II produce un aumento de la expresión de las subunidades que integran a la NAD(P)H oxidasa como lo son la p22phox, nox1, nox4, y gp91phox, así como un incremento significativo de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Mollnau y col., 2002).

Existe evidencia que indica la presencia de los componentes de la NAD(P)H oxidasa en el sistema nervioso central (SNC), específicamente se ha reportado en células en cultivo del SNC (Suzukawa y col., 2000), y algunas de las subunidades han sido localizadas en el cerebro de roedores (Serrano y col., 2003). Aún más, se ha descrito actividad de la NAD(P)H oxidasa en áreas selectas del SNC que participan en la regulación de la función cardiovascular, el eflujo simpático, el equilibrio hidromineral y la función neuroendocrina como lo son el órgano subfornical (OSF), el núcleo del tracto solitario, la región ventrolateral rostral del bulbo y el hipotálamo (Chan y col., 2005; Erdős y col., 2006; Wang y col., 2004; Zimmerman y col., 2004).

Se ha sugerido que el superóxido derivado de la NAD(P)H oxidasa en el SNC cumple un papel en la apoptosis neuronal, en la isquemia por accidente cerebrovascular y en las enfermedades degenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Tammariello y col., 2000; Walter y col., 1997; Floyd, 1999). Sin embargo, además de su papel en los procesos fisiopatológicos, las EROs producidas a bajas concentraciones se encuentran implicadas en los procesos fisiológicos del SNC, especialmente en las funciones mediadas por la angiotensina II, como son la regulación cardiovascular, la ingesta de agua y la estimulación simpatoexcitatoria (Leiter y col., 2005; Erdős y col., 2006; Gao y col., 2004; Zimmermann y col., 2004).

Así, se sabe que ciertas acciones centrales de la ANG II producen la liberación de norepinefrina desde neuronas catecolaminérgicas por un incremento de la actividad eléctrica. Se ha sugerido la participación del anión superóxido como una molécula señalizadora a nivel intracelular en la modulación de la actividad nerviosa simpática por parte de la ANG II. En efecto, se demostró que la transfección de un adenovirus codificado para la Cu/Zn superóxido dismutasa reduce la simpatoexcitación en ratones con infarto al miocardio crónico, indicando que la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> con la ANG II activa el eflujo simpático por estimulación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de las EROs (Lindley y col.,

2004). De igual forma, se demostró que la administración intracerebroventricular de ANG II incrementa la actividad simpática renal en conejos sanos y en mayor proporción, en los que se les ha inducido infarto al miocardio experimental e insuficiencia cardíaca crónica. Este incremento del eflujo simpático estuvo asociado con un aumento de la producción de EROs en el área rostro-ventrolateral del bulbo y ambos efectos fueron bloqueados con el tratamiento ICV con un antagonista del receptor  $AT_1$  como el losartan, un SOD mimético como el tempol y un bloqueante de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina (Gao y col., 2004). Estos hallazgos indican que el eflujo simpático y la simpatoexcitación en la insuficiencia cardíaca crónica se encuentran mediados por la ANG II, el receptor  $AT_1$  y las EROs.

La evidencia reciente muestra que el incremento de la presión arterial y la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por la administración central de ANG II, son bloqueados cuando se sobre-expresa la superóxido dismutasa o se administra por vía intracerebroventricular (ICV) un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Erdős y col., 2006). Aún más, Lindley y col. (2004) han sugerido que las EROs median la señalización de la ANG II en el cerebro, y establecen la relación entre dicha cascada y el desarrollo de insuficiencia cardíaca por infarto al miocardio. Efectivamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas para detectar la inducción de la familia de c-fos, FosB, Fra1 y Fra2, se demostró que las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico son crónicamente activadas durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca, siendo el anión superóxido el que conduce la cascada señalizadora (Lindley y col., 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que el incremento de la presión arterial inducido por la infusión crónica de ANG II se asocia con la elevación de los niveles del anión superóxido en el OSF, una estructura circunventricular localizada fuera de la barrera hematoencefálica y rica en receptores  $AT_1$ . La transfección viral selectiva de la superóxido dismutasa al OSF previno el desarrollo de la hipertensión y de la elevación de la producción del anión superóxido, lo que demuestra que el incremento de la producción intracelular del anión superóxido en el OSF es crítico en el desarrollo de la hipertensión inducida por ANG II (Zimmerman y col., 2004).

Esta evidencia experimental proporciona una base para la comprensión del papel de las EROs como segundos mensajeros en los procesos fisiológicos del cerebro y en la regulación de la función cardiovascular; sin embargo se conoce muy poco sobre el papel de los mecanismos redox en el metabolismo hidromineral mediado por el sistema renina-

angiotensina central. Por esta razón examinamos el papel de la cascada de señalización dependiente de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta natriurética, kaliurética y antidiurética inducida por la administración central de ANG II, utilizando para ello un inhibidor selectivo de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina, un mimético de la superóxido dismutasa, el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (tempol), y un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), la chelerritrina.

## Materiales y métodos

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, de 200 a 250 gramos de peso corporal procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", las cuales fueron mantenidas con agua y alimento estándar para animales de laboratorio (Ratarina®) *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

### CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Los animales fueron canulados, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), mediante el uso de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments®), para lo cual se colocó una aguja hipodérmica de 20 GA, de 4 mm de longitud en el ventrículo lateral izquierdo, a 1 mm caudal a la sutura coronal y a 1,5 mm lateral a la sutura sagital. La administración ICV de los diferentes tratamientos se realizó mediante el uso de una inyectora Hamilton, acondicionada para permitir su adecuada penetración a través de la cánula. En todos los casos, se confirmó la canulación postmortem mediante administración de 5  $\mu$ l de solución colorante Fast Green (Sigma Chemicals Co., MO, USA), incluyendo, sólo aquellos animales en los que se observó una distribución uniforme del colorante en los ventrículos cerebrales (Severs y col., 1970).

Los animales de experimentación fueron divididos al azar en cuatro grupos experimentales para la administración de los tratamientos a seguir:

I. *Bloqueo de la NAD(P)H-oxidasa con apocinina*: 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5  $\mu$ l ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l); 3. Antagonista de NAD(P)H-oxidasa: apocinina (33  $\mu$ g/kg/5  $\mu$ l, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento); 4. Apocinina+ANG II.

II. *Administración de un SOD mimético: el tempol*: 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5  $\mu$ l ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l); 3. Tempol (100  $\mu$ g/5 $\mu$ l,

ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento);  
4. Tempol+ANG II.

III. *Bloqueo de la proteína kinasa C (PKC) con cloruro de cheleritrina (CH)*: 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5 µl ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5µl); 3. Antagonista de PKC (CH) (50 µM/5µl ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento); 4. CH+ANG II.

Inmediatamente después de cada uno de los tratamientos los animales recibieron una carga oral de agua (20 ml/kg, p.c.) y fueron colocados en jaulas metabólicas individuales sin acceso a agua ni alimento. Se recolectaron muestras de orina a las 1, 3 y 6 h. Se determinó la excreción urinaria de sodio y potasio.

#### DETERMINACIÓN DE NA<sup>+</sup> Y K<sup>+</sup> URINARIO

La cantidad de sodio y potasio en las muestras de orina recolectadas se determinó por fotometría de llama (Corning® 405 de Corning Medical Instruments, UK). Los resultados se expresaron en µEq/100 g, p.c.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media, más o menos el error estándar de la media ( $X \pm E.E.M$ ). La significancia estadística fue determinada usando la prueba de «t» de Student o el análisis de varianza de dos vías (ANOVA), y por el rango estadístico de Student-Newman-Keul. Se consideró como estadísticamente significativos los valores de *p* menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

### *Efecto de la administración central de la apocinina sobre la acción renal de la ANG II-ICV*

En la figura 1 se muestra el efecto de la apocinina sobre la acción urinaria de la ANG II administrada centralmente. El análisis de varianza de dos vías y la prueba de Newman-Keul revelaron que en este grupo experimental, la ANG II reduce significativamente el volumen urinario a la primera hora, efecto que es revertido a las 3 y 6 horas. El efecto de la ANG II sobre el volumen urinario estuvo asociado con un incremento de la excreción de sodio y potasio urinario a los períodos de recolección de orina de 3 y 6 hrs. El pretratamiento central con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina, no alteró significativamente la acción de la ANG II sobre el volumen urinario, sin embargo bloqueó su efecto natriurético y kaliurético (N= 12-30 por grupo). (Vol: V-ANG II<V-S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA  $p < 0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V S<V-ANG II, ANOVA  $p < 0,01$ ).

### *Efecto de la administración central del tempol, un SOD mimético, sobre la acción renal de la ANG II-ICV*

En la figura 2 se muestra que la ANG II-ICV reduce significativamente el volumen urinario a la hora, efecto que se revierte a las 3 y 6 HRS. De igual forma, la acción de la ANG II estuvo asociada a un

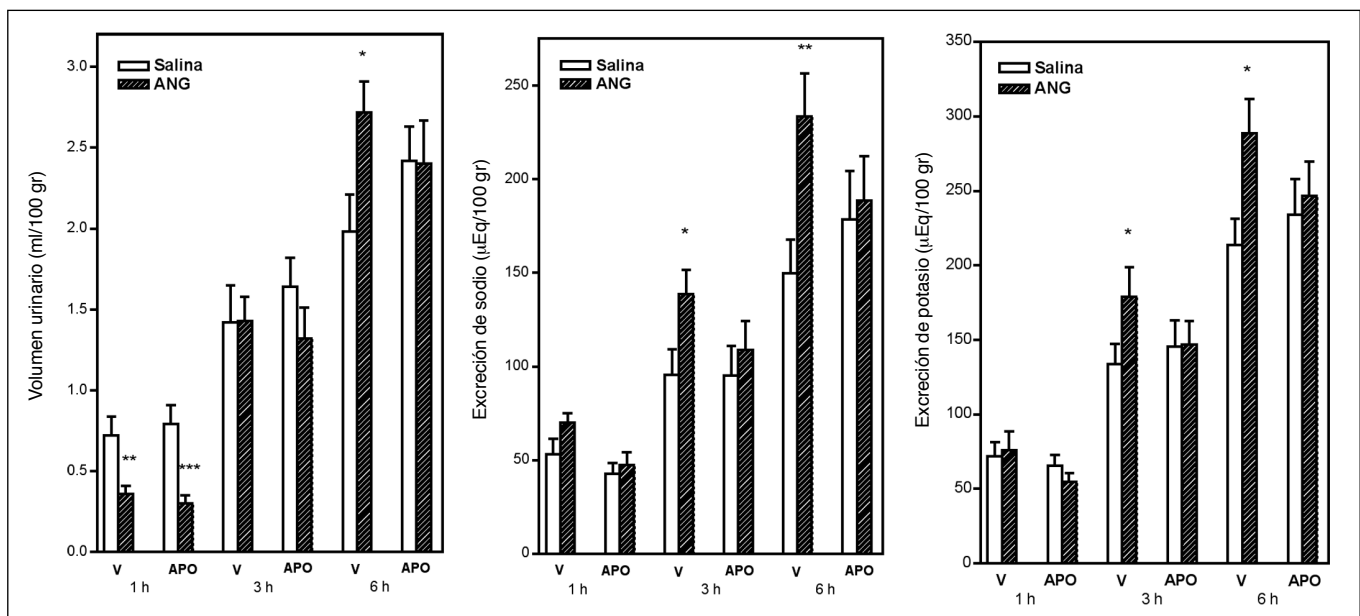


Figura 1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA NAD(P)H OXIDASA, LA APOCININA, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5 µl ICV o angiotensina II (50 pmol/5µl) o el antagonista de NAD(P)H-oxidasa: apocinina (33 µg/kg/5 µl, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o APO+ANG II. (N= 12-30 por grupo). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con su control.

aumento de la excreción urinaria de sodio y potasio a las 1, 3 y 6 horas. El pretratamiento con el tempol, un superóxido dismutasa mimético, no alteró el efecto antidiurético de la ANG II-ICV, pero bloqueó su acción natriurética y kaliurética a las 1, 3 y 6 hrs (N= 12-24 por grupo). (Vol: V-ANG II<V S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA,  $p<0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V-S<V-ANG II, ANOVA:  $p<0,01$ ).

### **Efecto de la administración central del inhibidor de la PKC, la cheleritrina, sobre la acción renal de la ANG II-ICV**

En la figura 3 se muestra el volumen urinario y la excreción de sodio y potasio en ratas hidratadas tratadas con cheleritrina. El análisis de varianza de dos vías y la prueba de Newman-Keul demostraron que la ANG II-ICV reduce significativamente el volumen urinario a la hora, e incrementa la excreción urinaria de sodio y potasio a las 3 y 6 horas. El inhibidor selectivo de la PKC, la cheleritrina, administrado centralmente no alteró el efecto antidiurético de la ANG II-ICV, sin embargo bloqueó completamente las acciones natriuréticas y kaliuréticas a las 3 y 6 horas (N= 12-26 por grupo). (Vol: V-ANG II<V S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA  $p<0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V-S<V-ANG II, ANOVA  $p<0,01$ ).

## **Discusión**

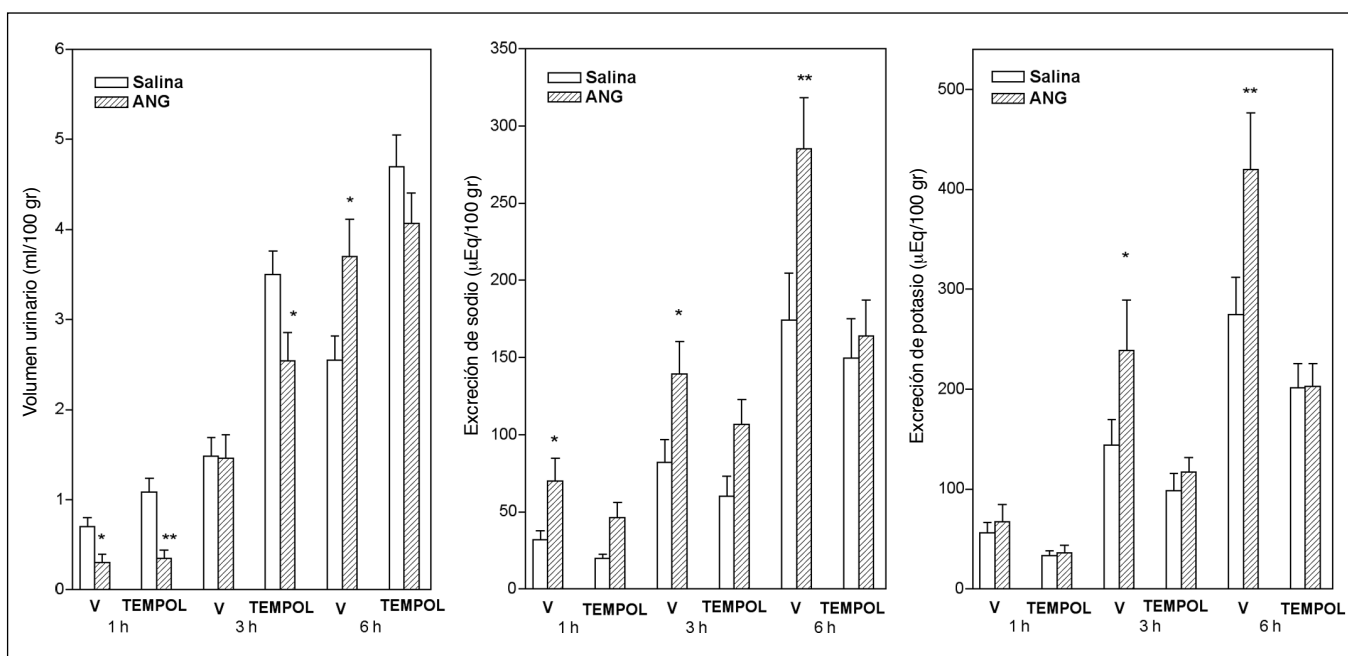
La estabilidad del medio interno requiere de mecanismos fisiológicos complejos capaces de man-

tener las concentraciones de electrolitos dentro de límites adecuados para la supervivencia del organismo. Todos esos procesos son debidamente regulados e integrados de manera que conforman una unidad global en el ser vivo. En los animales superiores, uno de esos mecanismos que han evolucionado en el tiempo como regulador del medio interno es el sistema renina-angiotensina (SRA). A nivel periférico, el SRA constituye uno de los más importantes sistemas que participan en el control de los niveles de agua y sodio en el organismo, así como en la regulación de la presión arterial.

La evidencia demuestra que existe en el cerebro un sistema renina-angiotensina activo, el cual participa en el control homeostático y cardiovascular. En efecto, todos los componentes del SRA, así como sus ARNm, han sido detectados en diferentes áreas del sistema nervioso central (Zini y col., 1996).

La administración central de ANG II o renina produce aumento de la presión arterial, dipsogenia, aumento del apetito por la sal, antidiuresis y, contrariamente a lo que produce periféricamente, incrementa la excreción urinaria de sodio (Itoh y col., 1988; Wright y Harding, 1997; Unger y col., 1996; Barbella y col., 1993). El mecanismo y los posibles efectores involucrados en la natriuresis inducida por la ANG II, no están aún bien establecidos.

Se conoce que las acciones fisiológicas que media la ANG II en el sistema nervioso central se encuentran relacionadas con las EROs y la estimulación



**Figura 2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL SOD MIMÉTICO, EL TEMPOL, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5 µl ICV o angiotensina II (50 pmol/5µl) o tempol (100 µg/5 µl, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o tempol+ANG II. (N= 12-24 por grupo). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  comparado con su control.**

de la NAD(P)H oxidasa (Sun y col., 2005; Zimmerman y col., 2004; Gao y col., 2005). En efecto, se ha demostrado que la sobre-expresión de la isoforma de la proteína Rac1 dominante-negativa (carente) en el ratón bloquea la respuesta presora, bradicárdica y dipsogénica inducida por la ANG II mientras que la sobre-expresión de la Rac1 la incrementa (Zimmerman y col., 2002). La respuesta presora y dipsogénica es también abolida por la administración ICV de gp91ds-tat, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Sun y col., 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que la ANG II incrementa la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa, así como la tasa de disparo de las neuronas en cultivos neuronales de hipotálamo y tallo cerebral, efecto que es atenuado por la gp91ds-tat (Sun y col., 2005). Aún más, la respuesta presora y bradicardizante inducida por la administración central de ANG II es abolida por la administración central de la apocinina, un compuesto que inhibe el ensamblaje de la subunidad p47phox de la NAD(P)H con el complejo de la enzima unido a la membrana (Erdős y col., 2006).

Nuestros resultados muestran que el incremento en la excreción urinaria de sodio y potasio inducidos por la ANG II-ICV es inhibido completamente con el pretratamiento con la apocinina, lo cual indica, de forma inequívoca, que la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa media la natriuresis y kaliuresis inducida por la administración central de angiotensina II en ratas conscientes.

Con el fin de establecer el papel del superóxido como molécula señalizadora en la acción central de la ANG II sobre el metabolismo hidromineral, empleamos el tempol, una molécula atrapadora de superóxido (Mok y col., 1998) capaz de normalizar la presión arterial y la producción de superóxido en modelos animales de hipertensión (Schnackenberg y col., 1998; Noshiyama y col., 2001). Los efectos natriurético y kaliurético de la ANG II son bloqueados completamente, *in vivo*, por el tempol, lo cual indica la participación del anión superóxido en el mecanismo de regulación del balance hidromineral mediado por la ANG II en el sistema nervioso central.

Hay que hacer notar que el efecto antidiurético de la ANG II fue resistente al bloqueo de la señalización de la vía de la NAD(P)H oxidasa, lo que sugiere que bajo nuestras condiciones experimentales, la secreción de vasopresina inducida por la ANG II es independiente de la producción de las EROs.

Se ha demostrado que la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> neuronal por la ANG II activa a la PKC y a la quinasa dependiente de calcio-calmodulina, las cuales tienen un papel crítico en la regulación de la actividad nerviosa y de la corriente de potasio (I<sub>kv</sub>) neuronal (Sumners y col., 2002). Hay evidencia experimental que establece una relación entre estas dos quinasas y la producción de las EROs en muchos tipos de células, incluyendo a las neuronas (Lassegue y Clempus, 2003). Fleegal y Sumners (2003) demostraron que la ANG II estimula la actividad de ambas quinasas en el

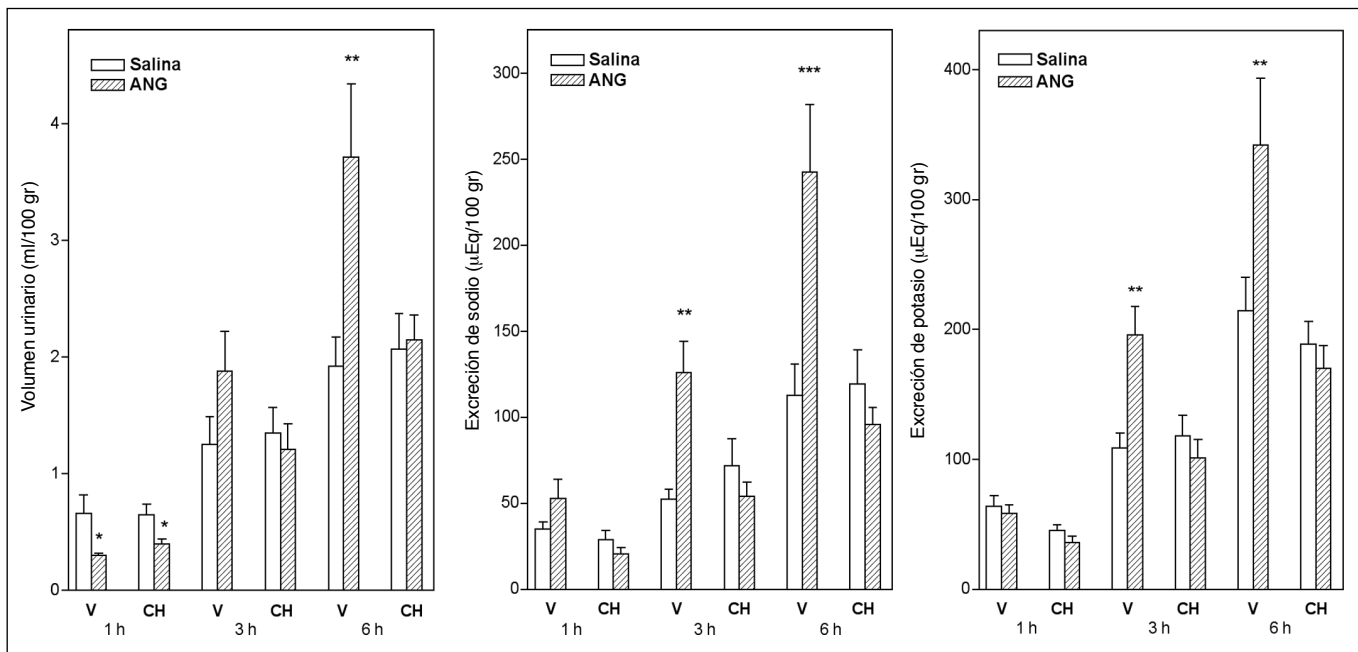


Figura 3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA PKC, LA CHELERITRINA, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5  $\mu$ l ICV o angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l) o inhibidor de la PKC (CH) (50  $\mu$ M/5 $\mu$ l ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o CH+ANG II. (N= 12-26 por grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 comparado con su control.

hipotálamo y que su inhibición atenúa la acción dipsogénica de la ANG II-ICV. Estos resultados, y los obtenidos en nuestro laboratorio utilizando un inhibidor de la PKC, la cheleritrina, en donde se evidencia un bloqueo completo de la excreción urinaria de sodio y potasio inducida por la ANG II, apoyan la posibilidad de que la estimulación de la PKC forma parte del mecanismo mediante el cual la ANG II ejerce su efecto sobre la regulación hidroelectrolítica del medio interno.

El mecanismo intracelular mediante el cual la NAD(P)H oxidasa podría estar implicada en la acción central de la angiotensina II no está claro aún. En los tejidos periféricos, existe evidencia de que la actividad de la NAD(P)H oxidasa es regulada por la PKC (Griendling y col., 2000; Lassegue y Clempus, 2003), enzima que también es activada por la ANG II en neuronas (Sumners y Fleegal, 2002). Adicionalmente, el anión superóxido producido en respuesta a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa por la ANG II, secuestra el óxido nítrico, el cual se sabe que inhibe la actividad del sistema nervioso simpático (Krukoff, 1999; Zanzinger, 2002); por lo que la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico generaría simpatoexcitación. Se ha demostrado, también, que las EROs ejercen un efecto modulador de la liberación de  $Ca^{+2}$  (Volk y col., 1997) y que existe relación entre la NAD(P)H oxidasa y el metabolismo de los fosfoinosítidos (Bravo y col., 2001). Finalmente, se sabe que las EROs son capaces de alterar la función de los canales de potasio en células del músculo liso vascular (Armstead, 2001), y que en el SNC la angiotensina II también es capaz de inhibir las corrientes de  $K^{+}$  en neuronas aumentando la tasa de descarga (Sun y col., 2005).

Estos hallazgos nos permiten inferir que la activación de los receptores  $AT_1$ , acoplados a proteínas G, conlleva a la estimulación de la proteína quinasa C y a la modulación de los canales de potasio y el disparo neuronal; o bien a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio. Estas rutas de señalización podrían ser las responsables de la acción presora, dispogénica y natriurética de la ANG II en el SNC.

## Referencias bibliográficas

- Armstead WM. 2001. Vasopressin-induced protein kinase C-dependent superoxide generation contributes to ATP-sensitive potassium channel brain injury. *Stroke* 32:1408-1414.
- Averill DB, Diz DI. 2000. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull* 51:119-128.
- Barbella Y, Cierco M, Israel A. 1993. Effect of losartan a non peptide angiotensin II receptor antagonist on drinking behavior and renal actions of centrally administered renin. *P.S.E.B.M.* 202: 401-406.
- Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJG, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L, Willimans RL. 2001. The crystal structure of the PX domain from, p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3 phosphate. *Mol Cell* 8:829-839.
- Bobik A. 2003. Intracellular signaling pathways regulating vascular NAD(P)H oxidase and hypertension: an opportunity for development of novel antihypertensive agents?. *J Hypertension* 21: 859-861.
- Chan S, Hsu K, Huang Ch, Wang L, Ou Ch, Chan J. 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.* 97:772-780.
- Erdős B, Broxson Ch, King M, Scarpace P, Tümer N. 2006. Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *J Hypertension* 24:109-116.
- Fleegal M, Sumners C. 2003. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and  $Ca^{+2}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R632-R640.
- Floyd RA. 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236-245.
- Gao L, Wang W, Li Y, Schultz H, Liu D, Cornish K, Zucker I. 2005. Sympathoexcitation by central ANG II: roles for  $AT_1$  receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RLVM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2271-H2279.
- Gao L, Wang W, Li Y, Schultz H, Liu D, Cornish K, Zucker I. 2004. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure, roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res* 95:937-944.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Itoh H, Nakao K, Yamada T, Morji N, Shiono S, Sugawara A, Saito Y, Mukoyama M, Arai H, Imura H. 1988. Central interaction of brain atrial natriuretic polypeptide (ANP) system and the brain renin-angiotensin system in ANP secretion from the heart: evidence for possible brain-heart axis. *Can J Physiol Pharmacol* 66:255-261.
- Kazama K, Anrather J, Zhou P, Girouard H, Frys K, Milner T, Iadecola C. 2004. Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NAD(P)H oxidase-derived radicals. *Circ Res.* 95:1019-1026.
- Krukoff TL. 1999. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 52-65.
- Lassegue B, Clempus RE. 2003. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-R297.

- Leiter LA, Lewanczu KRZ. 2005. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens* 18:121-128.
- Lindley T, Doobay M, Sharma R, Davisson R. 2004. Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res* 94:402-409.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov A, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. 2002. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90:e58-e65.
- Mok JS, Paisley K, Martin W. 1998. Inhibition of nitroergic neurotransmission in the bovine retractor penis muscle by an oxidant stress: effects of superoxide dismutase mimetic. *Br J Pharmacol* 124: 111-118.
- Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, Abe Y. 2001. Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 37:77-83.
- Ohtsu H, Frank G, Utsunomiya H, Eguchi S. 2005. Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7:1315-1326.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. 1998. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59-64.
- Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. 2004. Oral administration of an AT<sub>1</sub> receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1028:9-18.
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. 2003. NAD(P)H oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988:193-198.
- Seshiah P, Weber D, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling K. 2002. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H. *Circ Res* 91:406-413.
- Severs WB, Summy-Long J, Taylor J, Connor JA. 1970. Central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material. *J Pharmacol Exp Ther* 74: 27-34.
- Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, Kamata T. 2000. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275:13175-13178.
- Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. 2005. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 95:532-539.
- Sumners C, Fleegal MA, Zhu M. 2002. Angiotensin AT<sub>1</sub> receptor signalling pathway in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:483-490.
- Tammariello SP, Quinn MT, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:RC53.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. 1996. Angiotensin receptors. *J Hypertens* 14 (Suppl. 5): S95-S103.
- Volk T, Hensel M, Kox WJ. 1997. Transient Ca<sup>2+</sup> changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 171:11-21.
- Walter J, Grünberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C. 1997. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13; 94:5349-5354.
- Wang G, Anrather J, Huang J, Speth R, Pickel V, Iadecola C. 2004. NADPH Oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *Journal Neurosci* 24:5516-5524.
- Wright JW, Harding JW. 1997. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Behav Rev* 18: 21-53.
- Zanzinger J. 2002. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 98:24-27.
- Zimmerman M, Dunlay R, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma R, Engelhardt J, Davisson R. 2004. Requirement for Rac1-Dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res*. 95:532-539.
- Zimmerman M, Lazartigues E, Lang J, Sinnayah P, Ahmad I, Spitz D, Davisson R. 2002. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.
- Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques B, Corvol P, Llorens-Cortes C. 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 232: 11968-11973.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado a través del Proyecto IIF-10-2005 del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia y el Proyecto CDCH N° PG-06-30-5203-2006 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV.

## Addendum

Este trabajo ha sido galardonado con el Premio a la Investigación del Estudiante de Pregrado en su primera edición, del año 2008, otorgado por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la UCV.

**Recibido:** 15 de septiembre de 2008

**Aceptado:** 14 de diciembre de 2008

# Efecto de la *Cedrela odorata* sobre indicadores de estabilidad física en dispersiones de lipoesferas

## Influence of *Cedrella odorata* on physical stability indicators of lipospheres dispersion

MÓNICA J BUONANNO R, GISELA ÁVILA DE A, DORIS ATTÍAS DE G

### Resumen

Los exudados gomosos tienen una amplia aplicación en el área farmacéutica y cosmética, como agentes promotores de estabilidad física, por sus características propias que permiten utilizarlos tanto como agentes emulsificantes, gelificantes, así como viscosantes y suspensores en los sistemas heterogéneos, en los cuales, la principal causa de inestabilidad física es la sedimentación de la fase interna. La *Cedrela odorata* se encuentra dentro de este tipo de agentes. Nuestro objetivo es la evaluación de las propiedades hidrodinámicas de lipoesferas en dispersión acuosa de *Cedrela odorata* al 5%. Los resultados muestran que las lipoesferas en dispersión acuosa, presentan una alta velocidad de sedimentación, mientras que, al utilizar como vehículo la dispersión acuosa de *Cedrela odorata*, se reduce de manera importante la velocidad de sedimentación de la fase interna del sistema analizado. Concluyéndose que la dispersión de *Cedrela odorata* al 5% permite disminuir la inestabilidad física, mejorando las características del sistema en estudio.

**Palabras clave:** Exudado gomoso, *Cedrela odorata*, Velocidad de sedimentación.

### Abstract

The gummy exudate, are useful in the pharmaceutical and cosmetic field, like stability promoting agent, by their characteristics, allowing use as emulsifying, jellying, viscosity and suspending agents on heterogeneous systems; in which the main cause of instability physics is the sedimentation of the internal phase. The *Cedrela odorata* is in this type of agents. Our objective is the evaluation of the hydrodynamic properties of lipospheres in *Cedrela odorata* dispersion at 5%. The results of the study show, high speed sedimentation by the lipospheres in water, whereas when, using *Cedrela odorata* dispersion slower rates of sedimentation significantly. Results suggest that *Cedrela odorata* dispersion at 5%, allows reduce instability physics improving the characteristics of the system under study

**Key words:** Gummy exudates, *Cedrela odorata*; sedimentation rate.

### Introducción

Una de las herramientas tecnológicas más útiles para evitar problemas de inestabilidad, es la utilización de agentes promotores de viscosidad; pues ellos, como su nombre lo indica, favorecen un incremento en la viscosidad de los sistemas que los contienen y, con ello, disminuyen las inestabilidades de orden físico. Razón por la cual, estos agentes son considerados estabilizantes de los sistemas heterogéneos en general. Comúnmente, los polímeros son los que se emplean como agentes suspensores o viscosantes.

Las gomas son definidas como materiales poliméricos naturales, capaces de disolverse o dispersarse en el agua. En términos científicos se denominan hidrocoloides y entre éstos encontramos gomas naturales, modificadas sintéticamente y sintéticas. Los exudados gomosos pertenecen al primer grupo, llamados también gomas vegetales, gomas solubles en agua, coloides hidrofílicos o fibras dietéticas solubles (Anderson y Brydon, 1986).

Los exudados gomosos son productos naturales que excretan las plantas de regímenes tropicales y subtropicales, en condiciones adversas, y aparecen

como una respuesta a la práctica de herida mecánica espontánea, accidental o intencional a nivel del tallo, por remoción de una rama o por la presencia de insectos, bacterias u hongos (León de Pinto y col., 1989).

La exudación de la goma se ha considerado como un producto del metabolismo de las plantas. Los exudados gomosos, polímeros de gran aplicación industrial (León de Pinto, 1979), pueden estar constituidos por unidades de hexosas (galactosa, manosa, glucosa), pentosas (arabinosa y xilosa), metil-pentosas (ramnosa) y ácidos urónicos (ácidos galacturónico, glucurónico y su 4-O-metil-éter). La mayoría de las gomas estudiadas tienen estructuras en las que un galactano ramificado constituye el esqueleto central; sus ramificaciones están, preferentemente, constituidas por galactosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos (León de Pinto y col., 1992; León de Pinto y col., 1993). Se ha reportado recientemente un heteroglucano, de núcleo estructural atípico para las gomas de *Cercidium praecox* (León de Pinto y col., 1994) y de *Cedrela odorata* (León de Pinto y col., 1996).

Se han realizado estudios físico-químicos y estructurales de algunos de estos polímeros tanto en la Universidad del Zulia como en la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia (Ávila, 1991), y se ha demostrado que algunas de las gomas nativas tienen características que les permiten competir con las presentadas por la *Acacia senegal* en sus múltiples aplicaciones. Los exudados gomosos tienen numerosas aplicaciones en productos de consumo; las aplicaciones tradicionales se refieren a funciones como espesantes (Andon, 1987), emulsificantes (Judie, 1991), gelificantes (Rees, 1972), y recientemente se han estudiado sus características como viscosantes (Buonanno y col., 2004). Entre estos agentes se encuentra el exudado de la *Cedrela odorata*, de la cual se ha reportado su comportamiento reológico como agente estabilizante de sistemas heterogéneos (Buonanno y col., 2004). El presente trabajo pretende evaluar las características hidrodinámicas de las lipoesferas en el marco de dispersiones acuosas y con componentes macromoleculares, y de esta manera establecer con futuras investigaciones su compatibilidad y las ventajas que puedan generar este tipo de dispersiones en la efectividad desde el punto de vista cosmético.

Desde que los liposomas constituyen parte de una nueva forma de liberación de principios activos y que, dentro de este tipo de vectores existen las lipoesferas, que son formas con mayor estabilidad que los liposomas, surge la inquietud de trabajar con

estos vectores para determinar sus características propias y su comportamiento hidrodinámico. Adicionalmente, considerando que los exudados gomosos presentan propiedades como vehículos estructurados, los cuales permiten disminuir la velocidad de sedimentación en los sistemas heterogéneos, se evaluaron las características propias de las lipoesferas y el efecto que sobre éstas podría tener la incorporación de un derivado macromolecular de origen natural como lo es el exudado de *Cedrela odorata*.

## Materiales y métodos

Se utilizaron como componentes del sistema, el exudado gomoso de la *Cedrela odorata* y lipoesferas contentivas de vitaminas A y E.

Las muestras del exudado gomoso de la *Cedrela odorata* fueron suministradas por el Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales de la Universidad del Zulia. La *Cedrela odorata*, conocida como cedro americano, es un árbol de la familia de las Meliáceas de regiones tropicales de América. Sus nombres comunes son: cedro acajou, cedro español, cedro de las barbares, cedro de Guyana. Esta especie fue debidamente clasificada por la licenciada Carmen Clomens, de la Universidad del Zulia. Su recolección se realizó en periodos no lluviosos del año, en la localidad de Guamo, estado Yaracuy. Para estimular la producción del exudado se practicó una herida a nivel del tallo. Las muestras del exudado fueron suministradas en forma cruda y pulverizada.

Las muestras de lipoesferas fueron suministradas por Lipo Technologies. Se recibieron muestras de lipoesferas L1045 y L954, ambas con el mismo contenido de vitaminas A y E, siendo la única diferencia el color de la película que las recubre; en el primer caso un color rojo y en el segundo una cubierta de color blanco; ambas en vehículo acuoso con sus correspondientes preservativos.

Para la determinación de la distribución de tamaños de las lipoesferas en el vehículo acuoso y en la dispersión de *Cedrela odorata* al 5%, se elaboraron dispersiones en proporción de 1:10 de lipoesferas en agua y en exudado macromolecular. Para la determinación de la distribución de tamaños se utilizó un analizador de tamaño de partícula por dispersión de láser (Coulter LS Particle Size Analyser), modelo LS 230 con módulo de pequeños volúmenes para suspensión, utilizando un modelo óptico de Fraunhofer. El tiempo de corrida fue de 60 segundos, utilizando agua como fluido; se obtuvo la gráfica del porcentaje de partícula en número, en función del diámetro de esas partículas en micrómetros, el cual se funda-

menta en la difracción del rayo láser y a través de ésta permite conocer el tamaño de las partículas analizadas (Allen, 1990). Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada dispersión de lipoesferas al tiempo 0, 1, 2, 7 y 15 días.

Para la determinación de la variación de la conducta hidrodinámica de lipoesferas en dispersión acuosa de la *Cedrela odorata* en función de la velocidad de sedimentación, se elaboraron dispersiones de *Cedrela odorata* al 5% en agua desionizada y a éstas se les incorporó lipoesferas en una proporción de 1:10, tanto para las L1045 como para las L954.

La determinación de velocidad de sedimentación se realizó mediante el uso del dispositivo Turbiscan 2000 MA. El fundamento consiste en hacer incidir una cantidad de energía en forma de fotones a través de la solución que se va a analizar. Una parte de la energía incidente logra atravesar la muestra y es detectada mediante un diodo; se dice que es la energía transmitida. Por el contrario, a la energía que no logra atravesar la muestra se le llama energía de retrodifusión (Back Scattering). La prueba en el Turbiscan MA 2000 es un barrido de energía luminosa a lo largo de la longitud de un tubo de ensayo en el que se encuentra la muestra. A cada 0,5 mm de la longitud del tubo, el Turbiscan libera un pulso de fotones que son detectados en modo de transmisión y retro-difusión por los respectivos diodos. En el tiempo se registra la evolución de la señal de transmisión y retro-difusión; la interpretación de la secuencia que muestra la señal permite determinar si la emulsión es estable o si ésta sigue un mecanismo de desestabilización. En consecuencia, el equipo mide los parámetros de *retro-difusión* y *energía transmitida* en función de la longitud de la celda en donde se coloca la muestra. Es importante destacar que ambos parámetros dependen de la distribución de las partículas en la muestra que es analizada. Las lecturas pueden registrarse de acuerdo con el fenómeno que se decide observar, en función de las características de la muestra. Por ende, al hablar de porcentaje de transmisión o porcentaje de luz que retorna en el tiempo se indica la tendencia a sedimentar o flocular que tiene el sistema. La distancia o longitud en milímetros a la que aparece el pico o el valle de luz que retorna o que es transmitida, es indicativo de los milímetros que ocupa el sedimento o la floculación en ese sistema. Así mismo, puede interpretarse la formación de un sedimento en el tiempo por descenso del porcentaje de luz transmitida, durante el registro realizado, o por incremento del porcentaje de luz que retorna o «Back Scattering». Este equipo está dotado de un software que permite programar el intervalo de lectura deseado, el cual deberá ser estandarizado en función de la muestra.

Para utilizar este equipo fue necesario observar y conocer las características ópticas de las partículas y dispersiones que se estudian. Razón por la cual se determinó a las lipoesferas el índice de refracción para establecer el parámetro que permitiera obtener mejores resultados, pues podría presentarse el caso de partículas que absorban luz y por ende no se generen picos de luz al utilizar como referencia el «Back Scattering». Aun cuando existe sedimentación, en tal caso sería necesario realizar la lectura en términos de luz transmitida para poder obtener resultados acordes con la realidad del sistema.

Para realizar las determinaciones se colocaron aproximadamente 7 ml de las dispersiones dentro de la celda del Turbiscan. Estas muestras se corrieron tres veces y cada registro tuvo un tiempo de 30 minutos para las lecturas. Se realizaron lecturas de muestras al tiempo 0 es decir inmediatamente después de elaborada la muestra, a 7 días y a 15 días. Durante el intervalo de tiempo las muestras se mantuvieron en condiciones de temperatura  $\pm 10$  °C para evitar la contaminación de las mismas y previo a las lecturas se mantuvieron una hora a temperatura ambiente de 25 °C.

## Resultados

A partir de los datos recopilados se obtuvieron los siguientes resultados (ver tabla I):

En la Tabla I se muestran los resultados correspondientes a la determinación de la distribución de los tamaños de las lipoesferas L954 y L1045, tanto en agua como en la dispersión de *Cedrela odorata*, en función del tiempo.

Se observa en la misma que la distribución de tamaños, para ambos casos, permanece casi invariable en el tiempo del estudio. Así mismo se establece una diferencia entre las lipoesferas L954 y las L1045, pues para el primer caso existe una distribución de 68% de la muestra entre 1333 y 685,86 micras; mientras para el segundo caso la distribución de 68% de la muestra se encuentra entre 1508 y 737,93 micras.

Esta diferencia en los tamaños podría ser la responsable de las variaciones de velocidad de sedimentación que se evidenciaron entre las lipoesferas L954 y L1045; pues dentro de las variables que afectan este parámetro, el tamaño de las partículas es de importancia relevante.

En la Figura 1 se representa el tiempo de sedimentación de la dispersión de lipoesferas L954 en agua. En el eje de las ordenadas se representa el porcentaje de luz transmitida y en las abscisas el tiempo

Tabla I

Sistema	L954 en agua			L1045 en agua			L954 en disp. C.odorata			L1045 en disp C.odorata		
Distribución de tamaños menor que Límite Superior												
Tiempo de lectura	D90	D16	D84	D90	D16	D84	D90	D16	D84	D90	D16	D84
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
T0d	1482	685,86	1333	1656	737,93	1508	1347	288,83	1141	1348	291,3	1142,6
T7d	1483	685	1334	1656	736,81	1508	1347	288,83	1141	1348	291,3	1142,6
T15d	1482	685,86	1333,5	1656	736,81	1508	1347	288,83	1141	1348	291,3	1142,6
Promedio	1482,3	685,57	1333,5	1656	737,18	1508	1347	288,83	1141	1348	291,3	1142,6
Ds	0,5774	0,4965	0,50	0	0,6466	0	0	0	0	0	0	0

Resumen de los valores de tamaño de partículas obtenidos durante el estudio entre el tiempo 0 y 15 días

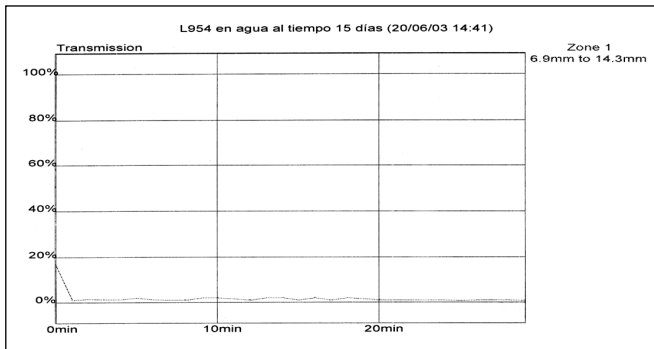


Figura 1. Determinación del tiempo de sedimentación de la lipoesfera L954 en dispersión acuosa.

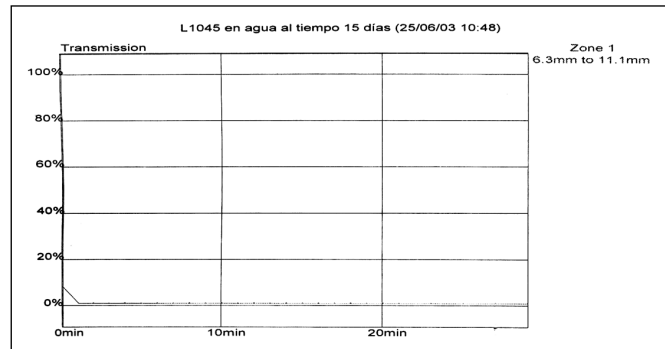


Figura 3. Determinación del tiempo de sedimentación de la lipoesferas de L1045 en dispersión acuosa.

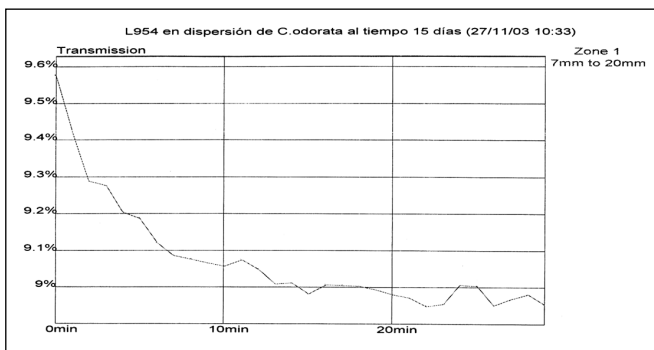


Figura 2. Determinación del tiempo de sedimentación de la lipoesfera L954 en dispersión de *Cedrela odorata*

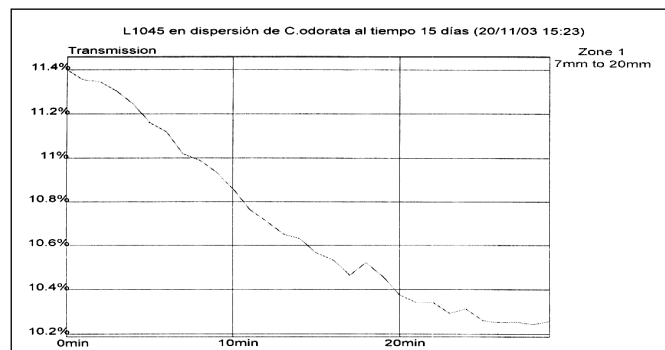


Figura 4. Determinación del tiempo de sedimentación de lipoesferas de L1045 en dispersión de *Cedrela odorata*

en minutos. Este gráfico permite establecer el tiempo en el que se genera el sedimento en función de la disminución del porcentaje de luz transmitida. Por ello, sobre esta base podemos establecer que la dispersión acuosa de las lipoesferas genera sedimento de partículas a partir de los 2 minutos, por lo que se observa un porcentaje de luz transmitida muy cercano a 0%. Mientras que, para el caso de las lipoesferas L954 en dispersión de *Cedrela odorata*, que se

representa en la Figura 2, se observa un descenso del porcentaje de luz transmitida, sin llegar a niveles cercanos a 0% como ocurría con la dispersión de lipoesferas en agua; lo cual es indicativo del efecto retardante en la sedimentación que genera la dispersión macromolecular utilizada en el estudio.

En la Figura 3 se representa el tiempo de sedimentación de la dispersión de lipoesferas de L1045 en agua. En el eje de las ordenadas se representa el

porcentaje de luz transmitida y en las abscisas el tiempo en minutos. Mediante esta representación se establece el tiempo en el que se genera el sedimento como consecuencia de la disminución del porcentaje de luz transmitida. Por ende, sobre esta base y de acuerdo con lo observado en la Figura 3, podemos establecer que la dispersión acuosa de lipoesferas genera sedimento de partículas a partir de 1 minuto, por lo que se observa un porcentaje de luz transmitida muy cercano a 0. Por otra parte, el caso de las lipoesferas de L1045 en dispersión de *Cedrela odorata* que se representa en la Figura 4, se observa un descenso del porcentaje de luz transmitida, sin llegar a niveles cercanos a 0% como ocurría con la dispersión de lipoesferas en agua; lo cual es indicativo del efecto retardante en la sedimentación que genera la dispersión macromolecular utilizada en el estudio.

Nuestros hallazgos demuestran que la dispersión macromolecular de *Cedrela odorata* al 5% utilizada en el presente estudio permite disminuir la sedimentación de las lipoesferas L954 y las L1045, con lo cual se genera un sistema físicamente más estable desde el punto de vista de separación de fases. Esto se explica sobre la base de que la *Cedrela odorata* en su dispersión acuosa, da lugar a la formación de una red macromolecular, generándose un incremento en el rango de viscosidad del sistema como tal (Buonanno y col., 2004). El mismo permitirá mantener la fase interna, que en este caso son las lipoesferas, dispersas por más tiempo, dando lugar a un descenso en la velocidad con la que sedimentan (Patel y Levinson, 1986).

## Conclusiones

Los resultados del presente trabajo indican que:

- Las lipoesferas L954 y L1045 analizadas en vehículo acuoso poseen una distribución de tamaños heterogénea en ambos casos, siendo que el 68% de la lipoesferas L954 presenta un tamaño mayor o igual que 685,57 micras y menor o igual que 1333,5 micras; mientras que las lipoesferas L1045 están entre mayores o iguales que 737,18 micras y menores o iguales que 1508 micras, con diferencia en el comportamiento hidrodinámico de las partículas que conforman al sistema. Para las L954 el D90 presenta un valor de 1482 micras y para el caso de las L1045 el D90 corresponde a un valor de 1656 desde el tiempo 0 días hasta el tiempo 15 días. Esta distribución de partículas no presenta variaciones durante el tiempo en el que se realizó el estudio.

- Los sistemas de lipoesferas L954 y L1045 en dispersión acuosa de *Cedrela odorata* al 5% presentaron una distribución de tamaños que sigue siendo heterogénea, ya que para las L954 el 68% de la muestra está comprendida entre 288,83 micras y 1.141 micras, y para las lipoesferas L1045 el 68% de la muestra presenta una distribución entre 291,3 micras y 1.142,6 micras, considerándose los límites de rangos inclusive para ambos casos. El valor del D90 para la dispersión de lipoesferas L954 corresponde a 1.347 micras y para las L1045 a 1.348 micras y se mantiene durante el tiempo del estudio.

- Los sistemas de lipoesferas en agua, tanto para las L954 como para las L1045, tienen una velocidad de sedimentación alta, lo cual permite considerarlos como físicamente inestables. Este comportamiento se mantiene en el tiempo y se le atribuye, tomando en consideración la Ley de Stokes, al rango de tamaño que presentan las lipoesferas y a la baja viscosidad del medio, el cual en este caso es agua.

- Las lipoesferas L954 y las L1045 en dispersión acuosa de *Cedrela odorata* al 5%, muestran una velocidad de sedimentación disminuida con respecto a las lipoesferas en agua, y esto podría sustentarse sobre la base de que la *Cedrela odorata* en su dispersión acuosa, da lugar a la formación de una red macromolecular, lo cual genera un incremento en la viscosidad del sistema como tal. Éste comportamiento prevalece en el tiempo correspondiente al estudio. Por ende, podemos considerar que la dispersión acuosa de *Cedrela odorata* al 5% es capaz de impartir viscosidad al sistema, resultando esto en una mayor estabilidad física.

## Referencias bibliográficas

- Allen T. 1990. Particle size measurement, 4<sup>th</sup> edition, chapter 13. Chapman and Hall. London 1990.
- Anderson DMW, Brydon WG. 1992. The effect of polysaccharides composition and structure of dietary fibers in fecal excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*. 44 (7): 51-57.
- Andon AS. 1987. Applications of soluble dietary fiber. *Food Technology* 41 (1): 74-75.
- Attias D. 1991. Reología de system emulsificados. Ed. Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.
- Avila AG. 1991. Caracterización de las propiedades estabilizantes del exudado gomoso *Enterolobium cyclocarpum* en sistemas emulsificados. Trabajo de ascenso para Asociado. Facultad de Farmacia UCV.
- Ayannides C. 1999. A rheological study of microemulsion gels of isopropyl myristate, polysorbate 80, glycerol, and water. *J Cosmet. Sci.* 50 (1): 1-3.

- Buonanno M, Ávila G, Attias D. 2004. Comportamiento reológico de lipoesferas® en una dispersión gomosa nativa *Cedrela odorata*. *Revista Facultad de Farmacia* 67(1-2): 35.
- Fresno M. 1993. Propiedades reológicas y estabilidad tixotrópica de una crema evanescente. *Ciencia Farmacéutica* 3 (2): 81.
- León de Pinto G. 1979. Analytical and structural studies of plant polysaccharides Ph. D Thesis, Edinburgh University. 133.
- León de Pinto G, Gonzalez N, Rojas A, Leal E. 1989. Espectro de R.M.N. de la goma de *Albizia lebeck* y de sus productos degradados. Aplicación a su elucidación estructural. *Acta Científica Venezolana* 40: 335-340.
- León de Pinto G, Martínez M, Troconis N, Rojas A, Leal E. 1992. Estudio estructural del exudado gomoso de *Swietenia mahagoni*. *Anales de Química* 88: 157-162.
- León de Pinto G, Álvarez S, Martínez M, Rojas A, Leal E. 1993. Structural studies of *Melicocca bijuga* gum exudates *Carbohydrate Research* 239: 257-265.
- León de Pinto G, Rodríguez O, Martínez M, Rivas C. 1994. Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudates. *Carbohydrate Research*. 260: 17-25.
- León de Pinto G, Martínez M, Mendoza J, Patel N, Levinson S. 1986. *Pharmaceutical suspensions in the theory and practice of industrial Pharmacy*, Third edition Lea & Febinger. Philadelphia, p. 486.
- Pridhan M, Sharma R, Khilar K. 1990. Stability of aqueous foams with polymers additives. *Journal of Colloids and Interface Science*, 139 (2).
- Ramírez J, Fresno M. 2002. Aportaciones de los liposomas de lípidos del estrato córneo a la formulación cosmética. *Noticias de Cosmética y Perfumería*. Año XXXI N° 267 Nov-Dic: 5-6.
- Rees DA. 1972. Polyssaccarides gels. *Chemistry and Industry*. 19: 630-636.
- Schott H. 2000. *Colloidal dispersions in Remington the Science and Practice of Pharmacy*. 20<sup>th</sup> edition. Philadelphia College of Pharmacy and Science.
- Tao L. 2000. Skin delivery from Lipid Vesicles. *Cosmetics & Toiletries*. 115 (4):43.

# Actividad antiinflamatoria y compuestos químicos aislados del extracto clorofórmico de las hojas de *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn

## Anti-inflammatory Activity and Chemical Compounds isolated from chloroform extract of *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn leaves

NERY PÉREZ<sup>1</sup>, BALBINA NOGUERA<sup>1</sup>, MARIELLA PASTOLLERO<sup>2</sup>,  
GERARDO HAIK<sup>3</sup>, ANITA ISRAEL<sup>2</sup> y JOSÉ D MEDINA<sup>1</sup>

### Resumen

La especie *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn (Compositae/Asteraceae) es una hierba erecta con ramificaciones, de aparición anual, originaria del Caribe y en la actualidad constituye una maleza pantropical. En Venezuela se encuentra frecuentemente en las tierras calientes, formando parte de la maleza conocida comúnmente como «deshinchadora» o «colmillo de puerco». En la medicina popular venezolana la hoja es usada en forma de cataplasma con aceite para curar golpes o hematomas. Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de cloroformo obtenido de las hojas de esta planta, y se aisló y caracterizó cinco compuestos químicos. Las hojas secas y molidas fueron extraídas por maceración a temperatura ambiente con solventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y etanol. La actividad antiinflamatoria de los extractos fue evaluada usando la técnica del edema de pata inducido por carragenina en ratas. El extracto de cloroformo mostró una actividad antiinflamatoria comparable con la fenilbutazona y el celecoxib. El extracto se fraccionó utilizando columnas de sílica gel y fase reversa, y luego fueron eluidas con diferentes solventes. Los compuestos aislados fueron identificados por técnicas espectroscópicas. Del extracto de cloroformo se caracterizó los compuestos: estigmasterol, ácido kaurénico, trans-fitol, ácido palmítico y el etil-éster del ácido palmítico. Debido a que los compuestos aislados han reportado actividad antiinflamatoria, se infiere que ellos podrían ser responsables de la actividad antiinflamatoria que se le atribuye a las hojas de *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.

**Palabras clave:** *Synedrella nodiflora*, actividad antiinflamatoria, terpenos.

### Abstract

*Synedrella nodiflora* species (L.) Gaertn, (Compositae/Asteraceae) is a small, annual weed of cultivation, native to tropical America, found in the Caribbean and at present constitute a pantropical weed. In Venezuela, grows thickly undisturbed sites, particularly of cleared rainforest, cultivated lands and plantation and it is known commonly like «deshinchadora» or «colmillo de puerco». In the Venezuelan popular medicine the leaf is used in the form of cataplasm with oil to cure bumps, blows or hematomas. In this investigation the anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Synedrella nodiflora* leaves was evaluated, and then were isolated and characterized five chemical compounds. The dry and ground leaves were extracted by maceration at room temperature with organic solvents in increasing polarity: hexane, chloroform and ethanol. The anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan induced paw edema technique, in rats. The chloroform extract showed a comparable anti-inflammatory activity with phenylbutazone and celecoxib. The extract was fractionated using silica gel columns and reverse phase, and then eluted with different solvents. The isolate compounds were identified by spectroscopic techniques. From the chloroform extract the following compounds were characterized: stigmasterol, kaurenic acid, trans-fitol, palmitic acid and the palmitic acid ethyl-ester. Since the isolated compounds have shown anti-inflammatory activity we infer that they could be responsible for the anti-inflammatory activity of *Synedrella nodiflora* leaves.

**Key words:** *Synedrella nodiflora*, anti-inflammatory activity, terpenes

<sup>1</sup> Laboratorio de Productos Naturales.

<sup>2</sup> Laboratorio de Neuropeptidos.

<sup>3</sup> Herbario Víctor Manuel Ovalles, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas D.C., Venezuela.

Correspondencia: [nery.perez@ucv.ve](mailto:nery.perez@ucv.ve), [neryperez42@gmail.com](mailto:neryperez42@gmail.com)

## Introducción

La búsqueda de fármacos antiinflamatorios sintéticos o naturales de alta efectividad, constituye un campo actual de las investigaciones, debido a la frecuencia del empleo de este tipo de medicamento y las reacciones colaterales indeseables que los acompañan, ya sean drogas de tipo esterooidal o no esteroidales. Como parte de un estudio de plantas que crecen en nuestro país y con posible actividad antiinflamatoria, se estudió las hojas de la especie *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn (*Asteraceae*). Esta planta es una hierba erecta con ramificaciones, de aparición anual, originaria del Caribe y en la actualidad constituye una maleza pantropical. En Venezuela se encuentra frecuentemente en las tierras calientes, formando parte de la maleza; es conocida comúnmente en la medicina popular venezolana como «deshinchadora» o «colmillo de puerco»; la hoja es usada en forma de cataplasma con aceite para curar golpes o hematomas (Delascio, 1985; Morton, 1981). En otras regiones tropicales del mundo (África, Asia, Caribe y Latinoamérica) es empleada como antiinflamatorio, emenagogo, diurético, laxante, anticonceptivo y contra una variedad de afecciones como: reumatismo, úlceras varicosas, llagas, lepra, enfermedades del corazón, resfriado, dolor de cabeza y dolor de oídos (Forestieri, 1996; Mannan y col., 1978; Morton, 1981; García, 1992; Grenand, 1987; Robineau, 1995).

Se han reportado varios estudios biológicos de esta planta (Forestieri y col., 1988; Forestieri y col., 1996; Abad y col., 1996; Martin Rathi y col., 2005), así como varios estudios fitoquímicos que demuestran la existencia en la planta de compuestos de naturaleza esterooidal y terpénica, así como saponinas (Mannan y col., 1978; Alonso y col., 1985; Aalbersberg y col., 1991; Yang y col., 1994). Sin embargo existe muy poca información acerca de la posible actividad antiinflamatoria de la especie *Synedrella nodiflora*. Es por ello que en el presente trabajo nos abocamos al estudio de la actividad antiinflamatoria del extracto de cloroformo obtenido de las hojas de esta especie, en un modelo experimental de inflamación aguda como es la inducción del edema de pata de la rata mediante la inyección subplantar de carragenina. Adicionalmente se procedió a aislar y caracterizar los posibles compuestos responsables de esta actividad antiinflamatoria, empleando métodos convencionales de extracción, separación y purificación, así como técnicas espectroscópicas respectivas.

## Materiales y métodos

### PLANTA

Las hojas de la especie *Synedrella nodiflora* fueron recolectadas en la ciudad de Caracas en Vene-

zuela, e identificadas por el profesor Gerardo Haiek. Se depositaron muestras de referencia en el Herbario Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Distrito Capital. El número de colección es 9927.

### EXTRACTOS

Las hojas se secaron al aire y seguidamente se pulverizaron con un molino mecánico. El material vegetal (2,3 Kg) fue extraído fraccionadamente por maceración a temperatura ambiente con los siguientes solventes de polaridad creciente: hexano; cloroformo y etanol, hasta agotar el material vegetal. Los solventes se evaporaron hasta sequedad al vacío obteniéndose el extracto de hexano (65 g; 2,83%), cloroformo (87 g; 3,78%) y etanol (42 g; 1,82%). En el presente estudio se empleó únicamente el extracto de cloroformo.

### ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de cloroformo (80 mg/Kg) de las hojas de la especie *Synedrella nodiflora*, utilizando el modelo de la inflamación aguda inducida por la carragenina (Mizushima y col., 1972), y empleando como referencia las drogas antiinflamatorias no esteroidales, el celecoxib (10 mg/Kg) y la fenilbutazona (80 mg/Kg). Para ello se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (180-220 g), las cuales fueron mantenidas en grupos de seis, con libre acceso a la comida y al agua. Los animales fueron divididos en los grupos experimentales siguientes: 1. Control (carboximetilcelulosa al 2%, p.o.); 2. celecoxib (CLX) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO; 10 mg/Kg, p.o), 3. fenilbutazona (FBZ) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO; 80 mg/Kg, p.o), ambas sustancias fueron usadas como drogas de referencia; 4. extracto de cloroformo (DBHC, 80 mg/Kg, p.o). Una hora después de la administración de cada uno de los tratamientos se indujo el edema de la pata mediante la inyección de 0,05 mL de una suspensión de l-carragenina tipo IV (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) al 3% en solución fisiológica, en la aponeurosis plantar de la pata trasera derecha de la rata. Se produjo una reacción de carácter inflamatorio (edema) y se cuantificó la inhibición del mismo por el método de desplazamiento de volumen, utilizando un pletismómetro digital (Ugo Basile, Modelo 7140, Italia). Las determinaciones se realizaron antes y una, tres, cinco y siete horas después de la inyección subplantar de carragenina. Los procedimientos aplicados en estos experimentos fueron aprobados por la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UC.V.

Los resultados de la actividad antiinflamatoria fueron expresados como la media, más o menos, el error estándar de la media (Media  $\pm$  EEM) del volumen desplazado y como porcentaje de inhibición del edema, calculado mediante la fórmula  $(1-V_t/V_c) \times 100$ , donde  $V_t$  y  $V_c$  son el volumen medio de la pata de los animales tratados y control, respectivamente. La diferencia entre los grupos experimentales fueron analizadas utilizando la prueba *t* de Student no-pareada y el análisis de varianza de una vía (One way ANOVA). Los valores  $p < 0,05$  se tomaron como indicativos de significado estadístico.

#### AISLAMIENTO DE COMPUESTOS QUÍMICOS

El extracto de cloroformo (70 g) se fraccionó mediante cromatografía de columna de fase normal sobre sílica gel (400 g), utilizando mezclas de solventes de polaridad creciente: hexano/cloroformo (25:75), cloroformo (100), cloroformo/acetato de etilo (95:5), 90:10, 50:50, acetato de etilo (100), acetato de etilo/metanol (50:50), metanol (100). Se recolectaron 74 fracciones de aproximadamente 100 mL c/u. Todas las fracciones se evaluaron por cromatografía de capa fina y las que resultaron similares se reunieron, obteniéndose en total 14 fracciones: I (1-6), II (8-12), III (13-18), IV (19-23), V (24-27), VI (28-32), VII (33-37), VIII (38-42), IX (43-49), X (49-54), XI (55-57), XII (58-65), XIII (68-71), XIV (72-74). De la fracción VI (1 g) obtenida del extracto de cloroformo, se aislaron 3 mg de estigmasterol (S1), el cual fue purificado por cristalización, 23 mg de ácido kaurénico (S2) y 25 mg de *trans*-fitol (S3), los cuales fueron purificados por cromatografía en columna fase normal (50 g de sílica gel). A partir de la fracción IX (1 g) obtenida del extracto de cloroformo se aislaron 60 mg de ácido palmítico (S4) y 3 mg del etil-éster del ácido palmítico (S5), que fueron purificados por cromatografía en columna fase normal (50 g sílica gel) y por cromatografía en capa fina preparativa.

#### DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

*Estigmasterol* (S1) (Estigmasta-5,22-dien-3-beta-ol, (24S)-5,22-estigmastadien-3-beta-ol): sólido blanco. MS: m/z (intensidad relativa (%)): 413 (100), 395(20), 380(25), 370(30), 352(30), 300(30), 273(30), 271(60), 255(45), 230(15), 200(20), 173(23), 133(37), 81(40). RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  (ppm) (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,50 (m, H-3); 5,33 (m, H-6); 0,68 (s; H-18); 0,99-1,01 (H-19, H-21); 5,14 (dd, H-22,  $J_{22/23} = 15,1$  Hz;  $J_{22/20} = 8,4$  Hz); 5,00 (dd, H-23,  $J_{23/22} = 15,1$  Hz,  $J_{22/20} = 8,4$  Hz); 0,76-0,84; H-26, H-27, H29). RMN C

$^{13}$ :  $\delta$  (ppm) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 37,2(C1); 31,6(C2); 71,8(C3); 42,2(C4); 140,7(C5); 121,7(C6); 31,8(C7); 31,8(C8); 50,1(C9); 36,4(C10); 21,2(C11); 39,6(C12); 42,1(C13); 56,8(C14); 24,3(C15); 28,9(C16); 55,9(C17); 12,2(C18); 19,3(C19); 40,4(C20); 21,0(C21); 138,3(C22); 129,2(C23); 51,2(C24); 31,8(C25); 18,9(C26), 21,0(C27); 25,3(C28); 12,0(C29).

*Ácido kaurénico* (S2) (Ácido (-)-kaur-16-en-19-oico, ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico): sólido blanco. MS: m/z (intensidad relativa (%)): 302(65), 287(48), 259(38), 257(33), 241(65), 213(48), 187(48), 159(38), 131(100), 105 (60), 91(83). RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  (ppm) (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,93(s, 3H-20a); 1,22(s, 3H-18b); 1,57(bs, 2H-11); 2,03(bs, 2H-15); 2,61(bs, 1H-13a); 4,77(bs; 1H-17a); 4,72(bs; 1H-17b). RMN  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  (ppm) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 40,7(C1); 19,1(C2); 37,8(C3); 44,2(C4); 57,0(C5); 22,0(C6); 33,1(C7); 43,7(C8); 55,1(C9); 39,7(C10); 18,4(C11); 41,3(C12); 43,9(C13); 39,7(C14); 49,0(C15); 155,9(C16); 103,7(C17); 29,0(C18); 184,5(C19); 15,6(C20).

*Trans*-fitol (S3) (2*E*, 7*R*, 11*R*)-3, 7, 11, 15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol): líquido aceitoso ligeramente amarillo. MS: m/z (intensidad relativa (%)): 296(1), 278(1), 263(1), 249(1), 236(1), 222(1), 210(1), 196(1), 179(1), 165(1), 151(1), 137(2), 123 (22), 111 (6), 95 (13), 81 (24), 71 (100), 57 (27), 43 (28). RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  (ppm) (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,14(d, 1H-1,  $J = 6,05$  Hz); 5,38(t, 1H-2,  $J = 6,05$  y 1,24 Hz); 1,96(t, 2H-4); 1,50(m, 1H-7); 1,64(s, 3H-17); 0,85(d, 6H-16 y 20); 0,84(d, 3H-18); 0,83(d, 3H-19). RMN  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  (ppm) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 59,4(C1); 123,1(C2); 140,3(C3); 39,9(C4); 25,2(C5); 36,7(C6); 32,7(C7); 37,4(C8); 24,5(C9); 37,3(C10); 32,8(C11); 37,4(C12); 24,8(C13); 39,4(C14); 28,0(C15); 22,7(C16); 16,2(C17); 19,8(C18); 19,8(C19); 22,6(C20).

*Ácido palmítico* (S4) (Ácido hexadecanoico): sólido blanco. MS: m/z (intensidad relativa (%)): 356(100), 239 (6), 227 (14), 213 (38), 199 (20), 185 (11), 171 (37), 157 (38), 143 (22), 129 (58), 115 (21), 101 (10), 87 (42) 73 (56), 60 (42). RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  (ppm) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,86 (t; 3H-16); 1,23-1,28 (bs; 24H-4 al15); 1,61 (m; 2H-3); 2,32 (t; 2H-2); 10,96 (bs; 1H-COOH). RMN  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  (ppm) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,53 (C-1); 34,12 (C-2); 24,66 (C-3); 29,05 (C-4); 29,23 (C-5); 29,42 (C-6); 29,58 (C-7); 29,69 (C-8); 29,69 (C-9); 29,69 (C-10); 29,69 (C-11); 29,66 (C-12); 29,36 (C-13); 31,92 (C-14); 22,68 (C-15); 14,09 (C-16).

*Éster del ácido palmítico* (S5) (Hexadecanoato de etilo): sólido blanco. MS: m/z (intensidad relativa (%)): 284(100), 278(12), 241(7), 213(4), 185(6), 157(14), 143(8), 129(6), 115(12), 101(50), 88(100), 70(16), 55(16), 43(25).

**EQUIPOS**

Punto de fusión: Fisher-Jhons (los valores son reportados sin corregir). Espectrometría de masa: Cromatógrafo de gases acoplado a masas GC/EM, Varian Saturno 2000. Espectroscopia: RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C: JOEL-Eclipse, 270 MHz y Bruker, 500 MHz. Los espectros fueron realizados en CDCl<sub>3</sub>.

**Resultados**

La inyección subplantar de la carragenina desarrolló un edema significativo en la pata de la rata en el grupo control. La Tabla I, en la que se muestran los resultados como volumen desplazado, y la Figura 1, en la que se expresan los resultados como porcentaje de inhibición de la inflamación, indican que la administración por vía oral, una hora antes de la inyección de la carragenina, causó una inhibición significativa del edema (p<0,01). El efecto inhibitorio máximo del extracto se registró a las 3h (36,42%) y 5h (37,41%) después de la inyección de la carragenina. Estos valores fueron comparables con los de las drogas antiinflamatorias no esteroideas de referencia: la fenilbutazona (FBZ) y el celecoxib (CLX)

Del extracto de cloroformo se aisló y caracterizó, en base a los datos obtenidos de RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C, DEPT, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HETCOR <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C y por comparación con los reportados en la literatura y bases de datos, los compuestos químicos: estigmasterol (Viqar y col., 1992; Gómez y col., 1999; Forgo y Köver, 2004); ácido kaurénico (Thorleif y Supa, 1971; Enriquez y col., 1997; Nguyen y col., 1992), transfitol (Sims, 1976; Pröbstle, 1994; Furumoto y col., 2002; Spectral Database for Organic Compounds, SDBC); ácido palmítico (Bengsch y col., 1986; Spectral Database SDBC; ACD Lab; Lipid library) y etil-éster del ácido palmítico (Spectral Database SDBC; Lipid library) (Figura 2). A excepción del estigmasterol, ninguno de los compuestos había sido previamente aislado de las hojas de *Synedrella nodiflora*.

**Discusión**

La evidencia muestra que la especie *Synedrella nodiflora* se ha empleado en la medicina tradicional, en especial las hojas se han utilizado como cataplasma para el reumatismo doloroso. Sin embargo, hasta el presente no se ha establecido su posible

Tabla I  
**Volumen Desplazado (mL)**

	1h	3h	5h	7h
Control (1)	ND	1,57 ± 0,08	1,6 ± 0,11	1,41 ± 0,08
FBZ	ND	0,85 ± 0,07 *	0,96 ± 0,07 *	0,83 ± 0,07 *
DHCB	ND	1,08 ± 0,14 *	1,16 ± 0,17 *	1,03 ± 0,15 *
Control (2)	0,63 ± 0,07	1,10 ± 0,05	1,28 ± 0,09	ND
CLX	0,30 ± 0,05 *	0,72 ± 0,05 *	0,91 ± 0,06 *	ND

Actividad antiinflamatoria, expresada como volumen desplazado en el pletismómetro digital, del extracto de cloroformo (DBHC) comparado con fenilbutazona (FBZ) con respecto al control (1), y con celecoxib (CLX) con respecto al control (2). \*p<0,01. ND: No Determinado.

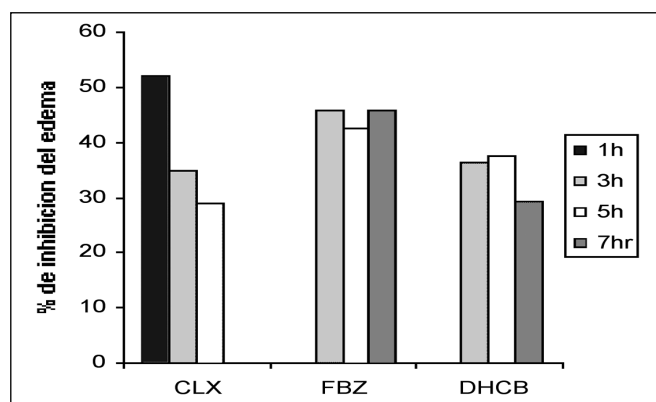


Figura 1. Actividad antiinflamatoria del extracto de cloroformo (DBHC) comparado con celecoxib (CLX) y fenilbutazona (FBZ).

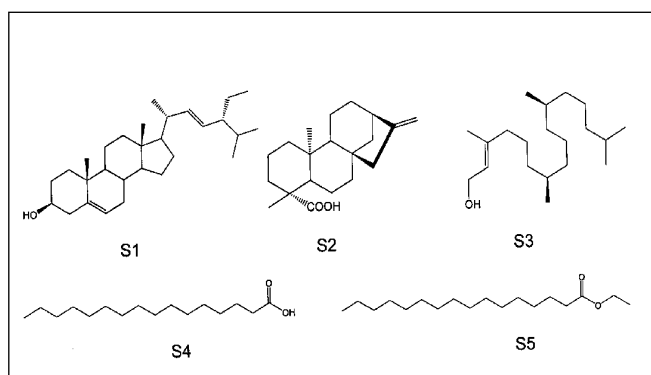


Figura 2. Compuestos químicos aislados de los extractos de cloroformo de hojas de *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. S1: estigmasterol; S2: ácido kaurénico; S3: trans-fitol; S4: ácido palmítico y S5: etil-éster del ácido palmítico.

uso como antiinflamatorio. Por ello, en el presente estudio examinamos el efecto antiinflamatorio del extracto de cloroformo de las hojas de la especie *Synedrella nodiflora* en el edema de la pata de la rata inducido por la carragenina. Nuestros resultados muestran que la inyección subplantar de carragenina produjo edema significativo, cuya primera fase se sabe que resulta de la liberación de histamina, serotonina y kininas y cuya segunda fase se correlaciona con niveles elevados de prostaglandinas, oxígeno derivado de los radicales libres, la producción de la ciclooxigenasa inducible y la activación e infiltración local de neutrófilos. La administración oral del extracto de cloroformo de las hojas de la especie *Synedrella nodiflora* produjo una inhibición significativa del edema de la pata de la rata, que fue comparable en magnitud al producido por la fenilbutazona y el celecoxib.

El estudio fitoquímico permitió la identificación de cinco compuestos químicos (estigmasterol, ácido kaurénico, trans-fitol, ácido palmítico y etil-éster del ácido palmítico), cuya actividad antiinflamatoria ha sido evidenciada a través de estudios *in vivo* e *in vitro*. En efecto, mediante el uso del modelo del edema de la oreja del ratón inducido por TPA *in vivo* (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol), usando aplicaciones simples (modelo agudo) y múltiples (modelo crónico) del agente a evaluar, se demostró un efecto antiinflamatorio significativo para el estigmasterol comparados con la indometacina (0,5 mg/oreja) y la dexametasona (0,05 mg/oreja) (Gómez y col., 1999). Los resultados del modelo agudo mostraron una inhibición del 59%, después de la administración tópica de una dosis de 0,5 mg/oreja. En el modelo crónico el efecto antiinflamatorio fue más moderado, la inhibición del edema fue de un 36%. Igualmente, se evaluó la actividad de la enzima mieloperoxidasa, la cual fue reducida en un 73% en el modelo agudo, mientras que en el edema crónico la inhibición de la enzima fue de un 30%. Estos resultados indicaron que el estigmasterol es más efectivo como agente antiinflamatorio tópico en procesos agudos que en crónicos y su acción está marcadamente influenciada por la inhibición de la migración de neutrófilos dentro del tejido inflamado. Estudios similares han sido reportados por Kasahara y col., 1994 y García y col., 1999.

El efecto antiinflamatorio *in vivo* del ácido kaurénico fue investigado utilizando el modelo de edema de pata inducido por albúmina en la rata. Tanto la aspirina como el ácido kaurénico, en la dosis más alta, mostraron efecto antiinflamatorio significativo, comparable y mantenido durante todo el período de observación (4h) (Sosa y col., 1997). Schwaiger y

col. (2004) estudiaron *in vitro* la actividad inhibitoria del ácido kaurénico sobre la biosíntesis de leucotrienos (LTB<sub>4</sub>). El ácido kaurénico fue evaluado en tres concentraciones; 25 µM, 10 µM y 5 µM; y como control positivo se utilizó el zileuton (10 µM), un inhibidor específico de la enzima 5-lipooxigenasa. El ácido kaurénico exhibió una marcada actividad inhibitoria de 74% a una concentración de 25 µM, mientras que a concentraciones menores la inhibición de la biosíntesis fue insignificante.

En los procesos inflamatorios se encuentran involucradas dos isoformas distintas de la enzima ciclooxigenasa, llamadas COX-1 y COX-2, las cuales participan en la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas. La COX-1 está encargada de la síntesis de prostaglandinas implicadas en la homeostasis general, mientras que la COX-2 inducible se encarga de la producir prostanoïdes en los lugares inflamados. La evidencia experimental *in vitro* ha demostrado que el ácido kaurénico tiene una actividad antiinflamatoria mucho mayor contra la COX-1 (IC<sub>50</sub> = 121,6 µM) que la aspirina (IC<sub>50</sub> = 1.804 µM) y una actividad inhibitoria relativamente significativa contra COX-2 (IC<sub>50</sub> = 127,6 µM), comparada con la obtenida por el control positivo indometacina (IC<sub>50</sub> = 76,5 µM) (Nguyen y col., 1992).

La actividad antiinflamatoria *in vivo* del fitol ha sido evaluada usando los modelos de inflamación de edema de la oreja de ratón inducido por el EPP (etil-fenilpropiolato) y el edema de pata inducido por la carragenina, la histamina o por el compuesto 48/80, en la rata (Pongprayoon y col., 1992; Shimizu y Tomoo, 1994). El fitol (1 mg/local; 65,3%) atenuó de manera significativa la inflamación inducida por la carragenina, siendo mucho más potente (0,5 mg/local; 74,2%) sobre el edema inducido por histamina, sugiriendo que el mecanismo de acción es debido a la inhibición de los receptores H<sub>1</sub>. También *in vitro* se evaluó la actividad inhibitoria del fitol sobre la biosíntesis de prostaglandina (Pröbstle, 1994). El fitol mostró una actividad inhibitoria significativa sobre la enzima ciclooxigenasa (CI<sub>50</sub>=55,7 µM), mientras que la indometacina exhibió una CI<sub>50</sub> de 1,2 µM, y la aspirina mostró sólo un 37% de inhibición a una concentración de 250 µM.

El ácido palmítico también inhibe la actividad de las enzimas ciclooxigenasa (Zhang y col., 2003). El nivel de inhibición de la COX-1 y COX-2, a una concentración de 100 µg/mL, fue de 39 y 45%, respectivamente. Los controles positivos vioxx® (1,67 µg/mL), celebres™ (1,67 µg/mL), aspirina (180 µg/mL), naproxen (2,52 µg/mL) e ibuprofeno (2,06 µg/mL) mostraron un 23, 37, 46, 92 y 30% de inhibición de la

COX-1, respectivamente, y en las mismas concentraciones exhibieron un 67, 88, 24, 61 y 43% de inhibición de la COX-2, respectivamente. Estos resultados se asemejan a los previamente obtenidos por Pröbstle (1994) en un estudio *in vitro* sobre la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas. El ácido palmítico a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  inhibió en un 77% la síntesis de prostaglandina y la  $\text{CI}_{50}$  fue de 18,5  $\mu\text{M}$ , comparado con la indometacina que a la misma dosis mostró un 100% de inhibición ( $\text{CI}_{50}=1,2 \mu\text{M}$ ), mientras que la aspirina, a una dosis de 250  $\mu\text{M}$  inhibió solamente un 39%, la síntesis de prostaglandina.

Estos hallazgos parecen indicar que los compuestos aislados de los extractos de la especie *Synedrella nodiflora* podrían ser responsables en cierto grado de la actividad antiinflamatoria observada después de la administración del extracto clorofórmico evaluado en el presente trabajo.

Nuestros hallazgos, en los que se demuestra la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Synedrella nodiflora*, contribuyen a la validación del uso de esta planta como antiinflamatorio en la medicina tradicional.

## Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (Proyecto N°: 04/2004) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, por el financiamiento recibido.

## Referencias Bibliográficas

Aalbersberg W, Singh Y. 1991. Essential Oils from Two Medicinal Plants of Fiji: *Dysoxylum richii* (A. Gray) C.D.C. Fruit and *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn Leaves. *Flav and Fragran J*. 6: 125-128.

Abad A, Bermejo P, Carretero E, Martínez-Acitores C, Noguera B, Villar A. 1996. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *J Ethnopharmacol* 55: 63-68.

Alonso M, Arriaga F, Borges J, Vázquez P. 1985. N-alkanes and Triterpenoids from some Salvadorian Compositae. *Fitoter*. 56(2):123-125.

Bengsch E, Perly B, Deleuze C, Valero A. 1986. A general rule for the assignment of the carbon-13 NMR peaks in fatty acid chains. *J Mag Res* 68: 1-13.

Delascio F. 1985. Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana. Dirección de Investigaciones Biológicas, División de Vegetación, Jardín Botánico, INPARQUES, pp. 53.

Enríquez R, Barajas J, Ortiz B, Lough A, Reynolds W, Yu, Leon I, Gnecco, D. 1997. Comparison of crystal and solution structures and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift for grandiflorenic acid, kaurenoic acid, and monoginoic acid. *Can J Chem*. 75: 342-347.

Forestieri A, Pizzimenti F, Monforte M, Bisignano G. 1988. Antibacterial Activity of some African Medicinal Plants. *Pharmacol., Res. Communication*, 20 (5): 33-36.

Forestieri A, Monforte M, Ragusa S, Trovato A. 1996. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. *Pharmacol Phytother Res* 10: 100-106.

Forgo P, Köver K. 2004. Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivate. *Steroids* 69:43-50.

Furumoto T, Wang R, Okazaki K, Hasan F, Ali M, Kondo A, Fukui H. 2002. Antitumor Promoters in leaves of Jute (*Corchorus capsularis* and *Corchorus olitorius*). *Food Sci Technol Res* 8 (3): 239-243.

García H. 1992. Flora Medicinal de Colombia, Tercer Mundo Editores, Tomo 3, pp. 423.

García M, Saens M, Gómez M, Fernández M. 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytother Res* 13 (1):78-80.

Grenand P, Moretti C, Jacqueming H. 1987. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Paris. Editions ORSTOM, pp. 569.

Gómez M, Sáenz M, García M, Fernández M. 1999. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Zeitschrift für Naturforschung- Section C J Biosci* 54(11): 937-941.

Kasahara Y, Kumasi K, Katagiri S, Yasukawa K, Yamanouchi S, Takido M, Akihisa T, Tamura T. 1994. Carthami Flos extract and its component, stigmasterol, inhibit tumor promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Phytother Res* 8 (6): 327-331.

Mannan A, Ahmad K. 1978. Preliminary study of sex hormones of medical importance in Bangladeshi plants. *Bangladesh. Med Res Counc Bull* 4 (2): 78-85.

Martin Rathi J, Gopalakrishnan S. 2005. Insecticidal Activity of aerial parts of *Synedrella nodiflora* Gaertn (Compositae) on *Spodoptera litura* (Fab.). *J Centr Eur Agric* 6(3): 223-228.

Mizushima Y, Tsukada W, Akimoto T. 1972. A modification of rat adjuvant arthritis for testing antirheumatic drugs. *J Pharm Pharmac* 24(10): 781-785.

Morton J. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America Bahamas to Yucatan, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., pp. 969.

Nguyen H, Xin Feng Z, Ming Zhang Z, Kun H, Hyeun W, Hyun P, Kihwan B, Pongprayoon U, Bohlin L, Baeckstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M. 1992. Inhibition of ethyl phenylpropiolate-induced rat ear oedema by compounds isolated from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br *Phytother Res* 6(2):104-107.

Pongprayoon U, Baeckstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin L. 1992. Antispasmodic activity of b-damasconone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Plant Med* 58(1):19-21.

Pröbstle A. 1994. Phytochemische y pharmakologische Untersuchungen von *Houttuynia cordata* THUNB, einer

- entzündshemmend wirkenden Arzneipflanze in der Traditionellen Chinesischen Medizin. Dissertation zur Erlangerung des Doktorsgrades. München, Deutschland. pp. 41-42.
- Robineau M. 1995. Hacia una Farmacopea Caribeña. *Enda-Caribe / U. A. G. / U. Antioquia*. Trámil 6/7. pp. 617.
- Schwaiger S, Adams M, Seger Ch, Ellmerer E, Bauer R, Stupper H. 2004. New constituents of *Leontopodium alpinum* and their in vitro leukotriene biosynthesis inhibitory activity. *Planta Med* 70: 978-985.
- Shimizu M, Tomoo T. 1994. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of aoki *Aucuba japonica* Thunb. *Biological and Pharmaz Bull* 17 (5):665-667.
- Sims J, Pettus J. 1976. Isolation of free cis and trans-phytol from the red alga *Gracilaria andersoniana*. *Phytochem* 13: 1076-1077.
- Sosa M, Gutiérrez E, Suárez O, Usubillaga A. 1997. Estudio farmacológico del efecto antiinflamatorio de ácido (-)-kaur-16-en-19-oico en ratas Sprague-Dawley. *Acta Científica Venezolana* 48(1):85.
- Thorleif A, Supa Ch. 1971. Isolation of ent-kaur-19-oic acid and ent-kaur-19-ol from *Abrotanella nivigena* Muell. *Acta Chem Scand* 25(5):1925-1927.
- Viqar H, Rahman A, Asista P, Mustafa S. 1992. A sterol glycoside from marine green alga *Codium Iyengarii*. *Phytochem* 31(4):1429-1431.
- Yang P, Luo S, Li H. 1994. Studies on chemical constituents of *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 25(6):252-255.
- Zhang Y, Mills G, Nair M. 2003. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom. *Agrocybe aegerita* *Phytomed* 10: 386-390.

# Posible nitración del complejo I mitocondrial durante la hipoxia/re-oxigenación

## Possible nitration of mitochondrial complex I in hypoxia/re-oxygenation conditions

DANIELA URRECHEAGA SILVA

### Resumen

La nitración de los residuos de tirosina de las proteínas es una modificación post-translacional que ocurre en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Este proceso puede alterar las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas, así como su fosforilación. El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) es el principal agente nitrante de las proteínas en el organismo, y es formado por la reacción entre cantidades equimolares de los radicales óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). El ONOO<sup>-</sup> formado extra o intramitocondrialmente puede difundirse a través de los compartimientos mitocondriales y producir oxidación, nitración y nitrosilación de críticos componentes de la matriz, de la membrana externa e interna y del espacio intermembrana de la mitocondria. Uno de esos componentes susceptibles de ser nitrado es el complejo I de la cadena de transporte de electrones, cuya principal función es la transferencia de electrones desde la NADH a la ubiquinona. Se ha observado que durante la hipoxia/re-oxigenación se produce una inhibición de la actividad del complejo I, siendo la nitración uno de los mecanismos propuestos como responsable de este efecto. Por lo tanto este artículo es principalmente focalizado en las evidencias que existen en la literatura sobre la nitración del complejo I en condiciones de hipoxia/re-oxigenación.

**Palabras clave:** Complejo I, mitocondria, nitración, hipoxia, re-oxigenación.

### Abstract

Protein tyrosine nitration is a common post-translational modification occurring under physiological and pathological conditions. This process can alter functional and structural properties of the proteins as well as their phosphorylation. Under normoxic conditions 0.1–3% of the oxygen consumed by mitochondria is converted to superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Once formed superoxide anion may undergo a near-diffusion-controlled reaction with NO yielding the highly reactive oxidizing peroxynitrite, which can, especially in the presence of CO<sub>2</sub>/bicarbonate anions, react with protein tyrosine residues forming 3-nitro-L-tyrosine. Extra- or intramitochondrially formed peroxynitrite can diffuse through mitochondrial compartments resulting in oxidation, nitration and nitrosation of critical components in the matrix, inner and outer membrane and intermembrane space of the mitochondria. One of those susceptible components being nitrated is the complex I, which is the first enzyme of the respiratory electron transport chain, whose main functional role is to transfer two electrons from NADH to ubiquinone in the inner-mitochondrial membrane. It has been observed that during hypoxia/re-oxygenation mitochondria exhibit a specific and significant decrease in complex I (NADH:CoQ reductase) activity, being nitration one of the mechanisms proposed as responsible for this effect. Therefore this review article was mainly is focused on the evidence shown in the literature related to nitration of complex I in hypoxia/re-oxygenation conditions.

**Key words:** Complex I, mitochondria, nitration, hypoxia, reoxygenation.

## Introducción

La mitocondria es un organelo especializado en la producción de energía, pero también participa en la producción de especies reactivas de oxígeno, en la regulación del ciclo celular, en la apoptosis y en la termogénesis (Gibson, 2005).

Clásicamente, la regulación del metabolismo energético se basa en la relación entre el ADP/ATP, pero recientemente ha sido identificado el óxido nítrico (NO) como un regulador fisiológico de la transferencia de electrones y la síntesis del ATP por inhibición de la citocromo c oxidasa, enzima terminal de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Callender y col., 2007; Carreras y col., 2004). Adicionalmente, el NO estimula la producción de especies reactivas de oxígeno, dentro de las que destacan el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Carreras y col., 2004). Dependiendo de la concentración de NO en la matriz mitocondrial, éste puede reaccionar en forma equimolar con el anión superóxido para generar peroxinitrito, el cual es responsable de la nitración, oxidación y nitrosilación de los componentes mitocondriales, lo que puede ocasionar una alteración de la función mitocondrial (Frein y col., 2005).

La nitración de las proteínas es considerada un proceso acumulativo y dañino a la célula, el cual afecta la actividad y función de la proteína nitrada, siendo éste un proceso selectivo, dinámico y reversible el cual puede ser tanto vital como dañino para la función celular (Turko y Murad., 2002). En las últimas décadas ha crecido de forma exponencial el interés en identificar las proteínas mitocondriales que constituyen el «proteoma de nitrotirosina» con la finalidad de entender el papel que juega la nitración de proteínas en la función mitocondrial durante condiciones tanto normales como patológicas (Gibson, 2005).

Una de las proteínas que ha sido identificada como susceptible de ser nitrada es el complejo I de la cadena de transporte de electrones, el cual parece muy susceptible a los efectos del peroxinitrito y a la nitración (Carreras y col., 2004). Se ha observado la inhibición de la actividad del complejo I en enfermedades en donde hay un incremento del estrés oxidativo y nitrosativo, como son la enfermedad de Parkinson, la sepsis, la endotoxemia, la angina y el cáncer, así como en condiciones donde hay hipoxia (Brown y Borutaite., 2004). Un complejo I deficiente produce una disminución de la energía generada por el sistema de fosforilación oxidativa, así como una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (Brown y Borutaite., 2004). Dada la importancia que tiene la transformación de energía por parte del complejo I mitocondrial, junto con otras de las proteínas

implicadas en el transporte de electrones, ha surgido en el ámbito científico la «nueva era del estudio del complejo I mitocondrial». Como parte de esta nueva visión científica, se pretende estudiar la nitración del complejo I durante la hipoxia.

## 1. La Mitocondria

### 1.1. ASPECTOS BÁSICOS

La mitocondria es un organelo subcelular muy complejo que tiene como principal función la producción de energía en forma de ATP, necesaria para la viabilidad y funcionamiento normal de la célula; además está implicada en muchas otras funciones celulares, tales como: el metabolismo de ácidos grasos, la biosíntesis de pirimidinas, la homeostasis de calcio y la señalización celular (Gibson, 2005).

La mitocondria es el único organelo que contiene su propio ADN, denominado ADNmt, el cual es responsable de codificar 13 proteínas esenciales que forman parte del complejo I, III, IV y V del sistema de fosforilación oxidativa, así como también dos ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia (Scheffer, 2001). El resto de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear.

Entre las estructuras que componen la mitocondria se encuentran la membrana externa e interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, las cuales cumplen funciones metabólicas específicas. Específicamente, en la membrana interna se encuentran las proteínas que conforman el sistema de fosforilación oxidativa (OxPHOS, de acuerdo con sus siglas en inglés) (Lesnefsky, 2006).

El OxPHOS consiste en cinco complejos proteicos, a saber: la NADH: ubiquinona óxido reductasa (complejo I), la succinato ubiquinona óxido reductasa (complejo II), la ubiquinol: citocromo c óxido reductasa (complejo III), la citocromo c oxidasa (complejo IV) y la  $F_0F_1$ -ATP sintasa (complejo V). Los primeros cuatro complejos, junto con la ubiquinona y el citocromo c, constituyen la cadena de transporte de electrones (Lazarou y col., 2008; Wallace, 2008).

Los electrones generados por la oxidación del NADH y del succinato por el complejo I y II, respectivamente, son transferidos a la ubiquinona, la cual se encarga de transportar los electrones a través de la membrana interna hasta el complejo III. Este último transfiere los electrones de la ubiquinona reducida al citocromo c, el cual se encuentra en el espacio intermembrana. Finalmente, el complejo IV completa la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno, reduciéndolo a agua (Lazarou y col., 2008; Wallace, 2008).

Este proceso de transferencia genera la energía necesaria para la síntesis de ATP, a través de la fuerza protomotriz producida por la translocación de protones provenientes de los complejos I, III y IV, desde la membrana interna hacia el espacio intermembrana; de manera que el complejo V se acopla a la energía del gradiente electroquímico para sintetizar el ATP en la matriz mitocondrial, tal como se ilustra en la Figura 1 (Lazarou y col., 2008; Wallace, 2008).

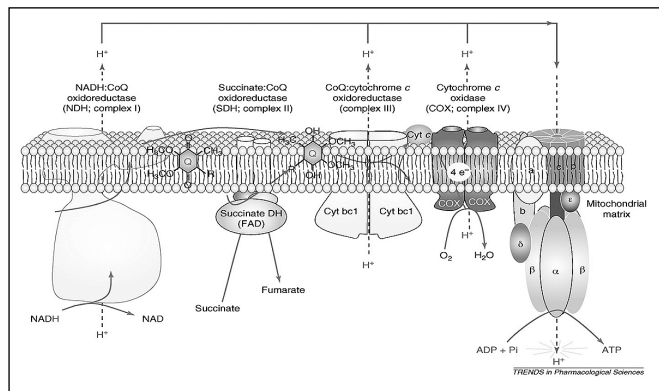


Figura 1. Sistema de fosforilación oxidativa (Wallace, 2008).

La disfunción del sistema de fosforilación oxidativa está asociada con una serie de manifestaciones clínicas, tales como miopatías, encefalopatías y cardiopatías. Siendo las deficiencias del complejo I la que con mayor frecuencia causa la disfunción de este sistema (Verkaart y col., 2007).

## 1.2. EL COMPLEJO I

La NADH: ubiquinona óxido reductasa o complejo I (CI; EC 1.6.5.3) es la enzima más grande y compleja de la cadena de transporte de electrones, que tiene como principal función la transferencia de electrones desde la NADH a la ubiquinona (Q) en una reacción que es acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembrana (Brown y Borutaite, 2004). La acción redox del CI puede ser resumida en la siguiente reacción:



El mecanismo mediante el cual el CI utiliza la energía redox para translocar cationes como el  $\text{H}^+$  o iones como el  $\text{Na}^+$  a través de la membrana interna mitocondrial no ha sido bien establecido (Takahiro, 2002). Adicionalmente, el CI cumple otras funciones, entre las que destaca la producción de anión superóxido (Brand y col., 2004; Carreras y col., 2004).

El CI está compuesto por 45 subunidades que ensambladas forman una estructura con un peso

molecular de aproximadamente 1000 kDa; siete de estas subunidades son codificadas por el ADN mitocondrial y las 38 subunidades restantes son codificadas por el ADN nuclear (Lenaz y col., 2006; Lazarou y col., 2008).

Dicho complejo está compuesto por tres módulos funcionales, a saber: el módulo N (NADH-deshidrogenasa), que transfiere los electrones desde la NADH vía la mononucleótido flavina (FMN en su siglas en inglés) a una cadena de grupo de proteínas de hierro azufradas (Brandt y col., 2006; Lazarou y col., 2008). El módulo Q (hidrogenasa), que recibe los electrones provenientes de los grupos de proteínas de hierro azufradas (Fe-S) y los transfiere a la ubiquinona. Tanto el módulo N como el Q se encuentran en la matriz mitocondrial (Brandt y col., 2006; Lazarou y col., 2008). Por último el módulo P (transportador), que está embebido en la membrana mitocondrial interna y que tiene como función translocar los protones a través de la membrana hacia el espacio intermembrana (Figura 2) (Brandt y col., 2006; Lazarou y col., 2008).

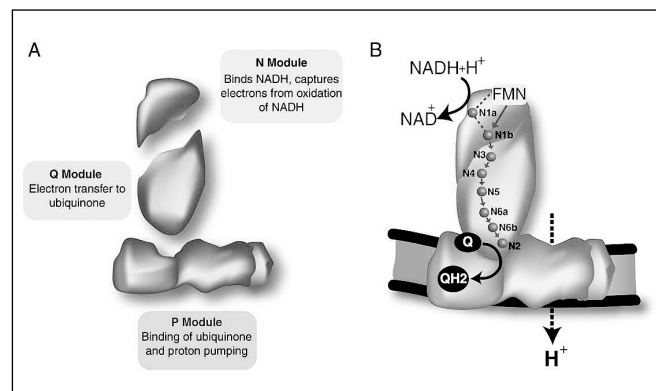


Figura 2. Módulos del complejo I y actividad (Lazarou y col., 2008).

### 1.2.2. Estructura y subunidades del complejo I

La estructura del complejo I mitocondrial tiene una forma de L, compuesta por un brazo periférico hidrofílico que se proyecta hacia la matriz mitocondrial, y por un brazo hidrofóbico perpendicular embebido en la membrana interna (Lazarou y col., 2008).

El brazo periférico del CI se subdivide en dos subcomplejos, el I $\alpha$  y el I $\lambda$ , los cuales están compuestos por subunidades hidrofílicas y contienen a la mononucleótido flavina (FMN) y a ocho grupos de proteínas hierro azufradas, los cuales son: el N1a, el N1b, el N3, el N4, el N5, el N6a, el N6b y el N2, siendo este último el que le dona los electrones a la ubiquinona (Figuras 2 y 3) (Takahiro, 2002).

Así mismo, el brazo hidrofóbico se subdivide en dos subcomplejos que son I $\gamma$  y I $\beta$ , compuesto por las

subunidades hidrofóbicas. En este brazo se lleva a cabo la reducción de la ubiquinona y el transporte de iones (Figuras 2 y 3) (Takahiro, 2002).

El complejo I bacteriano está compuesto por catorce subunidades que son conservadas a través de la evolución (Vogel y col., 2007). Estas subunidades representan el centro del complejo I y componen las unidades estructurales mínimas requeridas para la función primaria de la enzima y la transferencia de electrones acoplada a la translocación de protones (Lazarou y col., 2008).

La composición de las subunidades del complejo I bovino ha sido extensamente estudiada y la nomenclatura de las subunidades está basada en el tamaño expresado en kDa, mientras que la nomenclatura de las subunidades del complejo I humano se basa en el nombre del gen que las codifica (Lazarou y col., 2008). De esta forma las subunidades que son codificadas por el genoma nuclear son llamadas NADH ubiquinona deshidrogenasa (NDU, de acuerdo a sus siglas en inglés), seguido por la descripción de su función o localización, de la siguiente forma: las siglas FS para las proteínas de hierro azufradas, las siglas FV para la región de la flavo proteína, las siglas FA para el subcomplejo  $\alpha$ , las siglas FB para subcomplejo  $\beta$  y las siglas FC para el subcomplejo aún no definido. Y aquellas que son codificadas por el ADN mitocondrial son nombradas NADH deshidrogenasa (ND), seguido por el número de la subunidad (Figura 3) (Lazarou y col., 2008).

Las catorce subunidades del complejo I humano son la NDUFS1, NDUFS2, la NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 y NDUFV2, las cuales son codificadas por el genoma nuclear y están implicadas en la oxidación del NADH y la subsecuente transferencia de electrones a la ubiquinona. Mientras que las siete subunidades restantes son: la ND1-6 y la ND4L, que son codificadas por el ADN mitocondrial y están localizadas en el brazo hidrofóbico del complejo (Lazarou y col., 2008). Las subunidades ND1, la ND4 y la ND5 pueden albergar un sitio de unión a la quinona, por lo que pueden estar implicados en la unión a la ubiquinona. Por comparación de análisis de secuencias, de las subunidades ND2, ND4 y ND5 muestran que son similares a los antiportadores de  $K^+/H^+$  o  $Na^+/H^+$  lo que las pudiera implicar en la función de translocación de protones del complejo I (Lazarou y col., 2008).

Todas las otras subunidades que no forman parte del centro del complejo I son llamadas subunidades accesorias o supernuméricas y no se ha establecido la función exacta que cumplen, sin embargo se ha propuesto que pueden estabilizar o proteger al

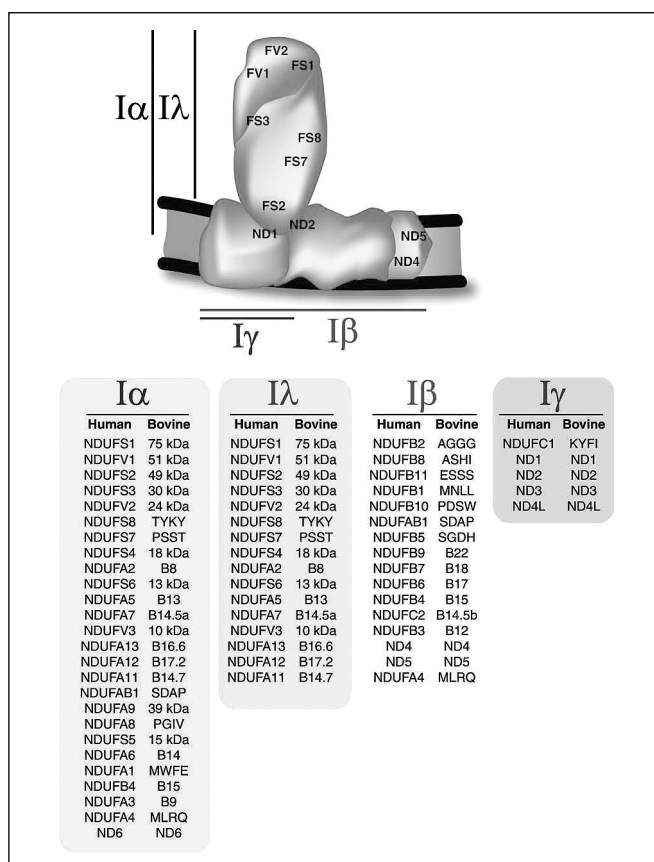


Figura 3. Topología de la subunidades del complejo I (Lazarou y col., 2008).

complejo de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Lenaz y col., 2006; Lazarou y col., 2008; Vogel y col., 2007). Así mismo, se han sugerido funciones más específicas para estas subunidades; por ejemplo la subunidad de 10 y 18 kDa son fosforiladas de forma dependiente del AMP cíclico; otras subunidades, como la NDUFA13, o también llamada GRIM-19, está implicada en la apoptosis (Lazarou y col., 2008).

Un importante punto al cual se debe hacer referencia es la existencia de supercomplejos en condiciones fisiológicas. Investigadores como Schägger y Pfeiffer, en el 2000 han aportado evidencia convincente de la existencia de multicomplejos en levaduras y en mitocondrias de mamíferos, utilizando técnicas que permiten separar los complejos de la membrana mitocondrial como lo es la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (BN-PAGE en sus siglas en inglés) (Schägger y Pfeiffer., 2000). Estos trabajos han demostrado que los complejos I y III de la mitocondria del corazón de bovino interaccionan formando un supercomplejo, el cual consiste de un complejo I y dos complejos III ( $I_1III_2$ ) los cuales se ensamblan en dos grandes supercomplejos con diferentes números del complejo IV ( $I_1III_2IV_2$  y  $I_1III_2IV_4$ ). Estos resultados han despertado interés en determinar la influencia del complejo III sobre el complejo I (Lenaz y col., 2006).

### 1.2.4. Aspectos médicos del complejo I

Alrededor del 50% de todos los desórdenes mitocondriales afectan el metabolismo energético, y éstos pueden ser originados por mutaciones en las subunidades del complejo I (Brandt, 2006). Por ejemplo, mutaciones en el ADNmt que codifica las subunidades del complejo están asociadas con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON en sus siglas en inglés) que sólo afecta al nervio óptico. Otras mutaciones pueden dar origen a encefalopatías mitocondriales, acidosis láctica y episodios semejantes a los accidentes cerebrovasculares (MELAS, en sus siglas en inglés) (Lazarou y col., 2008). Los defectos del CI también están asociados con el síndrome de Leigh, el cual se caracteriza por presentar alteraciones a nivel del sistema nervioso central en los niños (Brandt., 2006; Lazarou., 2008). Deficiencias del CI mitocondrial también son frecuentemente asociadas con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, así como en enfermedades en donde hay una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como lo es la angina, enfermedades isquémicas, sepsias, endotoxemia y cáncer, entre otras (Carreras, 2004; Lenaz y col., 2006).

### 1.3. PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN LA MITOCONDRIA

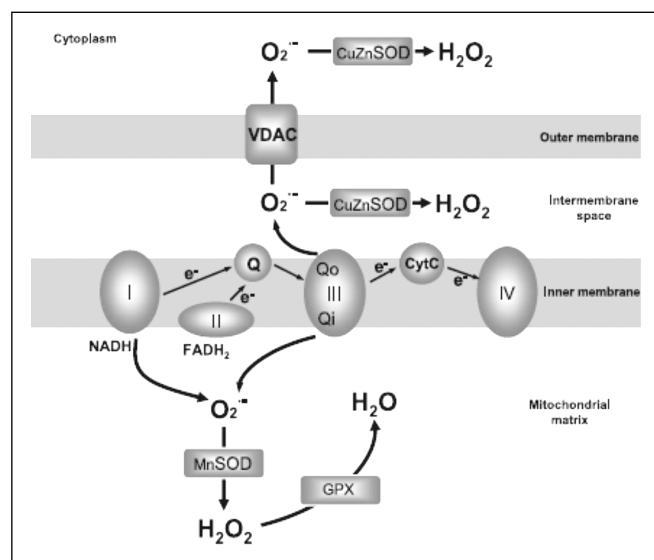
En la última década ha crecido de forma exponencial el interés por conocer el papel de las especies reactivas de oxígeno (EROs) como moléculas de señalización celular; éstas engloban un gran rango de moléculas que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), entre otros. Varios sistemas enzimáticos producen EROs, 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 (Turko y Murad, 2002; Fruehauf y Meyskens, 2007).

Sin embargo, la mitocondria es considerada como una de las principales fuentes intracelulares de estas EROs en condiciones normales y fisiológicas vía el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones (Giulivi y col., 2003, 2006). La tasa de producción de EROs por la mitocondria se incrementa en una variedad de condiciones patológicas, dentro de las cuales se incluyen la hipoxia, la isquemia, la reperfusión, la angina, entre otras (Chen y col., 2003). De un 2 a un 3% del oxígeno consumido por la mitocondria es reducido parcialmente a anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual puede ser convertido por reacciones enzimáticas y no enzimáticas en otras especies reac-

tivas de oxígeno (Warnholtz y col., 2004; Vizi y Chino-poulos., 2006; Zhang y Gutterman, 2006).

No se ha establecido el mecanismo exacto por el cual el complejo I genera  $O_2^-$ ; se ha propuesto a la mono nucleótido flavina (MNF), las proteínas de hierro azufradas (FeS) y los centros de unión a ubiquinona (Q) como los posibles sitios de producción de  $O_2^-$  por parte del complejo I. En contraste, el complejo III produce  $O_2^-$  por los centros  $Q_o$  y  $Q_i$  del ciclo de oxidación de la ubiquinona (Figura 4) (Zhang y Gutterman, 2006).

Dentro de la mitocondria se encuentran defensas antioxidantes contra el  $O_2^-$ , entre las cuales se pueden citar dos ejemplos: el primero de ellos se trata de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), que cataliza la conversión del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembrana, y en el citosol por la cobre/zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD); el segundo, la glutatión peroxidasa (GPX), la cual convierte en agua al peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa (Figura 4). Es importante destacar que el  $H_2O_2$  en presencia de metales de transición es convertido en  $\cdot OH$ , una especie muy reactiva, la cual media el daño al ADN, proteínas y lípidos durante el estrés oxidativo (Zhang y Gutterman, 2006).



**Figura 4. Producción de  $O_2^-$  por el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones y enzimas antioxidantes.**

Debido a la presencia de estas defensas antioxidantes en la mitocondria y la incapacidad del  $O_2^-$  de traspasar la membrana interna mitocondrial, la medida de la producción de  $O_2^-$  en la mitocondria se realiza por detección fluorométrica del peróxido de hidrógeno o por medida directa utilizando métodos de *spin traps* con espectroscopia electrónica de resonancia paramagnética en mitocondrias aisladas

en presencia de sustratos del complejo I (piruvato, malato y glutamato), o en presencia de sustratos del complejo II (succinato y  $\alpha$ -glicerofosfato), así como en presencia o ausencia de ADP, y con uso de inhibidores de los complejos de la cadena respiratoria (Vizi y Chinopoulos, 2006). Todas estas variables pueden influir crucialmente en los sitios y los mecanismos por los cuales se produce EROs en las mitocondrias aisladas.

### 1.3.1. Producción de Anión superóxido por los complejos I y III

El complejo I es considerado una de las principales enzimas que contribuyen a la generación de  $O_2^-$  en la mitocondria, pero el sitio de reducción univalente del oxígeno en el CI no ha sido bien establecido. Se ha sugerido a las proteínas hierro azufradas, específicamente al N2 y al N1a, los sitios de unión a ubiquinona, y a la FMN como los donadores de electrones al oxígeno (ver Figura 5) (Lenaz y col., 2006; Brand y col., 2004).

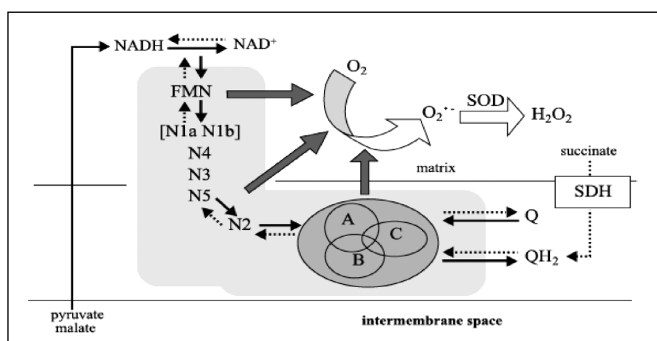


Figura 5. Posibles sitios de producción de  $O_2^-$  en el complejo I (Brand y col., 2004).

La producción de  $O_2^-$  por el CI es alta durante la transferencia de electrones reversos desde el succinato al NAD<sup>+</sup>, mientras que durante la transferencia de electrones desde el CI la producción de  $O_2^-$  es menor. En presencia de inhibidores del CI como la rotenona la formación de  $O_2^-$  es incrementada con sustratos del complejo I mientras que con sustratos del CII la producción de  $O_2^-$  es inhibida (Lenaz y col., 2006; Brand y col., 2004).

Por lo tanto se ha clasificado a los inhibidores del complejo I de la siguiente forma: los de clase A, que inducen un incremento en la producción de EROs desde el CI (rotenona, piericidina A, mixotiazol, etc.) y los de clase B, que previenen completamente la producción de EROs por la enzima (stigmatelina, capsaicina, coenzima Q<sub>2</sub>). Muchos de los inhibidores de la clase A son también inhibidores del centro Qo del CIII (Lenaz y col., 2006).

El complejo III o ubiquinol: la citocromo c óxido reductasa es otra enzima de la cadena de transporte de electrones que ha sido identificada como generadora de  $O_2^-$ . Éste produce  $O_2^-$  por autooxidación de la ubisemiquinona (QH), intermediario formado durante el ciclo Q en el complejo, en el cual el centro Qo del complejo produce  $O_2^-$  hacia el espacio intermembrana y en el sitio Qi produce  $O_2^-$  hacia la matriz mitocondrial. Los inhibidores como la antimicina A prolongan la vida de la QH impidiendo su paso a ubiquinol, lo que origina que se incremente la producción de  $O_2^-$  hacia la matriz; mientras que los inhibidores como el mixotiazol inhiben al centro Qi y previenen la formación de ubisemiquinona, por lo que la producción de  $O_2^-$  por ese centro disminuye (Zhang y Gutterman, 2006; Chen y col., 2003). Por lo tanto, el CIII tiene la capacidad de producir EROs hacia la matriz y el espacio intermembrana mitocondrial.

De esta forma el CI y el CIII pueden jugar distintos papeles en la producción de anión superóxido durante situaciones diferentes. Por ejemplo, se ha sugerido que el complejo III es el principal sitio de producción de  $O_2^-$  durante la hipoxia/ re-oxigenación en células endoteliales del cordón umbilical.

En este mismo contexto, la producción de  $O_2^-$  es regulada por factores fisiológicos como son el potencial de membrana, el calcio intracelular y el óxido nítrico. Así como también se ha visto que un complejo I deficiente incrementa la producción de las EROs (Lenaz y col., 2006; Verkaart y col., 2007).

Se ha establecido una relación entre las enfermedades mitocondriales y la producción de EROs, así la sobreproducción de EROs y una disminución en la producción de ATP pueden causar deficiencias de la fosforilación oxidativa y esto ocasionar enfermedad mitocondrial (Kirkinezos y Moraes., 2001).

### 1.4. PRODUCCIÓN DE NO EN LA MITOCONDRIA

Otra especie reactiva de oxígeno indispensable para los procesos de nitración, es el óxido nítrico (NO), el cual se produce dentro de la mitocondria a través de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) (Giulivi, 2002; Ghafourifar y Cadenas, 2005). El NO que produce la mitocondria y el generado fuera de ella, proveniente de la síntesis inducida por las óxido nítrico sintasas celulares, regula el consumo de oxígeno mitocondrial y el potencial transmembrana por inhibición de la citocromo c oxidasa, así como también estimula la producción de  $O_2^-$  mitocondrial (Warnholtz y col., 2004). Este NO puede reaccionar con el  $O_2^-$  para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un agente nitrante de las proteínas mitocondriales (Kulwant y col., 2004).

## 2. Nitración de Proteínas Mitocondriales

La nitración de los residuos de tirosina de las proteínas es una modificación post-translacional que ocurre en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (Ischiropoulos., 2003). La adición covalente de un grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) en la posición orto de uno de los carbonos del anillo aromático de la tirosina forma 3-nitrotirosina (3-NT) (ver Figura 6), la cual es considerada como un biomarcador del estrés oxidativo dependiente del óxido nítrico (NO) (Halliwell, 1997).

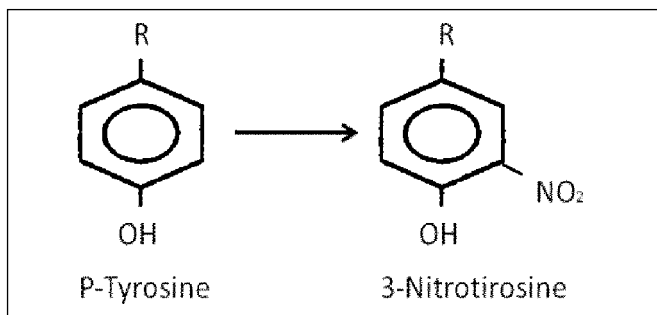


Figura 6. Formación de 3-Nitrotirosina.

Este proceso es mediado por especies reactivas de nitrógeno, como lo son el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ); formados como productos secundarios del metabolismo del NO en presencia de oxidantes como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y con metales de transición (Radi, 2004).

Se ha establecido que la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas puede alterar la estructura y función de las mismas, así como su fosforilación (Turko y Murad, 2002). La adición del grupo  $\text{NO}_2$  al residuo de tirosina cambia el pKa del grupo hidroxilo de 10.1 a 7.2, lo que introduce una carga negativa a la tirosina nitrada a pH fisiológicos, generando alteración de la estructura y de la actividad catalítica de la proteína (Woon-Seok Yeo y col., 2008).

Este proceso también puede cambiar la tasa de degradación proteolítica de las proteínas nitradas y favorecer su rápida eliminación o acumulación en el organismo, lo que sugiere que la nitración de proteínas está envuelta en la iniciación y progresión de enfermedades en donde hay sobreproducción de NO y especies reactivas de oxígeno (EROs) (Turko y Murad, 2002; Woon-Seok Yeo y col., 2008).

Como se explicó, una de las especies reactivas de nitrógeno que median la nitración de proteínas es el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ), un agente nitrante, el cual es formado por la reacción entre cantidades equimolares de los radicales óxido nítrico (NO) y anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ( $k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Radi y col., 2002). Este anión no reacciona directamente con los residuos de tirosina

sino que sufre una serie de reacciones de descomposición. Una de estas reacciones da origen a su forma protonada, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), el cual es transformado por escisión homolítica en dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), siendo este último el responsable de causar daños al ADN, proteínas y lípidos durante el estrés oxidativo (Figura 7.1) (Woon-Seok Yeo y col., 2008). El  $\cdot\text{OH}$  oxida los residuos de tirosina de las proteínas formando el radical tirosilo, el cual reacciona con  $\cdot\text{NO}_2$  para formar 3-NT (Woon-Seok Yeo y col., 2008). El  $\text{ONOO}^\cdot$  también puede reaccionar con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para formar nitroso peroxocarboxilato ( $\text{ONOOCO}_2^\cdot$ ), el cual se descompone espontáneamente a carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) (Figura 7.2) (Woon-Seok Yeo y col., 2008). El  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  formado reacciona con los residuos de tirosina para formar radical tirosilo que luego es transformado en 3-NT por reacción con el  $\cdot\text{NO}_2$  (Figura 8) (Radi y col., 2002).

El peroxinitrito no es la única fuente de formación de 3-NT *in vivo*; otras especies, como lo son el dióxido de nitrógeno, el ácido nitroso, el cloruro de nitrilo y ciertas peroxidases, median también la formación de 3-NT en el organismo. Por ejemplo, el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es formado por la autooxidación del NO o por oxidación del peroxinitrito; éste en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de peroxidases forma el  $\cdot\text{NO}_2$  el cual también es una especie nitrante (Figura 7.3) (Woon-Seok Yeo y col., 2008).

En la mitocondria la nitración de tirosinas es mediada principalmente por las reacciones del  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  con la tirosina, o por reacciones con metales de transición; esta última es catalizada por la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Figura 9) (Radi y col., 2002).

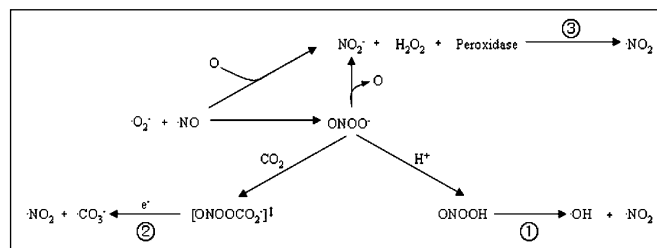


Figura 7. Vías de formación y descomposición del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ).  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , anión superóxido; NO, óxido nítrico;  $\text{ONOOCO}_2^\cdot$ , nitroso peroxocarboxilato;  $\text{ONOOH}$ , ácido peroxinitroso;  $\cdot\text{OH}$ , radicales hidroxilo;  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono;  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ , carbonato;  $\text{NO}_2^\cdot$ , nitrito;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno (Woon-Seok Yeo y col., 2008).

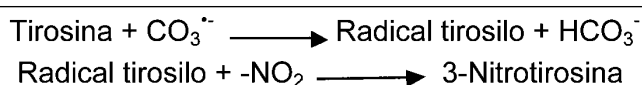
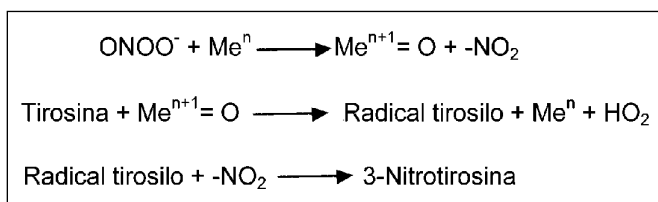
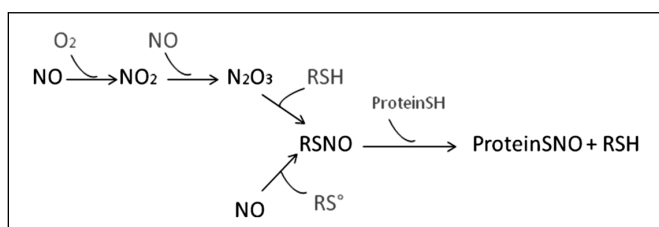


Figura 8. Formación del radical tirosilo y 3-nitrotirosina en presencia de  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  (Radi y col., 2002).



**Figura 9.** Reacción del peroxinitrito con metales de transición y formación de 3-nitrotirosina (Radi y col., 2002).

Otra de las reacciones mediadas por el NO en la mitocondria son las de nitrosación, la cual se producen cuando las concentraciones de NO son altas. El NO reacciona con el oxígeno para producir  $\text{NO}_2$  el cual reacciona rápidamente con el NO para producir  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Figura 10) (Brown y Borutaite, 2004). Este último, es el agente nitrosante el cual dona un grupo  $\text{NO}^+$  a las aminas para producir S-nitrosoaminas o a los tioles para formar S-nitrosotiol (RSNO). La nitrosación es frecuentemente también llamada nitrosilación, pero este término se refiere a la adición de un grupo  $\text{NO}^+$  a los átomos de  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 10.** Reacción de Nitrosación. NO, óxido nítrico;  $\text{O}_2$ , oxígeno;  $\text{-NO}_2$ , dióxido de nitrógeno;  $\text{N}_2\text{O}_3$ , RSH,  $\text{RS}^\bullet$ , RSNO, S-nitrosotioles; ProteinSH; ProteinSNO, proteína nitrosilada (Brown y Borutaite, 2004).

La transferencia directa del grupo  $\text{NO}^+$  entre los diferentes S-nitrosotioles es un proceso conocido como transnitrosación. La nitrosación, al igual que la nitrosación de proteínas, puede alterar la función de las mismas (Brown y Borutaite, 2004).

Es necesario destacar que la nitrosación de tirosina tiene un cierto grado de selectividad, no todos los residuos de tirosina son nitrados (Woon-Seok Yeo y col., 2008). Ciertos residuos de tirosina están correlacionados con la relación estructura-función de las proteínas nitradas; por ejemplo los residuos de tirosina 356 y 366 de la proteína esfingosina 1-fosfatasa 1 se encuentran localizados en el dominio catalítico de la proteína (Woon-Seok Yeo y col., 2008). Se han establecido los factores que determinan la aparente selectividad de la nitrosación de proteínas, los cuales son; la proximidad del residuo de tirosina al sitio de generación de los agentes nitrantes, segundo la abundancia de la proteína y el número de residuos de tirosina en la proteína y por último la secuencia de aminoácidos de la proteína o el medio

ambiente nitrante (Ischiropoulos, 2003; Woon-Seok Yeo y col., 2008; Schopfer y col., 2003).

En conclusión, queda establecido que en la mitocondria se produce  $\text{O}_2^-$  y NO, que son capaces de reaccionar para formar peroxinitrito. Este peroxinitrito formado en la mitocondria tiene una vida media corta de 3 a 5 mseg, por lo que se especula que puede difundir fuera de la mitocondria. Esto aunado al hecho que el peroxinitrito formado extramitocondrialmente puede difundir, a través de mecanismos aun no establecidos al interior de la mitocondria, incrementa la probabilidad de que las proteínas de los cuatro compartimientos mitocondriales sean nitradas (Radi y col., 2002); lo cual ha sido corroborado por la identificación de un gran número de proteínas nitradas *in vivo* e *in vitro* en la mitocondria, especialmente las que se encuentran localizadas en la matriz mitocondrial (Aulak y col., 2001; Turko y col., 2001).

Ahora bien, la primera proteína nitrada identificada *in vivo* fue la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), la cual cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. La nitrosación de la misma causa su inactivación, de forma que regula positivamente la formación de peroxinitrito intramitocondrial, que desencadena señales apoptóticas en la mitocondria (Ischiropoulos, 2003; Radi, 2004); siendo la nitrosación de esta proteína un ejemplo de la proximidad intramolecular que regula la nitrosación sitio específica (Woon-Seok Yeo y col., 2008). Otras proteínas implicadas en las vías antioxidantes, metabólicas y del sistema de fosforilación oxidativa han sido identificadas como nitradas *in vivo* (Figura 11). Algunas de ellas son la aconitasa, la citocromo c, los canales aniónicos dependientes de voltaje, la ATPasa, la succinil-CoA sintasa, la succinil-CoA:3-oxoácido CoA-transferasa, la malato deshidrogenasa (MDH), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la acil-CoA deshidrogenasa (acil-CoA-DH), la enoil-CoA hidratasa (enoil-CoA-HD), la  $\beta$ -cetotiolasa ( $\beta$ -KT) y los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (Koeck y col., 2005).

Además de producir nitrosación y nitrosilación de las proteínas, el peroxinitrito y el NO pueden disparar procesos que afectan la fisiología mitocondrial, de los cuales se puede mencionar inhibición del metabolismo energético, alteraciones de la homeostasis del calcio y apertura del poro de transición de permeabilidad, así como inhibición del citocromo c, de la ATP sintasa, del complejo I y II de la cadena de transporte de electrones (Brown y Borutaite, 2004).

Son numerosos los artículos que han sido publicados en donde se utilizan técnicas proteómicas

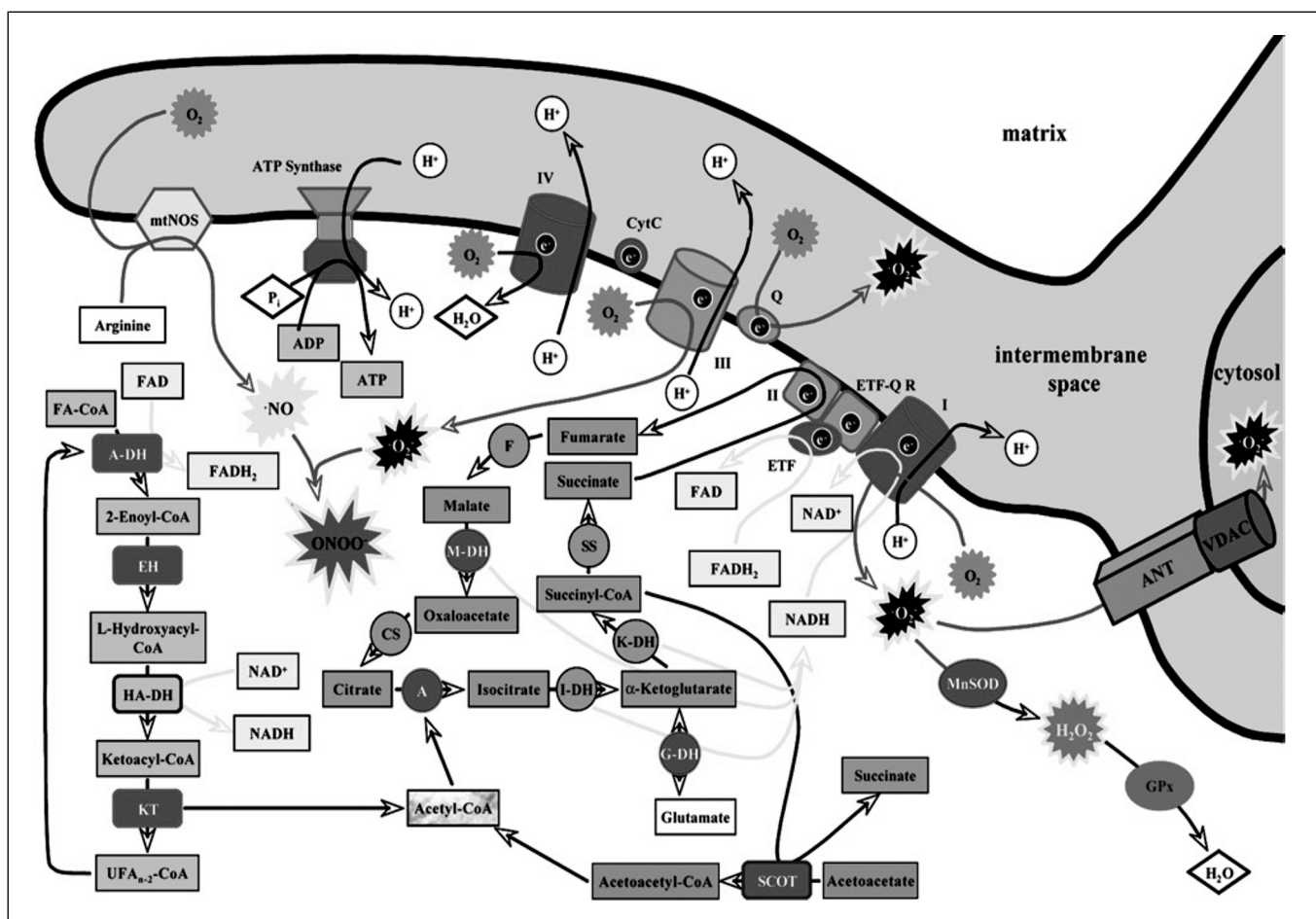


Figura 11. Proteínas mitocondriales nitradas. Las proteínas marcadas de color rojo son las que han sido identificadas como nitradas. MnSOD, manganeso superóxido dismutasa; A, aconitasa; Cyt c, citocromo c; VDAC, canales aniónicos dependientes de voltaje; ATPasa; SS, succinil-CoA sintasa; SCOT, succinil-CoA:3-oxoácido CoA-transferasa; M-DH, malato deshidrogenasa; G-DH, glutamato deshidrogenasa; A-DH, acil-CoA deshidrogenasa; EH, enolil-CoA hidratasa; KT, β-cetotiolasa y los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (Koeck y col., 2005).

para identificar proteínas mitocondriales nitradas en condiciones tanto normales como fisiopatológicas, con fuentes endógenas o exógenas de especies reactivas de nitrógeno (Bailey., 2005). Frecuentemente estos estudios han detectado las proteínas nitradas por Western blot, utilizando anticuerpos contra 3-NT pero también usando inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, HPLC con detección electroquímica y espectrometría de masa para su identificación (Larsen., 2008). Muchos de estos estudios han observado un incremento de las proteínas nitradas en enfermedades donde hay una sobreproducción de estrés nitrosativo, seguido de la identificación de los residuos de tirosina nitrados, con la finalidad de entender el papel que juega la nitración en la fisiología mitocondrial en condiciones tanto normales como patológicas.

### 2.1. NITRACIÓN DEL COMPLEJO I

Como se mencionó anteriormente, se sabe que el complejo I, o NADH: ubiquinona óxido reductasa

es una enzima compleja que forma parte de la cadena de transporte de electrones, cuya principal función es la transferencia de electrones desde la NADH a la ubiquinona, en una reacción que es acoplada a la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Brown y Borutaite, 2004). Adicionalmente cumple otras funciones, dentro de las que se destaca la producción de anión superóxido, esto aunado a la presencia del NO en la mitocondria la hace altamente susceptible a los efectos del peroxinitrito y a la nitración (Carreras y col., 2004).

El complejo I es inhibido por el peroxinitrito y el óxido nítrico a través de diferentes mecanismos, entre los cuales se encuentran la S-nitrosación, la nitración de tirosinas y daños a los centros de hierro azufrados del complejo (Brown y Borutaite, 2004).

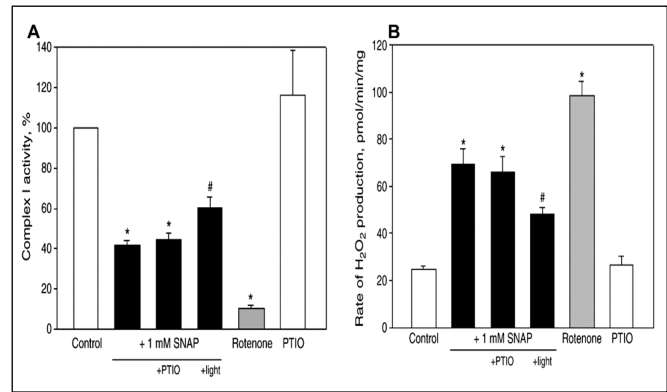
Galkin y Moncada (2007) han demostrado que la exposición prolongada de preparaciones de membranas mitocondriales al NO produce una persistente inhibición del complejo I, la cual es atribuida a la nitrosación de residuos de tiol, hecho que ha sido

demostrado por otros grupos (Dahm y col., 2006; Borutaite y col., 2000). Asimismo, Borutaite y colaboradores (2006) demostraron que la adición de donadores de NO S-nitrosantes como el SNAP (S-nitrosoacetilpenincilamina) a mitocondrias aisladas de corazón produce una rápida inhibición de la actividad del complejo I y un incremento de la producción de  $H_2O_2$ ; este último efecto es similar al producido por la rotenona, un inhibidor del complejo I. Cuando estas mitocondrias tratadas con SNAP fueron expuestas a la luz (la cual destruye los S-nitrosotios), se revirtió de forma parcial la inhibición de la actividad y la producción de  $H_2O_2$ , lo cual sugiere que la S-nitrosación del complejo I puede ser responsable de estos dos efectos. En este mismo contexto, el PTIO, un atrapador de NO que remueve el NO libre, no inhibió la disminución de la actividad y el incremento de la producción de  $H_2O_2$  inducidos por el SNAP, lo que indica una posible reacción de transnitrosación (Figura 12).

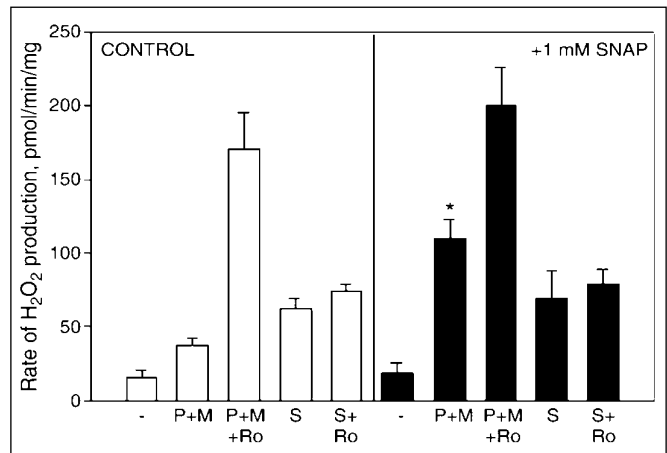
Sin embargo, el ditiotreitól (DTT), un agente reductor de tioles, no inhibió completamente el efecto producido por el SNAP en la mitocondria, lo que sugiere que el SNAP media la inhibición y la producción de EROs por un mecanismo adicional a la S-nitrosación.

Otro hallazgo interesante que muestran estos autores es el hecho que el SNAP solo incrementó la producción de  $H_2O_2$  en presencia de sustratos del complejo I como lo son el piruvato/malato, mientras que en presencia de sustratos del complejo II como lo es el succinato, el SNAP no produjo ningún incremento con respecto a la mitocondria control, así como tampoco produjo inhibición de la actividad del complejo II y III, indicando que la producción de EROs en las mitocondrias tratadas con SNAP es mediada por el complejo I (Figura 13).

Por otra parte, en experimentos realizados por el mismo grupo de Riobo y col. (2001) se reportó que la exposición de mitocondrias aisladas y de las partículas submitocondriales a un donador del NO (DETA-NOONOate) resulta en una inhibición específica de la NADH:ubiquinona óxido reductasa, la cual es parcialmente prevenida por la superóxido dismutasa (SOD) y por el ácido úrico, ambos atrapadores del  $O_2^-$  y del  $ONOO^-$  respectivamente. Estos hallazgos indican la participación del  $ONOO^-$  como mediador de la inhibición del complejo I. Sin embargo, el hecho de que la glutatión reducida (GSH) no revierte la inhibición del complejo I sugiere que la S-nitrosación no está envuelta; aunado a la detección de 3-NT de la subunidades del complejo I, parece indicar más bien que la nitración pudiera estar mediando la inhibición (Tabla I y Figura 14) (Riobo., 2001).



**Figura 12.** Efectos del SNAP sobre la actividad y producción de  $H_2O_2$  por el complejo I en mitocondrias aisladas de corazón. Las mitocondrias de corazón fueron tratadas con 1 mM de SNAP durante 30 min. en ausencia o en presencia de 1 mM de PTIO o con 2  $\mu$ M de rotenona por 5 min., luego fueron lavadas para determinar la producción de  $H_2O_2$  por la técnica de Amplex Red (B) y actividad del complejo I (A). + light indica que las mitocondrias fueron expuestas a la luz durante 4 min. (Brown y Borutaite, 2004).



**Figura 13.** Efectos de sustratos exógenos en la producción de  $H_2O_2$  en mitocondrias aisladas de corazón. P + M= 1 mM Piruvato + 1 mM Malato; P + M + R= 1 mM Piruvato + 1 mM Malato + 2  $\mu$ M Rotenona; S= 5 mM succinato; S + Ro= 5 mM Succinato + 2  $\mu$ M Rotenona (Brown y Borutaite, 2004).

Existe evidencia adicional que sugiere que el peroxinitrito inhibe el complejo I mediante un mecanismo que implica la nitración de tirosina (Bharath y col., 2005; Yamamoto, 2002). En efecto, mediante un estudio exhaustivo realizado por Murray y col. (2003) en mitocondrias aisladas de corazón de bovino, se demostró que los complejos I, II y V son inhibidos por el peroxinitrito; adicionalmente, mediante el uso de técnicas proteómicas se aisló el complejo I y se identificó mediante técnicas de espectrometría de masa a cinco proteínas del complejo I nitradas: la subunidad de 49 kDa (NDUFS2), la TYHY (NDUFS8), la B17.2, la B15 (NDUFB4) y la B14 (NDUFA6). Aun cuando las subunidades B15 y B14 fueron las que mayor nivel de nitración presentaron, éstas no están implicadas en la función catalítica del complejo I pero sí en el proceso de ensamblaje del mismo. (Murray

Tabla I  
Efecto del NO en las actividades del complejo I y II de partículas submitocondriales

	Enzyme activity (nmol of NAD <sup>+</sup> /min per mg of protein)	
	NADH:cytochrome c reductase	Succinate:cytochrome c reductase
Control	85 ± 9	107 ± 10
Decayed DETA-NONOate	77 ± 2	—
DETA-NONOate (without succinate)	75 ± 5	105 ± 13
DETA-NONOate	19 ± 5*	113 ± 11
+ 20 μM SOD	33 ± 7*	—
+ 100 μM SOD†	76 ± 9	—
+ 20 μM SOD + 2 mM uric acid	47 ± 3*	—
+ 100 μM SOD + 2 mM uric acid†	78 ± 6	—
+ 5 mM GSH‡	80 ± 8	—
+ 5 mM GSH§	22 ± 9*	—

\*  $P < 0.05$  with respect to control values.  
† Submitochondrial particles obtained in 100 μM Cu,Zn-SOD-supplemented sonication medium were used.  
‡ GSH was included at the beginning of incubation with NO.  
§ GSH was added after 20 min of incubation with NO and incubated for an additional 30 min.

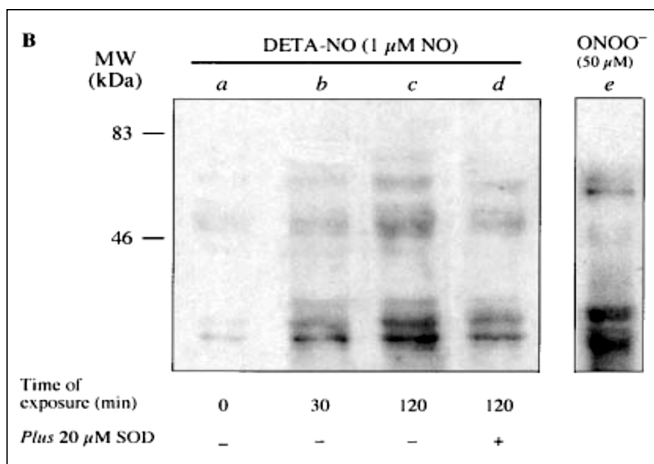


Figura 14. Detección de 3-NT en partículas submitocondriales de hígado de rata, incubadas con DETA-NONOate.

Adicionalmente, la NDUFS2 forma parte de las subunidades que constituyen el centro del complejo I y que están implicadas en la oxidación del NADH y transferencia de electrones, así como la subunidad accesoria B17.2 implicada en el ensamblaje del complejo. Otro trabajo realizado en un modelo de encefalomiелitis autoinmune identificaron a la subunidad B14 (NDUFA6) como nitrada, la cual pertenece a las subunidades NDUFA del complejo I que están envueltas en el ensamblaje del mismo (Qi y col., 2006). Por lo que no está claro si la nitración mediada por el peroxinitrito induce inhibición del complejo I.

Aún más, en células dopaminérgicas provenientes de pacientes con enfermedades neurodegenerativas se ha detectado 3-NT en la membrana plasmática, el núcleo y en fracciones mitocondriales pertenecientes a subunidades del complejo I (Yamamoto., 2002). Lo

que sugiere que la nitración del complejo puede producir disfunción mitocondrial, la cual ha sido observada en pacientes con enfermedad de Parkinson y angina.

En este mismo contexto se ha observado que la deficiencia del complejo I genera una disminución de la producción de la energía mitocondrial e incrementa su propia producción de anión superóxido, lo cual desencadena estrés oxidativo y nitrosativo en el organismo (Carreras, 2004; Takahiro, 2002).

### 3. La hipoxia

La hipoxia es considerada como una reducción de la entrada de oxígeno en los tejidos por debajo de los niveles fisiológicos e insuficiente para la demandas celulares. Es un factor común en muchas enfermedades entre las que se encuentran desórdenes pulmonares, sepsis, accidentes cerebrovasculares, angina e isquemia entre otras (Poderoso y col., 1978; Brandt, 2006; Blomgren y col., 2006). La hipoxia produce una serie de respuestas adaptativas a nivel tisular, celular y molecular. Una respuesta fisiológica a la hipoxia requiere de la existencia de un sensor de oxígeno acoplado a sistemas de traducción de la señal (Hoffman y col., 2007). La mitocondria ha sido propuesta como uno de esos sensores, ya que incrementa la producción de EROs durante la hipoxia (Chandel y Schumacker, 2000; Guzy y Schumacker, 2006). Estas especies parecen actuar como segundos mensajeros en respuestas adaptativa a la hipoxia en una variedad de células.

Existe evidencia que demuestra que la hipoxia incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico mitocondrial (Warnholtz., y col., 2002; Chandel y Schumacker, 2000; Guzy y Schumacker, 2006). El mecanismo mediante el cual la hipoxia incrementa la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> no ha sido bien establecido. Se han propuesto varios mecanismos; uno de ellos indica que las bajas concentraciones de oxígeno en la citocromo c oxidasa (complejo IV) causa un flujo reverso de electrones hacia la cadena proximal e incrementa la producción de anión superóxido (Hoffman y col., 2007). Sin embargo, recientemente este mecanismo ha sido redefinido y se ha propuesto que la hipoxia puede inducir un cambio conformacional en el complejo III de la cadena de transporte de electrones, el cual facilita la interacción entre el radical ubisemiquinona (UQ<sup>•</sup>) y el O<sub>2</sub>. La ubisemiquinona es un radical libre que puede transferir un electrón al oxígeno molecular para formar anión superóxido. Este último modelo está basado en estudios que muestran que los inhibidores de la cadena de transporte de electrones, como la roteno-

na y el DPI, previenen la generación de ubisemiquinona, disminuyendo por ende la generación de EROs en células sometidas a hipoxia, mientras que inhibidores como la antimicina A o el cianuro tienden a incrementar la generación de EROs por acumulación de la ubisemiquinona (Figuras 15 y 16) (Warnholtz y col., 2002; Guzy y Schumacker, 2006).

Otro mecanismo propuesto para la generación de EROs durante la hipoxia consiste en que el complejo IV puede reducir al citocromo c y por ende incrementar la producción de anión superóxido, ya que el citocromo c oxidado es un atrapador de este anión (Skulachew, 1998).

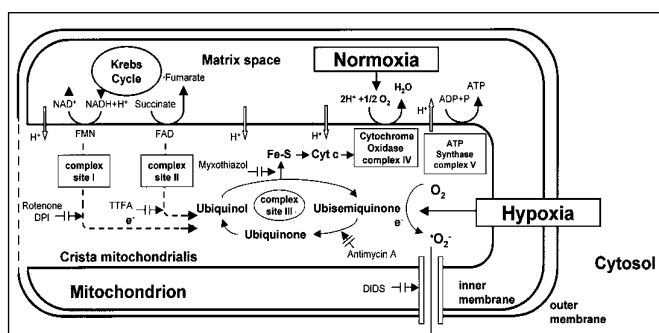


Figura 15. Modelo propuesto para la producción de  $O_2^-$  por el ciclo de oxidación de la ubiquinona del complejo III durante la hipoxia (Warnholtz y col., 2002).

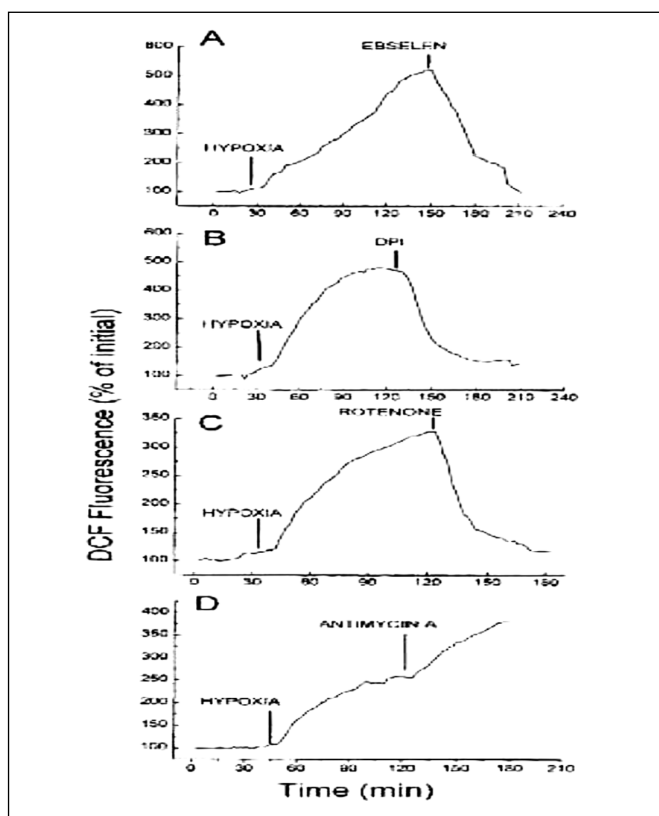


Figura 16. Efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones y del ebselen en la oxidación del DCFH en células hepáticas 3B durante la hipoxia. DCFH= 2',7'-diclorofluorescina (Guzy y Schumacker., 2006).

Sin embargo, se necesita el oxígeno para la producción de las EROs. Existe controversia y debaten para explicar cómo la hipoxia incrementa la generación de las EROs en la mitocondria. Una hipótesis alternativa ha sido propuesta, en la que se sugiere que durante la hipoxia la generación de EROs disminuye y que ésta actúa como señalización hipóxica, activando la expresión de genes a través de la estabilización del factor inducible de hipoxia alfa (HIF- $\alpha$  en sus siglas en inglés) (Hoffman y col., 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que la hipoxia incrementa la producción de NO y nitrito en las mitocondrias aisladas del hígado de la rata en un modelo de hipoxia/re-oxigenación (isquemia-reperfusion); y que esta producción puede ser inhibida por el L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (Figura 17) (Schild y col., 2003). Adicionalmente, se demostró que la hipoxia produce un deterioro del estado activo de la respiración en presencia de glutamato/malato después de la re-oxigenación (Figura 18).

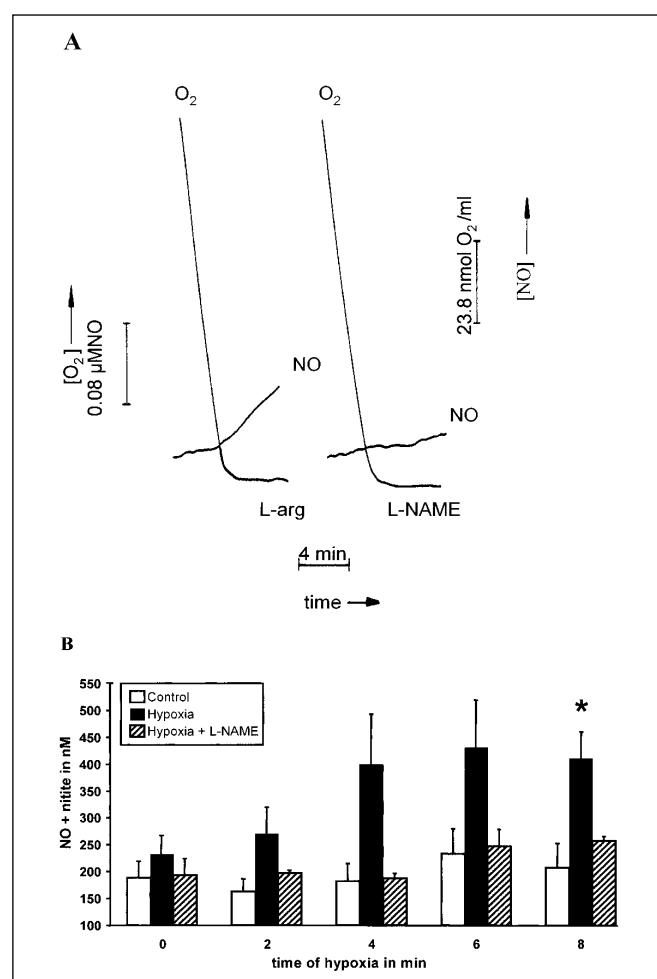


Figura 17. Efecto de la hipoxia sobre la producción de NO y nitrito. La mitocondria del hígado de la rata (2 mg/ml) fue incubada en presencia de 10 mM de L-arginina o 10 mM de L-NAME a 30 °C. Detección de la producción de NO y medida del consumo de  $O_2$  por un electrodo sensible a NO combinado con un electrodo tipo Clark (A), Producción de NO más nitrito (B) (Schild y col., 2003).

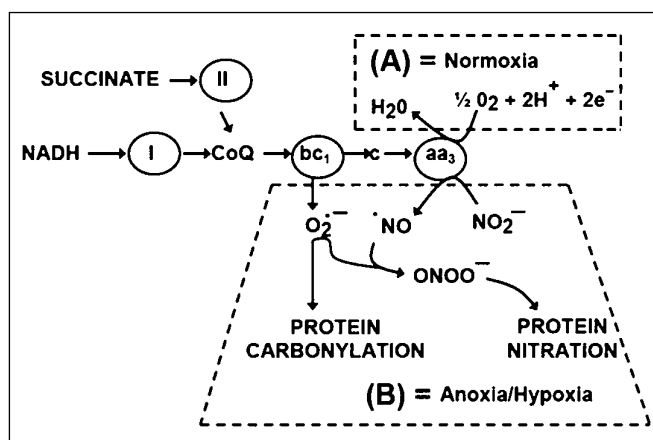
Aún más, el NO producido durante la hipoxia incrementa los niveles de proteínas carboniladas y produce una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH); ambos efectos fueron bloqueados por el L-NAME, lo que sugiere que la hipoxia media sus acciones a través del NO generado por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (Schild y col., 2003).

Velocidad de respiración en ng átomos de $O$ $min^{-1} mg^{-1}$		
	-hip/reox	+hip/reox
Sin reposo	$6.9 \pm 0.8$	$7.7 \pm 0.8$
Activa	$80.5 \pm 4.6$	$67.6 \pm 7.1$
RCR	$11.6 \pm 0.9$	$8.7 \pm 1.6$
L-arginina		
Reposo	$10.5 \pm 2.1$	$8.1 \pm 0.6$
Activa	$49.9 \pm 3.8$	$51.5 \pm 4.3$
RCR	$4.7 \pm 1.7$	$6.4 \pm 1.7$
L-NAME		
Reposo	$7.2 \pm 0.6$	$7.4 \pm 0.7$
Activa	$80.5 \pm 5.2$	$82.1 \pm 6.9$
RCR	$11.1 \pm 1.9$	$11.1 \pm 0.6$

**Figura 18.** Efecto del NO sobre la respiración mitocondrial en condiciones normóxicas y de hipoxia/re-oxigenación. Las mitocondrias hepáticas fueron incubadas en el medio de incubación a  $30^\circ C$  o sometidas a 10 min. a hipoxia y a 5 min de re-oxigenación. Inmediatamente antes de la medida del consumo de oxígeno, se adicionó como sustrato 5 mM glutamato mas 5 mM de malato, y se registró el consumo de oxígeno en condiciones basales por 3 min. Se adicionó ADP (200  $\mu M$ ) para estimular el estado 3 de la respiración. Donde se indica, las incubaciones también contenían 10 mM de L-arginina o de 10 mM de L-NAME. Los datos de la respiración en reposo o activa, así como el índice de control respiratorio (RCR), se presentan como la media  $\pm$  ESM de cinco preparaciones mitocondriales (Schild y col., 2003).

Se ha propuesto a la citocromo c oxidasa como una fuente de NO en condiciones de hipoxia en la mitocondria (Castello y col., 2006; Palacios y col., 2007). La citocromo c oxidasa cataliza la oxidación y reducción del NO. Cuando el NO interacciona con la enzima reducida, ésta lo transforma a  $N_2O$ . Pero cuando el NO interacciona con la enzima oxidada se forma nitrito ( $NO_2^-$ ), el cual también puede ser reducido por esta enzima a NO (Castello y col., 2006; Palacios y col., 2007). Aún mas, se ha propuesto que el NO producido por la citocromo c oxidasa es el responsable de reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito generando nitración de proteínas durante la hipoxia (Figura 19) (Castello y col., 2006).

Asimismo, también existen estudios que muestran que la hipoxia inhibe la actividad de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y



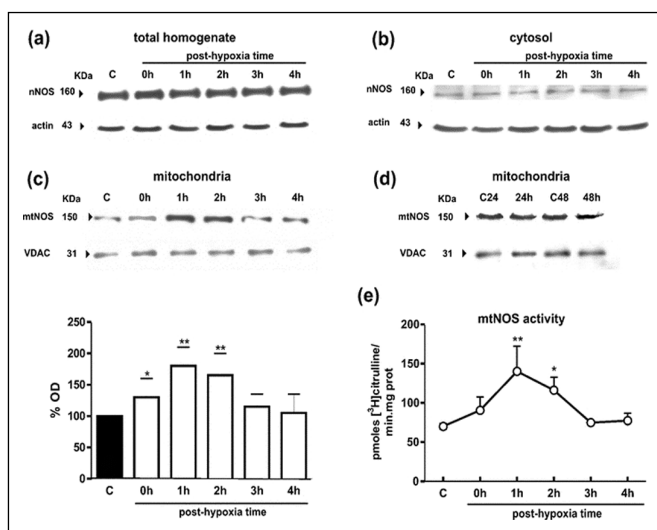
**Figura 19.** Modelo propuesto para el papel de la citocromo c oxidasa en la generación de NO durante la hipoxia (Castello y col., 2006).

produce nitración, nitrosilación y carbonilación de las proteínas mitocondriales (Schild y col., 1997; Frost y col., 2005; Giusti y col., 2008). Experimentos realizados por Giusti y colaboradores (2008) mostraron un incremento de la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial después de 0 a 2 horas de post-hipoxia en mitocondrias de cerebro de embriones de pollo expuesto *in vivo* a hipoxia/re-oxigenación (Figura 20) (Giusti y col., 2008). En paralelo con la cinética de activación de la NOSmt se observó inhibición del complejo I y acumulación de proteínas mitocondriales nitradas (Figura 21) (Giusti y col., 2008).

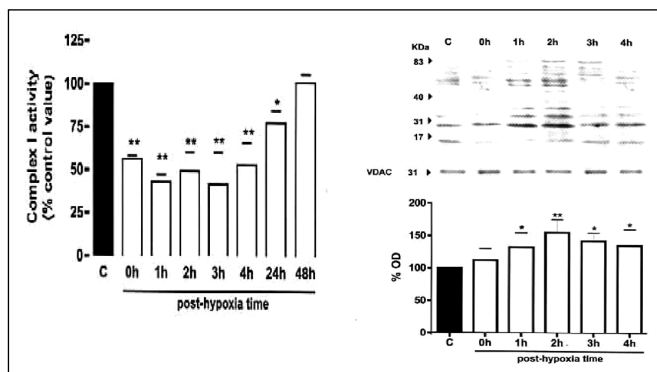
Investigaciones recientes sugieren que la nitración de las proteínas pudiera ser un mecanismo de señalización celular (Koeck, 2005). Igualmente se ha demostrado la especificidad de la nitración de proteínas y la alteración de la estructura y función de las proteínas nitradas. Sin embargo existe muy poca evidencia acerca de la reversibilidad de la nitración de las proteínas, proceso que ha sido denominado como desnitración. En modelos de hipoxia/re-oxigenación ha sido observada la desnitración de proteínas mitocondriales.

Todos estos hallazgos parecen indicar que la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial es mediada por el NO, por mecanismos de S-nitrosilación o nitración del mismo (Borutaite y col., 2006; Ribo y col., 2001; Murray y col., 2003). Esta evidencia, aunada al hecho de que la hipoxia induce un incremento de la actividad de la NOSmt y de la producción de  $O_2^-$ , así como una inhibición del complejo I, nos permite proponer que el posible mecanismo mediante el cual la hipoxia produce inhibición del complejo I es a través de la nitración de algunas de las subunidades del complejo I con función catalítica.

La evidencia permite proponer avenidas para establecer el papel de la nitración del complejo I du-



**Figura 20.** Incremento de la expresión y actividad del NOSmt después de la hipoxia/re-oxigenación. Inmunoblots representativos de a) homogenatos y b) fracción citológica reveladas con anticuerpo anti-nNOS. Las membranas fueron deshidridizadas y reincubadas con anti-actina para confirmar la carga de igual cantidad de proteínas; c y d) Inmunoblots representativos de la fracción mitocondrial con anticuerpo anti-nNOS; y e) análisis densitométrico de la cinética de 0-4 h. Se evaluó la igualdad de la carga de proteínas de la fracción mitocondrial con un anticuerpo contra la proteína mitocondrial constitutiva VDAC (en inglés, voltage-dependent anion channel); e) actividad de la mtNOS en la fracción mitocondrial, medida como la conversión de [<sup>3</sup>H]-L-arginina a [<sup>3</sup>H]-L-citrulina. Los valores son la media ± ESM de n = 4 experimentos independientes. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control (Giusti y col., 2008).



**Figura 21.** Actividad del complejo I mitocondrial y acumulación de proteínas mitocondriales nitradas después de la hipoxia/re-oxigenación. Inmunoblots representativos de la fracción mitocondrial incubada con anticuerpo contra anti-3-nitrotirosina en la re-oxigenación tardía, a) inicial; y b) re-oxigenación tardía. Se incluye el análisis densitométrico de la cinética a 0-4 h. Las membranas fueron deshidridizadas e incubadas con anti-VDAC para confirmar igual carga de proteínas. Los valores de densidad óptica son la media ± ESM de n = 4 experimentos independientes. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control (Giusti y col., 2008).

rante la hipoxia o hipoxia/re-oxigenación, situación que se asemeja a la condición de isquemia/reperusión; en presencia o ausencia de donadores de NO, peroxinitrito e inhibidores de la NOSintasa. Resulta interesante igualmente, determinar el efecto de la hipoxia sobre la actividad de los complejos I y III y

evaluar el efecto de inhibidores como la rotenona, antimicina A y mixotiazol en presencia de sustratos del complejo I y el complejo II de la cadena de transporte de electrones como una forma de evaluar la producción de EROs en la mitocondria sobre la nitración del complejo I durante la hipoxia.

## Referencias bibliográficas

- Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ. 2001. Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98: 12056-12061.
- Bailey SM, Landar A, Usmar VD. 2005. Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radical Biol Med* 38: 175-188.
- Bharath S, Andersen JK. 2005. Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: implications for Parkinson's disease. *Antioxidant Redox Signal* 7-8:900-910.
- Blomgren K, Hagberg H. 2006. Free Radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free radical Biol Med* 40: 388-397.
- Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. 2000. Reversal of nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiol induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* 1459: 405-412.
- Borutaite V, Brown GC. 2006. S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochim Biophys Acta* 1757: 562-566.
- Brandt U. 2006. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69-92.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. 2004. Mitochondrial Superoxide: Production, Biological Effects and Activation of Uncoupling Proteins. *Free Radical Biol Med* 37: 755-767.
- Brown GC, Borutaite V. 2004. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1658:44-49.
- Carreras MC, Franco Ma C, Peralta JG, Poderoso JJ. 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 125-139.
- Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* 3: 277-287.
- Chandel Na S, Schumacker PT. 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria old questions, new insight. *J Appl Physiol* 88: 1880-1889.
- Chen Q, Vazques Ed J, Moghaddas S, Hoppe CL, Lesnfsky EJ. 2003. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. Central Role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-36031.

- Dahm CC, Moore K, Murphy MP. 2006. Persistent S-Nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane protein by S-Nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite. Implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem* 281: 10056-10065.
- Frein DJ, Schildknecht S, Bachschmid M, Volker U. 2005. Redox regulation: A new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol* 70: 811-823.
- Frost MT, Wang Qi, Moncada S, Singer M. 2005. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R394-R400.
- Fruehauf JP, Meyskens F. 2007. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death. *Clin Cancer Res* 13: 789-794.
- Galkin A, Moncada S. 2007. S-Nitrosation of Mitochondrial Complex I Depends on Its Structural Conformation. *J Biol Chem* 282:37448-37453.
- Gibson Bradford W. 2005. The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Inter. J Biochem Cell Biol* 37:927-934.
- Giusti S, Converso DP, Poderoso JJ, Plazas SF. 2008. Hypoxia induces complex I inhibition and ultrastructural damage by increasing mitochondrial nitric oxide in developing CNS. *Euro J Neurosci* 27:123-131.
- Giulivi C. 2003. Characterization and Function of Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase. *Free Radical Biol Med* 34: 397-408.
- Giulivi C, Kato K, Cooper CE. 2006. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1225-C1231.
- Ghafourifar P, Cadenas E. 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacol Sci* 26:190-194.
- Guzy RD, Schumacker PT. 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91:807-819.
- Halliwell B. 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?. *FEBS Letters*. 411:157-160.
- Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS. 2007. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H101-H108.
- Ischiropoulos H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Comm* 305:776-783.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell Develop Biol* 12: 449-457.
- Koeck T, Stuehr DJ, Aulak KS. 2005. Mitochondria and regulates tyrosine nitration. *Biochem Soc Transac* 33: 1399-1403.
- Kulwant SA, Koeck T, Crabb JW, Stuehr DJ. 2004. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H30-H38.
- Larsen J, Trine R, Söderling A-S, Caidahl K, Roepstorff P, Gramsbergen JB. 2008. Nitration of soluble proteins in organotypic culture models of Parkinson's disease. *Neurochem Internat* 52: 487-494.
- Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, and McKenzie Matthew. 2008. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochem Biophys Acta* 11: 4C: 2, 3,4,8.
- Lenaz G, Fato R, Genova ML, BC, Bianchi C, Biondi A. 2006. Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta*. 1757: 1406-1420.
- Lesnefsky EJ, Hoppel CL. 2006. Oxidative phosphorylation and aging. *Aging Res Reviews* 5: 402-433
- Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA. 2003. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* 278:37223-37230.
- Palacios CPM, Hollis V, Mitchison M, Frakich N, Unitt D, Moncada S. 2007. Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: a possible explanation for hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18508-18513.
- Poderoso JJ, Boveris A, Jorge MA, Gherardi CR, Caprile AW, Turrens J, Stoppani AOM. 1978. Mitochondrial function in septic shock (function mitochondrial en el shock séptico). *Medicina (BsAs)* 38:371-377.
- Qi X, Lewin A, Sun L, Hauswirth W, Guy J. 2006. Mitochondrial Protein neurogeneration in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Biol Chem*. 281: 31950-31962.
- Radi R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS*. 101(12): 4003-4008.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biol Med* 33:1451-1464.
- Riobo NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 359:139-145.
- Schild L, Reinheckel T, Wiswedel I, Augustin W. 1997. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modifications. *Biochem J* 328: 205-210.
- Schild L, Reinheckel T, Reiser M, Horn TFW, Wolf G, Augustin W. 2003. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J*. 17: 2194-2201.
- Scheffer IE. 2001. Mitochondrial make a come back. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 49: 3-26.
- Schopfer FJ, Baker PRS, Freeman BA. 2003. No-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Scienc* 28: 646-654.
- Schägger H, Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO*. 19:1777-1783,
- Skulachew VP. 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423: 275-280.
- Takahiro Y. 2002. The energy-transducing NADH: quinone oxidoreductase, complex I. *Molec Aspect Med* 1: 345-368.

- Turko IV, Marcondes M, Murad F. 2001. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281: H2289-H2294.
- Turko IV, Murad F. 2002. Protein Nitration in Cardiovascular Diseases. *Pharmacol Reviews*. 54:619-634.
- Vizi A, Chinopoulos VC. 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *TRENDS Pharmacol Sci* 27:639-645.
- Verkaart S, Koopman Werner JH, Emst-de Vries Sjenet E, Nijtmans Leo GJ, Lambertus WPJ. 2007. Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Bioch Biophys Acta* 1772: 373-381.
- Vogel Rutger J, Smeitink AM, Nijtmans Leo GJ. 2007. Human mitochondrial complex I assembly: A dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1215-1227.
- Wallace KB. 2008. Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 6:1-6.
- Warnholtz A, Wendt M, Thomas M. 2002. When Sleeping Beauty Turns Ugly mitochondria in Hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:525-527.
- Warnholtz A, Wendt M, August M, Münzel T. 2004. Clinical aspects of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem Soc Symp*. 71:121-133.
- Woon-Seok Y, Soo JL, Jung RL, Kwang PK. 2008. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Reports*. 194-203.
- Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y, Naoi M. 2002. Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm* 109:1-13.
- Zhang DX, Gutterman DD. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2023-H2031.

# ÍNDICE DE DESCRIPTORES

Vol. 71 - Nº 2 - 2008

---

<b>A</b>	
Actividad antiinflamatoria .....	33
Angiotensina II .....	19
Apocinina.....	19
<b>C</b>	
<i>Cedrela odorata</i> .....	27
Chelitrina .....	19
Complejo I .....	40
Comportamiento reológico .....	11
<b>E</b>	
Enseñanza .....	2
Especialización.....	2
Exudado gomoso.....	27
<b>H</b>	
Hipoxia .....	40
<b>I</b>	
Isotonizante .....	11
<b>M</b>	
Maestría .....	2
Mitocondria.....	40
<b>N</b>	
Natriuresis .....	19
Nitración .....	40
<b>R</b>	
Re-oxigenación .....	40
<b>S</b>	
Solución amortiguadora.....	11
<i>Synedrella nodiflora</i> .....	33
<b>T</b>	
Tempol .....	19
Terpenos.....	33
Toxicología.....	2
<b>V</b>	
Velocidad de sedimentación .....	27
Viscosidad .....	11

---

# ÍNDICE DE AUTORES

Vol. 71 - Nº 2 - 2008

---

Amaro Mary Isabel .....	2
Andueza Isabel C .....	11
Arzola Jorge.....	19
Attías de Galíndez Doris.....	11, 27
Ávila de A Gisela .....	11, 27
Buonanno R Mónica J.....	27
De Jesús Sara .....	19
Guevara Beatriz Helena .....	2
Haiek Gerardo.....	33
Israel Anita .....	19, 33
Medina José Domingo .....	33
Pérez Nery Margarita.....	33
Noguera Balbina.....	33
Pastorello Mariella .....	33
Pérez Nery .....	33
Romero de Galí Gladys .....	2
Urrecheaga Silva Daniela .....	40
Varela Maider.....	19

# 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, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas revisiones o cartas al editor. 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 veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas.

Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

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

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. pp. 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 de 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.

# PUBLICACIONES CDCH - UCV 2008

▪ Bifano, José Luis  
**LUCES ENTRE SOMBRAS.  
La UCV, el CDCH y la investigación universitaria**

▪ Borges Iturriza, Julio, Mario De Bastos y Maritza Cotúa  
**SITUACIONES CLÍNICAS EN NEUROLOGÍA**

▪ Durand Parodi, Mario  
**TOMA DE DECISIONES  
EN EL PACIENTE CON ASCITIS**

▪ Hernández, Ángel G.  
**EL DESARROLLO COMO PROBLEMA  
¿Igualdad de qué?**

▪ Nikken, Pedro  
**CÓDIGO DE DERECHOS HUMANOS**  
(1ª. reimpresión de la 2ª. edición)  
(Coedición con Editorial Jurídica Venezolana)

▪ Rangel, Ana Lisett, Rosa Lacasella,  
María Teresa Guevara y Miriam Dembo  
**GUÍA DE ACTIVIDADES: DRAMATIZACIÓN.  
PARA EL DESARROLLO TEMPRANO  
Y OTROS PROGRAMAS DE ATENCIÓN AL NIÑO**

▪ Rangel, Ana Lisett, Rosa Lacasella,  
María Teresa Guevara y Miriam Dembo  
**GUÍA FUNCIONAL: DISCRIMINACIÓN.  
PARA EL DESARROLLO TEMPRANO  
Y OTROS PROGRAMAS DE ATENCIÓN AL NIÑO**

▪ Rangel, Ana Lisett, Rosa Lacasella,  
María Teresa Guevara y Miriam Dembo  
**GUÍA FUNCIONAL: LENGUAJE.  
PARA EL DESARROLLO TEMPRANO  
Y OTROS PROGRAMAS DE ATENCIÓN AL NIÑO**

▪ Rangel, Ana Lisett, Rosa Lacasella,  
María Teresa Guevara y Miriam Dembo  
**GUÍA FUNCIONAL: NÚMERO.  
PARA EL DESARROLLO TEMPRANO  
Y OTROS PROGRAMAS DE ATENCIÓN AL NIÑO**

▪ Rosales, Elsie, Carmelo Borrego y Gilda Núñez  
**SISTEMA PENAL Y ACCESO A LA JUSTICIA**

▪ Texera A., Yolanda  
**EL SURGIMIENTO DE LA BIOLOGÍA ACADÉMICA  
EN VENEZUELA 1946-1958**



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 y en el portal [www.lalibreriadelaucv.com](http://www.lalibreriadelaucv.com)  
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° 71-2**

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