

REVISTA FACULTAD DE
FARMACIA

Volumen 86

N^{os} 3

2023

ISSN: 0041-8307



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 86 - N°3 - 2023

ISSN: 0041-8307

ISSN-e: 2739-0373

Depósito legal: 195902 DF 224

Caracas/Venezuela

Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

Universidad Central de Venezuela

Rector

Dr. Víctor Rago

Vicerrectora Académica

Dra. María Fátima Garcés

Vicerrector Administrativo

Dr. José Balbino León

Secretaria

Dra. Corina Aristimuño

Facultad de Farmacia

Decano

Dr. Carlos Ciangherotti

Directora Administrativa

Dra. María Isabel Calderón

Coordinadora Académica

Esp. Dhilcia Astrid Pinto

Directora del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas

Dra. María Gabriela Matos

Director de Postgrado

Dr. Michael Mijares

Coordinadora de Extensión

Esp. Marisol Gómez

Revista Facultad de Farmacia

Editora

Dra. Anita Stern Israel

Comité Editorial

Dra. María Margarita Salazar-Bookaman

Dra. Alírica Suárez

Dr. Jaime Charris

Dra. Isabel Andueza

Dr. David De Souza

Dra. Miriam Regnault

Diagramación y montaje en línea

Yraiceles Jiménez (yrajimenez@gmail.com)

Dirección

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

Portada: Conmemoración del Octogésimo Segundo Aniversario
de la Reinstalación de la Facultad de Farmacia, UCV

Arte: Erlen Zerpa

Contenido

Databases on aromatic plants NERLIS PÁJARO CASTRO	121
Caracterización de un enjuague bucal mucoadhesivo con nanopartículas de plata ISABEL ANDUEZA, LAURA SÁNCHEZ, KARLA CALO	131
La teoría del funcional de la densidad para el estudio de análogos novedosos del N-dicloroaraquil- 2-aminoindano con actividad doparminérgica central MARIENMY VELASQUEZ, ALEXANDER ALBARRACIN, LIGIA ANGEL, RODOLFO IZQUIERDO, MARÍA RAMÍREZ, BIAGINA MIGLIORE, ANA CÁCERES, MIGUEL RODRÍGUEZ, JAIME CHARRIS, ANITA ISRAEL, SIMÓN LÓPEZ, JORGE ANGEL	138
El envejecimiento: ¿Podemos frenarlo? Telómeros/Telomerasa, Senescencia Celular. Primera Parte MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO	150
El envejecimiento: ¿Podemos frenarlo? Autofagia/Nutrición. Reprogramación Celular. Segunda Parte MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO	172
Dermatoscopia ungueal y la biopsia excisional en la caracterización de la Melanoniquia: un análisis morfométrico SANDRA PAOLA JARAMILLO, MIGUEL ALEJANDRO LÓPEZ, MARÍA ALEJANDRA DA SILVA, MARCO ALVAREZ	197
Estudio comparativo de las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente Bothrops colombiensis de tres regiones geográficas de Venezuela CARMEN T. DUQUE ZERPA, ÁNGEL G.A. FLORES PEREIRA, REINALDO GUEVARA, ALBA M. VARGAS	205
El Polipéptido Insulinotrópico dependiente de Glucosa en la Preeclampsia y el Riesgo de Diabetes Gestacional ELSA CAMACHO, MARÍA GABRIELA MATOS, RAFAEL CORTÉZ, ANITA ISRAEL	218
NORMAS DE PUBLICACIÓN	230

*Esta publicación fue parcialmente subvencionada
por la Sociedad Venezolana de Ciencias Cosméticas*



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



CDCH-UCV

cdch-ucv.net

publicaciones@cdch-ucv.net



Databases on aromatic plants

Bases de datos sobre plantas aromáticas

NERLIS PÁJARO CASTRO

Abstract

Essential oils are a mixture of isoprenoid-type organic compounds that have many biological properties and have been widely used in the cosmetic, food, and pharmaceutical industries, among others. That is why there is a lot of information on this broad group of molecules, in fact, there are specialized databases with detailed information on different essential oils from different types of plants. This review aimed to search the existing databases with information on essential oils. The search of the databases was carried out using the keywords databases and essential oils in different search engines. This yielded a variety of specialized databases with detailed information on essential oils and their sources of obtaining them, as well as chemical structures, physicochemical properties, forms of extraction, pharmacological and biological properties, and utility, among others. In conclusion, these essential oil databases have advantages such as the potential to discover new medicines from nature and gather important information for users so that they can easily browse, search, download, and view data on a natural product of interest.

Keywords: Natural products, isoprenoids, database, plants

Resumen

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos orgánicos de tipo isoprenoides que poseen muchas propiedades biológicas, las cuales han sido ampliamente utilizadas en la industria cosmética, de alimentos, farmacéuticas, entre otras. Es por ello por lo que existe bastante información sobre este grupo de moléculas tan amplia, de hecho, hay bases de datos especializadas con información detallada de diferentes aceites esenciales provenientes de distintos tipos de plantas, por lo tanto, el objetivo de esta revisión fue realizar una búsqueda sobre las bases de datos existente con información sobre los aceites esenciales. La búsqueda de las bases de datos se realizó utilizando las palabras claves bases de datos y aceites esenciales en diferentes buscadores. Esta búsqueda arrojó una variedad de bases de datos especializadas con información detallada de aceites esenciales y sus fuentes de obtención, así como estructuras químicas, propiedades fisicoquímicas, formas de extracción, propiedades farmacológicas y biológicas, utilidad, entre otros. En conclusión, estas bases de datos de aceites esenciales tienen ventajas por su potencial para descubrir nuevos medicamentos de la naturaleza y recopilar información importante para los usuarios, de modo que puedan navegar, buscar, descargar y ver fácilmente datos sobre un producto natural de interés.

Palabras clave: Productos naturales, isoprenoides, base de datos, plantas

Professor. University of Sucre. Medical and Pharmaceutical Sciences group. Sincelejo, Sucre, Colombia.
Correspondencia: nerlis.pajaro@unisucra.edu.co

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.12](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.12)

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

Recepción: 18/07/2023

Aprobación: 04/09/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(3): 121-130. 2023

Introduction

Aromatic plants are recognized as an important resource worldwide, they have been used for approximately 60,000 years, because they contribute to the development of the economy, to the processing of products in the industry, to marketing, they are an important source of metabolites with pharmacological properties, among others (Tofiño-Rivera et al., 2017). These plants are also known as herbs and spices, they have been used since ancient times as folk medicine and as food preservatives. The best-known aromatic plants, such as oregano, rosemary, sage, anise, and basil, among others, are native to the Mediterranean area. They contain many biologically active compounds, mainly polyphenols, which possess antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, antiprotozoal, antifungal, and anti-inflammatory properties. Currently, the demand for these plants and their derivatives has increased because they are natural, eco-friendly, and generally recognized as safe products. Therefore, aromatic plants and their extracts have the potential to become new-generation substances for human and animal nutrition and health (Christaki et al., 2012). Therefore, aromatic plants provide us with a large number of compounds with interesting biological properties, among which we have essential oils, which are an important source of new bioactive molecules, which can replace synthetic chemicals since they are friendly to the environment and are less toxic. Currently, there are more than 20,000 publications in which essential oils are related to some biological activity. This confirms the wide usefulness of essential oils as the main source of bioactive metabolites, which can be used in different areas of our

lives (León-Méndez et al., 2019). Several active components of many essential oils are capable of modulating paradoxical responses triggered by different genes and pathways. Consequently, understanding the mechanism of action of bioactive components on the modulation of such paradoxical responses, within a cell or between different cell types, is a prerequisite for developing new therapeutic strategies against many different pathologies. In addition, efforts should be concentrated to investigate the synergistic effects of the bioactive components, which allow a better and more effective response. For an adequate preventive and therapeutic use of essential oils or their active components, the specificity and cytotoxicity must be considered (Saad, Muller and Lobstein, 2013).

On the other hand, plant secondary metabolites and plant-derived extracts represent a valuable reservoir of bioactive compounds: phenols, terpenoids, etc. Consequently, aromatic plants possess a variety of functions with health-related benefits and nutrigenomic implications in gut development and immunity. Currently, there is enormous pressure on the food and feed industry to seek natural, organic, and generally safe substances for use in nutrition. Aromatic plants meet these demands so they can serve as nutraceuticals with many possible commercial applications, such as growth promoters, antimicrobials, immunostimulatory, antioxidants, flavorings, pigments, and preservatives in animals, and alternatives to synthetic substances. The mechanisms of action of these plants are not clear, but the recent development of "omics" techniques provides better knowledge (Christaki et al., 2020). Therefore, this review aims to show

the existing databases on aromatic plants and the information available on them.

In a search carried out in the PubMed database using the keywords: "Databases on aromatic plants" it was found that from 2013 to date, 229 articles related to the subject have been published, but few databases of aromatic plants, evidence was found of the use of hallucinatory words to natural products as shown in Figure 1.



Figure 1. Word cloud related to natural products

INFORMATION ON DATABASES OF PLANTS

The search for information or databases on aromatic plants generates very varied and dispersed information among many information sources that present the indomitable task of obtaining complete information, however, international databases have been collecting information in a more controlled manner for decades, so it is possible to find more complete information about aromatic plants (Bartol and Baricevic, 2015). In a search carried out in January 2023 using the keywords

aromatic plants and the database in PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), it was found that there are 229 publications in the last 10 years, however, the part of the publications refers to different biological activities that aromatic plants have, so there is little information compiled in databases on aromatic plants, which demonstrates the need to create new databases on the subject or strengthen existing ones. However, by searching other sources of information, an article was found that reports 120 databases of natural products that have been used in the last 20 years. However, 16% of these are no longer available online, 40% are commercial and their content is not easily accessible. Open resources are usually specialized in a particular type of Natural Products (NP) or lack annotations. For example, the Natural Products Catalogs of the ZINC database are made up of more than 80,000 entries, some of which can be purchased, but apart from their structure and the fact that they are of natural origin, no additional information is provided. Super Natural II is considered the largest among all Natural Products databases, it was available online in 2020, but it seems to be no longer maintained and is mostly made up of purchasable compounds. Another recent database, NPAtlas, is constantly growing and very well annotated, but it focuses solely on microbial NPs. Another important category of NPs, plant-produced compounds, also called phytochemicals, is available in several popular and well-maintained databases, such as NuBBEDB, KnapSack, CMAUP, and TCM@Taiwan. In addition to these relatively large databases, there are a large number of smaller, specialized NP collections, such as FooDB, a user-friendly database that hosts a relatively large number of NPs found in foods. Therefore, there is a need for a generalist NP database, that efficiently

aggregates NP information from various sources, improves its annotation, and offers a pleasant user experience (Sorokina and Steinbeck, 2020).

At present there are several databases of aromatic plants, in a work carried out by Maia and Andrade (2009) it describes the creation of a database of aromatic plants of the Amazon, which catalogs general information on 1250 specimens. The database has made it possible to publish the chemical composition of the oils and aromas of more than 350 species, associated with a greater number of chemical types. The essential oils of many species offer optimal conditions for economic exploitation and use in the national and international market for fragrances, cosmetics, and agricultural and domestic pesticides (Maia and Andrade, 2009). Another database is AromaDb (<http://bioinfo.cimap.res.in/aromadb/>) covers information on plant varieties/chemotypes, essential oils, chemical constituents, GC-MS profile, yield variations due to agromorphological parameters, data trade names, aromatic compounds, fragrance type, and bioactivity details. The database includes 1,321 scent chemical structures, bioactivities of essential oils/scent compounds, 357 fragrance types, 166 commercially used plants, and their 148 high-yielding varieties/chemotypes. It also includes calculated chemoinformatic properties related to identification, physicochemical properties, pharmacokinetics, and toxicological and ecological information. It also comprises interacting human genes that affect various disease-related cell signaling pathways that correlate with aromatherapy use. This database could be a useful resource for plant growers/producers, the flavor/fragrance industry, health professionals,

and researchers exploring the potential of essential oils and flavor compounds in developing new formulations against human disease (Kumar et al., 2018).

In India, it was created a comprehensive online database called IMPPAT on the phytochemistry of medicinal plants which will enable computational approaches to drug discovery based on natural products. This database was hand-curated from 1742 Indian medicinal plants, 9596 phytochemicals, and 1124 therapeutic uses spanning 27074 plant phytochemical associations and 11514 plant-therapeutic associations. Notably, the curation effort led to a non-redundant in silico library of 9596 phytochemicals with standard chemical identifiers and structure information. Using cheminformatic approaches, we have computed the physicochemical, ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity), and drug-likeness properties of the IMPPAT phytochemicals. We show that the stereochemical complexity and shape complexity of IMPPAT phytochemicals differs from libraries of commercial compounds or diversity-oriented synthesis compounds while being similar to other libraries of natural products. Within IMPPAT, we have filtered a subset of 960 potential druggable phytochemicals, of which the majority have no significant similarity to existing FDA-approved drugs, thus, rendering them good candidates for prospective drugs. IMPPAT database is openly accessible at: <https://cb.imsc.res.in/imppat> (Mohanraj et al., 2018). In the case of Latin America, even though we stand out for having a rich and unique biodiversity, which perhaps encompasses a third of global biodiversity, only a few Latin American countries have compiled and characterized the natural products of their region in a

database. To the best of our knowledge, research groups in Colombia, Peru, and El Salvador are building composite databases to be released in the future (Gómez-García and Medina-Franco, 2022).

Another example of a database of natural products is COCONUT (<https://coconut.naturalproducts.net>), this database is free and open to all users and no login is required to access it. Its web interface allows various simple searches (e.g., by molecule name, InChI, InChI key, SMILES, drawn structure, molecular formula), advanced searches by molecular features, along substructure and similarity searches. Users can also download the full data set or search for results in different formats. The database can be queried programmatically via a REST API, making it easy to integrate COCONUT into workflows. The web interface, backend, and database are implemented as Docker containers, making it easy to port to host other NP sets and deploy on-premises (Sorokina et al., 2021).

Carrying out a search of databases of natural products in general from the year 2013 onwards, 47 databases focused on collecting information related to natural products have been found, however, few are specifically focused on aromatic plants (Table 1).

There are different types of databases, the general ones that contain information on natural and synthetic molecules, and there are the specialized ones that only contain information on natural products, within these we have commercial and Open access. We could identify a total of 92 open-access NP resources across the literature in the last 20 years. The concept of "Open access" encourages and prioritizes free and open online access to academic information, such as data and scientific publications. For a dataset, whether in a database or attached as additional information to an article, it means that anyone can read, download, copy, distribute, print, search for, and within and re-use all or parts of data that

Table 1. Natural Products Databases

Database	Description	References
AromaDb	Database of Medicinal and Aromatic Plant's Aroma Molecules With Phytochemistry and Therapeutic Potentials	Kumar et al., 2018
phytochemdb	a platform for virtual screening and computer-aided drug designing https://phytochemdb.com/ .	Mahmud et al., 2022
MPD3	a useful medicinal plants database for drug designing	Mumtaz et al., 2017
Uttarakhand Medicinal Plants Database (UMPDB):	A Platform for Exploring Genomic, Chemical, and Traditional Knowledge	Kumar et al., 2018
OSADHI	An online structural and analytics-based database for herbs of India	Kiewhuo et al., 2023
North East India Medicinal Plants Database (NEI-MPDB)	The present study is an attempt to develop a comprehensive resource of the medicinal plants with a quantitative analysis of the phytochemicals which can enhance knowledge on therapeutic indications and contribute to drug discovery and development	Kiewhuo et al., 2022

MPDB 2.0	A large-scale and integrated medicinal plant database of Bangladesh	Hussain et al., 2021
CDK4	As a phytochemical-based anticancer drug target	Ashraf et al., 2022
NeMedPlant	A database of therapeutic applications and chemical constituents of medicinal plants from the north-east region of India	Meetei et al., 2012
DiaNat-DB	A molecular database of antidiabetic compounds from medicinal plants	Madariaga-Mazón et al., 2021
IMPPAT	A curated database of Indian Medicinal Plants, Phytochemistry and Therapeutics	Mohanraj et al., 2018
IMPPAT 2.0	an enhanced and expanded phytochemical atlas of Indian medicinal plants	Vivek-Ananth et al., 2023
NANPDB	A Resource for Natural Products from Northern African Sources	Ntie-Kang et al., 2017
COCONUT online	Collection of Open Natural Products Database	Sorokina et al., 2021
NP Navigator	A New Look at the Natural Product Chemical Space	Zabolotna et al., 2021
NPASS database update 2023	Quantitative natural product activity and species source database for biomedical research	Zhao et al., 2023
CMAUP	A database of collective molecular activities of useful plants	Zeng et al., 2019
SANCDB	An update on South African natural compounds and their readily available analogs	Diallo et al., 2021
SerpentinaDB	A database of plant-derived molecules of <i>Rauvolfia serpentina</i>	Pathania et al., 2015
MeFSAT	A curated natural product database specific to secondary metabolites of medicinal fungi	Vivek-Ananth et al., 2022
SuperNatural II	A database of natural products	Banerjee et al., 2015
SuperNatural 3.0	A database of natural products and natural product-based derivatives	Gallo et al., 2023
SuperNatural	A searchable database of available natural compounds	Dunkel et al., 2006
ConMedNP	A natural product library from Central African medicinal plants for drug discovery	Ntie-Kang et al., 2014
AfroDb	A Select Highly Potent and Diverse Natural Product Library from African Medicinal Plants	Ntie-Kang et al., 2013
MedPServer	A database for the identification of therapeutic targets and novel leads about natural products	Potshangbam et al., 2018
BioPhytMol	A drug discovery community resource on anti-mycobacterial phytomolecules and plant extracts	Sharma et al., 2014
SANCDB	A South African natural compound database	Hatherley et al., 2015
TM-MC	A database of medicinal materials and chemical compounds in Northeast Asian traditional medicine	Kim et al., 2015
LTM-TCM	A Comprehensive Database for the Linking of Traditional Chinese Medicine with Modern Medicine at Molecular and Phenotypic Levels.	Li et al., 2022

TCMID	Traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis	Xue et al., 2013
YaTCM	Yet another Traditional Chinese Medicine Database for Drug Discovery	Li et al., 2018
ETCM	An Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine	Xu et al., 2019
HERB	A high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine	Fang et al., 2021
TCMPG	An integrative database for traditional Chinese medicine plant genomes	Meng et al., 2022
IrGO	Iranian traditional medicine General Ontology and knowledge base	Naghizadeh et al., 2021
CPMCP	A database of Chinese patent medicine and compound prescription	Sun et al., 2022
SymMap	An integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping	Wu et al., 2019
TCMSID	A simplified integrated database for drug discovery from traditional Chinese Medicine	Zhang et al., 2022
TCMID 2.0	A comprehensive resource for TCM	Huang et al., 2017
TCMIO	A Comprehensive Database of Traditional Chinese Medicine on Immuno-Oncology	Liu et al., 2020
Plant Metabolite Databases	From Herbal Medicines to Modern Drug Discovery	Nguyen-Vo et al., 2029
UNaProd	A Universal Natural Product Database for Materia Medica of Iranian Traditional Medicine	Naghizadeh et al., 2020
Sistemax	An Online Web-Based Cheminformatics Tool for Data Management of Secondary Metabolites	Scotti et al., 2018
VIETHERB	A Database for Vietnamese Herbal Species	Nguyen-Vo et al., 2029
GreenMolBD	Nature Derived Bioactive Molecules' Database	Hosen et al., 2022
ETM-DB	Integrated Ethiopian traditional herbal medicine and phytochemicals database	Fathifar et al., 2019

are contained in it (Sorokina and Steinbeck, 2020). Databases on natural products have advantages such as the potential to discover new medicines from nature and collect important information for users so that they can easily browse search, download, and view data on a natural product of interest (Fathifar et al., 2023).

References

- Ashraf MA, Sayed S, Bello M, Hussain N, Chando RK, Alam S, Rana MI, Hasan K. 2022. CDK4 as a phytochemical-based anticancer drug target. *Informatics in Medicine Unlocked* 28:100826.
- Bartol T, Baricevic D. 2015. Medicinal and Aromatic Plants in Scientific Databases. In *Medicinal and Aromatic Plants of the World* p. 359-373.
- Banerjee P, Erehman J, Gohlke B, Wilhelm T, Preissner R, Dunkel M. 2015. Super Natural II—a database of natural products. *Nucleic Acids Research* 43(Database issue): D935-D939.
- Bultum LE, Woyessa AM, Lee D. 2019. ETM-DB: integrated Ethiopian traditional herbal medicine and phytochemicals database. *BMC Complement Altern Med* 19(1):212.
- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneri P. 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2(3): 228-243.
- Christaki E, Giannenas I, Bonos E, Florou-Paneri P. 2020. Chapter 2 - Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition.

- Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health p.19-34.
- Diallo BN, Glenister M, Musyoka TM, Lobb KA, Tastan Bishop Ö. 2021. SANCDB: An update on South African natural compounds and their readily available analogs. *J Cheminformatics* 13(1):37.
- Dunkel M, Füllbeck M, Neumann S, Preissner R. 2006. SuperNatural: a searchable database of available natural compounds. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D678-83.
- Fang S, Dong L, Liu L, Guo J, Zhao L, Zhang J, Bu D, Liu X, Huo P, Cao W, Dong Q, Wu J, Zeng X, Wu Y, Zhao Y. 2021. HERB: a high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine. *Nucleic Acids Research* 49(D1):D1197-D1206.
- Fathifar Z, Kalankesh LR, Ostadrahimi A, Ferdousi R. 2023. New approaches in developing medicinal herbs databases. *Database (Oxford)* 2023:baac110.
- Gallo K, Kemmler E, Goede A, Becker F, Dunkel M, Preissner R, Banerjee P. 2023. Super Natural 3.0-a database of natural products and natural product-based derivatives. *Nucleic Acids Research* 51(D1):D654-D659.
- Gómez-García A, Medina-Franco JL. 2022. Progress and Impact of Latin American Natural Product Databases. *Biomolecules* 12(9):1202.
- Hatherley R, Brown DK, Musyoka TM, Penkler DL, Faya N, Lobb KA, Tastan Bishop Ö. 2015. SANCDB: a South African natural compound database. *J Cheminformatics* 7:29.
- Hosen SMZ, Junaid M, Alam MS, Rubayed M, Dash R, Akter R, Sharmin T, Mouri NJ, Moni MA, Khatun M, Mostafa M. 2022. GreenMolBD: Nature Derived Bioactive Molecules' Database. *Med Chem* 18(6):724-733.
- Huang L, Xie D, Yu Y, Liu H, Shi Y, Shi T, Wen C. 2017. TCMID 2.0: A comprehensive resource for TCM. *Nucleic Acids Research* 46(D1):D1117-D1120.
- Hussain N, Chanda R, Abir RA, Mou MA, Hasan MK, Ashraf MA. 2021. MPDB 2.0: a large-scale and integrated medicinal plant database of Bangladesh. *BMC Research Notes*. 14(1):301.
- Kiewhuo K, Gogoi D, Mahanta HJ, Rawal RK, Das D, Sastry GN. 2022. North East India Medicinal Plants database (NEI-MPDB). *Computational Biology Chemistry*. 100: 107728.
- Kiewhuo K, Gogoi D, Mahanta HJ, Rawal RK, Das DSV, Jamir E, Sastry GN. 2023. OSADHI - An online structural and analytics-based database for herbs of India. *Computational Biology Chemistry*. 102: 107799.
- Kim SK, Nam S, Jang H, Kim A, Lee JJ. 2015. TM-MC: a database of medicinal materials and chemical compounds in Northeast Asian traditional medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:218.
- Kumar Y, Prakash O, Tripathi H, Tandon S, Gupta MM, Rahman L-U, Lal RK, Semwal M, Pandurarg Darokar M, Kahn F. 2018. AromaDb: A Database of Medicinal and Aromatic Plant's Aroma Molecules With Phytochemistry and Therapeutic Potentials. *Frontiers in Plant Science* 9:1081.
- Kumar A, Kumar R, Sharma MM, Kumar U, Gajula MN, Singh KP. 2018. Uttarakhand Medicinal Plants Database (UMPDB): A Platform for Exploring Genomic, Chemical, and Traditional Knowledge. *Data* 3(1):7.
- León-Méndez G, Pájaro-Castro N, Pájaro-Castro E, Torrenegra-Alarcón M, Herrera-Barros A. 2019. Essential oils as a source of bioactive molecules. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 48(1); 80-93.
- Li B, Ma C, Zhao X, Hu Z, Du T, Xu X, Wang Z, Lin J. 2018. YaTCM: Yet another Traditional Chinese Medicine Database for Drug Discovery. *Computational and Structural Biotechnology J* 16: 600-610.
- Li X, Ren J, Zhang W, Zhang Z, Yu J, Wu J, Sun H, Zhou S, Yan K, Xijun Y, Wang W. 2022. LTM-TCM: A Comprehensive Database for the Linking of Traditional Chinese Medicine with Modern Medicine at Molecular and Phenotypic Levels. *Pharmacological Research* 178;106185.
- Liu Z, Cai C, Du J, Liu B, Cui L, Fan X, Wu Q, Fang J, Xie L. 2020. TCMIO: A Comprehensive Database of Traditional Chinese Medicine on Immuno-Oncology. *Frontiers in Pharmacology* 11:439.
- Maia JG, Andrade EH. 2009. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Quimica Nova* 32(3):595-622.
- Madariaga-Mazón A, Naveja JJ, Medina-Franco JL, Noriega-Colima K, Martínez-Mayorga K. 2021. DiaNat-DB: a molecular database of antidiabetic compounds from medicinal plants. *RSC Advances* 11(9): 5172-5178.
- Mahmud S, Paul GK, Biswas S, Kazi T, Mahbub S, Mita MA, Afrose S, Islam A, Ahaduzzaman S, Hasan R, Shimu SS, Promi MM, Shehab MN, Rahman E, Sujon KM, Alom W, Modak A, Zaman S, Uddin S, Emran TB, Islam S, Saleh A. 2022. phytochemdb: a platform for virtual screening and computer-aided drug designing. *Database (Oxford)* (2022):baac002.
- Meetei PA, Singh P, Nongdam P, Prabhu NP, Rathore R, Vindal V. 2012. NeMedPlant: a database

- of therapeutic applications and chemical constituents of medicinal plants from the northeast region of India. *Bioinformatics* 8(4): 209-211.
- Meng F, Tang Q, Chu T, Li X, Lin Y, Song X, Chen W. 2022. TCMPG: an integrative database for traditional Chinese medicine plant genomes. *Horticulture Research* 9:uhac060.
- Mohanraj KG, Karthikeyan BS, Vivek-Ananth RP, Chand RPB, Aparna SR, Mangalapandi P, Samal A. 2018. IMPPAT: A curated database of Indian Medicinal Plants, *Phytochemistry And Therapeutics*. *Scientific Reports* 8(1):4329.
- Mumtaz A, Ashfaq UA, ul Qamar MT, Anwar F, Gulzar F, Ali MA, Saari N, Pervez MT. 2017. MPD3: a useful medicinal plants database for drug designing. *Natural Product Research* 31(11): 1228-1236.
- Naghizadeh A, Hamzeheian D, Akbari S, Mohammadi F, Otoufat T, Asgari S, Zarei A, Noroozi S, Nasiri N, Salamat M, Karbalaie R, Mirzaie M, Rezaeizadeh H, Karimi M, Jafari, M. 2020. UNaProd: A Universal Natural Product Database for *Materia Medica* of Iranian Traditional Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020:3690781.
- Naghizadeh A, Salamat M, Hamzeian D, Akbari S, Rezaeizadeh H, Vaghasloo MA, Karbalaie R, Mirzaie M, Karimi M, Jafari M. 2021. IrGO: Iranian traditional medicine General Ontology and knowledge base. *J Biomedical Semantics* 12(1):9.
- Nguyen-Vo TH, Nguyen L, Do N, Nguyen TN, Trinh K, Cao H, Le L. 2019. Plant Metabolite Databases: From Herbal Medicines to Modern Drug Discovery. *J Chemical Information and Modeling* 60(3):1101-1110.
- Nguyen-Vo TH, Le T, Pham D, Nguyen T, Le P, Nguyen A, Nguyen T, Nguyen TN, Nguyen V, Do H, Trinh K, Duong HT, Le L. 2019. VIETHERB: A Database for Vietnamese Herbal Species. 1. *J Chem Inf Model* 59(1):1-9.
- Ntie-Kang F, Zofou D, Babiaka SB, Meudom R, Scharfe M, Lifongo LL, Mbah JA, Mbaze LM, Sippl W, Efang SM. 2013. AfroDb: A Select Highly Potent and Diverse Natural Product Library from African Medicinal Plants. *PLoS One* 8(10):e78085.
- Ntie-Kang F, Telukunta KK, Döring K, Simoben CV, A Moubock AF, Malange YI, Njume LE, Yong JN, Sippl W, Günther S. 2017. NANPDB: A Resource for Natural Products from Northern African Sources. *J Natural Products* 80(7):2067-2076.
- Pathania S, Ramakrishnan SM, Randhawa V, Bagler G. 2015. SerpentinaDB: a database of plant-derived molecules of *Rauvolfia serpentina*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:262.
- Potshangbam AM, Polavarapu R, Rathore RS, Naresh D, Prabhu NP, Potshangbam N, Kumar P, Vindal V. 2018. MedPServer: A database for identification of therapeutic targets and novel leads about natural products. *Chemical Biology & Drug Design* 93(4):438-446.
- Saad NY, Muller CD, Lobstein A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance J* p. 269-279.
- Scotti M, Herrera-Acevedo C, Oliveita TB, Oliveira Costa RP, de Oliveira Santos SYK, Pereira Rodrigues R, Scotti L, Batista Da-Costa F. 2018. Sistemax, an Online Web-Based Cheminformatics Tool for Data Management of Secondary Metabolites. *Molecules* 23(1):103.
- Sharma A, Dutta P, Sharma M, Rajput N, Dodiya B, George JJ, Kholia T, OSDD Consortium, Bhardwaj. 2014. BioPhytMol: a drug discovery community resource on anti-mycobacterial phytomolecules and plant extracts. *J Cheminformatics* 6(1):46.
- Sorokina M, Steinbeck C. 2020. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J Cheminformatics* 12(1):20.
- Sorokina M, Merseburger P, Rajan K, Yirik MA, Steinbeck C. 2021. COCONUT online: Collection of Open Natural Products database. *J Cheminformatics* 13(1):2.
- Sun C, Huang J, Tang R, Li M, Yuan H, Wang Y, Wei J, Liu J. 2022. CPMCP: a database of Chinese patent medicine and compound prescription. *Database (Oxford)* 2022:baac073.
- Tofiño-Rivera AP, Ortega-Cuadros M, Melo-Rios A, Mier-Giraldo HJ. 2017. Vigilancia tecnológica de plantas aromáticas: de la investigación a la consolidación de la agrocadena colombiana. *Corpoico Ciencia y Tecnología Agropecuaria Mosquera (Colombia)* 18(2):353-357.
- Vivek-Ananth RP, Sahoo AK, Kumaravel K, Mohanraj KG, Samal A. 2022. MeFSAT: a curated natural product database specific to secondary metabolites of medicinal fungi. *RSC Advances* 11(5): 2596 - 2607.
- Vivek-Ananth RP, Mohanraj KG, Sahoo AK, Samal A. 2023. IMPPAT 2.0: An enhanced and expanded phytochemical atlas of Indian medicinal plants. *ACS Omega* 8(9):8827-8845.
- Wu Y, Zhang F, Yang K, Fang S, Bu D, Li H, Sun L, Hu H, Gao K, Wang W, Zhou X, Zhao Y, Chen J. 2019. SymMap: an integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by

- symptom mapping. *Nucleic Acids Research* 47(D1):D1110-D1117.
- Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, Chen T, Lv CY, Tang SH, Zhang XB, Zhang W, Li ZY, Zhou RR, Yang HJ, Wang XJ, Huang LQ. 2019. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine. *Nucleic Acids Research* 47(D1):D976-D982.
- Xue R, Fang Z, Zhang M, Yi Z, Wen C, Shi T. 2013. TCMID: traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D1089-95.
- Zabolotna Y, Ertl P, Horvath D, Bonachéra F, Marcou G, Varnek A. 2021. NP Navigator: A New Look at the Natural Product Chemical Space. *Molecular Informatics* 40(9):e2100068.
- Zhang L, Dong J, Wei H, Shi S, Lu A, Deng G, Cao D. 2022. TCMSID: a simplified integrated database for drug discovery from traditional Chinese medicine. *J Cheminformatics* 14(1):89.
- Zhao H, Yang Y, Wang S, Yang X, Zhou K, Xu C, Zhang X, Fan J, Hou D, Li X, Lin H, Tan, Y, Wang S, Chu X, Zhuoma D, Zhang F, Ju D, Zeng X, Chen YZ. 2023. NPASS database update 2023: quantitative natural product activity and species source database for biomedical research. *Nucleic Acids Research* 51(D1):D621-D628.
- Zeng X, Zhang P, Wang Y, Qin C, Chen SY, He W, Tao L, Tan Y, Gao D, Wang B, Chen Z, Chen W, Jiang YY, Chen YZ. 2019. CMAUP: a database of collective molecular activities of useful plants. *Nucleic Acids Research* 47(D1):D1118-D1127.



Caracterización de un enjuague bucal mucoadhesivo con nanopartículas de plata

Characterization of a mucoadhesive mouthwash with silver nanoparticles

ISABEL ANDUEZA*, LAURA SÁNCHEZ**, KARLA CALO*

Resumen

En el presente trabajo se caracterizaron las propiedades físicas de un enjuague bucal mucoadhesivo desarrollado con nanopartículas de plata (NpsAg). Para mantener concentraciones efectivas de los ingredientes activos por períodos prolongados en la cavidad oral, es fundamental que las formulaciones resistan la temperatura, el recambio salival y los movimientos bucolinguales. Es por lo que la asociación de polímeros mucoadhesivos con sistemas nanoparticulados es una alternativa que mejoraría la efectividad terapéutica y modificaría el patrón de liberación, favoreciendo la penetración de los ingredientes activos en la biopelícula dental; reduciendo la placa, gingivitis y halitosis, entre otras patologías. Se elaboraron tres lotes y se evaluaron las propiedades organolépticas (color, olor, sabor y apariencia). Se determinaron por triplicado a 26°C, la viscosidad (η) en un viscosímetro rotacional LVT, con aguja L1 a 12 r.p.m. A una disolución al 2% p/p en agua destilada se le midió el pH y la conductividad en un pHmetro/ISE Thermo Electron Scientific, modelo Orion 4-Star. El enjuague presentó un color gris claro, sabor dulce-refrescante de apariencia ligeramente viscosa. Se reportaron valores de viscosidades dentro del rango entre 100-150 mPa.sec, con un pH dentro el rango fisiológico. La conductividad se encontró en un rango entre 140-160 μ S/cm, no evidenciando diferencia significativa durante el mes de estudio. La combinación de los componentes empleados en el desarrollo de este enjuague bucal podría ser una nueva alternativa más eficiente en los efectos: antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano. Igualmente, protegería por más tiempo el ambiente bucal contra la aparición de enfermedades periodontales.

Palabras clave: Nanopartículas de plata (NpsAg), Enjuague bucal, Mucoadhesivo

Abstract

The following research describes the physical properties of a mucoadhesive mouthwash developed with silver nanoparticles (NpsAg). To maintain effective concentrations of the active ingredients for prolonged periods in the oral cavity, the formulations must resist temperature, salivary turnover, and buccolingual movements. For this reason, the conjunction of mucoadhesive polymers with nanoparticle systems constitutes an alternative that would improve therapeutic effectiveness while modifying the release pattern. This would contribute to the penetration of active ingredients into the dental biofilm, reducing plaque, gingivitis, and halitosis, among other pathologies. Three batches were produced, and their organoleptic properties (color, smell, flavor, and appearance) were evaluated. Their viscosity (η) was determined in triplicate at 26°C in an LVT rotational viscometer, with an L1 needle at 12 r.p.m. The pH and conductivity of a 2% w/w solution in distilled water were measured in a Thermo Electron Scientific pH meter/ISE, model Orion 4-Star. The mouthwash had a light gray color, a sweet-refreshing flavor, and a slightly viscous appearance. Viscosity values were reported within the range between 100-150 mPa.sec, with a pH within the physiological range. Conductivity was found in a range between 140-160 μ S/cm and no significant difference was found during the study month. The combination of the components used in developing this mouthwash could represent a new alternative with more efficient anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects. Likewise, this would protect the oral environment against the appearance of periodontal diseases for a longer time.

Keywords: Silver Nanoparticles (NpsAg), Mouthwash, Mucoadhesive

*Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas. **Fisicoquímica y Tecnología Farmacéutica I. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Correspondencia: isabel.andueza@ucv.ve / ianduezaif@gmail.com

Orcid: [0000-0002-1585-862X](https://orcid.org/0000-0002-1585-862X)

[0009-0009-6065-5264](https://orcid.org/0009-0009-6065-5264)

[0000-0003-2985-9110](https://orcid.org/0000-0003-2985-9110)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.13](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.13)

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

Recepción: 12/10/2023

Aprobación: 16/10/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(3): 131-137. 2023

Introducción

La cavidad bucal, se encuentra bañada en su superficie por secreciones fisiológicas que tienen entre otras funciones la de protegerla, lubricarla e hidratarla. Esto se logra mediante la renovación salival, los movimientos bucolinguales, y la temperatura. Una buena higiene bucal es fundamental para evitar el desarrollo de la placa dental que es un agente causante de las caries, gingivitis y enfermedades periodontales. Los enjuagues bucales son coadyuvantes de la limpieza mecánica, manteniendo sana la mucosa oral, ya que contribuyen en el control de la biopelícula dental (Farah y col., 2009; Figuero y col., 2017). Estos productos son sistemas líquidos o ligeramente viscosos que contiene como ingrediente principal un agente antimicrobiano y antiséptico, capaz de controlar el crecimiento de los microorganismos oportunistas (Enrile de Rojas y Santos-Aleman, 2005). Entre ellos se encuentran: el *Streptococcus mutans.*, el *Lactobacillus* spp., y la *Candida albicans* (Figuero y col., 2017). Dentro de los ingredientes con actividad antibacteriana más frecuentes que se encuentran en los enjuagues bucales están el cloruro de cetilpiridinio, el triclosan, el eucaliptol, timol, la clorhexidina, entre otros (Farmacia Profesional, 2001). Así mismo, se asocian con aceites esenciales relacionados con la estructura del fenol, lo que exhiben una amplia actividad antimicrobiana, retardando la formación y patogenicidad que produce la placa dental. Estos tipos de compuestos son también recomendados en personas que sufren inflamación gingival en conjunción con el cepillado regular. Es por ello, que estos productos están siendo empleados en el tratamiento de las infecciones, en la reducción de la inflamación, alivio del

dolor, disminución de la halitosis entre otras enfermedades bucodentales (Farah y col., 2009; Maher y col., 2022).

Por otra parte, la plata bajo la forma de nanopartículas (NpsAg), es en la actualidad un ingrediente que se está empleando en formulaciones farmacéuticas por sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antimicóticas y antioxidantes (Barkat y col., 2018). Adicionalmente, presenta baja toxicidad y mutagenicidad para las células humanas. Bajo la forma de Nps, ha evidenciado su capacidad de eliminar microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans.*, *Lactobacillus* spp. y *Candida albicans* (Marstin y col., 2015; Mishra y Tyagi, 2018; Shah y col., 2021). En el campo de la odontología, las NpsAg se incorporan en resinas acrílicas y compuestas, en la endodoncia específicamente, la gutapercha recubierta con NpsAg exhibe notables propiedades antimicrobianas. El tamaño pequeño de las Nps le permite brindar una gran área de superficie, lo que incrementa el efecto antimicrobiano de la plata debido al mayor contacto con la célula bacteriana (Mishra y Tyagi, 2018; Soltani y col., 2022). Además, estas Nps han demostrado importantes efectos curativos y previenen la formación de cicatrices (Soltani y col., 2022).

Como consecuencia de ello, han surgido nuevas tendencias en el desarrollo de productos para la salud bucodental que mejoren su efectividad, mediante la incorporación de ingredientes capaces de adherirse a estas células epiteliales, permitiendo permanecer por más tiempo en el sitio de aplicación. Es por ello que la

combinación de polímeros mucoadhesivos con sistemas nanoparticulados constituye una alternativa que mejoraría la efectividad terapéutica y modificaría el patrón de liberación del ingrediente activo, favoreciendo la penetración en la biopelícula dental reduciendo las afecciones orales (Andueza, 2018).

En este sentido, la mucoadhesión es una herramienta que en la actualidad está siendo ampliamente estudiada para su aplicación en el desarrollo de los sistemas de liberación de compuestos activos dentro de las mucosas donde la mucina está presente, para lograr prolongar el tiempo de contacto en el sitio de adsorción y como consecuencia incrementar la efectividad terapéutica. Ingredientes con estas características, se incorporan en estas formulaciones con la finalidad de adherirse a los tejidos y así disminuir la velocidad de eliminación en la cavidad bucal (Saraswathi y col., 2013; Vieira y Andueza, 2018; Dat Phar, y col., 2021).

Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar las propiedades físicas de un enjuague bucal mucoadhesivo desarrollado con nanopartículas de plata de producción local.

Materiales y Métodos

Se prepararon tres lotes del enjuague bucal. Se evaluaron las propiedades físicas 48 horas después de elaborados (tiempo 0) y al día 30 (tiempo 30), a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

1. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Por medio de este análisis se confirmó el color, sabor, olor y apariencia de los

enjuagues elaborados. La determinación de estas características se realizó de manera sensorial, es decir usando los sentidos del vista, gusto y olfato.

Las propiedades fueron evaluadas en función del tiempo mediante la comparación con una formulación recientemente preparada (48 horas), bajo las mismas condiciones y los mismos lotes de materias primas que se emplearon para los enjuagues bucales en estudio.

2. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Se empleó el método descrito por la USP-NF 2021, capítulo 912, para un viscosímetro rotacional. Los valores de viscosidad se reportan en función del tipo de aguja empleada, la velocidad de rotación y de la temperatura. Por lo tanto, este parámetro tan importante para determinar la estabilidad de las formulaciones se realizó en un viscosímetro rotacional, Visco-Star Plus L, utilizando la aguja L1 a una velocidad de 12 revoluciones por minuto (r.p.m.). Los valores de viscosidad fueron expresados en miliPascal.segundos (mPa.seg), (USP-NF 2021; Marriott, 2022).

3. DETERMINACIÓN DEL PH

El enjuague bucal fue previamente dispersado en agua destilada hasta una concentración de 2% p/p. Se utilizó un medidor de pH/ISE Thermo Electron Scientific, modelo Orion 4-Star, con un electrodo estándar combinado Ag/AgCl Triode TM, modelo 9157BNMD, de acuerdo con el método establecido en la USP-NF 2021 capítulo 791 (USP-NF, 2021).

4. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD

Las NpsAg poseen carga superficial, por lo que, al ser incorporadas en las

formulaciones acuosas, podrían tener la capacidad de conducir la corriente eléctrica y tener influencia en la estabilidad de la formulación. Por ello que es de suma importancia conocer y evaluar el carácter iónico de esta dispersión. Para evaluar el comportamiento dieléctrico en función del tiempo, se diluyeron los lotes elaborados con agua destilada a una concentración de 2% p/p y se siguió el capítulo 645 de la USP-NF 2021, empleando un pHmetro/ISE Thermo Electrón Scientific, modelo Orion 4-Star. Los resultados fueron expresados en microSiemens/centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$), (Vila Jato, 2001; USP-NF, 2021; Andueza y col., 2021).

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

Resultados y Discusión

1. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de las propiedades organolépticas color, sabor, olor y apariencia. Las mismas, se mantuvieron constantes durante los 30 días de evaluación.

2. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

La viscosidad es un parámetro que contribuye no solamente con la estabilidad de las NpsAg en la formulación, sino que a su vez las características del viscosante empleado, permite mantener el producto en la cavidad bucal, puesto que reduce la velocidad de eliminación causada por

Tabla I.

Propiedades Organolépticas del enjuague bucal con NpsAg, tiempo 30 días, Temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$

Propiedad	Evaluación
Color	Gris claro
Sabor	-Dulce -Ligeramente picante -Adormecimiento de la lengua -Sensación refrescante
Olor	-Característico
Apariencia	-Líquido ligeramente viscoso -Ligeramente opaco -NpsAg con fácil redispersión

los fluidos salivales y los movimientos bucolinguales. Los valores de viscosidad se encontraron dentro del rango 100-150 mPa.seg. El análisis estadístico indicó que no hubo diferencia significativa en función del tiempo (Figura 1). Cook y col. (2018), demostraron que las moléculas de sabor y aroma incorporadas a polímeros mucoadhesivos producen una extendida percepción en la cavidad oral, debido a la formación de una matriz adherente que retrasa la liberación de los compuestos y prolonga su residencia en la mucosa. Por consiguiente, el enjuague bucal con NpsAg formulado con polímeros mucoadhesivos y viscosos, podría favorecer el tiempo de contacto de los ingredientes activos antisépticos como de sus aceites esenciales, y contribuir a mejorar la estabilidad de la formulación.

3. DETERMINACIÓN DEL pH

El pH es un factor importante para mantener el ambiente y funcionalidad del epitelio bucal. En este estudio se observó que los lotes evaluados en función del tiempo (Figura 2), no presentaron diferencias significativas con 95% de exactitud. El pH se encontró dentro del

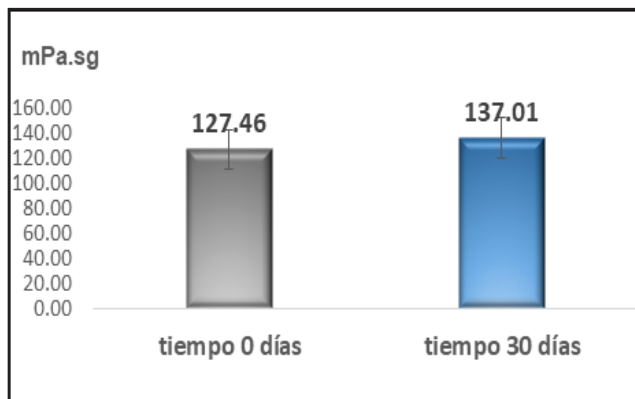


Figura 1. Viscosidad en mPa.s del enjuague bucal con NpsAg en función del tiempo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

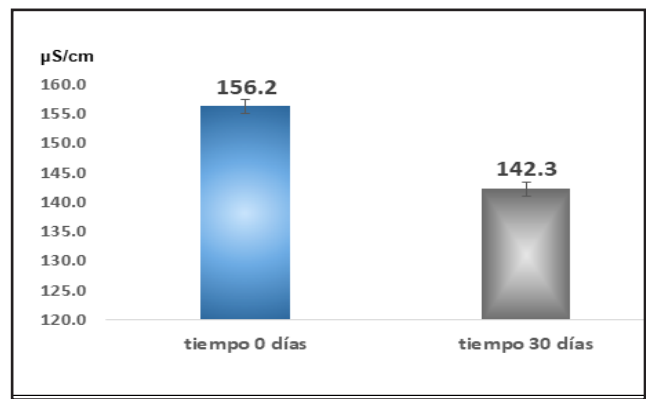


Figura 3. Conductividad en $\mu\text{S/cm}$ del enjuague bucal con NpsAg en función del tiempo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

rango permitido por la USP-NF 2021 para otros enjuagues bucales, el cual oscila entre 5 -7 (USP-NF, 2021).

Es importante resaltar que mantener por tiempo prolongado un pH ácido en la boca, podría ocasionar la desmineralización del esmalte lo que lleva a la posible aparición de lesiones en los dientes y las encías. (Equipo de Redacción, 2001).

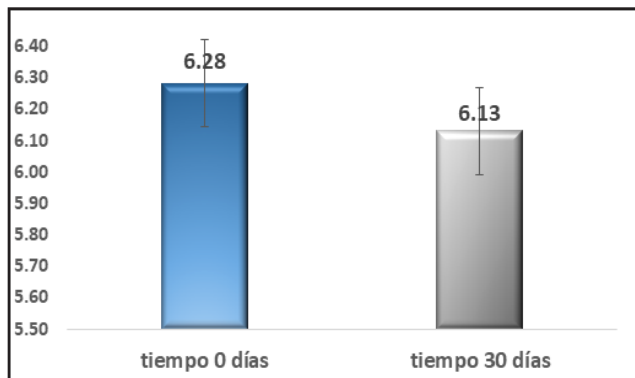


Figura 2. pH del enjuague bucal con NpsAg en función del tiempo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

4. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD

En la Figura 3, se observa el promedio de los valores de conductividad en función del tiempo. El análisis estadístico indicó que no había diferencia significativa entre las medias al cabo de un mes de estudio, por lo que se podría pensar que durante ese

período las NpsAg mantienen su tamaño debido a la intervención de las fuerzas tipo Van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial. Estas fuerzas han permitido la fácil redispersión de las Nps en la formulación, lo que favorece su estabilidad. Sin embargo, se debe continuar evaluando este parámetro físico durante mayor tiempo ya que, se ha encontrado que los efectos in vivo de las NpsAg dependen de la interacción de las diferentes cargas superficiales con los sistemas biológicos (Fernández, 2017).

Conclusiones

Se puede concluir que el estudio de esta formulación es de suma importancia ya que, modificaciones en las diferentes formas y tamaños de partícula, la formación de agregados, su carga superficial y su concentración, pueden influir en la actividad biocida contra diferentes microorganismos, siendo los productos biocidas mezclas que contienen una o más sustancias activas que sirven para repeler, neutralizar o destruir organismos nocivos. Del mismo modo, el empleo de vehículos viscoso con características bioadhesivas podría

favorecer tanto la estabilidad de las Nps en la formulación como la biodisponibilidad de los ingredientes activos en el sitio de aplicación. Igualmente, es indispensable realizar evaluaciones microbiológicas y estudios clínicos, que demuestren su eficacia a la hora de administrarlos a nivel bucal, con el fin de obtener en un futuro cercano formulaciones eficaces y seguras, que permitan prevenir patologías orales.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Agradecimiento

Agradecemos al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- Andueza I, Calo K, Vieira M. 2018. Preparación y evaluación *in vitro* de las propiedades mucoadhesivas para dispersiones de Escleroglucano/Dextrano y Escleroglucano/Quitosano. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2): 90-98.
- Andueza I, Calo K, Rodríguez M, Castillo J. 2021. Efecto de la temperatura y humedad sobre algunas propiedades fisicoquímicas de formulaciones tópicas con nanopartículas de plata y zinc. *Rev Fac Farm* 84 (1 y 2): 134-142.
- Barkat MA, Harshita, Beg S, Naim MJ, Pottoo FH, Singh SP, Ahmad FJ. 2018. Current Progress in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 13 (1): 53-69.
- Cook SL, Woods S, Methven L, Parker JK, Khutoryanskiy VV. 2018. Mucoadhesive polysaccharides modulate sodium retention, release, and taste perception. *Food Chem* 240:482-489.
- Dat Pham Q, Nöjd S, Edman M, Lindell K, To Pgaard D, Wahlgren M. 2021. Mucoadhesion: Mucin-polymer molecular interactions. *Inter J Pharm* 610: 121245.
- Enrile de Rojas FJ, Santos-Aleman A. 2005. Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. *RCOE* 10(4): 445-452.
- Equipo de Redacción. 2001. Colutorios enjuagues y elixires bucales Higiene Completa. *Farmacia Profesional* 15 (9): 83-91.
- Farah C, McIntosh L, McCullough J. 2009. Mouthwashes. *Aust Prescr* 32:162-4.
- Fernández T. 2017. Estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata. Trabajo de Fin de Grado de Farmacia Revisión bibliográfica Universidad de Sevilla. España. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/66375/Fern%C3%A1ndez%20Bueno%2C%20Teresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Figuero E, Nóbrega DE, García-Gargallo M, Tenuta LMA, Herrera D, Carvalho JC. 2017. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries. A systematic review. *J Clin Periodontol* 44(Suppl. 18): S116-34.
- Maher Y, Fathi A, Sembawa B, Elkhy S, Hafiz H, Marghalani A. 2022. Effectiveness of Mouthwash-Containing Silver Nanoparticles on Cariogenic Microorganisms, Plaque Index, and Salivary pH in A Group of Saudi Children Crossref. *The Open Dentistry Journal* 16: 1-8.
- Marslin G, Selvakesavan RK, Franklin G, Sarmento B, Dias AC. 2015. Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *Int J Nanomedicine* 22 (10):5955-63.
- Marriott C. Rheology En: Aulton ME (ed). *The Science of Dosage Form Design*. 2da ed. Elsevier Limited. London, 2002. pp. 41-54.
- Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. *Introducción a la probabilidad estadística*. Cap. 10 y 12. 13º ed. Cengage Learning; USA, 2010. pp. 395-400, 424-430, 488-490.
- Mishra P, Tyagi S. 2018. Surface analysis of gutta-percha after disinfecting with sodium hypochlorite and silver nanoparticles by atomic force microscopy: An in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)* 15(4): 242-247.
- Shah MKA, Azad AK, Nawaz A, Ullah S, Latif MS, Rahman H, Alsharif KF, Alzahrani KJ, El-Kott AF, Albrakati A, Abdel-Daim MM. 2021. Formulation development, characterization and antifungal evaluation of Chitosan NPs for topical delivery of voriconazole in vitro and ex vivo. *Polymers (Basel)* 30;14(1):135.
- Saraswathi B, Balaji A, Umashankar M. 2013. Polymers in mucoadhesive drug delivery system updates. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(3): 423-430.

- Soltani S, Akhbari K, Anukorn Phuruangrat A. 2022. Incorporation of silver nanoparticles on Cu-BTC metal-organic framework under the influence of reaction conditions and investigation of their antibacterial activity. *Applied Organometallic Chemistry* 36; 6:e6634.
- USP-NF. 2021. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USA: The United States Pharmacopeial Convention. General Chapter: 791; 645; 912 and Chlorhexidine Gluconate Oral Rinse: DocId: 1_GUID-D199694B-DF76-4E93-BD74-924BB6F84D3F_4_en-US
- Vieira M, Andueza I. 2018. Comparación de la adhesividad por diferentes ensayos *in vitro* para dispersiones poliméricas de uso oftálmico. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2):13-24.
- Vila Jato J. Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Vol 1. Madrid. Editorial Síntesis S.A, 2001. pp. 208-316.



La teoría del funcional de la densidad para el estudio de análogos novedosos del N-dicloroaralkil-2-aminoindano con actividad dopaminérgica central

Density functional theory for the study of new N-2-dichloroaralkyl-2-aminoindane analogues with central dopaminergic activity

MARIENMY VELASQUEZ^{*1}, ALEXANDER ALBARRACIN^{*2}, LIGIA ANGEL^{*3}, RODOLFO IZQUIERDO^{*4}, MARÍA RAMÍREZ^{*5},
BIAGINA MIGLIORE^{*6}, ANA CÁCERES^{*7}, MIGUEL RODRÍGUEZ^{**8}, JAIME CHARRIS^{**9}, ANITA ISRAEL^{***10},
SIMÓN LÓPEZ^{****11}, JORGE ANGEL^{*12}

Resumen

La dopamina (DA) está relacionada con los trastornos neurodegenerativos que afectan al sistema nervioso central (SNC) tales como la enfermedad de Parkinson. Con el propósito de contribuir en la búsqueda de nuevos fármacos capaces de restablecer la homeostasis de la transmisión dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson, en estudios previos se realizó la síntesis y evaluación farmacológica de los compuestos clorhidratos de N-[(2,4-diclorofenil)-1-metiletil]-2-aminoindano **2**, N-[(3,4-diclorofenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano **3** y N-[(2,6-diclorofenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano **4**, los cuales mostraron actividad como agonistas dopaminérgicos centrales al inducir respuestas conductuales estereotipadas propias de los ganglios basales y del sistema límbico. El compuesto **4** presentó mayor selectividad hacia las respuestas de los ganglios basales que las límbicas. En el presente trabajo se realizó el estudio conformacional y electrónico de los compuestos **2-4**, a través del programa GAUSSIAN-09 (G-09) y la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), empleando el funcional híbrido de rango separado ω B97XD con el conjunto base 6-31+G**. El compuesto **4** presentó una significativa disminución del momento dipolar, lo que explicaría su afinidad hacia los ganglios basales, y dejando entredicho que son más hidrofóbicos que las estructuras límbicas. Este estudio permite incluir al compuesto **4** como potencial agente capaz de contrarrestar la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: Agonista dopaminérgico, profármaco, enfermedad de Parkinson, cálculos (DFT), momento dipolar

Abstract

Dopamine (DA) is related to neurodegenerative disorders that affect the central nervous system (CNS) such as Parkinson's disease. To contribute to the search for new drugs capable of restoring the homeostasis of dopaminergic transmission in Parkinson's disease, in previous studies we performed the synthesis and pharmacological evaluation of hydrochloride compounds N-[(2,4-dichlorophenyl)-1-methylethyl]-2-aminoindane **2**, N-[(3,4-dichlorophenyl)-1-methyl-ethyl]-2-aminoindane **3** and N-[(2,6-dichlorophenyl)-1-methyl-ethyl]-2-aminoindane **4**, which showed central dopaminergic agonistic activity by inducing stereotyped behavioral responses typical of the basal ganglia and the limbic system. Compound **4** presented greater selectivity towards basal ganglia responses than limbic responses. In the present work, the conformational and electronic study of compounds **2-4** was carried out through the GAUSSIAN-09 (G-09) program and the Density Functional Theory (DFT), using the rank-separated hybrid functional ω B97XD with the base set 6-31+G**. Compound **4** presented a significant decrease in the dipole moment, which would explain its affinity towards the basal ganglia, leaving evidence that they are more hydrophobic than the limbic structures. This study allows us to include compound **4** as a potential agent capable of counteracting Parkinson's disease.

Keywords: Dopamine agonist, prodrug, Parkinson's disease, DFT calculations, dipole moment

*Laboratorio de Síntesis Orgánica, Diseño y Evaluación Farmacológica de nuevos productos. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. **Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ***Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ****Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida, USA. Correspondencia: jangel63@yahoo.com / ja116ag@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0001-7327-166X](https://orcid.org/0000-0001-7327-166X) ⁷[0000-0002-3515-5315](https://orcid.org/0000-0002-3515-5315)
²[0000-0002-5014-2280](https://orcid.org/0000-0002-5014-2280) ⁸[0000-0003-4335-3052](https://orcid.org/0000-0003-4335-3052)
³[0000-0003-3324-6202](https://orcid.org/0000-0003-3324-6202) ⁹[0000-0003-4404-2619](https://orcid.org/0000-0003-4404-2619)
⁴[0000-0002-2978-8693](https://orcid.org/0000-0002-2978-8693) ¹⁰[0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)
⁵[0000-0001-5894-0706](https://orcid.org/0000-0001-5894-0706) ¹¹[0000-0002-4326-129X](https://orcid.org/0000-0002-4326-129X)
⁶[0000-0002-7993-8389](https://orcid.org/0000-0002-7993-8389) ¹²[0000-0002-2423-3285](https://orcid.org/0000-0002-2423-3285)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.86.3.14](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.86.3.14)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 04/11/2023
Aprobación: 13/11/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 138-149. 2023

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que aparece en la edad adulta, de curso crónico y progresivo, con afectación multisistémica, tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico, lo que provoca la aparición de síntomas motores y no motores. Su base anatomopatológica se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) del mesencéfalo, así como la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy, que están formados por agregados insolubles de proteína alfa-sinucleína anormalmente plegada. El resultado de dicha neurodegeneración es la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SNpc hacia el núcleo estriado, lo que condiciona una alteración en la fisiología normal de los ganglios basales (GB) que origina las principales manifestaciones de la enfermedad. La degeneración neuronal de la sustancia negra conlleva a una disminución en los niveles de dopamina (DA) **1** (Figura 1) ocasionando un desequilibrio en los niveles de acetilcolina (ACh) y dopamina (DA) en la vía nigroestriatal, esto debido a que la deficiencia de la DA en las vías nigroestriadas del sistema extrapiramidal conlleva al aumento de la secreción del neurotransmisor excitatorio, la acetilcolina. Este desequilibrio genera una variedad de síntomas motores (temblor, rigidez, lentitud de movimientos) y no motores (Haider y col., 2023; Ramesh y col., 2023; Brichta y col., 2013).

La EP se caracteriza clínicamente por la presencia de la tríada motora acinesia o lentitud de movimientos, temblor de reposo y rigidez y por ello ha sido clásicamente considerada y estudiada

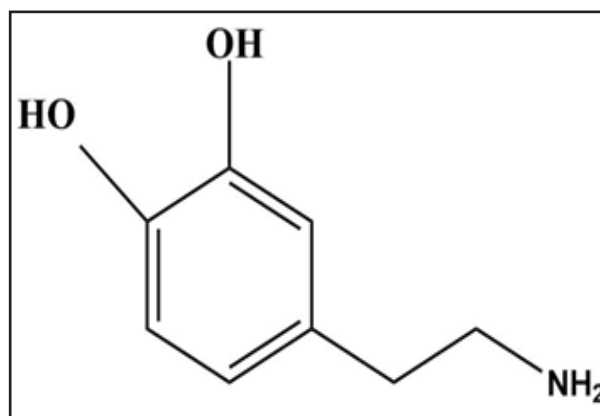


Figura 1. Dopamina (DA) **1**

como un trastorno motor. Los desórdenes neuromotores característicos tales como la rigidez muscular, la bradicinesia (lentitud del movimiento) y/o la aquinesia (pobreza del movimiento), el temblor en reposo, la inestabilidad postural y la dificultad para iniciar o detener el movimiento y el temblor en reposo. Los síntomas comienzan con la rigidez muscular mínima e insidiosa o temblores casi imperceptibles, que evolucionan en forma lenta pero inexorable hacia diversas discapacidades funcionales que incluyen, la incapacidad de caminar y de comer, las facies inexpresivas y las alteraciones en el habla y la escritura (Brichta y col., 2013; Aono y col., 2014; Zhang y col., 2021; Krishnan y Pisharady, 2017; Munhoz y col., 2014). En las últimas décadas, ha aumentado el reconocimiento de manifestaciones no motoras de la EP como la apatía, el deterioro cognitivo o los síntomas disautonómicos entre otros. La Enfermedad de Parkinson está asociada con numerosos síntomas negativos tales como, desórdenes cognitivos, depresión y ansiedad, problemas de sueño, disfunción autonómica y síntomas gastrointestinales (Krishnan y Pisharady, 2017; Munhoz y col., 2014).

El tratamiento de primera elección para la EP se centra en la sustitución farmacológica

de la dopamina, que mejora los síntomas y la calidad de vida. La farmacología que apunta a restaurar la estimulación de receptores para dopamina es la principal terapéutica utilizada para tratar los síntomas motores. Estos fármacos incluyen a la levodopa (L-DOPA), los agonistas dopaminérgicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa tipo B (MAO-B, que degrada la dopamina en el espacio sináptico) (Kalia y Lang, 2015). Desde que la terapia intenta mejorar la calidad de vida del paciente, en general comienza a administrarse una vez que los síntomas se vuelven debilitantes. Aunque todos estos fármacos permiten adecuar la terapia de reemplazo de dopamina a las necesidades de cada paciente en etapas tempranas de la enfermedad, en etapas avanzadas sólo la L-DOPA provee suficiente beneficio sintomático para sostener un adecuado desempeño social (Connolly y Lang, 2014; Giugni y Okun, 2014; Meissner y col., 2011). La L-DOPA es un precursor de dopamina (y de todas las catecolaminas) que se co-administra por vía sistémica junto con inhibidores de la enzima DOPA-descarboxilasa que no atraviesa la barrera hematoencefálica, como la carbidopa o benserazida, para evitar que la L-DOPA se degrade antes de llegar al cerebro. Una vez en el cerebro, la L-DOPA es captada por las neuronas dopaminérgicas remanentes, lo que les permite aumentar la liberación de dopamina en el estriado, restaurar la estimulación de los receptores dopaminérgicos y por consiguiente atenuar la sintomatología motora. La administración de L-DOPA sigue siendo la terapéutica más efectiva y su introducción en el tratamiento de la enfermedad incrementó enormemente la esperanza de vida de los pacientes (Fahn y col., 2004).

Aun cuando el tratamiento con levodopa y otros fármacos anti-parkinsonianos, permite que los pacientes presenten mejoría clínica con beneficios máximos del medicamento, su eficacia disminuye con el tiempo o bien su uso prolongado produce efectos indeseables en el paciente, lo que incide en la suspensión de dichos fármacos. Por otra parte, el tratamiento quirúrgico suele quedar limitado a pacientes con síntomas no controlables o disquinesias en etapas tardías, además, en su mayoría aún se encuentran en fase experimental por ser de alcance limitado (Zhang y col., 2007).

La acción de la DA está mediada a través de la interacción con sus receptores, los cuales se han dividido farmacológicamente en dos clases, los D_1 y los D_2 . A la familia de los receptores D_1 pertenecen los subtipos D_{11} y D_{15} , mientras que la familia de los D_2 incluye los subtipos D_{22} , D_{23} y D_{24} (Zhang y col., 2007; Ross y Margolis, 2005). Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a la proteína G. Los receptores D_1 se acoplan principalmente a las proteínas $G_{\alpha s/olf}$, y estimulan la actividad de la adenilil ciclasa y la producción del segundo mensajero AMPc; mientras que los receptores D_2 se asocian con las proteínas $G_{\alpha i/o}$ que inhiben la producción del AMPc. En este sentido, la activación de los receptores dopaminérgicos acoplados a proteínas G permiten el reclutamiento de las proteínas multifuncionales de soporte llamadas "beta-arrestina 1" y "beta-arrestina 2" (βArr_1 y βArr_2) a través de la rápida fosforilación por parte de las proteínas quinasas involucradas. La función de estas proteínas consiste en desensibilizar e internalizar al receptor acoplado a la proteína G. En el caso de que los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2

sean reclutados por la "beta-arrestina 2", se activaría una vía de señalización celular independiente de la proteína G, que induce a un movimiento normal reduciendo así las discinesias, al mejorar la locomoción anormal (Del'guidice y col., 2011).

Basándose en este hecho, se ha procurado el desarrollo de los agonistas parcializados hacia la ruta de la β -arrestina, como una nueva aproximación terapéutica para tratar la Enfermedad de Parkinson sin inducir las discinesias. Para ello se ha propuesto el desarrollo de los agonistas dopaminérgicos de acción dual hacia los receptores D_1 y D_2 , a fin lograr una óptima respuesta motora, libre de movimientos anormales generados por la acción de los agonistas tradicionales en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Park y col., 2020).

Con relación a esto, los derivados del 2-aminoindano-N-aralquílicos han mostrado tener actividad selectiva sobre el sistema dopaminérgico central al inducir respuestas conductuales estereotipadas propia de los receptores D_1 y D_2 , ubicados en el sistema límbico y los ganglios basales (Pérez y col., 1997; Angel, 2001; Rodríguez y col., 2003; Angel y col., 2004; Andujar y col., 2006; Angel, 2008; Angel y col., 2008; Angel y col., 2015a,b; Angel y col., 2015; Angel y col., 2018).

Con el propósito de contribuir en la búsqueda de nuevos fármacos que permitan restablecer la homeostasis de la transmisión dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson, los compuestos clorhidratos de N-[(2,4-diclorofenil)-1-metiletil]-2-aminoindano **2**, N-[(3,4-diclorofenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano **3** y N-[(2,6-diclorofenil)-1-metil-etil]-2-aminoindano **4** (Figura 2), en estudios

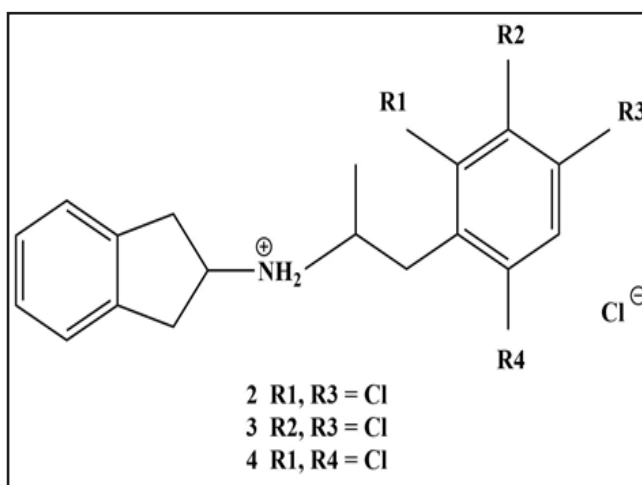


Figura 2. Compuestos **2**, **3** y **4**

farmacológicos *in vivo*, con ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, demostraron que presentan actividad agonística mediada por mecanismos dopaminérgicos centrales ya que inducen respuestas conductuales estereotipadas propias de los receptores D_1 y D_2 ubicados en el sistema límbico (acicalamientos y lamidas) y en los ganglios basales (roídas y olfateos) (Angel y col., 2018; Angel y col., 2023).

Los compuestos **2-4** presentan sobre el anillo aromático del sistema aralquil dos átomos de cloro con los patrones de sustitución en las posiciones (2,4), (3,4) y (2,6), respectivamente. El compuesto **4** presenta el patrón (2,6) y mostró mayor selectividad hacia las respuestas de los ganglios basales que las mostradas por los compuestos **2** y **3**. Al hacer una comparación decreciente de acuerdo con las respuestas conductual estereotipada de los ganglios basales, se encontró que el compuesto **4** presentó mayor intensidad sobre la conducta estereotipadas (roídas), que las obtenidas por los compuestos **3** y **2**, respectivamente. En cuanto a las conductas mediadas por el sistema límbico (lamidas y acicalamientos), el compuesto **2** mostró mayor intensidad que el compuesto **3** y

éste, sobre el compuesto **4** (Angel y col., 2018; Angel y col., 2023).

Posiblemente, el cambio isostérico en el patrón de sustitución (2,6) del compuesto **4** favorece las respuestas estereotipadas de los ganglios basales sobre las del sistema límbico. Con el fin de explicar esta selectividad en la acción del compuesto **4**, se realizó el presente estudio teórico computacional, considerando los enfoques de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés), como una herramienta útil para el estudio de la estructura electrónica y las propiedades de la materia a nivel atómico, que ha demostrado tener un formidable poder predictivo (Silva-Junior y col., 2017). Para tal fin, se empleó el funcional híbrido de rango separado ω B97XD con el conjunto base 6-31+G** (Becke, 1988; Lee y col., 1988; Frisch y col., 2016).

Materiales y Métodos

SECCIÓN MODELADO MOLECULAR

Para establecer una aproximación químico-medicinal acerca del diseño y la evaluación farmacológica de los compuestos **2**, **3** y **4**, fue necesario realizar un estudio conformacional y electrónico a nivel computacional. Se realizaron los cálculos mecanocuánticos con el programa GAUSSIAN-09 (G-09) (Frisch y col., 2016) que es un paquete de química computacional con varios métodos para calcular propiedades de sistemas moleculares y periódicos, usando descripciones mecánico-cuánticas estándar para las funciones de onda o la densidad electrónica. Para optimizar las estructuras se combinó la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (Silva-Junior y col., 2017),

empleando el funcional híbrido de rango separado ω B97XD con el conjunto base 6-31+G**. A las estructuras optimizadas se les calcularon los potenciales electrostáticos moleculares (PEM) y los momentos dipolares (μ), bajo las formas neutras (N), catiónicas (N-H⁺) y pares iónicos con el contra ion Cl⁻(M-H⁺...Cl⁻); donde N= **2**, **3** y **4** son los números asociados a los tres compuestos en el estudio (North, 1989; Polilzer y Truhlar, 1991; Carrupt y col., 1991; Murray y col., 1996; Sarai, 1989).

Resultados y Discusión

Con el fin de conocer la aproximación químico-medicinal entre el tipo de sustitución de los átomos de cloro sobre el anillo aromático del sistema aralquil y la respuesta de la conducta estereotipada selectiva (roída) del compuesto **4**, sobre las obtenidas por los compuestos **3** y **2** (Angel y col., 2018; Angel y col., 2023), se realizaron los cálculos mecano-cuánticos a las estructuras optimizadas (Figura 3). Se les calcularon los potenciales electrostáticos moleculares (PEM) y los momentos dipolares (μ), bajo las formas neutras (N), catiónicas (N-H⁺) y pares iónicos con el contra ion Cl⁻(M-H⁺...Cl⁻); donde N= **2**, **3** y **4** son los números asociados a los tres compuestos en el estudio. A tal efecto en la Figura 4, se muestran los resultados obtenidos y al considerar los pares iónicos de los compuestos **2**, **3** y **4** que serán denotados como 2-H⁺...Cl⁻, 3-H⁺...Cl⁻ y 4-H⁺...Cl⁻ (isómeros de posición en relación con los átomos de cloro presentes en el anillo bencénico del fragmento aralquil), se observa que no se encontraron diferencias energéticas significativas entre ellos. El isómero 2-H⁺...Cl⁻ resultó ser 4.4 kJ mol⁻¹ y 2.6 kJ mol⁻¹ más estable que los isómeros 4-H⁺...Cl⁻ y 3-H⁺...Cl⁻, respectivamente.

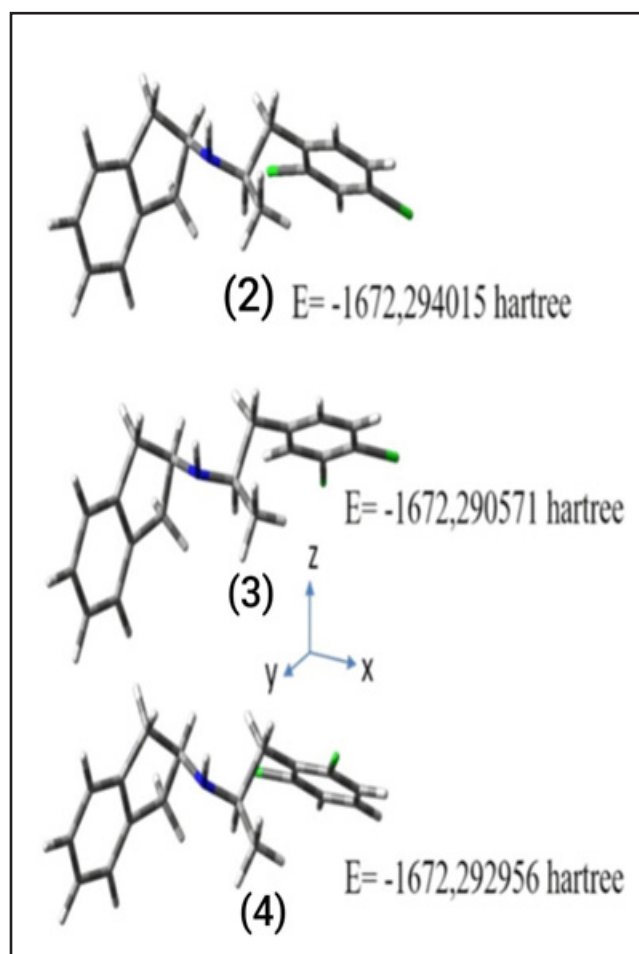


Figura 3. Superposición estructural de los conformeros más estables: **2** (b), (c) **3** (c) y **4** (d)

La permeabilidad característica de la barrera hematoencefálica es sumamente restringida, de forma que sólo algunos gases (por ejemplo, O_2 o CO_2), moléculas lipofílicas de entre 400 y 600 Da y otras moléculas orgánicas pueden cruzar la barrera a través de canales específicos y regulados. Únicamente el agua atraviesa sin restricción alguna. Ahora bien, como los pares iónicos son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica, pero sí son solubles en medios acuosos (polares), son capaces de sufrir una serie de disociaciones hasta liberar las especies neutras de los compuestos **2**, **3** y **4**, las cuáles podrían así ser transportadas hacia el interior del cerebro. Esta aseveración se apoya con

los datos obtenidos y representados en la Tabla I, dónde se indica que el proceso de protonación de la especie neutra a nivel intracelular es exotérmico y espontáneo. Por ejemplo, el precursor $4-H^{+}Cl^{-}$, en medios hidrofílicos (plasma), genera la especie neutra **4**, la cual sería capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y una vez dentro del cerebro podría generar la especie protonada $4-H^{+}$ al tomar un protón del H_3O^{+} proveniente del metabolismo intraneural.

Tabla I.

Funciones termodinámicas para las reacciones de protonación de los compuestos (**2**), (**3**) y (**4**)

Reacción	ΔH_p (kJ mol ⁻¹)	ΔG_p (kJ mol ⁻¹)
2 + $H_3O^{+} \rightarrow 2-H^{+} + H_2O$	-278,04	-276,9
3 + $H_3O^{+} \rightarrow 3-H^{+} + H_2O$	-267,0	-266,2
4 + $H_3O^{+} \rightarrow 4-H^{+} + H_2O$	-285,1	-284,0

El Potencial Electroestático Molecular (PEM) se ha convertido en una herramienta fundamental para elaborar teorías y modelos químicos que expliquen la reactividad de las moléculas. A partir del principio clásico de que: cargas del mismo signo se repelen y cargas de signo opuesto se atraen, se han podido entender y predecir la reactividad química en muchos contextos; gracias a la comparación del PEM. Con la finalidad de conocer las propiedades estereoelectrónicas de los compuestos **2**, **3** y **4**, se realizaron los cálculos del potencial electrostático molecular (PEMs), encontrándose muchas similitudes (Figura 4). Los PEMs son de gran utilidad porque permiten una visualización y descripción de la capacidad que tendría una molécula para interactuar electrostáticamente con un potencial sitio de unión y pueden ser interpretados como un patrón farmacofórico

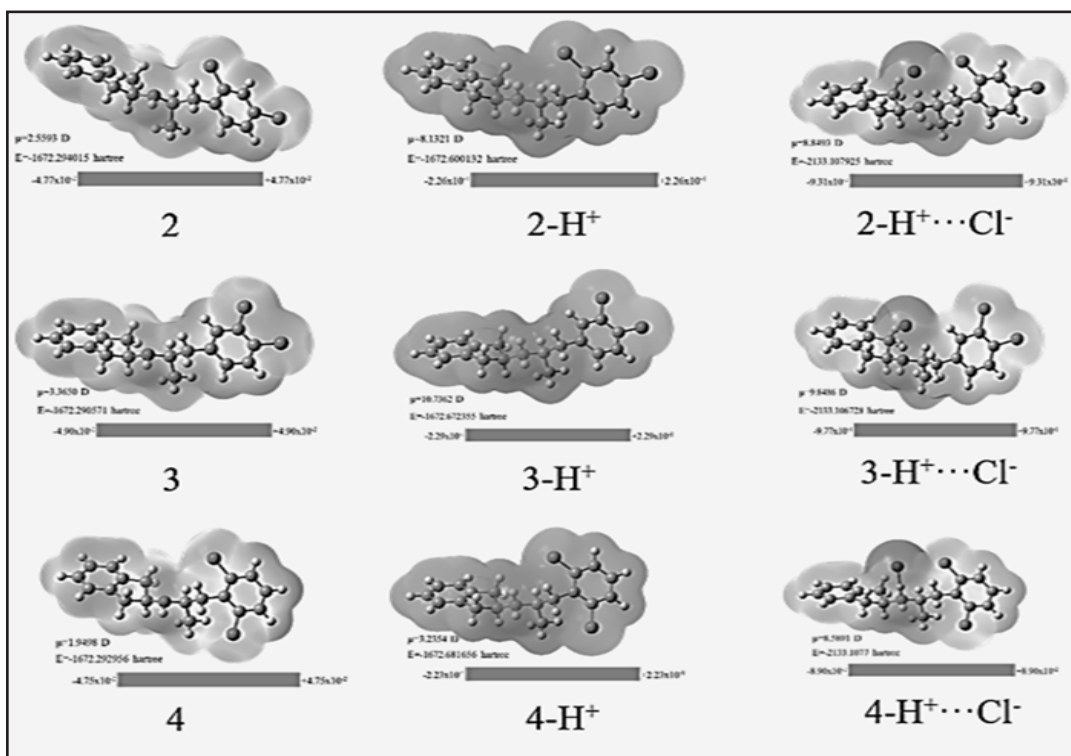


Figura 4. Estructuras optimizadas y PEMs para los compuestos: **2**, **3** y **4**, 2-H⁺, 3-H⁺ y 4-H⁺, 2-H⁺...Cl⁻, 3-H⁺...Cl⁻ y 4-H⁺...Cl⁻. El tono gris oscuro indica la mayor atracción a una carga positiva puntual y el tono gris claro la mayor repulsión. El potencial representa una medida de la distribución de carga de toda la molécula

que condensa la información sobre las fuerzas electrostáticas involucradas en la formación del complejo ligando-receptor (North, 1989; Polilzer y Truhlar, 1991; Carrupt y col., 1991; Murray y col., 1996; Sarai, 1989). En vista que los compuestos **2**, **3** y **4** poseen cambios bioisostéricos con los patrones de sustitución de los átomos de cloro del anillo aromático del sistema aralquil, y que dichos cambios generaron una selectividad significativa sobre las conductas estereotipadas provenientes de los ganglios basales con respecto a las estructuras límbicas; fue necesario plantearse las siguientes interrogantes a fin de poder explicar estos resultados farmacológicos (Angel y col., 2023). ¿Existe similitud estereoelectrónica entre los compuestos **2**, **3** y **4**? En caso afirmativo, ¿es posible pensar que estos compuestos actuarían por un mecanismo molecular

similar? Sí bien al sólo observar y comparar estos núcleos base parece que existe una similitud, está claro que la manera más directa de evaluar esta similitud es calcular y comparar las propiedades estructurales y electrónicas de cada compuesto. El reconocimiento molecular, y el concepto de especificidad, muchas veces puede ser explicado, en términos mecanísticos y también reduccionistas, como una “complementariedad” entre el ligando y el receptor (Carrupt y col., 1991; Murray y col., 1996; Sarai, 1989). Con relación a esto, la comparación de las características estereoelectrónicas de los compuestos **2**, **3** y **4** resultaría de gran ayuda para determinar un posible patrón farmacofórico y de este modo, entender mejor los resultados experimentales farmacológicos obtenidos. En la Figura 3 se muestra una zona predominantemente nucleofílica (tono gris

oscuro) cercana a los pares de electrones libres sobre el átomo de nitrógeno en los compuestos de **2** y **4**, siendo el compuesto **4** quien presenta la mayor concentración de carga negativa sobre el átomo de nitrógeno. Así, se esperaría que los compuestos **2** y **4** reaccionen fuertemente frente a los electrófilos o H_3O^+ del metabolismo, debido a que los valores de ΔH_p para los compuestos (Tabla I) validan este hecho, y de acuerdo a esto se ratifica que el compuesto **4** genera más fácilmente la especie catiónica al ser comparado con los compuestos **2** y **3**. En cuanto a los PEMs (Figura 4) de las especies catiónicas $2-H^+$, $3-H^+$ y $4-H^+$ se observa una zona predominantemente electrofílica en torno al H^+ ubicado sobre el átomo de nitrógeno en las aminas cuaternarias, por lo que podría interactuar fácilmente con el sitio de unión en el receptor dopaminérgico, predominantemente nucleofílico (Asp 86). La especie $4-H^+$ presentó PEMs muy parecidos a los demás compuestos $2-H^+$ y $3-H^+$ sin embargo, la evidencia farmacológica demostró que es más selectivo hacia las respuestas de los ganglios basales al ser comparado con los otros compuestos. Esta selectividad puede ser explicada por el hecho que ésta especie $4-H^+$ presentó los valores más bajos de su momento dipolar (μ), al ser comparado con los demás compuestos estudiados. Para ello es preciso señalar que los valores de baja polaridad en estos cationes le confieren al compuesto protonado $4-H^+$ una alta solubilidad en los ambientes hidrófobos o grasos y de acuerdo con los resultados experimentales farmacológicos en los que se demostró que la administración intracerebroventricular del compuesto **4** indujo un comportamiento estereotipado a nivel del sistema extrapiramidal (roídas y olfateos) y en el sistema límbico. El hecho que el haloperidol (antagonista no selectivo)

bloqueó las conductas estereotipadas inducidas por el compuesto **4** demostró su acción dopaminérgica en ambos sitios, sin embargo, mostró selectividad en las respuestas conductuales propias de los ganglios basales sobre las estructuras límbicas (Angel y col., 2023), lo que sugiere que los ganglios basales son más hidrofóbicos que las estructuras límbicas. Al contrario, las especies $2-H^+$ y $3-H^+$ mostraron una polaridad significativa mayor y sus respuestas farmacológicas apuntan hacia las estructuras límbicas.

Ahora bien, se conoce que el cambio isostérico de posición de los átomos de cloro sobre el sistema aralquil modifica las propiedades estereoelectrónicas y por ende las respuestas farmacológicas obtenidas experimentalmente. Tal y como se observa en la Figura 4, los PEMs muestran en un tono gris claro la ubicación de los átomos de cloro, y representan las zonas moleculares con cargas ligeramente positivas, lo cual tiene sentido por el efecto inductor negativo que ejerce cada átomo de cloro. Sin embargo, estos fragmentos del sistema aralquil forman parte de la zona más hidrofóbica contenida en estas moléculas.

Por otro lado, lo que parece ser más interesante, es la forma global del PEM mostrado por el compuesto **4** y la diferencia con los compuestos **2** y **3**, por su forma y tamaño. Esta diferencia hace pensar que, aunque los tres compuestos son similares por ser isómeros de posición, las diferencias estereoelectrónicas mostradas por el compuesto **4**, le facilita atravesar las membranas y desencadenar en el sistema nervioso central la respuesta dopaminérgica selectiva en los ganglios basales. Para ello el compuesto **4** requeriría la previa activación metabólica (Figura 5) dentro

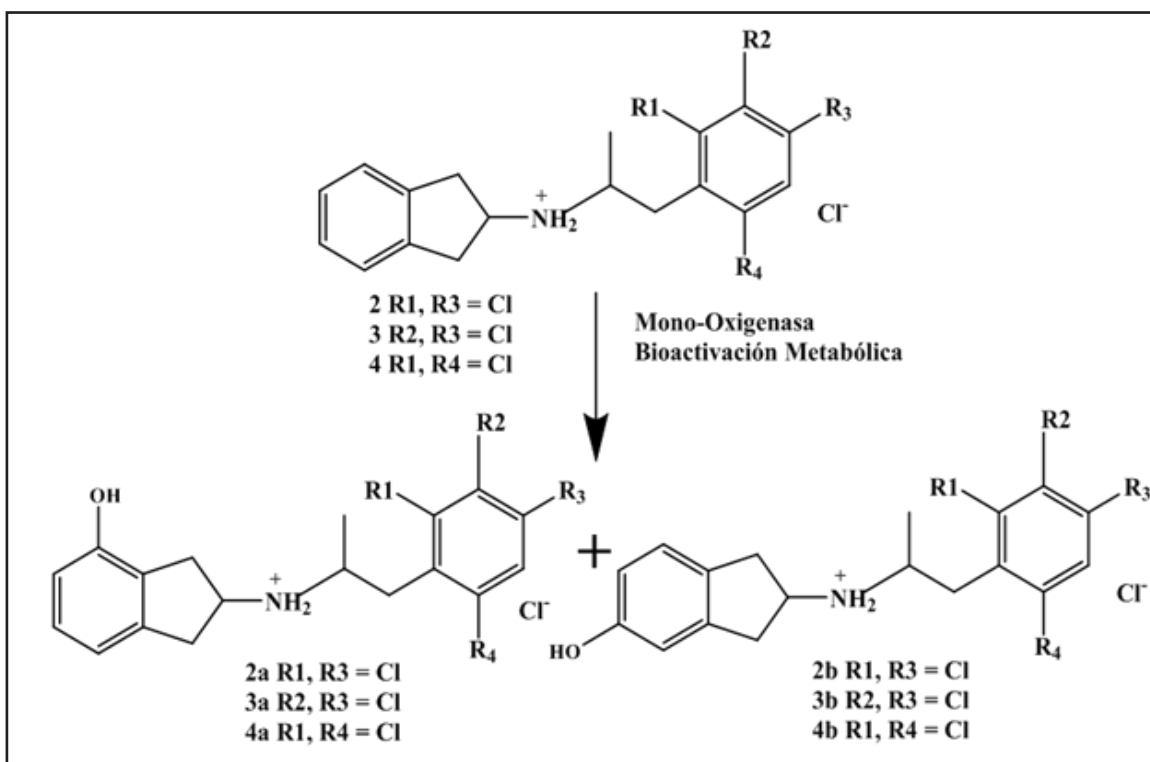


Figura 5. Posible bioactivación metabólica de los compuestos **2**, **3** y **4** (formas inactivas).

Los compuestos 2a-b, 3a-b y 4a-b son las formas activas

del cerebro que le permita interactuar sobre su receptor dopaminérgico D_2 y desencadenar las respuestas conductuales propias de los ganglios basales. En base a estos resultados de los cálculos DFT computacionales (modelaje molecular) y complementados con los resultados experimentales farmacológicos, se podría proponer que las neuronas de los ganglios basales son más hidrofóbicas que las límbicas.

Para finalizar es preciso resaltar el comportamiento del compuesto **4**, el cuál fue diseñado como un profármaco al igual que sus análogos **2** y **3**, ya reportados (Angel y col., 2018; Angel y col., 2023) y que al sufrir la bioactivación metabólica (Figura 5) se incorpora el fragmento farmacofórico "m-hidroxifeniletilamino" en el núcleo indano, específico para que puedan interactuar a nivel postsináptico

sobre los receptores D_2 . Cuando se considera el cambio isostérico del patrón de sustitución de los átomos de cloro en las posiciones 2,6 en el anillo bencénico de fragmento aralquil en el compuesto **4**, se favoreció selectivamente las respuestas estereotipadas de los ganglios basales sobre las respuestas de las estructuras límbicas (Angel y col., 2023). Para poder dar una posible aproximación químico medicinal y así explicar este resultado farmacológico experimental, es preciso tomar en cuenta los valores de los momentos dipolares de $\mu = 8.1321D$, $\mu = 10.7362 D$ y $\mu = 3.2354$ que se corresponden a las conformaciones protonada de los compuestos **2**, **3** y **4**, respectivamente; y de esta forma se podría concluir que los ganglios basales son menos polares que las estructuras límbicas, debido a la notable disminución del momento dipolar del compuesto **4**. En cambio, los compuestos **2** y **3** mostraron

mayor afinidad hacia las estructuras límbicas, por poseer momentos dipolares significativamente mayores.

Conclusiones

El estudio conformacional y electrónico a nivel computacional de los compuestos **2**, **3** y **4**, a través de los cálculos mecanocuánticos con el programa GAUSSIAN-09 (G-09) y la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), empleando el funcional híbrido de rango separado ω B97XD con el conjunto base 6-31+G**, confirma la aproximación químico medicinal entre el patrón de sustitución de los átomos de cloro sobre el anillo bencénico del sistema aralquil con la respuesta farmacológica reportada. La notable disminución del momento dipolar en el compuesto **4**, sugiere que los ganglios basales son más hidrofóbicos que las estructuras límbicas. Este hecho nos permite incluir al compuesto **4** como un nuevo potencial agente capaz de contrarrestar la enfermedad de Parkinson.

Agradecimiento

El autor dedica este manuscrito a la Memoria de su Padres, Sr. Álvaro Angel Rangel (11-05-1931/24-05-2021) y Sra. Ligia Guío de Angel (22-09-1935/13-11-2006)

Financiamiento

Proyecto FDI N°02-2017, Programa CONDES-CC-0239-17 y CONDESCC-0378-15.

Referencias Bibliográficas

Andujar S, Garibotto F, Migliore B, Charris J, Enriz R, Ángel J. 2006. Molecular recognition and

binding mechanism of N-aralkyl substituted 2-aminoindans to the dopamine D₂ receptor. A theoretical study. *J Argent Chem Soc* 94(1-3): 1-11.

Angel Guío JE. 2001. Diseño, Síntesis, Estudio Teórico y Evaluación Farmacológica de Compuestos con Actividad Dopaminérgica. *Arch Venezol Farmacol Ter* 20: 86-90.

Angel J, Andujar S, Migliore B, Charris J, Israel A, Suárez H, López S, Garrido M, Cabrera E, Visbal G, Rosales C, Suvire F, Enriz R. 2008. Synthesis, dopaminergic profile and molecular dynamics calculations of N-Aralkyl substituted 2-aminoindans. *Bioorg Med Chem* 16(6): 3233-3244.

Angel J, Charris J, Israel A, Migliore B, Suárez H, Garrido M, López S, Ferrer R, Michelena E, Rodríguez L, Silva J, Moronta A, Espinoza G, Quintero L. 2004. Perfil dopaminérgico del compuesto 2-aminoindano-N-aralquil sustituido. *Arch Venezol Terap Farmacol* 23(2): 136-142.

Angel J, Ferrer R, Urdaneta N, Porta N, Rodríguez L, Rosales C, Espinoza G, Angel L, Balza K, Perdomo L, Faría A, Dabian A, Zapata M, Linero A, Acurero G, Israel A, Garrido M, Suárez H, Migliore B, López S, Charris J, Ramírez M. 2015a. Novedosos agentes dopaminérgicos centrales derivados del 2-aminoindano-4,7disustituido atípico. Síntesis y perfil farmacológico central. *Invest Clin* 56(2): 137-154.

Angel J, Montero L, Velásquez M, Caldera J, Vera M, Blanco C, Angel L, Migliore B, Charris J, Israel A, López S, Izquierdo R, Ortega J, Ramírez M. 2018. Síntesis y evaluación farmacológica de los novedosos agentes dopaminérgicos centrales análogos del N-dicloroaralquil-2-aminoindano. *Rev Fac Farm* 81(1-2): 41-50.

Angel J, Perdomo L, Balza K, Acurero G, Ángel L, Dabian A, Faría A, Linero A, Zapata M, Vera M, Migliore, Suárez H, Israel A, Charris J, López S, Ramírez M, 2015b. Design, synthesis and preliminary pharmacologic evaluation of 2-aminoindane-quinoline analogues as dopaminergic agents. *Der Pharma Chem* 7(5): 130-135.

Angel J. 2008. Una compilación en el diseño y evaluación farmacológica preliminar de nuevos compuestos con actividad dopaminérgica central. *Invest Clin* 49(1): 71-73.

Angel JE, Velasquez MDV, Albarracín AE, Boscán K, Ángel L, Izquierdo R, Ramírez MM, Migliore B, Charris J, Garrido M, Israel A, López S. 2023. Efecto del compuesto N-2,6-dicloro-aralquil-2-

- Aminoindano en la conducta estereotipada de ratas. Acción dopaminérgica selectiva central sobre los ganglios basales más que en las estructuras límbicas. *Invest Clin* 64(1): 15-27.
- Aono M, Iga J, Ueno S, Agawa M, Tsuda T, Ohmori T. 2014. Neuropsychological and psychiatric assessments following bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Japanese patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 21(9): 1595-1598.
- Becke AD. 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A Gen Phys A* 38(6):3098-3100.
- Brichta L, Greengard P, Flajolet M. 2013. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36(9): 543-554.
- Carrupt PA, El Tayar N, Karlén A, Testa B. 1991. Molecular electrostatic potentials for characterizing drug-biosystem interactions. *Methods Enzymol* 203: 638-677.
- Connolly BS, Lang AE. 2014. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311:1670-1683.
- Del'guidice T, Lemasson M, Beaulieu JM. 2011. Role of beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the basal ganglia. *Front Neuroanat* 5: 58. Disponible online en: <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00058>.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K. 2004. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498-2508.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, A Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, WILLIAMS-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox DJ. 2016. Gaussian 16. Revision A 03. Gaussian Inc: Wallingford CT.
- Giugni JC, Okun MS. 2014. Treatment of advanced Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 27:450-460.
- Haider A, Elghazawy NH, Dawoud A, Gebhard C, Wichmann T, Sippl T, Hoener M, Arenas E, Liang SH. 2023. Translational molecular imaging and drug development in Parkinson's disease. *Mol Neurodegeneration* 18(11): 1-21.
- Kalia LV, Lang AE. 2015. Parkinson's disease. *Lancet* (London, England) 386:896-912.
- Krishnan S, Pisharady KK. 2017. Surgical treatment of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Ann Indian Acad Neurol* 20(3): 199-206.
- Lee C, Yang W, Parr RG. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter* 37(2): 785-789.
- Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schapira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E. 2011. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov* 10(5): 377-393.
- Munhoz RP, Cerasa A, Okun MS. 2014. Surgical treatment of dyskinesia in Parkinson's disease. *Front Neurol* 5:(65). Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00065>
- Murray JS, Sen K. 1996. Molecular electrostatic potentials: Concepts and applications. *Theoretical and computational chemistry*, Amsterdam, Elsevier Science BV 3, p. 587-617.
- North AC. 1989. Applications of molecular graphics for the study of recognition. *J Mol Graph* 7(2): 67-70, 97.
- Park H, Urs A, Zimmerman J, Liu C, Wang Q, Urs N. 2020. Structure-functional-selectivity relationship studies of novel apomorphine analogs to develop D1R/D2R.
- Pérez J, Domínguez J, Angel J, Duerto Z, Salazar M, Acosta H, Charris J. 1997. N-Aralkyl substitution of 2-aminoindans synthesis and their inotropic and chronotropic activity in isolated guinea pig atria. *Arzneimittel Forschung Drug Research* 47 (11): 1208-1210.
- Politzer P, Truhlar D. 1991. *Chemical applications of atomic and molecular electrostatic potentials*, New York, Plenum Publishing.
- Ramesh S, Perera Molligoda Arachchige AS. 2023. Depletion of dopamine in Parkinson's disease and relevant therapeutic options: A review of the literature. *AIMS Neurosci* 10(3): 200-231.
- Rodríguez L, Medina Y, Suárez H, Migliore B, Israel A, Charris J, López S, Caldera J, Ángel J. 2003. Conformational theoretical study of substituted

- and non-substituted N-alkyl-2-aminoindans and its relation with dopaminergic activity. *J Mol Struct Theochem* 636(1-3): 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(03\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(03)00023-X)
- Ross C, Margolis R. 2005. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. *Clin Neurosci Res* 5(1): 3-14.
- Sarai AJ. 1989. Molecular recognition and information gain. *J Theor Biol* 140(1): 137-143.
- Silva-Junior EF, Aquino TM, Araújo-Júnior JX. 2017. Quantum Mechanical (QM) calculations applied to ADMET drug prediction: A Review. *Current Drug Metabolism* 18:511-526.
- Zhang A, Neumeyer J, Baldessarini R. 2007. Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: potential therapeutics for neurological. *Chem Rev* 107(1): 274-302.
- Zhang C, Han Q, Chen N, Yuan Y. 2021. Research on developing drugs for Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 168: 100-109.



El envejecimiento: ¿Podemos frenarlo? Telómeros/Telomerasa, Senescencia Celular Primera Parte

Aging: ¿Can we stop it?
Telomeres/Telomerase, Cellular Senescence
First Part

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO

Resumen

Todos los seres vivos sufren un declinio fisiológico sistémico después de la ontogenia, caracterizado como "envejecimiento". El proceso del envejecimiento es multifactorial, probablemente ocasionado por una miríada de factores, que interactúan y con consecuencias a todos los niveles del organismo. En las últimas dos décadas, la medicina moderna ha incrementado la esperanza de vida más de dos veces en el mundo desarrollado, creando una sociedad envejecida con una mayor predisposición a enfermedades degenerativas, con la mitad de las personas de más de 65 años padeciendo dos o más enfermedades crónicas y tomando una cantidad similar de medicamentos para tratarlas. Muchos son los procesos que conducen al envejecimiento y tan variados como la exposición al estrés celular, la inflamación crónica, la autofagia y la supervivencia y muerte celular. La aproximación clásica de focalizar una sola vía o un hecho individual puede fallar en visualizar la complejidad y la interconectividad del envejecimiento. Por lo tanto, aliviar las consecuencias inmediatas del envejecimiento: el deterioro fisiológico, es el objetivo principal de los estudios en este campo. En esta revisión, en sus dos partes (I y II), se pretende dar una visión sobre los factores principales que influyen en el envejecimiento y las posibles terapias que las últimas investigaciones nos proponen, muchas están aún en fase experimental, pero en los que los progresos tecnológicos y científicos lucen esperanzadores.

Palabras clave: Envejecimiento, telómeros, telomerasa, senescencia celular, senolíticos

Abstract

All living beings undergo systemic physiological decline following ontogeny, characterized as aging. Aging is a multifactorial process, probably caused by a myriad of interacting factors and with consequences at all levels of the organism. Modern medicine has increased life expectancy, more than twofold in the developed world over the past two centuries, yet this has created an aged society that has more predisposition to degenerative disorders, with half of people over 65 suffering from two or more chronic diseases and taking a similar number of medications to treat them. Many are the factors leading to aging, as varied as sustained exposure to cellular stress, chronic inflammation, autophagy, and cell survival and death. The classical approach of focusing on single pathways or even individual hallmarks might fail to capture the complexity and interconnectedness of aging. Therefore, alleviating the immediate consequence of aging, the physiological deterioration, is the foremost goal of aging-oriented studies in humans. In this review, (parts I and II), the aim is to give a vision of the main factors that influence aging and the possible therapies that the latest research suggests. Many are still in the experimental phase, but technological progress and scientists look hopeful.

Keywords: Aging, telomeres, telomerase, cellular senescence, senolytics

Prof. Jubilado, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Cátedra de Biología. Correspondencia: mrgarrido11@hotmail.com

Orcid: [0000-0001-9662-4405](https://orcid.org/0000-0001-9662-4405)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.15](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.15)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 20/10/2023
Aprobación: 15/11/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 150-171, 2023

Introducción

Desde el principio de los tiempos, la Humanidad ha estado obsesionada por la inmortalidad y la eterna juventud. Muestra de ello nos la da “La epopeya de Gilgamesh” (2500-2000 A. C.), narración acadia en verso que constituye la obra épica más antigua conocida, basada en las gestas del rey Gilgamesh, de la ciudad mesopotámica de Uruk, centrada en su desesperada búsqueda de la inmortalidad. Sin ir tan atrás en la historia, la búsqueda de la inmortalidad aún cautiva el imaginario colectivo, así, la primera escena de Piratas del Caribe en Mareas Misteriosas (Rob Marshall), narra la búsqueda de la fuente de la juventud que protagonizan los personajes, capitán Jack Sparrow y capitán Barbosa, basado en un supuesto libro escrito por el español Juan Ponce de León, primer europeo del que se tiene constancia en llegar a las costas de Florida. Se dice que fue allí en busca de la fuente de la Eterna Juventud. Y qué decir del éxito de JK Rowling con la saga “Harry Potter”, cuyo primer tomo está centrado precisamente en la búsqueda de la inmortalidad.

Sin embargo, hay organismos en la naturaleza, con vidas extraordinariamente largas e incluso algunos están considerados como casi inmortales, los cuales presentan una Senescencia Insignificante, término acuñado por el biogerontólogo Caleb Finch, para denotar organismos que no exhiben evidencia de envejecimiento biológico (senescencia), tales como reducción mensurable en su capacidad reproductiva, declive funcional mensurable o tasas de mortalidad crecientes con la edad (Finch, 1990, 1994, 2009).

En 2018, las ratas topo desnudas fueron identificadas como el primer mamífero en

desafiar la ley de mortalidad de Gompertz-Makeham, que establece que la tasa de mortalidad humana es la suma de un componente dependiente de la edad, que aumenta exponencialmente con la edad y un componente independiente de la edad, y alcanzar una senescencia insignificante (Ruby y col., 2018).

Algunos ejemplos de vida máxima observada de animales que se cree que son insignificamente senescentes son: el tiburón de Groenlandia (400 años), la almeja Quahog oceánica (507 años), la Tortuga gigante de Aldabra (255 años), el pez de roca de ojos ásperos (205 años), la Hydra, observada como biológicamente inmortal y la medusa inmortal o *Turritopsis dohrnii*, la cual es capaz de regresar a un estado larvario y volver a crecer hasta convertirse en adulto. Diversos estudios han indicado una conexión entre los fenómenos relacionados con la senescencia insignificante y la estabilidad general del genoma de un organismo durante su vida (Kogan y col., 2015; Guerin, 2004).

Los humanos no tenemos tanta suerte, como especie, ahora vivimos más que nunca, pero no mucho mejor, así que cuando pensamos en vivir hasta los 100 años la mayoría piensa: “no lo quiera Dios”, respiradores, cócteles de medicamentos, quimioterapia y radiación, cirugías y gastos médicos!

La mitad de las personas de 65 años tiene dos o más enfermedades crónicas, la persona promedio de 80 años padece unas 5 enfermedades distintas y toma una cantidad similar de medicamentos para tratarlas. El sistema inmunitario se debilita con la vejez y pierde su fuerza para combatir las infecciones, además de otros cambios embarazosos e inoportunos como incontinencia o impotencia.



Estamos acostumbrados a considerar cada elemento como una alteración independiente de las demás, el enfoque de la medicina es igualmente particular, con medicamentos y operaciones para cada una de las enfermedades, ignorando por completo el origen, que es el proceso de envejecimiento en sí.

La teoría de la evolución de Darwin está basada en el concepto que la variación, al azar y hereditable, de rasgos biológicos entre individuos, causada por mutaciones, conducirá a la selección natural por reproducción preferente de aquellos individuos que encajen particularmente en un ambiente dado. Por otro lado, el proceso de envejecimiento incrementa la vulnerabilidad y conduce al final a la muerte de los organismos. Las teorías evolucionistas del envejecimiento, por lo tanto, tratan de explicar la evolución biológica y la evolución del envejecimiento mediante la interrelación entre los procesos de mutación y de selección (Ljubuncic y Reznic, 2009).

Los gerontólogos definen el envejecimiento como un conjunto de cambios deteriorantes postmaduracionales, con pérdida progresiva de las funciones corporales y una disminución en la fertilidad. Estos procesos degenerativos, de comienzo temprano y progresión lenta, implican una

disminución en la habilidad del organismo para sobrevivir.

Un concepto actual del envejecimiento lo describe como: "una colección de daños acumulativos en la estructura molecular y celular del organismo adulto, resultado de los procesos metabólicos esenciales, que una vez que progresan demasiado, incrementan la desorganización del metabolismo, llevando a la patología y a la muerte" (De Grey, 2003a,b).

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Se han postulado varias teorías que explican el proceso del envejecimiento desde el punto de vista evolutivo (Kirkwood, 1977; Kirkwood y Austad, 2003). La primera de ellas es **La teoría de la mortalidad extrínseca**, que postula que la muerte natural no es producto de la vejez, sino de condiciones extrínsecas del ambiente. En las especies silvestres, el envejecimiento no es un proceso frecuente, dado que la predación, los accidentes naturales, las condiciones ambientales drásticas y las infecciones acaban con los individuos en edades tempranas. Cuando la longevidad de las especies escapa del control de la naturaleza, tal y como ocurre con una población protegida como la humana o los animales domésticos, la muerte se convierte en un proceso intrínseco que se relaciona con la vejez.

De los argumentos anteriores, nacen otras tres teorías del envejecimiento. (1) la teoría de la acumulación de mutaciones, (2) la hipótesis de antagonismo pleiotrópico y (3) la teoría del soma desechable.

La teoría de la acumulación de mutaciones se fundamenta en la observación

de que la fuerza de la selección natural declina con la edad. Se origina de las ideas de Peter Medawar (Medawar, 1952) y postula que son pocos los individuos que superan la etapa de la juventud en las poblaciones silvestres. La naturaleza invierte poco esfuerzo en mantener estos sobrevivientes, de modo que hay una disminución progresiva en la fuerza de la selección conforme aumenta la edad de un individuo. Desde que todos los organismos mueren eventualmente por diferentes causas, los genes beneficiosos en etapas tempranas de la vida, son favorecidos por la selección natural, consecuentemente, la mayor contribución para crear una nueva generación viene de los organismos jóvenes y no de los viejos, al envejecer, declina el poder de la selección natural, se acumulan gran cantidad de mutaciones en las líneas somáticas que van a tener efectos deletéreos que se manifiestan en las edades seniles (Charlesworth y col., 2000; Medawar, 2000; Kirkwood y Austad, 2003).

La teoría de la pleiotropía de George Williams (Williams, 1957), propone que hay genes que son seleccionados por la naturaleza por sus efectos positivos en la vida joven, pero que van a resultar deletéreos en etapas posteriores de la vida. Los genes con efectos opuestos según la edad son llamados genes pleiotrópicos. Tales genes se mantendrán en la población debido a sus efectos positivos en la reproducción a edades tempranas, a pesar de sus efectos negativos en edades post-reproductivas, con efectos negativos que se corresponden a los procesos de envejecimiento.

Un ejemplo de pleiotropía antagónica lo tenemos en la senescencia celular replicativa, la cual suprime la tumorigénesis deteniendo el crecimiento celular en etapas tempranas de la vida, pero que puede

promover el cáncer en etapas tardías ya que las células senescentes estimulan a otras células premalignas a proliferar y formar tumores (Krtolica y col., 2001; Cutler y Semsei, 1989).

La teoría del soma desechable se basa en el reparto óptimo de las funciones metabólicas entre el mantenimiento somático y la reproducción. El organismo invierte su energía en un adecuado mantenimiento somático hasta que el individuo se reproduce, por lo que, a partir de este momento, los mecanismos de reparación y metabolismo celular se vuelven limitados, el organismo se considera desechable y comienza el proceso de envejecimiento. Luego de la etapa reproductiva, no hay ventaja selectiva en mantener las células somáticas en perfecto estado. La longevidad dependería, entonces, de la capacidad de mantener la calidad de las células somáticas intacta (Hasty y Vijg, 2002).

El envejecimiento afecta a todos los aspectos de la biología, desde las moléculas, pasando por las células, los tejidos y los órganos. A medida que envejecemos, el cuerpo acumula cambios, desde los superficiales -canas y arrugas- hasta otros más serios como debilidad, pérdida de memoria y riesgo de enfermedades mortales como cáncer, cardiopatías, derrames cerebrales etc.

Desde hace dos o tres décadas, sin embargo, el paradigma de las enfermedades y el envejecimiento viene cambiando de un modo radical, no envejecemos porque empezamos a sufrir múltiples achaques, sino que enfermamos porque envejecemos. Hoy en día se considera al ENVEJECIMIENTO, como el **factor de riesgo principal** para el desarrollo de múltiples enfermedades crónicas (Tchkonia y col., 2013; Tchkonia y Kirkland, 2018).

La Hipótesis de la GEROCIENCIA, postula que los mecanismos fundamentales del envejecimiento son la "RAIZ" de procesos interligados tales como: inflamación de bajo grado que conduce a fibrosis, disfunciones macromoleculares, disfunción de células inmunes y progenitoras y la senescencia celular (Kirkland y Tchkonja, 2020).

Mientras que, en la primera mitad del siglo XX, el aumento de la esperanza de vida fue impulsado principalmente por la reducción de la mortalidad infantil y de adultos jóvenes, más recientemente, los mayores avances se han hecho en la lucha contra las enfermedades posteriores de la vida. Como consecuencia, los problemas de salud crónicos asociados al envejecimiento, como la sarcopenia, la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer, que antes eran raros, se han vuelto ahora comunes. A medida que la población mundial siga envejeciendo durante los próximos decenios, las enfermedades del envejecimiento amenazan con abrumar a nuestra infraestructura de salud, perturbar nuestra economía y, potencialmente, envenenar la relación entre generaciones (Steele, 2022).

No es de extrañar por lo tanto, que inversores de todo el mundo, entre ellos Google, hayan fundado en 2013, CALICO (*California Life Company*), compañía de biotecnología de investigación y desarrollo con el objetivo de combatir el envejecimiento y las enfermedades asociadas. En la Carta de Fundadores de 2013 de Google, se describe a CALICO como una compañía enfocada en "salud, bienestar y longevidad".

Del mismo modo, la familia real SAUDÍ, ha lanzado una ONG llamada Fundación Hevolution que proyecta gastar hasta US\$ 1.000 millones al año de su riqueza

petrolera para sostener investigación básica en la biología del envejecimiento y buscar maneras de extender los años de vida con buena salud, un concepto conocido como "el alcance de la salud". Esa inversión convertiría a los sauditas en los más grandes patrocinadores de la investigación que busca entender las causas básicas del envejecimiento, y cómo demorarlo con drogas.

Altos Labs: Creada a principios de 2021, está reuniendo a un auténtico "*Dream Team*" que incluye un equipo de científicos de primer nivel, especializados en esta área y donde se les ha ofrecido sueldos de más de 1 millón de dólares para que acepten trabajar, para conseguir un propósito de lo más ambicioso: revertir el envejecimiento celular. Ha pasado poco tiempo desde su puesta en marcha, pero ya hay una enorme ronda de financiación de 3.000 millones de dólares para intentar revolucionar la biotecnología y lograr la reprogramación celular. El sueño de la vida eterna todavía queda lejos, pero Altos Labs es uno de los intentos más serios hasta la fecha para acercarnos a ello. La página Web de Altos Labs, la define como "una nueva compañía biotecnológica, enfocada en la programación del rejuvenecimiento celular con el fin de restaurar la salud y la resiliencia celular, con el objetivo de revertir la enfermedad y transformar la medicina".

Curar el envejecimiento no significa vivir para siempre, pero supondría una reducción del sufrimiento. Así, el lector interesado puede disfrutar hoy en día de una copiosa literatura al respecto, podemos citar como ejemplos: Morir Joven a los 140 años. La muerte de la muerte. Eternos. Alarga tu esperanza de vida. La solución de los telómeros, Autofagia, entre muchos otros.

Pero, ¿cuánto podemos vivir?

La comunidad judía felicita los cumpleaños con la frase: “*ads mea veesrim*” (hasta los 120 años). Esto está basado en la supuesta longevidad de Moisés, quien llegó a Egipto a los 80 años para liberar al pueblo judío y quien después de vagar por el desierto durante 40 años, no entró en la tierra prometida, pues “se le había terminado su tiempo”. **Curiosamente, esto coincide con nuestro tiempo estimado de vida.**



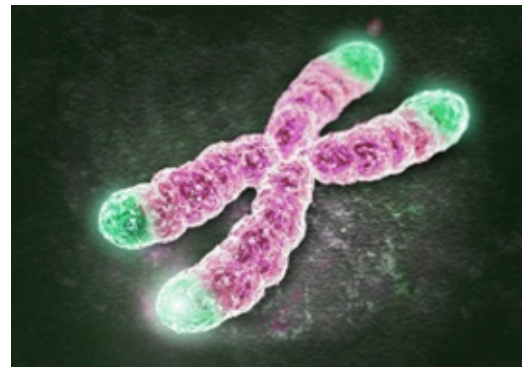
Juan Vicente Pérez Mora es un agricultor y campesino venezolano, que en 2022 se convirtió en el hombre más anciano del mundo, reconocido por *Latin American Supercentenarians* (LAS) y por el Libro Guinness de los récords. A sus 114 años, Juan Vicente Pérez ha visto de todo. Este venezolano es en la actualidad **el hombre más longevo del mundo**, con 11 hijos, 12 tataranietos, 18 bisnietos y 41 nietos, asegura su médico, goza de una excelente salud. Su secreto: una copa de aguardiente al día.

Sin embargo, Juan Vicente ostenta este récord entre los hombres, ya que entre las mujeres hay cuatro que alcanzan los 116 años, como la española María Branyas Morera y eso porque el 19 de abril del 2022 falleció la nipona Kane Tanaka, que era considerada la persona **más longeva** del

mundo hasta ese momento, con 119 años y 108 días. Y tampoco ostenta ninguno el récord de longevidad, que hasta ahora está en poder de la francesa Jeanne Calment, quien vivió 122 años y 164 días.

¿Que determina nuestro tiempo estimado de vida?

Cada cromosoma humano está formado por una cadena lineal de miles o millones de nucleótidos. En cada extremo de esta cadena aparece una **secuencia repetitiva de nucleótidos** que son las conocidas como telómeros.



1. TELÓMEROS Y TELOMERASA

Los telómeros fueron descritos por primera vez en 1930 por Hermann Müller y Barbara McClintock quienes observaron en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y en maíz (*Zea mays*), respectivamente, que los extremos del cromosoma natural tenían propiedades y estructuras especiales que desempeñaban una función esencial en su protección. Müller, acuñó en el año 1938 el término telómero para referirse a la parte terminal, que, a manera de casquete protector ubicado en los extremos de los cromosomas, impedía que estos sufrieran daño al ser irradiados con rayos X, en experimentos realizados en células de la mosca de la fruta. Müller recibiría el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1946 (Müller, 1938).

Más tarde, Bárbara McClintock, investigadora de la Universidad de Misuri, trabajó en los veranos de 1931 y 1932, con el genetista Lewis Stadler, que le aportó el uso de rayos X como agente mutágeno (Stadler y Roman, 1948). Empleando así, líneas de maíz mutagenizadas, identificó los cromosomas en anillo, que son estructuras de ácido desoxirribonucleico (ADN) circulares generadas por la fusión de los extremos de un único cromosoma irradiado (McClintock, 1941, 1950; Chuaire, 2006).

Analizando este resultado, McClintock hipotetizó que debía existir una estructura en los extremos de los cromosomas que los estabilizaran y demostró que, a pesar del daño al cromosoma, los extremos se podían restaurar gracias a la adquisición de nuevo telómero, concluyendo que estos jugaban un papel crucial en la integridad de los cromosomas. Muchos años después, McClintock recibiría el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1983 (Perea y Buzzi, 2018; Lama, 2020).

No fue sino hasta 30 años después, cuando comenzaron a ser desvelados los mecanismos subyacentes a la replicación del ADN, donde el trabajo de James Watson, el mismo que describió la estructura doble helicoidal del ADN, revistió una singular importancia. Watson identificó el «**problema de la replicación terminal**», consistente en la incapacidad de las células para copiar por completo los extremos del ADN lineal. Propuso además la existencia de un mecanismo de protección para prevenir el acortamiento cromosómico (Watson, 1972; Blackburn y Epel, 2017).

En la misma época, Alexsei Olovnikov, un científico ruso de la era soviética decidió comprobar si en las células humanas

los cromosomas se acortaban con el paso del tiempo, comprobando que la mayoría de las células somáticas normales que examinó perdía segmentos de sus telómeros a medida que se dividían en el cultivo. Paralelamente se encontró que los telómeros de algunos tejidos humanos normales se acortaban conforme la gente envejecía (Olovnikov, 1971; Epel y Blackburn, 2017).

La palabra telómero proviene del griego τέλος [telos] (final), y μέρος [meros] (parte). Son complejos especializados de ADN-proteína que se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales y los protegen de la degradación y pérdida de genes esenciales. Los telómeros son típicos de células eucariotas, que tienen cromosomas lineales, pero la mayoría de las procariotas, como las bacterias, tienen cromosomas circulares y no tienen telómeros.

Los telómeros consisten en repeticiones de nucleótidos en número variable, unidas a un complejo multi-proteico denominado shelterina/telosoma. Los telómeros terminales son secuencias de ADN no codificante, que en el ser humano y el resto de los vertebrados consisten mayoritariamente en la repetición de una secuencia muy simple, la secuencia TTAGGG, suelen terminar en hebras sencillas de ADN enrolladas en los llamados bucles T, que estabilizan y cierran el telómero. Los telómeros funcionales previenen que la maquinaria de reparación del ADN reconozca la parte terminal del cromosoma como una ruptura de la doble hélice de ADN, a la cual las células responden rápidamente e intentan reparar (Steele, 2022; Cascales y Álvarez, 2010).

La replicación de los telómeros presenta un dilema especial denominado «problema

de la replicación terminal». En el proceso de la división celular, los telómeros de las células somáticas normales no pueden replicarse en su totalidad por el complejo convencional ADN polimerasa y esto se debe a la diferencia en la replicación de las dos cadenas del ADN (Cascales y Álvarez, 2010). Cada vez que una célula se divide, se pierde una pequeña cantidad de ADN del final del cromosoma. Cuando se pierde algo de los telómeros al duplicarse el ADN durante la división celular no sucede nada terrible, pero a medida que las células se dividen repetidamente y que la longitud de los telómeros disminuye, nos acercamos peligrosamente al ADN codificante (Steele, 2022).

¿Podría el encogimiento de los telómeros y la merma de capacidad proliferativa a lo largo del tiempo ser una causa del envejecimiento humano? Probablemente sí. Para Olovnikov (1971), el problema de la replicación terminal era la causa del acortamiento progresivo de los telómeros que, a su vez, actuaba como un reloj interno para determinar el número de divisiones que la célula podía experimentar a lo largo de su existencia y, por ende, para controlar el proceso de envejecimiento.

El modelo propuesto demostró tener una impresionante exactitud; en la actualidad se acepta no sólo que el acortamiento telomérico es la principal causa de la senescencia celular, sino que en realidad el reloj molecular cuenta el número de ciclos que la célula puede soportar.

Los telómeros cortos han sido asociados a enfermedades como diabetes, enfermedades cardíacas, algunos tipos de cáncer, alteración de la función inmunitaria y problemas pulmonares. Sin ir más lejos, el acortamiento de los telómeros es el

causante de nuestras canas. Las células madre de los folículos pilosos se diferencian en melanocitos, que liberan melanina, responsable del color. Con telómeros cortos en las células madre no se produce más diferenciación en melanocitos, por lo que no hay más melanina y el cabello recupera su color natural que es el blanco puro (Steele, 2022).

En la mayoría de las células somáticas derivadas de tejidos normales, la pérdida de la capacidad replicativa, que conlleva la senescencia celular, se debe a este acortamiento de los telómeros asociado con la ausencia de actividad telomerasa. Los telómeros y la telomerasa presentan un gran interés a la hora de encontrar explicación, no solo a los cambios relacionados con el envejecimiento, sino también a los relativos a la tumorigénesis (Lansdorp, 2022).

Para solucionar este problema la mayoría de las células eucariotas utilizan la telomerasa, que actúa alargando los extremos de los cromosomas con una secuencia telomérica específica. La actividad de la telomerasa fue descubierta en el ciliado *Tetrahymena*, por Greider y Blackburn (1985), quienes denominaron su actividad como "transferasa de los telómeros terminales" debido a su capacidad para alargar los "primers" teloméricos en ausencia de un molde de ADN. Pronto se demostró que la telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la síntesis de novo de ADN telomérico repetitivo después de la división celular y mantiene la estabilidad cromosómica, lo que lleva a la inmortalización celular. La telomerasa utiliza un componente de ácido ribonucleico (ARN) como molde, y por lo tanto posee actividad de transcriptasa reversa (Greider y Blackburn, 1985, 1987, 1989; Cascales y Álvarez, 2010; Chuaire, 2006).

La telomerasa es el principal regulador de la longitud de los telómeros en las células de mamíferos. La mayoría de las células somáticas no poseen suficiente telomerasa y ocurre un desgaste de los telómeros, acoplado a la división celular (Harley y col., 1990). En modelos de ratones con déficit de telomerasa, se han observado finales de cromosomas carentes de terminales TTAGGG, fusiones de finales de cromosomas y pérdida de la viabilidad celular. La reintroducción de la telomerasa previene el acortamiento de los telómeros tanto en cultivos celulares como en el ratón deficiente de telomerasa (Blasco y col., 1995, 1996, 1997, 2002).

Entonces, ¿es factible rejuvenecer, o al menos ralentizar el envejecimiento reintroduciendo la telomerasa en nuestros tejidos? Como se ha mencionado, la reintroducción de telomerasa puede reelargar los telómeros cortos en el ratón deficiente en telomerasa, así como prevenir el fenotipo prematuro del envejecimiento (Sampery col., 2001), abriendo la posibilidad de una terapia génica para síndromes de envejecimiento prematuro, caracterizados por la rápida pérdida de telómeros, como la Dyskeratosis congénita (Collins y Mitchell, 2002). De manera similar, se encontró que la inducción de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT (*Human Telomerase Reverse Transcriptase*, hTERT), era capaz de revertir el deterioro funcional del envejecimiento en la tercera generación de un ratón mutante y que la utilización de hTERT como terapia génica en un ratón viejo retrasaba el envejecimiento y prolongaba el tiempo de vida (Bernardes de Jesús y col., 2011; Bernardes de Jesús y Blasco, 2013).

Aunque el cáncer y el envejecimiento han sido estudiados como enfermedades

independientes, evidencia creciente sugiere que el cáncer es una enfermedad asociada a la edad y que ambas entidades comparten muchas vías moleculares. En particular, los estudios antes mencionados validan la activación de la telomerasa como un blanco terapéutico potencial para las enfermedades relacionadas con la edad, y al mismo tiempo, una expresión anormal de la telomerasa, así como mutaciones en la misma, han sido asociadas con diferentes tipos de tumores en humanos (Bernardes de Jesús y Blasco, 2013).

Así, la telomerasa puede actuar como una especie de Dr. Jekyll y Mr. Hyde. Sabemos que el acortamiento de los telómeros es un proceso clave en el desarrollo del envejecimiento, pero también actúa como una barrera en la progresión de tumores (Bernardes de Jesús y col., 2012; Bernardes de Jesús y Blasco, 2013).

La disfunción de los telómeros y la activación de la telomerasa han sido implicados en la progresión del cáncer humano. Se detecta un alto nivel de actividad telomerasa (AT) en aproximadamente el 90% de las muestras de cáncer humano, mientras que la mayoría de las células somáticas no muestran AT o la expresan solo en niveles muy bajos de una manera dependiente del ciclo celular. La sobreexpresión de telomerasa puede estabilizar los telómeros en células humanas normales y extender su vida replicativa al menos 20 veces. Por el contrario, la inhibición de AT en las células cancerosas conduce a una reducción de la longitud de los telómeros y a la muerte de las células tumorales. Estos hallazgos establecen un papel importante del mantenimiento de los telómeros mediado por la telomerasa en células humanas y sugieren que la regulación positiva de la telomerasa puede contribuir

activamente a la inmortalización celular y la carcinogénesis (Zhang y col., 2012)

Las células embrionarias y las células madre pluripotenciales son "inmortales" a efectos prácticos, ya que la pérdida de las repeticiones teloméricas está completamente compensada. En estas células, la expresión de telomerasa mantiene la longitud de los telómeros a fin de permitir su proliferación ilimitada. Sin embargo, los niveles de telomerasa en células somáticas están regulados hacia abajo tras la diferenciación por mecanismos que incluyen el silenciamiento transcripcional y el splicing alternativo del gen de la transcriptasa reversa, el hTERT. Al limitar los niveles de telomerasa, la mayoría de las células somáticas muestran un acortamiento progresivo de los telómeros, esto proporciona una ventaja selectiva que permite un alargamiento del tiempo de vida, disminuyendo el riesgo de transformaciones malignas. Esto tiene efectos pleiotrópicos deletéreos, ya que la limitación de la renovación celular, impuesta por la pérdida progresiva de telómeros, provoca respuestas inmunes deficientes, y la acumulación de células senescentes que contribuyen al envejecimiento.

Una excepción son las células cancerígenas, en las que sí está activa la telomerasa, y esa es de hecho una de las razones de que estas células se dividan sin parar: sus telómeros no se acortan nunca lo bastante como para frenar la división, y como resultado las células de cáncer son virtualmente inmortales (Lansdorp, 2022).

Ahora bien, los datos que poseemos provienen de modelos animales manipulados genéticamente, pero ¿qué pasa con los humanos? ¿es posible "administrar" telomerasa? La respuesta

es NO, esta estrategia no es aplicable a humanos, porque implicaría modificar el genoma desde la fase embrionaria. Lo que sí es potencialmente aplicable a humanos es la terapia génica que activa la telomerasa allí donde se desea, tras una única inyección local.

El potencial uso médico de la telomerasa siempre se ha enfrentado al miedo a un posible aumento del riesgo de cáncer. Grupos de trabajo como los Investigadores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), del Laboratorio Telómeros y Telomerasa, liderados por María Blasco, diseñaron en el 2012 una estrategia del todo innovadora: una terapia génica que reactiva el gen de la telomerasa solo durante unas pocas divisiones celulares usando los llamados vectores adeno-asociados (AAV). La enzima ejerce así su función reparadora únicamente durante un tiempo limitado y, de este modo, los riesgos asociados, la activación de la telomerasa en todo el organismo, se minimizan (Muñoz-Lorente y col., 2018). Los virus adenoasociados (AAV) son virus de ADN monocatenarios sin envoltura que se reproducen solo en presencia de un virus auxiliar (ya sea un adenovirus o un herpesvirus) (Daya y Berns, 2008).

Posteriormente se aplicó esta terapia génica sobre un animal modelo, un ratón, que reproduce el cáncer de pulmón humano y que, por tanto, tiene un riesgo ya de por sí mayor de desarrollar esta enfermedad. Los resultados fueron negativos: "La activación de la telomerasa mediante esta terapia génica no aumenta el riesgo de padecer cáncer" ni siquiera en estos ratones. Este grupo, ha mostrado también resultados prometedores en ratones con fibrosis pulmonar debido a la edad (Piñeiro-Hermida y col., 2020).



La mujer de la imagen es Elizabeth Parrish (Liz Parrish), quien tiene 52 años y dice tener una edad biológica de la mitad. Es el resultado de haberse sometido a la terapia génica basada en la telomerasa, enzima de las células que las ayuda a mantenerse vivas. El tratamiento lo ha desarrollado la misma compañía biotecnológica que dirige y fundó Parrish, *BioViva Science*, de la que puede decirse que es juez y parte después de haberse proclamado “paciente cero” de un tratamiento con el que la comunidad científica no acaba de comulgar. Y esa es la aventura a la que ha dedicado, literalmente, su vida puesto que ella es, en sus propias palabras, “conejillo de indias” de un nuevo tratamiento genético que no está aprobado en Estados Unidos aún, por lo que se tiene que desplazar a Colombia para llevarlo a cabo.

A la espera de que este tipo de terapia génica se apruebe y extienda, la posible activación de la telomerasa para retrasar enfermedades asociadas al envejecimiento ha extendido el interés de muchas empresas comerciales. En este contexto, el TA-65 (compuesto aislado de la raíz de *Astragalus membranaceus*), un débil potenciador de la actividad de la telomerasa ha probado llevar a un leve incremento de la longitud de los telómeros en ratones, pinzones

cebra y humanos, así como mejorar algunos parámetros relacionados con el envejecimiento, aunque no se ha reportado un incremento de la longevidad en estudios realizados en ratones (Bernardes de Jesús y col., 2011),

Aparte del TA-65, otros activadores de la telomerasa propuestos han sido el cicloastragenol (CAG) (Yu y col., 2018), una saponina triterpenoide obtenida de la hidrólisis del Astragalósido IV, el componente principal del *Astragalus membranaceus* y una formulación de extracto de *Centella asiática* (08AGTLF), todos ensayados en célula mononucleares periféricas humanas (Tsoukalas y col., 2019).

Es posible que una terapia segura basada en la activación de la telomerasa se pueda llevar próximamente a la clínica tanto para el tratamiento de enfermedades que actualmente no tienen curación, como para combatir los signos del envejecimiento.

2. SENESCENCIA CELULAR

La división celular es el proceso que hace que una célula dé lugar a dos hijas idénticas. Esta es la base de la proliferación celular. La senescencia consiste en la incapacidad de llevar a cabo este ciclo.

Durante muchos años, uno de los paradigmas de la biología celular fue que las células cultivadas *in vitro* podían vivir y duplicarse de manera ilimitada, siempre y cuando se suplementaran con los medios y nutrientes adecuados, esto cambió en la década de 1960, cuando Hayflick y Moorhead (1961) demostraron que las células en cultivo primario sólo tenían un número limitado de duplicaciones y no podían proliferar indefinidamente.

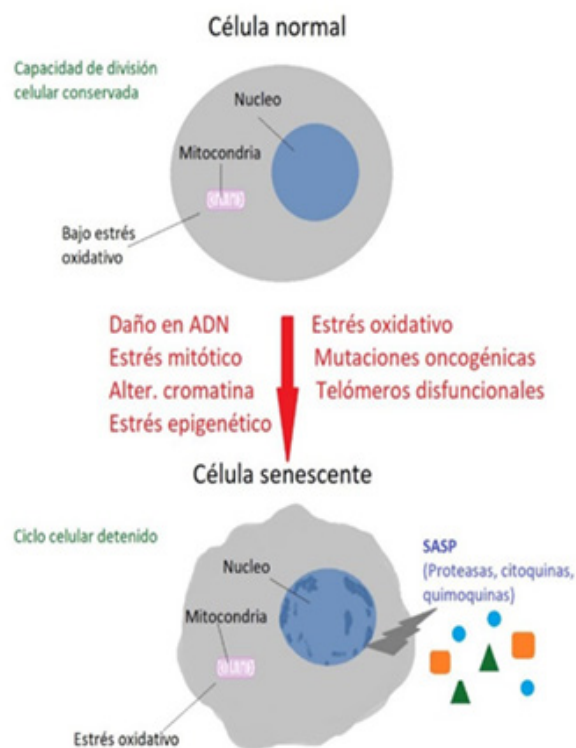
Cuando un cultivo primario cesa su proliferación celular (senescencia replicativa [SR]), se dice que ha alcanzado el límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1965), es un fenómeno que ocurre principalmente *in vitro* y es una consecuencia del acortamiento de los telómeros después de repetidas divisiones celulares (González-Puertos y col., 2015a,b; Maciel-Barón y col., 2017, 2018). Cada vez que una célula se divide, se pierden alrededor de 100 bases de ADN, por ejemplo, un glóbulo blanco joven en un recién nacido puede tener telómeros de 10.000 bases de longitud (unos 1700 TTAGG). A los 35 años se reducirá a 7500 bases y a los 70, el telómero promedio podría tener menos de 5.000 bases (Steele, 2022).

La senescencia replicativa no es sinónimo de muerte celular. Las células senescentes no mueren inmediatamente, la mayoría de ellas permanece viable y metabólicamente activas durante largos períodos en cultivo (Campisi, 1996).

Sin embargo, la senescencia celular no es un proceso exclusivo de las células en cultivo, el grupo de Judith Campisi en 1995, demostró la presencia de células senescentes *in vivo*, así, la senescencia no sólo sucede durante el envejecimiento, sino que ocurre de manera natural y durante toda la vida de los organismos (Campisi, 1996; Dimri y col., 1995; Rodier y Campisi, 2011)

Cuando los telómeros empiezan a ser demasiado cortos, la célula ha llegado al máximo de su capacidad proliferativa y envía señales de alerta que impiden que se siga dividiendo, deteniéndose de modo irreversible en la fase G0/G1 del ciclo celular (Blackburn, 2001).

En palabras del divulgador científico Andrew Steele, el final más hermoso de la vida de una célula es el proceso de apoptosis o muerte celular programada. Un conjunto de controles y equilibrios moleculares está siempre atento a cómo se comporta una célula y si algo va mal, inicia una sucesión de fenómenos autodestructivos minuciosamente orquestados. De hecho, casi todas las células frágiles se sacrifican por el cuerpo y mueren en el momento justo, pero hay otras células que no: se quedan, ya no se dividen y son células zombis envejecidas que se niegan a cometer el suicidio que deberían convirtiéndose en células senescentes (Steele, 2022).



Tomado de: <https://www.doctorfuster.com/reduciendo-las-celulas-senescentes-en-humanos/>

Las células senescentes muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, alteraciones morfológicas, como un aumento del tamaño con aspecto aplanado y una gran cantidad de vacuolas, la presencia de daño

o “cicatrices” en el ADN, y presencia de cambios en la heterocromatina (Rodier y Campisi, 2011). A nivel fisiológico, se ha demostrado que son metabólicamente activas, pero presentan una expresión génica perturbada, lo cual conlleva una alteración en la expresión de proteínas, asociada a los cambios morfológicos antes descritos, junto con la carencia de respuesta a estímulos mitogénicos y/o apoptóticos (Muller, 2009).

La senescencia celular es un fenómeno que tradicionalmente se ha caracterizado por la detención de la proliferación de células postmitóticas como respuesta a algún tipo de daño (González-Puertos y col., 2015 a,b; Maciel-Barón y col., 2017), el acortamiento de los telómeros es el principal de ellos, no obstante, estudios posteriores demostraron otras vías iniciadas por estímulos o estresores por las cuales las células pueden entrar en senescencia y dejar de proliferar, independientemente del número de duplicaciones. En conjunto, a este tipo de senescencia se le conoce como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS por sus siglas en inglés: stress-induced premature senescence) (Toussaint y col., 2000); entre los estresores más estudiados que inducen senescencia prematura se encuentran el estrés oxidativo, exposición a radiación UV, deterioro de la autofagia, inhibición del proteosoma, daños al ADN, disfunción mitocondrial, y señales nutricionales, entre otros (Torres y col., 2006; Maciel-Barón y col., 2017; González-Puertos y col., 2015 a,b). Además, la sobreexpresión de algunos oncogenes puede inducir también senescencia prematura, conocida como senescencia inducida por activación de oncogenes (Serrano, 2017; Serrano y col., 1997; Maciel-Barón y col., 2017).

Así, en presencia de estos daños, especialmente daños al ADN y mutaciones acumulativas que ponen a la célula en riesgo de volverse cancerosa, la senescencia pone freno, por lo tanto, la senescencia celular existe como mecanismo anticancerígeno, dado que el cáncer está causado por células que se dividen sin control, convertir a una célula pre-cancerígena en senescente, que ya no se divide, es una forma segura de evitar que se convierta en tumor (Steele, 2022).

Una característica peculiar de las células senescentes es que aumentan la expresión de la enzima β -galactosidasa, y, aunque aún no se sabe a ciencia cierta la razón por la cual ocurre este evento, la actividad de dicha enzima se utiliza como marcador del estado senescente y, muy importante, de la secreción de un complejo patrón de citocinas y otras moléculas, conocido como SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Funayama e Ishikawa, 2007; Maciel-Barón y col., 2017).

El SASP se caracteriza por un incremento en la secreción de numerosos factores involucrados en diferentes vías de señalización intracelular (González-Puertos y col., 2015 a,b). El SASP incluye familias de factores solubles e insolubles que modulan las células circundantes, ya que activan receptores de superficie de membrana y su correspondiente vía de transducción de señales, y pueden conducir a múltiples enfermedades. Los factores pueden dividirse en dos categorías principales: factores de señalización solubles o proteínicos, como las interleucinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas, y componentes insolubles o no proteínicos como las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Coppé y col., 2010; González-Puertos y col., 2015 a,b).

Las células senescentes son metabólicamente activas, aunque no cumplen la función de una célula nueva y funcional, por lo que deben pedir ayuda, esas moléculas inflamatorias alertan al sistema inmune de su presencia a fin de ser eliminadas, pero, si la célula sobrevive y sigue segregando SASP, puede acelerar el envejecimiento en todo el cuerpo (Steele, 2022).

La inflamación y el envejecimiento prematuro del sistema inmunológico son dos fenómenos relacionados y peligrosos para la salud. Esta conexión se ha condensado en el término *inflammaging* o envejecimiento inflamatorio, término acuñado en la década de 2000 por el inmunólogo Dr. Claudio Franceschi, de la Universidad de Bolonia, para describir una condición del organismo, afectado por una inflamación leve, persistente, que no presenta síntomas visibles (latentes), pero que es capaz de producir efectos sistémicos. Esta "inflamación crónica de bajo grado" es un factor predominante, recurrente, crónico y silencioso que no se activa como consecuencia de una agresión externa para defender al organismo, sino que se autoalimenta debido al agotamiento del sistema inmunológico que provoca la producción crónica de moléculas como las citocinas proinflamatorias, que se relaciona con el proceso del envejecimiento. Estos efectos sistémicos tienen consecuencias en la salud y afectan a todas las partes del cuerpo, desde el sistema inmunológico hasta la piel, hasta el punto de ser considerados por muchos investigadores como responsables de una amplia gama de enfermedades crónico-degenerativas. De hecho, la inflamación crónica de bajo grado se considera un precursor de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, neoplasias,

enfermedades cerebrales, enfermedades hepáticas, la disminución progresiva de la masa y fuerza muscular conocida como sarcopenia, entre otros, correlacionando el papel que juega la inflamación en el deterioro y las enfermedades asociadas a la vejez, con el síndrome de fragilidad (Franceschi y col., 2000; Chung y col., 2009).

De manera interesante, entre los principales marcadores de inflamación asociados con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la depresión, la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, la artritis, la osteoporosis y la insuficiencia renal, entre otras, se encuentran varios de los componentes del SASP, entre los que destacan los niveles elevados de IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como otras quimiocinas y citocinas.

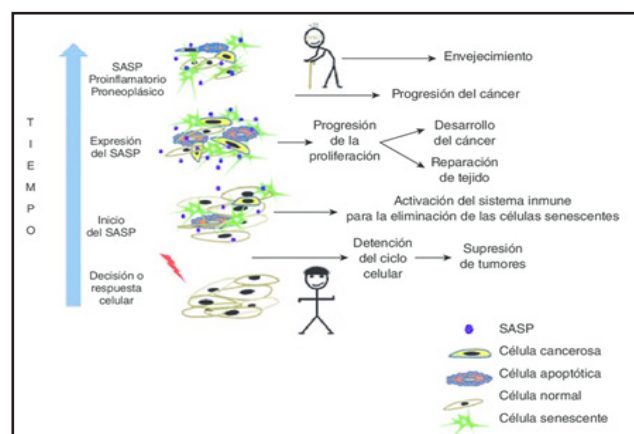
Andrew Steele destaca, que las células vigilan sus telómeros por razones distintas a la disminución en longitud, los telómeros son muy susceptibles al daño del ADN y cada vez hay más indicios de que actúan como el canario de las minas de carbón. Si hay daño en los telómeros, podría haber daño en el resto del ADN. Esto es importante en células que no se dividen o se dividen poco en órganos como el cerebro y el corazón por lo que sus telómeros no se acortan por división celular, pero si el daño se acumula gradualmente puede tener efectos similares, ya no cumplen las funciones de una célula nueva y funcional y deben pedir ayuda segregando moléculas inflamatorias que alerten al sistema inmune de su presencia pidiendo ser eliminadas.

A pesar de los efectos dañinos del SASP que contribuyen a las enfermedades durante el envejecimiento, nuevos hallazgos sugieren que el envejecimiento es un factor

de riesgo modificable, y que es viable retrasar las enfermedades relacionadas con la edad mediante la modulación de los mecanismos fundamentales de este proceso. Hasta ahora se han generado modelos de ratones modificados genéticamente que permiten diseccionar la relación causal entre la senescencia celular, el SASP y las enfermedades relacionadas con la edad, como las cardiovasculares y la diabetes (González-Puertos y col., 2015 a,b). Por ejemplo, en estudios realizados con ratones modificados genéticamente se diseñó una estrategia para eliminar específicamente las células senescentes positivas a p16INK4a, y se encontró que, al eliminar las células senescentes del tejido adiposo, musculoesquelético y del ojo se retrasaba el fenotipo de las enfermedades relacionadas con la edad (Baker y col., 2011).

Así, en mamíferos, la senescencia juega un papel de gran importancia en el mantenimiento de la funcionalidad de los tejidos, especialmente como supresora de tumores, ya que limita la proliferación de células dañadas que tienen un riesgo potencial de transformación neoplásica (Campisi y col., 2007; Campisi, 2013; Funayama e Ishikawa, 2007) aunque también puede contribuir al fenotipo envejecido. Esta aparente contradicción puede ser explicada mediante el antagonismo pleiotrópico, ya mencionado, que establece que ciertos procesos que se han seleccionado por sus efectos benéficos en edades tempranas presentan efectos dañinos en edades avanzadas. Resulta claro entonces el papel multifuncional y pleiotrópico del SASP, que en gran medida dependerá del tipo celular que lo reciba y del estado en el que se encuentre, de modo que, dependiendo del contexto biológico, el SASP puede

ser benéfico, al participar en procesos de reparación y regeneración, o perjudicial, por promover enfermedades degenerativas e hiperplásicas (González-Puertos y col., 2015 a,b).



Transformación del SASP a través del tiempo. En una primera etapa las células dañadas o sometidas a ciertos tipos de estrés presentan una detención del ciclo celular que se refleja como un evento supresor de tumores, ya que impide la proliferación de las células dañadas. No obstante, las células senescentes secretan diversas moléculas, como citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas, etc., que juntas se conocen como SASP. El SASP, además de ser un evento autocrino de perpetuación del fenotipo senescente, también atrae a células inmunitarias que destruyen las células senescentes. Sin embargo, si no se remueven dichas células, algunos componentes del SASP pueden promover la proliferación celular, ya sea para la reparación de tejidos o para el desarrollo de cáncer. Una manifestación tardía del SASP es la expresión de proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria crónica, por lo que la acumulación de las células senescentes con niveles crónicos del SASP podría influir en la salud de los organismos generando un fenotipo de envejecimiento y fomentando diversas enfermedades.

Tomado de González-Puertos y col., 2015 a,b

Esto se advierte pocas veces en poblaciones silvestres debido al bajo índice de individuos que llegan a edad avanzada, pero es común observarlo en los humanos (Kirkwood y Austad, 2000).

Se considera que la senescencia celular es más importante que otras formas de muerte celular en la supresión de tumores en mamíferos. Por ejemplo, ratones con una apoptosis defectuosa no están

marcadamente predispuestos a neoplasias, mientras que perturbaciones, incluso sutiles en la maquinaria senescente, influencia dramáticamente la susceptibilidad al cáncer (Lecot y col., 2016).

Muchos estudios han demostrado que las células senescentes se acumulan en diversas patologías humanas escapando de los mecanismos de muerte programada y dañando los tejidos. Se han relacionado con la fibrosis pulmonar, renal y hepática, la arterioesclerosis y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, hasta hace poco no existían terapias para reducir la acumulación de estas células nocivas que se produce con la edad y provocan enfermedades crónicas. En modelos animales de ratones, se ha observado que, eliminando estas células senescentes se prolonga la vida y mejora la salud a pesar de la edad cronológica. Es decir, se consigue **augmentar la vida en ausencia de enfermedad**. Para eliminar estas células se pueden usar diferentes estrategias, como modificar genes suicidas celulares, pero son procesos complejos solo utilizables en modelos experimentales.

Recientemente se han obtenido fármacos que pueden realizar la misma función, lo que abre un campo muy prometedor y que podría tener un gran impacto especialmente en la calidad de vida de las personas de edad avanzada, retrasando la aparición de enfermedades crónicas. Así, la “**senoterapéutica**” toma gran relevancia para atacar las enfermedades asociadas a la edad. La senoterapéutica incluye drogas que eliminan de modo selectivo las células senescentes, denominados “**senolíticos**”; drogas que eliminan el SASP conocidas como “**senomórficos**” y terapias no farmacológicas (Huang y col., 2022; Guo y col., 2022).

Los senolíticos son compuestos que favorecen la apoptosis, es decir, la muerte celular programada, y convencen a las células zombi de que descansen en paz, pero sin afectar a las células sanas. Lo sorprendente es que, aunque la ciencia de las células senescentes es reciente, hay compuestos senolíticos con una larga historia: en su mayoría, son poderosos antioxidantes derivados de las plantas, tales como el resveratrol, el cual ha mostrado actividad anti SASP (Menicacci y col., 2017).

Un estudio realizado en 2011 con ratones modificados genéticamente fue el primer paso para demostrar que, la eliminación de células senescentes en un animal alivia la carga de las enfermedades y de las disfunciones asociadas a la edad (Kirkland y Tchkonja, 2020). Los autores hipotetizaron que las células senescentes dependen de vías antiapoptóticas, y pro-supervivencia a fin de evitar la auto destrucción. El análisis de bases de datos de proteómica y transcriptómica, revelaron que había una regulación hacia arriba de una o más vías antiapoptóticas para las células senescentes e identificaron 46 compuestos con blancos en estas vías, con potencial capacidad senolítica (Zhu y col., 2015; Chaib y col., 2022). Los criterios de selección posteriores se basaron en tres lineamientos: 1) que atacaran varias vías apoptóticas, 2) que pudiesen ser administrados oralmente y 3) que fuesen productos naturales, sin efectos adversos o ya aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*). Estos compuestos fueron: el inhibidor de tirosina kinasa, Dasatinib (D), el cual eliminaría células senescentes de progenitores de células adiposas y está aprobado y ha sido extensivamente usado desde 2006, y los flavonoides naturales, la quercetina que parece afectar células senescentes endoteliales y fisetina, ambas

presentes en frutas y alimentos (Zhu y col., 2015; Chaib y col., 2022).

De los compuestos arriba mencionados, el Dasatinib, utilizado en quimioterapia y con un buen perfil de seguridad, y la Quercetina, un flavonide natural, probaron ser más eficaces juntos pues eliminaban las células senescentes en múltiples tejidos del cuerpo y dejaban ilesas a las células normales. En un estudio realizado en 2015 se administró esta combinación a ratones de 24 meses (unos 70 años en humanos) y se demostró que tenían una mejor función cardíaca y mayor elasticidad en vasos sanguíneos (Zhu y col., 2015). Estudios posteriores avalan los resultados del Dasatinib+Quercetina en diversas enfermedades y en parámetros relacionados con la edad, incrementando la longevidad en ratones sin presentar signos de enfermedad geriátrica (Steele, 2022).

El primer ensayo clínico en humanos se publicó a principios del 2019, un pequeño estudio de seguridad farmacológica con solo 14 voluntarios, que utilizó el D+Q en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Los resultados fueron positivos, los medicamentos parecían seguros e incluso hubo una pequeña mejoría en el rendimiento físico de los pacientes (Justice y col., 2019; Steele, 2022). Este primer ensayo en humanos de senolíticos, verificó la viabilidad del reclutamiento de pacientes, evaluaciones y métodos e indicó su potencial para ensayos clínicos indicando que las intervenciones diseñadas para combatir a las células senescentes pueden aliviar las consecuencias funcionales del envejecimiento (Justice y col., 2019; Steele, 2022).

Asimismo, Hickson y col. (2019), publicaron un reporte preliminar en pacientes con enfermedad renal con

resultados positivos. Aunque promisorio, el campo de esta combinación es aún muy nuevo. Teniendo que explorar los posibles efectos adversos, dosis e intervalos de administración de los mismos (Hickson y col., 2019).

Otra de las vías exploradas en el combate a las células senescentes es la inhibición de la familia de proteínas pro-supervivencia y antiapoptóticas, Bcl-2, dada la necesidad de las células senescentes de suprimir la apoptosis para sobrevivir (Chang y col., 2016). El navitoclax, un fármaco experimental contra el cáncer es un potente inhibidor de estas proteínas, induce la apoptosis y posee potentes efectos senolíticos en modelos animales (Huang y col., 2022). Lamentablemente, el uso del navitoclax en humanos ha sido limitado, debido a efectos adversos como la trombocitopenia (He y Sharpless, 2017).

Otros potenciales senolíticos son la fisetina y la procianidina C1, flavonoides encontrados en semillas de uvas, pero también en fresas y cebollas. La fisetina actúa reduciendo los marcadores que hacen que envejecan las células de los tejidos, previniendo el contagio entre las células zombi y las sanas, especialmente en el tejido adiposo. Al igual que la combinación D+Q, la fisetina mejora la disfunción física en modelos de ratón progeroides así como en ratones viejos y puede formar parte de esta generación de senolíticos (Justice y col., 2019).

El ginsenósido, un extracto del ginseng, previene la senescencia de células de la médula ósea. El cardo mariano (*Silybum marianum*) es una planta cuyas semillas se han utilizado desde hace más de 2.000 años como hierba medicinal, principalmente para el tratamiento de enfermedades del

hígado. El principio activo de la hierba es la silimarina, el extracto de las semillas y las flores del cardo mariano evitan la aparición de células senescentes en el hígado y otros órganos como la piel (Huang y col., 2022).

Aunque algunos de estos compuestos son medicamentos muy específicos, en concreto los que se utilizan como terapia contra el cáncer, hay otros que podemos encontrar en el herbolario. Las investigaciones están ahora orientadas a descubrir cuál es la dosis adecuada para que estas sustancias sean efectivas.

Antes de ir a comprar en internet todos estos compuestos y tomarlos por las mañanas, se debe saber que la administración crónica de estos compuestos no funciona tan bien como cabría pensar. Curiosamente, se ha comprobado que estos compuestos senolíticos tienen mejores efectos cuando se toman en dosis altas y poco frecuentes (una vez al mes, por ejemplo), en lugar de tomarlos todos los días. Al parecer, estas dosis elevadas inducen al organismo a hacer "limpieza" y liberarse de las células zombi, pero después es necesario un periodo de descanso y adaptación de días o semanas antes de volver a tomarlos.

Entre las drogas "senomórficas" (eliminan el SASP), una de las mejores estudiadas es la metformina, la cual reduce la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad y expande el tiempo de vida en modelos como el gusano *Caenorhabditis elegans*, ratones y pacientes con diabetes tipo 2 (Soukas y col., 2019). La metformina incrementa la eficacia anticáncer de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKs), las cuales son enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular mediante modulación del SASP (Moiseeva y col., 2013); asimismo inhibe la senescencia

endotelial inducida por glucosa, y dispara la eliminación de células senescentes mediada por el sistema inmune (Menéndez y col., 2011). Igualmente, se ha postulado a la metformina como un posible agente inductor de la autofagia.

Algunas hormonas también poseen efectos senomórficos, por ejemplo, la melatonina suprime la expresión de genes de SASP, mejora la actividad de células T senescentes, así como la disfunción mitocondrial en un modelo de ratón con senescencia acelerada (Yu y col., 2017).

Así, la senolisis proporciona una alternativa, aparte de cambios en el estilo de vida o intervenciones farmacológicas, en la terapia antiedad, para enlentecer el inicio de la decrepitud inducida por la edad. Sin embargo, muchos de estos compuestos no han superado aún problemas tales como estudios a largo plazo de intolerancia o toxicidad, pero ofrece esperanzas para revertir los efectos tóxicos que resultan de la acumulación de la carga abrumadora de células senescentes, durante nuestro tiempo de vida.

Está demostrado que la vejez está asociada a un declino fisiológico que finalmente conduce a la incapacitación del individuo y a un incremento en la predisposición a enfermedades. Gracias a las inversiones millonarias que a nivel mundial se están realizando en este campo, estamos cada vez más cerca de conocer los mecanismos celulares y fisiológicos que inciden sobre el envejecimiento y las enfermedades asociadas, así como las posibilidades terapéuticas en cada campo. En esta primera parte hemos abordado el problema del acortamiento de los telómeros y la importancia de un abordaje génico para combatirlo, así como

los mecanismos de senescencia celular, sus efectos y consecuencias y nos hemos introducido en los posibles fármacos para combatirla.

En la segunda parte de esta revisión nos enfrentaremos a los problemas relacionados con la autofagia y nos asomaremos a la, cada vez más desafiante posibilidad de reprogramación celular.

Referencias Bibliográficas

- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479(7372):232-236.
- Bernardes de Jesús B, Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA. 2011. The telomerase activator Ta-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell* 10: 604-621.
- Bernardes de Jesús B, Kerstin Schneeberger EV, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, Blasco MA. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4:691-704.
- Bernardes de Jesús B, Blasco MA. 2013. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet* 29(9): 513-520.
- Epel E, Blackburn E. 2017. La solución de los telómeros. Aprende a vivir sano y feliz. ISBN 978-84-03-50114-0 (Penguin Random House Grupo Editorial, S.A.U).
- Blackburn EH. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673.
- Blasco MA, Funk WD, Villeponteau B, Greider CW. 1995. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269: 1267-1270.
- Blasco MA, Rizen M, Greider CW, Hanahan D. 1996. Differential regulation of telomerase activity and its RNA component during multistage tumorigenesis. *Nat Genet* 12: 200-204
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91(1):25-34.
- Blasco MA. 2002. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* 2: 627-632.
- Campisi J. 1996. Replicative Senescence: Minireview. An Old Lives' Tale? *Cell* 84:497-500.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729-740.
- Campisi J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75:685-705.
- Cascales-Angosto M, Álvarez Gomez JA. 2010. Telómeros y telomerasa, sus implicaciones en el envejecimiento y el cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores* 14(1): 49-70.
- Chaib S, Tchkonja T, Kirkland JL. 2022. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med* 28(8):1556-1568.
- Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, Krager K, Ponnappan U, Hauer-Jensen M, Meng A, Zhou D. 2016. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22(1):78-83.
- Charlesworth B. 2000. Fisher, Medawar, Hamilton and the evolution of aging. *Genetics* 156: 927-931.
- Chuaire L. 2006. Telómeros y telomerasa: breve recuento de una historia iniciada por Hermann Müller y Barbara McClintock. *Colombia Médica* 37(4):332-335.
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Hae, Marzetti E, Giovannini S, Young Seo A, Carter C, Pal Yu B, Leeuwenburgh C. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8(1):18-30.
- Collins K, Mitchell JR. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564-579.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5:99-118.
- Cutler RG, Semsei I. 1989. Development, cancer and aging: possible common mechanisms of action and regulation. *J Gerontol* 44: 25-34.
- Daya S, Berns KI. 2008. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev* 21(4): 583-593.
- de Grey ADNJ. 2003a. An engineer's approach to the development of real anti-aging medicine. *Science's SAGE KE* 2, <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke;2003/1/vp1>
- de Grey ADNJ. 2003b. Challenging but essential

- targets for genuine anti-ageing drugs. *Expert Opin Therap Targ* 7(1):1-5.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(20):9363-7.
- Finch CE. 1990. *Longevity, Senescence, and the Genome*. Chicago, University of Chicago Press.
- Finch CE. 1994. *Senescencia insignificante. Longevidad, senescencia y genoma*. Chicago, IL: Prensa de la Universidad de Chicago. págs. 206-247.
- Finch CE. 2009. Update on Slow Aging and Negligible Senescence – A Mini-Review *Gerontology*. 55:307-313.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244-54.
- Funayama R, Ishikawa F. 2007. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 116(5):431-40.
- González-Puertos VY, Maciel-Barón LA, Barajas-Gómez BA, López-Diazguerrero NE y Königsberg M. 2015a. Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) involvement in the development of cancer, aging and age-related diseases. *Gac Med Mex* 151:460-8.
- González-Puertos VY, Maciel-Barón LA, Barajas-Gómez BA, López-Diazguerrero NE, Königsberg M. 2015b. Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gac Med Mex* 151:491-500
- Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.
- Greider CW, Blackburn EH. 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887-898.
- Greider CW, Blackburn EH. 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337.
- Guerin JC. 2004. Emerging area of aging research: long-lived animals with “negligible senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019 (1): 518-520.
- Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J. 2022. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):391.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274):458-60.
- Hasty P, Vijg J. 2002. Genomic priorities in aging. *Science* 296(5571):1250-1.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 37:614-36.
- He S, Sharpless NE. 2017. Senescence in Health and Disease. *Cell* 169(6):1000-1011.
- Hickson LaTJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, Herrmann SM, Jensen MD, Jia Q, Jordan KL, Kellogg TA, Khosla S, Koerber DM, Lagnado AB, Lawsoni DK, LeBrasseur NK, Lerman LO, McDonald KM, McKenzie TJ, Passos JF, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Saadiq IM, Schaefer KK, Textor SC, Victorelli SG, Volkman TL, Xue A, Wentworth MA, Wissler Gerdes EO, Zhua Y, Tamara Tchkonina T, Kirkland JL. 2019. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47:446-456.
- Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. 2022. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol* 18(10):611-627.
- Justice JN, Nambiar AM, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, Prata L, Masternak MM, Kritchevsky SB, Musi N, Kirkland JL. 2019. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* 40:554-563.
- Kirkland JL, Tchkonina TJ. 2020. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med* 288(5):518-536.
- Kirkwood TB. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304.
- Kirkwood TB, Austad SN. 2000. Why do we age? *Nature* 408(6809):233-8.
- Kogan V, Molodtsov I, Menshikov LI, Shmookler Reis RJ, Fedichev P. 2015. Stability analysis of a model gene network links aging, stress resistance, and negligible senescence. *Scientific Reports* 5:13589.
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P, Campisi J.

2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci* 98(21):12072-12077.
- Lama A. 2020. Telómeros y Enfermedad Cardíaca. *Revista Chilena de Cardiología* 39(1):80-81.
- Lansdorp PM. 2022. Telomeres, aging, and cancer: the big picture. *Blood* 139(6): 813-821.
- Lecot P, Alimirah F, Desprez PY, Campisi J, Wiley C. 2016. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer* 114(11):1180-4.
- Ljubuncic P, Reznick AZ. 2009. The Evolutionary Theories of Aging Revisited – A Mini-Review. *Gerontology* 55:205–216.
- Maciel-Barón LÁ, Pérez VI, Torres C, González-Puertos VY, Königsberg M, López-Díazguerrero NE. 2017. Cellular senescence as a common denominator in age-related diseases. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 55(4):490-497.
- Maciel-Barón LÁ, Moreno-Blas D, Morales-Rosales SL, González-Puertos VY, López-Díazguerrero NE, Torres C, Castro-Obregón S, Königsberg M. 2018. Cellular Senescence, Neurological Function, and Redox State. *Antioxid Redox Signal* 28(18):1704-1723.
- McClintock B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282.
- McClintock B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36(6):344–355.
- Medawar PB. 1952. An Unsolved Problem of Biology. HK Lewis, London (Reprinted in Medawar, P.B. (1981) *The Uniqueness of the Individual*. 2nd Revised Edition, Dover, New York, 28-54) London, HK Lewis, 1952.
- Menéndez JA, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Martín-Castillo B, Joven J, Vellon L, Vazquez-Martinet A. 2011. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer. *Aging* 3:1063-1077.
- Menicacci B, Laurenzana A, Chillà A, Margheri F, Peppicelli S, Tanganelli E, Fibbi G, Giovannelli L, Del Rosso M, Mocali A. 2017. Chronic resveratrol treatment inhibits MRC5 fibroblast SASP-related protumoral effects on melanoma cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72:1187-1195
- Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyret G. 2013. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell* 12:489–498.
- Müller HJ. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* 13: 181-198.
- Müller M. 2009. Cellular senescence: molecular mechanisms, *in vivo* significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 11(1):59-98.
- Muñoz-Lorente MA, Martínez P, Tejera A, Whittemore K, Moisés-Silva AC, Bosch F, Blasco MA. 2018. AAV9-mediated telomerase activation does not accelerate tumorigenesis in the context of oncogenic K-Ras-induced lung cancer *PLoS Genetics* 14(8):e1007562.
- Olovnikov AM. 1971. The principle of marginotomy in the matrix synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201: 1496-1499.
- Perea JE, Buzzi AE. 2018. Telómeros: los temporizadores de la célula. *Alma Cultura y Medicina*. Editorial Alfredo Buzzi 4(1). - www.almarevista.com.
- Piñeiro-Hermida S, Autilio C, Martínez P, Bosch F, Pérez-Gil J, Blasco MA. 2020. Telomerase treatment prevents lung pro-fibrotic pathologies associated with physiological aging. *J Cell Biology* 219(10): e202002120.
- Rodier F, Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192(4):547-56.
- Ruby JG, Smith M, Buffenstein R. 2018. Las tasas de mortalidad de ratas topo desnudas desafían las leyes de Gompertz al no aumentar con la edad. Rose, M (ed.). *eLife* 7: e31157.
- Samper E, Flores JM, Blasco MA. 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2: 1–8.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5):593-602.
- Serrano M. 2017. Understanding Aging. *N Engl J Med*. 376(11):1083-1085
- Soukas AA, Hao H, Wu L. 2019. Metformin as anti-aging therapy: is it for everyone? *Trends Endocrinol. Metab* 30:745–755.
- Stadler LJ, Roman H. 1948. The Effect of X-Rays upon Mutation of the Gene A in Maize *Genetics* 33(3):273-303.
- Steele A. 2022. Eternos: La nueva ciencia para cumplir años sin envejecer. Editorial GeoPlaneta CIENCIA. ISBN-13:978-8408249320
- Tchkonia T, Kirkland JL. 2018. Aging, cell senescence, and chronic disease: emerging therapeutic strategies. *J Am Med Assoc* 320: 1319–20.

- Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype : therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123(3):966-72.
- Torres C, Lewis L, Cristofalo VJ. 2006. Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J Cell Physiol*. 207(3):845-53.
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35(8):927-45.
- Tsoukalas D, Fragkiadaki P, Docea AC, Alegakis AK, Sarandi E, Thanasoula M, Spandidos DA, Tsatsakis A, Razgonova MA, Calina D. 2019. Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. *Molecular Medicine Reports* 20: 3701-3708.
- Watson JD. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239: 197-201.
- Williams GC. 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411.
- Yu S, Wang X, Geng P, Tang X, Xiang L, Lu X, Li J, Ruan Z, Chen J, Xie G, Wang Z, Ou J, Peng Y, Luo X, Zhang X, Dong Y, Pang X, Miao H, Chen H, Liang H. 2017. Melatonin regulates PARP1 to control the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fetal lung fibroblast cells. *J Pineal Res* 63(1).
- Yu Y, Zhou L, Yang Y, Liu Y. 2018. Cycloastragenol: An exciting novel candidate for age-associated diseases. *Exp Ther Med* 16:2175-2182.
- Zhang Y, Toh L, Lau P, Wang X. 2012. Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Is a Novel Target of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Human Cance. *J Biol Chem* 287(39): 32494-32511.
- Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL. 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14:644-658.



El envejecimiento: ¿Podemos frenarlo? Autofagia/Nutrición. Reprogramación Celular Segunda Parte

Aging: ¿Can we stop it?
Autophagy/Nutrition. Cellular reprogramming
Second Part

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO

Resumen

Como individuos, estamos sujetos a daños permanentes en las células y los tejidos. Muchos factores contribuyen a esto, entre ellos, el deterioro propio de la madurez y el envejecimiento. La autofagia es un proceso de reciclaje presente en todas las células que permite la degradación dentro de los lisosomas de componentes celulares dañados o prescindibles. Ocurre naturalmente preservando a las células de la acumulación de toxinas, moléculas y organelos dañados y además permite los procesos de desarrollo y diferenciación de los tejidos. Los sustratos reciclados generan ATP, lo que constituye una fuente alternativa de energía en situaciones de estrés. Alteraciones en el funcionamiento de la autofagia pueden desarrollar diversas patologías, tales como el daño hepático, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. A medida que envejecemos experimentamos un incremento de las enfermedades. Se ha demostrado el papel relevante de la genética gracias a la caracterización de muchos "loci" que influyen en los rasgos de envejecimiento, surgiendo varias estrategias para atenuar los efectos fisiológicos del mismo. En este contexto, la reprogramación celular mediada por el uso de factores de pluripotenciales ha demostrado ser capaz de revertir el fenotipo celular envejecido. Más aún, los protocolos de rejuvenecimiento por reprogramación parcial han logrado revertir la edad biológica, medible por biomarcadores de gran precisión conocidos como relojes epigenéticos.

Palabras clave: Autofagia, reciclaje, mTOR, supervivencia celular, reprogramación celular, epigenética, envejecimiento, factores de Yamanaka

Abstract

As individuals, we are subject to permanent damage to cells and tissues. Many factors contribute to this, including the deterioration of maturity and aging. Autophagy is a recycling process present in all cells that allows the degradation of damaged or dispensable cellular components within lysosomes. It occurs naturally, preserving cells from the accumulation of toxins, molecules, and damaged organelles, and allows the development and differentiation processes of tissues. Recycled substrates generate ATP, which is an alternative energy source in stressful situations. Alterations in the functioning of autophagy can develop various pathologies, such as liver damage, cancer, and neurodegenerative diseases. As we age, we experience an increase in diseases. The relevant role of genetics has been demonstrated thanks to the characterization of many "loci" that influence aging traits, emerging several strategies to attenuate the physiological effects of aging. In this context, cellular reprogramming mediated using pluripotency factors is capable of reversing the aged cellular phenotype. Furthermore, rejuvenation protocols through partial reprogramming have managed to reverse biological age, measurable by highly precise biomarkers known as epigenetic clocks.

Keywords: Aging, telomeres, telomerase, cellular senescence, senolytics

Prof. Jubilado, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Cátedra de Biología. Correspondencia: mrgarrido11@hotmail.com

Orcid: [0000-0001-9662-4405](https://orcid.org/0000-0001-9662-4405)

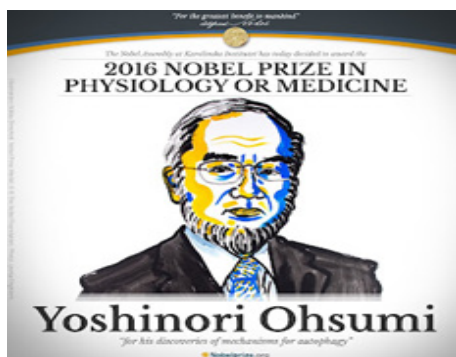
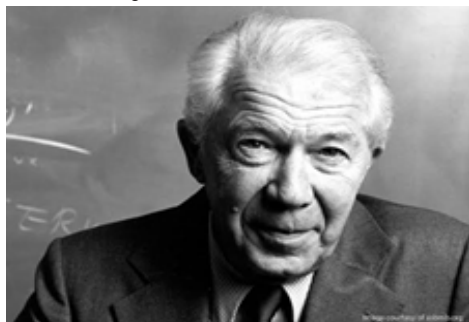
DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.16](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.16)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 25/10/2023
Aprobación: 21/11/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 172-196, 2023

AUTOFAGIA/NUTRICIÓN

El tema de la autofagia es tan relevante, que nos ha dado dos premios Nobel. En las imágenes tenemos al Dr. Christian de Duve, quien recibió en 1974 el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por descubrir el lisosoma y el Dr. Yoshinori Ohsumi, Premio Nobel de Fisiología o Medicina del año 2016, otorgado por su trabajo de toda una vida sobre la autofagia (Ohsumi, 2014; Galluzzi y col., 2017).



A este respecto, nos viene a la memoria las clases impartidas a los alumnos sobre el sistema lisosomal, con la clásica imagen de los lisosomas englobando y “comiendo” organelos dañados, restos vesiculares, etc.

Estas imágenes enlazan con el hoy, tan de moda, “**ayuno intermitente**”, que estamos usando para, como no, adelgazar, sin saber muchas veces que estamos usando el mismo concepto, ya que, al prolongar el ayuno, forzamos a nuestro cuerpo a usar las reservas que tiene, y eso incluye “destruir” las cosas viejas, para usar los “ladrillos” en una nueva construcción.

El Dr. Christian de Duve acuñó el término “autofagia” o “comerse a sí mismo”. La definición científica original de autofagia es la entrega de carga citoplasmática al lisosoma para su degradación (Galluzzi y col., 2017; Levine y Kroemer, 2019). La autofagia se activa por el ayuno –o falta de nutrientes- pero también por numerosas situaciones de estrés celular (Maruzs y col., 2019).

El individuo debe enfrentar permanentemente daños a sus células y tejidos. Cada una de las subunidades celulares, subcelulares y supracelulares que componen el organismo, sufre modificaciones resultantes de daño endógeno, como modificaciones oxidativas de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, desnaturalización y degradación de macromoléculas con pérdida de sus configuraciones nativas, o por un estrés exógeno. El organismo posee mecanismos para protegerse de las células dañadas, ya sea deshaciéndose de ellas o bien impidiendo que se propaguen, de modo de evitar una descendencia de células portadoras de errores y mutaciones que podrían derivar en estados patológicos (Costas y Rubio, 2017). Así, para evitar la degeneración, la mayoría de los componentes celulares y de los tipos celulares, debe ser continuamente reciclada, o sea, deben sufrir destrucción seguida de reemplazo sin errores (Daolin y col., 2019).

Entre los mecanismos que suprimen la existencia de células dañadas, perjudiciales para la salud o innecesarias para el correcto funcionamiento de los aparatos y sistemas, se encuentran la “apoptosis”, y la “senescencia celular”. La autofagia es un proceso alternativo de supervivencia celular, el cual destruye partes de la célula o moléculas dañadas para preservar su vida (Costas y Rubio, 2017). Para ello,

las células moribundas deben emitir señales de “encuéntrame” que atraen a los fagocitos; señales (unidas a membrana), de “cómeme”, que facilitan su reconocimiento y englobamiento por fagocitos, así como señales antiinflamatorias que evitan una reacción exagerada y no deseada (Medina y col., 2020). Un aclaramiento defectuoso conduce a la acumulación de células muertas, vertido de su contenido en el tejido, inflamación y reacciones autoinmunes (López-Otín y Kroemer, 2021).

La autofagia puede ser concebida como el mecanismo de reciclaje citoplasmático más importante, y su estimulación directa, ya sea por manipulación genética, restricción calórica, ciclos de ayuno, dietas cetogénicas, inhibición de la señalización de insulina o manipulación farmacológica de sensores de nutrientes, extiende la esperanza de vida y el lapso de vida saludable en modelos animales (Madeo y Bauer, 2019; Eisenberg y col., 2009, 2016).



Ignacio Ramírez Pardo © Pardo IR. 2017

Disponible: <https://cuentamedeciencia.blogspot.com/2017/04/que-es-la-autofagia>

Adicionalmente, el incremento de la autofagia, inducida farmacológicamente, puede retardar la manifestación de enfermedades que incluyen las enfermedades mitocondriales hereditarias,

el síndrome metabólico, la arterioesclerosis y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras. De hecho, la autofagia protege a las células de muerte prematura, reduce la inflamación y mejora la inmunosupervivencia ante el cáncer (López-Otín y Kroemer, 2021).

La citoprotección se obtiene por la autofagia de las mitocondrias dañadas, la remoción de los agregados, potencialmente tóxicos, de proteínas mal plegadas y la destrucción de proteínas pro-necroptóticas. La inflamación se reduce debido a que la autofagia previene la liberación de ADN de micronúcleos secuestrados en mitocondrias permeables y reduce la abundancia de componentes del inflammasoma (López-Otín y Kroemer, 2021). Se mencionan dos o tres tipos de autofagia, según el modelo de entrega de la carga al lisosoma: la autofagia mediada por proteínas chaperonas, la macroautofagia y la microautofagia.

La macroautofagia es el principal mecanismo catabólico utilizado por las células eucariotas para mantener la homeostasis de los nutrientes y el control de calidad de los organelos, está mediada por un grupo de genes evolutivamente conservados, los genes relacionados con la autofagia-ATG (Klionsky y col., 2003), alrededor de 40 genes/proteínas ATGs juegan papeles clave en la dinámica de membranas autofágicas y sus procesos (Galluzzi y col., 2017; Dikic y Elazar, 2018).

La mitofagia, una forma de macroautofagia que resulta fundamental en la eliminación de mitocondrias disfuncionales y el mantenimiento del número adecuado de las mismas según el tipo de tejido y su función. La mitofagia es un proceso importante en el desarrollo de tumores (Jin y White, 2007) y enfermedades

neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y en el Parkinson donde se acumulan mitocondrias disfuncionales por fallas en dicho proceso (Kerr y col., 2017). Más aún, la activación de la mitofagia por precursores de la nicotinamida dinucleótido (NAD⁺), ha mostrado una mejoría en modelos de envejecimiento vascular y miopatías en roedores (Das y col., 2018) y reduce el incremento de citocinas inflamatorias relacionadas con los procesos de envejecimiento en pacientes (Galluzzi y col., 2017; Elhassan y col., 2019).

La microautofagia a su vez, desempeña un papel importante en la detoxificación de los tejidos. Varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como el Alzheimer, Parkinson o Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y demencia frontotemporal son "**proteíno patías**" caracterizadas por la acumulación de proteínas mal plegadas procesadas incorrectamente o con pérdida de funciones debido a modificaciones post-traslacionales. Otras enfermedades como la fibrosis quística involucran acúmulos de moléculas no degradadas por la disfunción de la autofagia denominados agregosomas (Luciani y col., 2010; Galluzzi y col., 2017; Boland y col., 2018). Asimismo, el deterioro de todos esos mecanismos ha sido involucrado en la patogénesis de enfermedades asociadas a la edad, mientras que su restauración está siendo explorada como posibles estrategias de tratamiento (Boland y col., 2018).

Cuando se produce la autofagia, además de eliminarse partes de la célula que no sirven o que resultan perjudiciales para su sana supervivencia, los desechos se aprovechan como metabolitos para producir energía. En condiciones de estrés por falta de nutrientes u oxígeno, algunas

células disparan el proceso de autofagia sacrificando parte de sí mismas para producir energía y sobrevivir en condiciones adversas (Costas y Rubio, 2017).

Más allá de la supervivencia celular específica, la autofagia es necesaria para la supervivencia de los mamíferos (Daolin y col., 2019). Se ha demostrado que si se eliminaba el gen *Atg7* (*Autophagy related gene*), en ratones en condiciones de ayuno, los animales se morían poco tiempo después de nacer. En animales adultos, la supresión del mismo gen también resulta letal. Tanto la degradación de glucógeno para producir glucosa, como el catabolismo lipídico para la producción de glicerol y ácidos grasos son ineficientes. Las reservas se agotan rápidamente en un catabolismo acelerado y, al no poder mantener los niveles circulantes de glucosa, los animales mueren rápidamente por hipoglucemia, daño hepático y neurodegeneración (Guo y White, 2016). Por lo tanto, la autofagia, además de una respuesta al estrés, es un proceso requerido normalmente para mantener la homeostasis en el metabolismo.

Hay varias estrategias terapéuticas para incrementar y mejorar el **reciclaje** celular. La primera, que mencionaremos ampliamente en el punto siguiente, es reprogramar células somáticas diferenciadas mediante la expresión cíclica y transitoria de los factores de transmisión de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc) (Steele, 2022; López-Otín y Kroemer 2021). Esto reduce la manifestación de fenotipos asociados a la edad, al favorecer, presumiblemente, el reemplazo de células dañadas o muertas (Ocampo y col., 2016). En segundo lugar, la muerte celular apoptótica inducida preferencialmente en células senescentes, las cuales se acumulan en tejidos envejecidos

y necesitan ser reemplazados por células funcionales, no senescentes, provenientes de una proliferación compensatoria (He y Sharpless, 2017). Esta terapia “senolítica” puede lograrse mediante la inducción de “genes suicidas” bajo el control de promotores inducibles (Baker y col., 2011), o bien mediante el uso de “drogas senolíticas” como el navitoclax (antagonista de Bcl-2) y el Desatinib más la Quercetina, que “superan” la resistencia intrínseca de las células senescentes (Aguayo-Mazzucato y col., 2019; Hickson y col., 2019; Khosla y col., 2020).

La tercera de estas terapias es la inducción de la autofagia, ya que una reducción en la autofagia probablemente es fundamental para el proceso del envejecimiento. Más aún, la obesidad, que implica un exceso de nutrientes y hormonas tróficas, puede acelerar el envejecimiento y la manifestación precoz de enfermedades relacionadas con la edad, en parte debido a una inhibición de la autofagia (López-Otín y col., 2013, 2016).

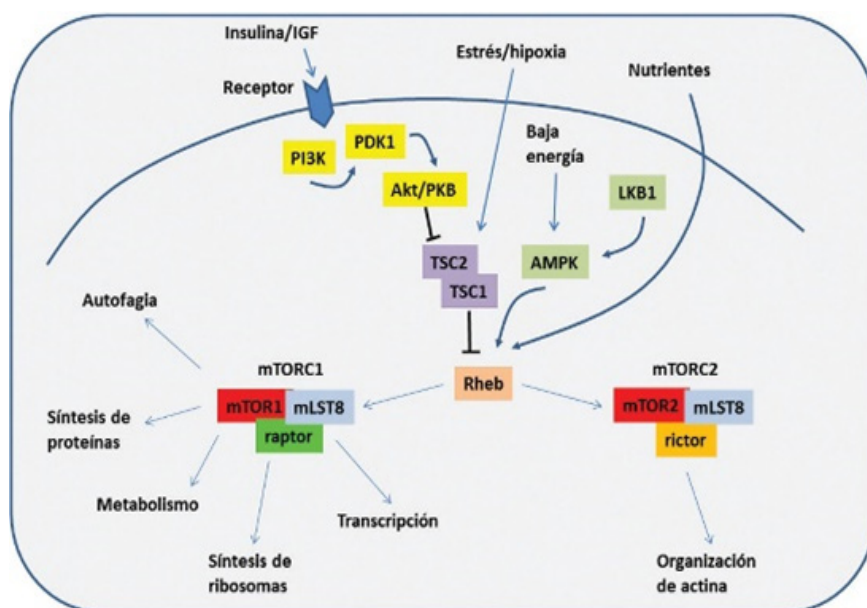
Dado que la restricción calórica aumenta los niveles de autofagia, comer sustancialmente menos podría ser una estrategia para activar este proceso y ralentizar el propio envejecimiento. Pero sería aún mejor si encontramos una forma de imitar los efectos de la dieta, evitando la abstinencia. Los miméticos de la restricción calórica son fármacos que activan mecanismos de la autofagia, sin necesidad de comer menos (Steele, 2022).

La historia de los miméticos de la restricción calórica se inicia en 1964, en la isla chilena de Pascua o *Rapa Nui* en lengua nativa. Una excursión canadiense llevó a cabo una meticulosa toma de muestras de suelo, una de las cuales fue enviada a

Canadá y 4 años después fue entregada a un grupo de investigación interesado en encontrar nuevos medicamentos producidos por bacterias. Una de las cepas investigadas, *Streptomyces hygrosopicus*, mostró eficacia contra *Candida*. Se aisló la sustancia química responsable y la denominaron “rapamicina”, en honor a Rapa Nui (Lamming y col., 2013; Steele, 2022).

La rapamicina o sirólimus es un macrólido que resultó ser mucho más que un antifúngico, ya que investigaciones posteriores demostraron que era un poderoso supresor inmunitario y que impedía que las células se multiplicaran. Estas propiedades la hacían prometedora en trasplantes y como posible tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, años de investigación no consiguieron formular un fármaco prometedor y se cerró el programa de investigación en 1982. El científico Suren Sehgal, cinco años después volvió a investigar la rapamicina y aunque hoy en día está autorizada para esos usos, su mayor contribución a la salud humana podría ser en la medicina contra el envejecimiento (Lamming y col., 2013, Steele, 2022).

La rapamicina, interactúa con una proteína a la que llamaron diana de la rapamicina o **mTOR**, por sus siglas en inglés (*mammalian Target of Rapamycin*). La familia de proteínas TOR tiene funciones pleiotrópicas y participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y la traducción a proteína en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales (Rodríguez Pérez, 2011; Lamming y col., 2013). mTOR detecta las concentraciones de azúcares, aminoácidos, oxígeno e insulina y a partir de lo que encuentran dan instrucciones a otras proteínas en la célula



La red de señalización mTOR consta de dos ramas principales, cada una mediada por un mTORC. La vía rapamicina sensible mTORC1 controla varios caminos que colectivamente determinan la masa o tamaño de la célula. mTORC1 y mTORC2 responden a factores de crecimiento (insulina / IGF), al estado energético de las células, nutrientes (aminoácidos) y a estrés. RAPTOR (regulatory-associated protein of mTOR), RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*) (Tomado de Costas y Rubio 2017)

(Costas y Rubio 2017; Steele, 2022).

Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (mTORC1), que se define por su interacción con la proteína **raptor** (regulatory-associated protein of mTOR), y un complejo insensible a rapamicina (mTORC2), que se define por su interacción con **rictor** (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). La evidencia apoya la hipótesis que mTOR es la llave del catabolismo y anabolismo celular que determina si las células, y en particular las células cancerígenas, deben crecer y proliferar. Además, mTOR tiene efectos en la regulación de la apoptosis (Costas y Rubio, 2017). La ruta raptor-mTOR (-mTORC1) regula el crecimiento celular (acumulación de masa celular) y la proliferación, responde a nutrientes y a factores de crecimiento. El complejo rictor-mTOR (mTORC2) controla

la polaridad celular y el citoesqueleto (Rodríguez Pérez, 2011).

La rapamicina bloquea la forma mTORC1, de modo que no puede indicar al resto de la célula cuando hay abundancia de nutrientes engañando a la célula, ralentizando el crecimiento y promoviendo la autofagia, con efectos muy similares a la restricción calórica. Harrison y col., en 2009, demostraron que la rapamicina funciona, incluso en ratones viejos, con un incremento en la vida promedio del 10%, pero su efecto inmunosupresor, incrementa el riesgo de infecciones. Asimismo,

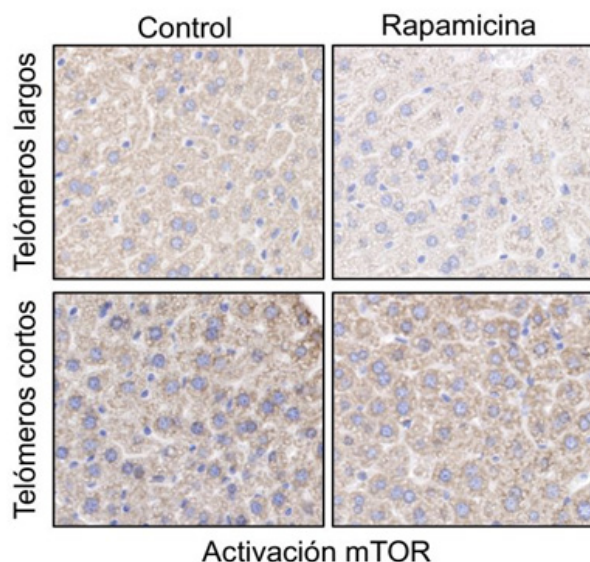
predispone a la diabetes, a problemas de fertilidad y otros. Hay que aclarar, que estos efectos secundarios se observan con dosis de rapamicina mucho mayores que las necesarias como medicación antienvjecimiento, contrariamente a lo que cabría esperar, dosis bajas del compuesto parecen mejorar el funcionamiento del sistema inmune (Ehninger y col., 2014; Steele, 2022).

Por otro lado, la capacidad de las células para detectar nutrientes depende de una cascada de señales bioquímicas que activa la proteína mTOR. Es una vía molecular esencial, porque controla el crecimiento de las células -y de todo el organismo-; además, tiene un papel central en el envejecimiento: si la vía mTOR se bloquea, el envejecimiento se frena. Pero esto solo se ha demostrado en ratones jóvenes y sanos.

En el Grupo de Telómeros y Telomerasa que dirige la española María Blasco en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) (Madrid, España), descubrieron de modo inesperado, que bloquear la detección de nutrientes mediante el tratamiento con rapamicina, efectivamente retrasa el envejecimiento de los ratones sanos, pero curiosamente, empeora las enfermedades y la vejez prematura que sufren los ratones con telómeros cortos. Esto tiene implicaciones importantes en el tratamiento de enfermedades asociadas a telómeros cortos, así como en el caso de enfermedades del envejecimiento que también están asociadas a telómeros cortos (Ferrara-Romeo y col., 2020).

Al evaluar si la rapamicina pudiera alargar también la vida de los ratones con telómeros cortos, se observó que ocurre lo contrario: envejecen hasta un 50% más rápido. Este hallazgo básico ha permitido establecer que, efectivamente mTOR es importante para la supervivencia de ratones con telómeros cortos y que por lo tanto su bloqueo es negativo (Ferrara-Romeo y col., 2020). Pero además ello tiene implicaciones clínicas. Los telómeros cortos se asocian o son la causa de los llamados síndromes teloméricos, enfermedades como la disqueratosis congénita, la anemia aplásica, las fibrosis pulmonar y hepática y otras enfermedades degenerativas que hoy día apenas tienen tratamiento. El bloqueo de la vía mTOR con rapamicina se consideraba una posible estrategia terapéutica contra estas enfermedades, pero los resultados del trabajo apuntan a que no funcionaría e incluso podría ser pernicioso (Ferrara-Romeo y col., 2020).

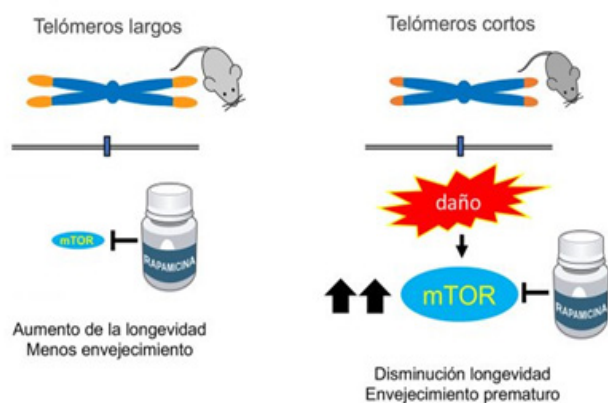
Otro hallazgo inesperado fue que en los ratones con telómeros cortos la vía mTOR está sobreactivada, es decir, sus células son



La rapamicina inhibe la actividad de mTOR en muestras de hígado de ratones con telómeros largos, pero no en ratones con telómeros cortos/CNIO. Tomado de: <https://www.cnio.es/noticias/publicaciones/la-rapamicina-tiene-efectos-perjudiciales-cuando-los-telomeros-son-cortos/>

más sensibles de lo habitual a la presencia de alimento. Esto ha sido interpretado como que es precisamente la mayor capacidad de detección de nutrientes lo que permite sobrevivir a estos ratones. De hecho, se sabe que mTOR también está sobreactivada en algunos órganos de ratones de edad avanzada, lo que podría indicar que este es un fenómeno asociado no solo al envejecimiento anormalmente acelerado, sino al envejecimiento fisiológico natural (Ferrara-Romeo y col., 2020).

En vista de lo anterior, se han buscado activamente análogos de la rapamicina, denominados rapalogs o rapalogues. Se han desarrollado varios derivados de la rapamicina con mejor farmacocinética, entre ellos temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, 32-deoxo-rapamicina, y zotarolimus. A pesar de los resultados prometedores en modelos animales, los rapalogs han decepcionado en los ensayos en humanos (Lamming y col., 2013).



El tratamiento crónico con rapamicina inhibe la ruta de mTOR y conlleva a una reducción de cáncer y envejecimiento y un aumento de la longevidad. Los ratones con telómeros cortos presentan una hiperactivación de la ruta mTOR como respuesta endógena de supervivencia. La inhibición de la ruta mTOR en estos ratones es perjudicial para ellos e induce un envejecimiento acelerado y una reducción de la longevidad/CNIT. Tomado de: <https://www.cnio.es/noticias/publicaciones/la-rapamicina-tiene-efectos-perjudiciales-cuando-los-telomeros-son-cortos/>

Afortunadamente, existe un cierto número de compuestos, aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), que reducen la actividad de mTORC1. El más usado sin duda es la aspirina (Lamming y col., 2013). Así, se ha señalado que la aspirina influencia la longevidad en ratones, extendiendo el promedio de vida, aunque no la longevidad máxima en ratones macho (Strong y col., 2008); además, se ha demostrado que disminuye tanto la mortalidad por cáncer como en general, toda la mortalidad en humanos (Rothwell y col., 2011). La cafeína es un débil inhibidor de mTOR. En levaduras expuestas a cafeína, la inhibición de mTOR media una extensión de la vida media y es posible que la dosis presente en el café pueda ser suficiente para ejercer efectos en el ser humano (Wanke y col., 2008; Lamming y col., 2013).

Recientemente se ha demostrado que la metformina también regula a mTORC1 (Kalender y col., 2010; Lamming y col.,

2013). Esta droga, es la primera línea del tratamiento para la diabetes tipo 2, disminuye los niveles de glucosa en sangre, inhibe la lipólisis y disminuye los niveles de ácidos grasos libres, con pocos efectos adversos. De modo interesante, un estudio a largo plazo en humanos encontró que el tratamiento con metformina en pacientes con diabetes disminuyó la mortalidad por todas las causas, incluyendo diabetes, cáncer e infarto al miocardio. Sin embargo, un efecto de prolongación de la vida en humanos tiene aún que ser demostrado (Lamming y col., 2013).

La espermidina pertenece a la familia de las poliaminas, que son moléculas de naturaleza policatiónica que interactúan con moléculas cargadas negativamente incluyendo el ADN, el ARN y los lípidos, estando involucradas en procesos tales como estabilidad del ADN, crecimiento celular, proliferación y muerte. Diversos estudios han reportado efectos cardioprotectores, neuroprotectores y promotores de la longevidad de esta poliamida (Hofer y col., 2021).

Se ha identificado como el principal mecanismo de acción de la espermidina en el aumento de la longevidad, a su posible capacidad de inducir un incremento de la autofagia (Eisenberg y col., 2009, 2016). La espermidina afecta la acetilación de muchas proteínas, entre las cuales se encuentra una gran proporción en la red de proteínas de la autofagia en humanos, así como favorece la desacetilación en el citosol y la acetilación en el núcleo (Minois, 2014).

Además de su papel en la autofagia, se encontró que esta poliamina suprime la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y los niveles de muerte necrótica celular, disminuyendo el daño por estrés

oxidativo en ratones viejos (Eisenberg y col., 2009, 2016; Minois y col., 2011; Minois, 2014).

Es reconocido que los niveles de poliamidas disminuyen con la edad (Minois y col., 2011). Sin embargo, solo recientemente se ha investigado el efecto de las poliamidas, especialmente la espermidina, sobre la edad. Pucciarelli y col. (2012) observaron que la media de los niveles de espermidina en humanos entre 60 y 80 años de edad estaba por debajo de los humanos menores de 50, sin embargo, en humanos con más de 90 años, los niveles de espermidina eran similares a la población menor de los 50, sugiriendo que mantener los niveles de espermidina puede contribuir a la longevidad.

Los niveles de poliaminas pueden incrementarse tanto en modelos animales como en humanos mediante suplementos alimenticios, ejemplos de alimentos ricos en poliamidas son: salvado de arroz, pimiento verde, brócoli, soja, champiñones, naranjas y té verde (Minois, 2011).

Así, la evidencia creciente revela que ciertos fitoquímicos poseen propiedades potenciales de antienvjecimiento. Los productos naturales en medicina y salud han sido usados por cientos de años y productos naturales con propiedades farmacológicas han contribuido al descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas (Mathur y Hoskins, 2017). Entre estos productos provenientes de fuentes vegetales, encontramos polifenoles, saponinas, alcaloides y polisacáridos, reconocidos como moléculas antiedad que pueden promover la salud y extender el promedio de vida a través de múltiples mecanismos (Chen y col., 2022). Las principales vías celulares que median los efectos de los productos naturales que

prolongan la longevidad implican vías de detección de nutrientes. Entre estas, las vías SIRT/NAD⁺, AMPK, mTOR, p53 e IIS (Gao y col., 2023).

Los polifenoles poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Arora y col., 2020). Entre los polifenoles, las clases principales son: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los ácidos fenólicos están presentes en frutas, vegetales, granos, café y té.

Los flavonoides están divididos en varias clases según su estructura, siendo el más conocido, la quercetina, un potencial compuesto senolítico y que posee además importantes propiedades como antioxidante, ya que regula los niveles de glutatión e induce la expresión de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (Gao y col., 2023). Adicionalmente, se ha demostrado que la quercetina promueve la maduración de los oocitos y el desarrollo embrionario en modelos celulares *in vitro* de humanos y ratones viejos, mediante eliminación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, reduciendo la apoptosis y mejorando la autofagia (Cao y col., 2020).

La quercetina ha sido considerada como un compuesto antienvjecimiento por sus propiedades antiinflamatorias a largo plazo, disminuyendo los niveles de citocinas proinflamatorias en modelos de cultivo celular (Kang y col., 2011, 2022; Cai y col., 2021). Asimismo, la administración de quercetina a ratas diabéticas disminuyó efectivamente los niveles de proteína C reactiva sérica, el factor de necrosis tumoral alfa, la glucosa sanguínea y las citocinas inflamatorias (Hosseini y col., 2021).

Otra flavona natural es la luteolina, encontrada en las hojas de muchas plantas medicinales y comestibles como perejil, apio, brócoli, romero, cardamomo, anís y diente de león (Jia y col., 2015). Aunque la luteolina es un componente minoritario en la alimentación diaria posee potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Muy importante, la luteolina puede prevenir o reducir la degradación de elastina y colágeno inducidos por la radiación UV, y responsable del envejecimiento y arrugas de la piel al reducir la liberación de citocinas como la IL-6, TNF- α , e IL-20 de los queratinocitos y fibroblastos (Gao y col., 2023). Las principales fuentes naturales de flavonoides son el té verde, las frutas rojas y moradas, los vegetales, los granos y el chocolate.

El resveratrol es un polifenol ampliamente encontrado en alimentos y bebidas consumidas diariamente como uvas, maní, granadas, arándanos, cacao y vino rojo. Diversos estudios muestran que el resveratrol exhibe propiedades farmacológicas tales como actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, inmunomoduladoras y neuroprotectoras; más aún, es capaz de combatir enfermedades degenerativas asociadas a la edad (Diepvens y col., 2007; Perrone y col., 2017; Santhiravel y col., 2022). Se ha demostrado que un suplemento de resveratrol extiende la vida media en el *Nothobranchius guentheri* (Notho de cola roja) un pequeño pez, que se ha constituido en un nuevo modelo para estudios de longevidad. El resveratrol incrementa las actividades cognitivas y motoras y retrasa la activación de marcadores asociados a senescencia, cuando son comparados con el grupo control, sin afectar el tamaño corporal (Yu y Li, 2012). Considerando esas

múltiples propiedades, es natural que se difunden cada vez más estudios sobre las posibles aplicaciones del resveratrol como un suplemento nutricional.

Las moléculas antienvjecimiento presentes en productos naturales y el sinergismo entre ellas, no están completamente dilucidados. Nos encontramos que todavía hacen falta estudios epidemiológicos bien controlados y ensayos clínicos rigurosos sobre los efectos antienvjecimiento de los productos y suplementos alimenticios para determinar las dosis, eficacia, seguridad y tolerancia de estos productos (Gao y col., 2023).

REPROGRAMACIÓN CELULAR/EPIGENÉTICA

El envejecimiento puede ser definido como un proceso complejo, dependiente del tiempo y que afecta a múltiples tejidos y órganos llevando a una reducción progresiva en la integridad fisiológica de tejidos y órganos. Entender las causas de la edad, ha sido un área de interés a través de la historia humana.

La longevidad ha sido utilizada como el criterio primario en muchos modelos biológicos de envejecimiento, sin embargo, se debería considerar este incremento cuantitativo menos prioritario que un incremento cualitativo. Por lo tanto, aliviar las consecuencias inmediatas del envejecimiento, el deterioro físico, es el objetivo más destacado de los estudios sobre el envejecimiento en humanos, así la expectativa de una vida sana o "**lapso de salud**", puede ser definido como el tiempo en que un individuo es fisiológicamente competente y capaz de mantener la homeostasis en respuesta a estresores

externos, lo cual no necesariamente es igual a "**tiempo de vida**" (Hansen y Kennedy, 2016; Crimmins, 2015; Beyret y col., 2018).

Durante los últimos 30 años la investigación sobre el envejecimiento ha avanzado de modo importante y uno de los puntos de interés reciente es la llamada medicina regenerativa, la cual cubre diversos aspectos de la regeneración celular. Entre ellos la terapia con células madre, pero **¿Que son las células madre?**

La mayoría de las células del cuerpo humano son células diferenciadas, específicas para cada tejido, poseen una identidad y función específica, que no puede ser cambiada. Ellas serán células musculares, neuronas, células de la piel etc.

A diferencia de las anteriores, las células madre no están diferenciadas, lo que significa que no poseen una identidad y función fija. Las células madre se encuentran en todos los organismos pluricelulares y tienen la capacidad de dividirse a través de la mitosis y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, además de autorrenovarse para producir más células madre.

La única célula madre totipotencial, o sea con capacidad de crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios como los extraembrionarios (la placenta), o sea, puede formar todos los tipos celulares, es el cigoto. El desarrollo procede de un estado de totipotencialidad característico del cigoto y blastómeros durante los primeros clivajes del embrión, hasta células con un potencial restringido para el

desarrollo (Mitalipov y Wolf, 2009; Hanna y col., 2010).

Las células madre embrionarias son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días de edad. Estas son pluripotentes o pluripotenciales, lo cual significa que pueden dar origen a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células madre multipotenciales son aquellas que solo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario, un ejemplo: las células madre hematopoyéticas, células madre de la sangre que puede diferenciarse en los múltiples tipos celulares de la sangre (Mitalipov y Wolf, 2009).

Algunas células madre tienen la capacidad de dividirse asimétricamente en un mecanismo que iguala la autorenovación y la diferenciación mediante la producción de una célula madre y una célula diferenciada, lo que permite el mantenimiento de la población de células madre (Inaba y Yamashita, 2012). Consecuentemente, el declino cualitativo y cuantitativo de la función de las células madre durante la vida, conocido como agotamiento de las células madre, ha sido propuesto como uno de los impulsores del envejecimiento (López-Otín y col., 2013).

Las células madre constituyen piezas centrales de la medicina regenerativa, que involucra el crecimiento de nuevas células, tejidos y órganos para reemplazar o reparar lo que está deteriorado por daños, enfermedad o edad, ya que ellas son regenerativas y maleables. Así, los fenotipos asociados a la edad pueden ser restaurados por la inducción del rejuvenecimiento de las células madre *in vivo* (Rando y Chang, 2012).

Aun así, un cierto bombo publicitario rodea a la terapia con células madre, lo que hace que a menudo se malinterpreten sus posibilidades. El término "células madre" lo suelen utilizar charlatanes para atraer pacientes a clínicas rimbombantes, donde les aplican misteriosas soluciones para "curar" todo tipo de dolencias (Steele, 2022).

Para entender el enorme y genuino potencial de estas terapias es necesario comprender que es esencial llevar las células precisas, al lugar correcto y en el momento adecuado. El proceso de pasar de una célula madre a un tipo específico de célula se conoce como diferenciación (Steele, 2022).

Todos empezamos siendo un óvulo fecundado, la gran matriarca capaz de formar todas las células de un bebé en desarrollo. El cigoto es transcripcionalmente inactivo y el desarrollo embrionario inicial depende únicamente de factores maternos como ARN y proteínas, proporcionadas por el citoplasma del óvulo que inicia la primera división celular. El cigoto se transforma en mórula y después en blastocisto mediante divisiones mitóticas, antes de la implantación. La masa celular interna del blastocisto madura y da origen a las tres capas germinales: el endodermo, mesodermo y ectodermo, lo que quiere decir que las células de la masa celular interna se pueden diferenciar en todos los tipos celulares del cuerpo humano (Mitalipov y Wolf, 2009; Robinton y Daley, 2012; Wu e Izpisúa Belmonte, 2016; Zakrzewski y col., 2019). Esta capacidad, altamente especializada, se conoce como pluripotencialidad.

Pero esta pluripotencialidad es fugaz, no pasa mucho tiempo antes de que todas

las células del embrión sean simplemente multipotenciales. Con el tiempo, la mayoría de las células llegan al final del camino, el puñado de células descendientes por diferenciación terminal son "células madre adultas" (Mitalipov y Wolf 2009; Steele, 2022).

La primera categoría de terapia con células madre es el trasplante de células madre adultas de un individuo a otro o de un individuo a sí mismo. El más común es el trasplante de médula ósea. Las células madre hematopoyéticas pueden ser encontradas en la médula ósea en el adulto, así como en la sangre del cordón umbilical y son utilizadas para repoblar la médula ósea y los glóbulos blancos en pacientes con leucemia.

El problema es que estas células solo pueden funcionar donde existe una población adecuada de células madre, lo cual no sucede por ejemplo en cerebro o corazón. El segundo problema es el rechazo inmunitario que puede incluso conducir a la muerte (Yamanaka, 2020; Steele, 2022).

Una segunda opción en este tipo de terapias es el uso de células madre embrionarias (CsME), estas células han sido utilizadas en terapias celulares para dolencias como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o diabetes tipo 1 (Yamanaka, 2020). Sin embargo, respecto a su uso en clínica, se debe considerar aspectos éticos, ya que estas células provienen de embriones humanos e igualmente el rechazo tras el trasplante (Yamanaka, 2020).

Así, muchos grupos han intentado generar CsME humanas provenientes de células somáticas del propio paciente mediante transferencia nuclear. El origen

de esta técnica viene de 1960, cuando John Gurdon tomó el núcleo de una célula de rana, que contiene el ADN, y lo colocó en un óvulo de rana al que previamente se había privado del núcleo. Los núcleos de embriones jóvenes transferidos a un óvulo podían convertirse en ranas adultas, pero los núcleos de ranas adultas fallaron en este cometido (Steele, 2022; Karagiannis y col., 2018, 2019; Yamanaka, 2020). Esta técnica perfeccionada fue popularizada en 1996 para concebir a la que probablemente haya sido la oveja más famosa del mundo: Dolly, el primer mamífero clonado (Campbell y col., 1996). Sin embargo, y aunque estudios científicos reportan haber tenido éxito en la producción de CsME (Tachibana y col., 2013), la generación de estas células es técnicamente desafiante (Karagiannis y col., 2018, 2019).

Durante mucho tiempo se pensó que el proceso de desarrollo y diferenciación era unidireccional, desde el óvulo fertilizado hasta las distintas células del cuerpo. En palabras del científico y divulgador Andrew Steele, en retrospectiva, debería haber sido obvio que no es así. Después de todo, el milagro del embarazo requiere que dos células adultas hiper-especializadas (un óvulo y un espermatozoide) se fusionen y al hacerlo den marcha atrás al reloj para ser de nuevo, un óvulo fertilizado con capacidad recuperada para convertirse en cualquier célula del cuerpo humano (Steele, 2022).

De las ranas de Gurdon, a la oveja de Wilmut y Campbell, los investigadores habían sospechado por largo tiempo, de la existencia de factores misteriosos en las células del óvulo que pueden reprogramar el núcleo de una célula adulta hasta llevarla a un estado embrionario. Pero estos factores permanecieron elusivos, hasta

que el científico japonés Shinya Yamanaka inició su búsqueda a final de los 1990 (Nair, 2012).

Yamanaka hipotetizó que la pluripotencialidad podría ser inducida en células somáticas por factores definidos, existentes en las células madre embrionarias y comenzó en su laboratorio la búsqueda de estos factores. De 24 factores iniciales, la búsqueda se redujo finalmente a 4: Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc, conocidos hoy en día como factores de Yamanaka, que fueron capaces de inducir la pluripotencialidad en fibroblastos fetales y adultos de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi 2014; Yamanaka, 2020).

Se designó a este nuevo tipo de célula pluripotencial, como células pluripotenciales inducidas o iPSCs (por sus siglas en inglés: induced pluripotent stem cells). Las células pluripotenciales inducidas humanas (hiPSCs) fueron generadas en 2007 (Yu y col., 2007; Tanabe y col., 2014; Takahashi, 2014; Yamanaka, 2020).

La inducción de células madre pluripotenciales (iPSCs), inició una era de oro para la medicina regenerativa debido a su capacidad de generar cualquier tipo de célula del cuerpo (Takahashi y Yamanaka, 2006). Este descubrimiento cimentó el concepto que la identidad celular es apenas un estado y que puede ser modificado por factores inductivos que sostienen el estado de la célula deseada. La subsecuente identificación de una variedad de tales factores permite la conversión directa de células a estados diferenciados sin alcanzar la pluripotencialidad. Aunque el uso de esta tecnología fue dirigido en un principio a la generación *in vitro* de células para trasplantes, su aplicación directa *in vivo* ha sido recientemente explorada y algunos ya

están en ensayos clínicos (Robbins y col., 2010; Gourronc y Klingelutz, 2012; Beyret y col., 2018).

La expectación por la promesa de las células inducidas es máxima, sin embargo, hay muchos desafíos que necesitan ser cubiertos a fin de ofertar esta tecnología al mayor número de pacientes. Los tres grandes problemas por estudiar son la tumorigenicidad, la inmunogenicidad y la heterogeneidad (Yamanaka, 2020).

Una ventaja importante de la PSCs, es su potencial de proliferación infinita, sin embargo, esta propiedad es una espada de doble filo, ya que, si células no diferenciadas o inmaduras son retenidas, estas células continúan proliferando después del trasplante, pudiendo resultar en teratomas o tumores. Lo mismo podría ocurrir si los factores de reprogramación permanecen activos en las células PS. Asimismo, la tumorigenicidad puede ser causada por mutaciones genéticas que ocurran durante el cultivo de las células PSCs (Yamanaka, 2020).

Por otro lado, el rechazo inmunitario ha sido objetado en esta terapia celular; las células procedentes del mismo paciente proporcionan una oportunidad sin precedentes para realizar trasplantes autólogos, sin embargo, se deben realizar más estudios en este campo. Por último, tenemos que considerar que cada línea de PSC es diferente a otra en cuanto a morfología, curva de crecimiento, expresión génica y propensión a diferenciarse en varios linajes, esta heterogeneidad constituye un obstáculo, si las líneas de iPSC presentan defectos en su diferenciación. En palabras del propio Yamanaka "Esta tecnología es aún muy joven, dentro de 10 años, esperamos haber creado un tratamiento efectivo, utilizando

células iPSC paciente-específicas. Esperamos también que esta tecnología conduzca a ensayos clínicos para enfermedades como el Parkinson y la degeneración macular" (Yamanaka, 2020).

Pero la ciencia no se detiene, y el descubrimiento de los factores de Yamanaka ha abierto las vías a otros modos de reprogramación. A fin de evitar los problemas mencionados anteriormente, los científicos han comprobado que la reprogramación parcial, mediante cortos ciclos de expresión de los factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM), mejoran las "huellas" de la edad, tanto a nivel celular como fisiológico en modelos animales (Ocampo y col., 2016).

Debemos considerar que las aberraciones asociadas a la edad son fundamentalmente el efecto de la entropía que afecta universalmente a toda la materia. Sujetos a la entropía toda la materia tiende al desorden, sin embargo, los seres vivos poseen una cualidad especial, la habilidad de mantener activamente un estado organizado. Desafortunadamente, en esta lucha, los seres vivos terminan perdiendo la batalla contra la entropía, el orden biológico se deteriora gradualmente manifestado como envejecimiento, y finalmente colapsa produciéndose la muerte (Beyret y col., 2018).

Además de los diversos factores que afectan este proceso del envejecimiento, incluidos los genéticos (mutaciones, acortamiento de los telómeros) y los metabólicos (autofagia, senolisis), recientemente la epigenética se ha convertido en un tema central en el proceso de envejecimiento mediante la demostración de que el perfil epigenético cambia durante el mismo.

Los primeros estudios en este campo se remontan a la década de los 40, cuando antes incluso de que se denominase como tal, Conrad Waddington y Ernst Hadorn comenzaron una amplia investigación centrada en la combinación de la genética con la biología del desarrollo. A raíz de este estudio Waddington, en 1942, fue la primera persona en acuñar el término epigenética el cual deriva de la palabra griega “**epigénesis**”, que originariamente describía la influencia de los procesos genéticos en el desarrollo (Waddington, 2012). Originalmente, el término epigenética fue acuñado para describir los cambios hereditables, que no eran mendelianos, pero, hoy en día el término ha evolucionado para referirse a toda la información no genómica almacenada en las células, incluida redes de genes, estructura de la cromatina y modificaciones post-transcripcionales de histonas (Kane y Sinclair, 2019).

Según el *National Human Genome Research Institute*, la **epigenética** es un campo de estudio centrado en los cambios del ADN que no implican alteraciones de la secuencia subyacente. Los nucleótidos del ADN y las proteínas que interactúan con el ADN pueden tener modificaciones químicas que cambian el nivel en el que los genes se activan y desactivan. Ciertas modificaciones epigenéticas se pueden transmitir de la célula progenitora a la célula hija durante la división celular o de una generación a la siguiente. El conjunto de todos los cambios epigenéticos en un genoma se llama **epigenoma**.

Parte de la información epigenética de las células se pierde como consecuencia de la reparación de roturas en la doble cadena del ADN, durante esa reparación, diferentes proteínas modificadoras de la cromatina

cambian de localización, desplazándose donde el ADN está dañado y alterando con ello la accesibilidad de la maquinaria de expresión genética en las regiones afectadas (Kane y Sinclair, 2019; Yang y col., 2023).

La organización genómica está determinada por la compleja estructura de la cromatina. Hay dos tipos de cromatina, la **eucromatina**, que está desenrollada y es accesible y transcripcionalmente activa y la **heterocromatina**, fuertemente enrollada y transcripcionalmente silente (Wallrath, 1998; Grewal y Moazed, 2003). La unidad básica es el nucleosoma, compuesto de 147 pares de bases enrolladas alrededor de un octámero de proteínas denominadas histonas (dos copias de H2A, H2B, H3 y H4) (Luger y col., 1997a, b; Hansen, 2002). Tanto las histonas como el ADN están sujetos a modificaciones químicas que afectan a la estructura de la cromatina y finalmente a la expresión de los genes.

La información epigenética original proviene de nuestros padres, pero puede verse alterada en función de nuestros hábitos de vida, nuestra alimentación, nuestros sentimientos y pensamientos. Todas estas interacciones van modificando esta expresión génica, haciendo que se “enciendan y apaguen” ciertos genes. Muchos de ellos solo modifican sutilmente nuestro organismo, pero otros pueden llegar a tener una gran influencia en nuestra salud y nuestra vida. Por ejemplo, algunos cambios epigenéticos pueden llegar a producir diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, reproductivas e inmunes (Lehmann y col., 2019; Pan y col., 2023; Yang y col., 2023). Regulando la red epigenética, hay factores que modifican a la cromatina, incluyendo tanto al ADN, como enzimas que modifican a las histonas, factores de

transcripción y los más recientemente identificados ARNs no codificantes (ARNnc).

La heterocromatina, transcripcionalmente inactiva, está caracterizada por la presencia de la proteína de la heterocromatina 1 (HP1), e histonas como la H1, la disminución de la acetilación en las histonas y un incremento en el marcador de histonas H3K9me3 (histona 3, tri-metilada en la lisina 9) (Oberdoerffer y Sinclair, 2007; Tsurumi y Li, 2012).

Conforme envejecemos y las células se dirigen o entran en senescencia, estos cambios incluyen una reducción global de la heterocromatina, con áreas específicas de la misma, conocidas como focos de heterocromatina asociada a la senescencia (senescent-associated heterochromatin foci, SAHF), los cuales están caracterizados por un incremento de HP1, marcas de H3K9me3, macroH2A entre otros (Narita y col., 2006). Asimismo, se producen cambios en el posicionamiento de los nucleosomas, reducción del corazón de histonas que constituye el nucleosoma y reemplazo de las histonas tradicionales por variantes de las mismas, tales como H3.3 (Kane y Sinclair, 2019). Marcas alteradas de las histonas como la disminución en las marcas represivas de histonas y un incremento en las marcas activas de histonas, la hipometilación global del ADN, cambios en la abundancia de ARNnc y relocalización de factores modificantes de la cromatina (Kane y Sinclair, 2019).

Los estudios de Douet y col. (2017) acerca de la pérdida de función genética en el desarrollo, el cáncer y la reprogramación de células somáticas han sugerido que el grupo de variantes de histonas macroH2A tienen una función importante en el mantenimiento de la organización nuclear

y la arquitectura de la heterocromatina. La pérdida de macroH2A conduce a defectos importantes en la organización nuclear, incluida una circularidad nuclear reducida, alteración de los nucléolos y una pérdida global de heterocromatina densa. Los dominios formados por secuencias repetidas cuando se agota el macroH2A se desorganizan, se expanden, se fragmentan y se re-expresan levemente. Adicionalmente, se requiere macroH2A para la interacción de secuencias repetidas con la proteína nucleoes estructural Lamin B1, por lo que una función importante de las variantes de histonas macroH2A es vincular la composición de los nucleosomas con la arquitectura de la cromatina de orden superior (Douet y col., 2017).

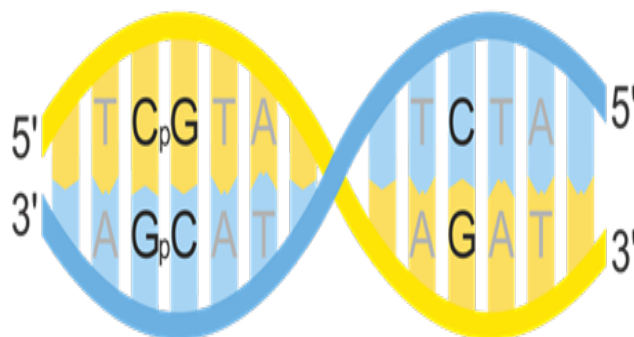
Más aún, la elucidación de los cambios en el patrón de la metilación del ADN relacionado con la edad ha acuñado el término "**reloj de metilación del ADN**" como un predictor preciso de la edad a nivel molecular (Petkovich y col., 2017), cambios en la estructura de la cromatina están correlacionados con los fenotipos relacionados con la edad en especies que van desde levaduras a humanos (Booth y Brunet, 2016). Las consecuencias de esos cambios epigenéticos incluyen un incremento en la inestabilidad genómica y distintos cambios en la expresión génica con la edad (Sinclair y col., 1995, 1998; Hu y col., 2014).

El término epigenética hace referencia al conjunto de elementos que regulan la expresión de los genes sin modificar la secuencia del ADN.

Sí y cómo, los cambios en la metilación del ADN contribuyen al envejecimiento, es objeto de una intensa investigación, pero poco se sabe al respecto (Pal y Tyler 2016).



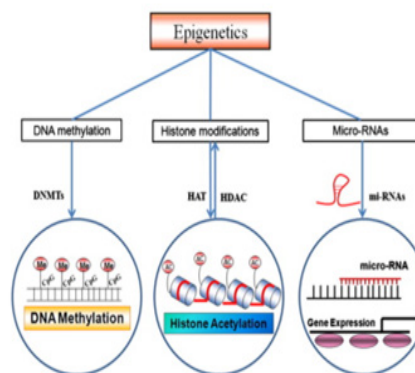
El *National Human Genome Research Institute* (cuyas siglas son NHGRI, en español Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano) lanzó el programa *Genomics of Gene Regulation* (GGR) a fin de descifrar el lenguaje de cómo y cuándo se encienden y apagan los genes. Los investigadores buscan estudiar la red de genes y sus vías en diferentes sistemas del cuerpo humano. Corazón de histonas en torno a los cuales se enrolla el ADN. Se destacan en amarillo las "marcas" de histonas. Imagen: Darryl Leja, *National Human Genome Research Institute* (www.genome.gov).



Un sitio CpG, es decir, una secuencia de nucleótidos " 5'-C-fosfato-G-3' ", indicado en una hebra de ADN (en amarillo). En la hebra de ADN inversa (en azul), se muestra el sitio 5'-CpG-3' complementario. Se indica también (a la derecha) un apareamiento de bases C-G entre las dos hebras de ADN, que no se deben confundir con un sitio CpG (Tomado de Wikipedia).

Mecanismos Epigenéticos

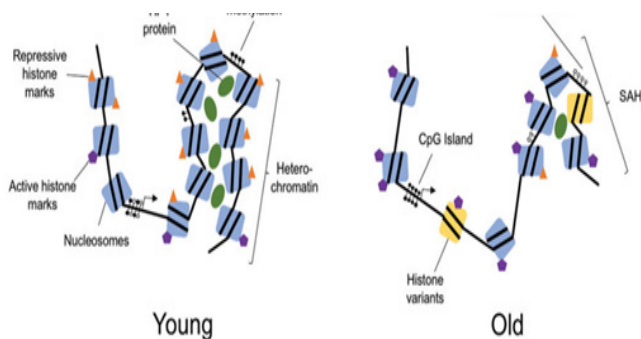
Cambios de la expresión de nuestro ADN sin que se modifique la secuencia genética



Transformando tu cuerpo y tu cerebro

www.banpro.es

www.humaning.es



Por ejemplo, la pérdida de metilación en los promotores de la integrina alpha L (ITGAL) y de la interleucina (IL)-17RC, conduce a una respuesta autoinmune y contribuye a la degeneración macular (Wei y col., 2012; Zhang y col., 2002), implicando que, al menos en sitios específicos, existen efectos patológicos de la reducción de la metilación del ADN.

En humanos, la metilación del ADN ocurre en residuos de citosina, para formar la 5-metilcitosina. Las Islas CpG son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos, la citosina en las islas CpG están desmetilados si los genes están expresándose. La presencia de múltiples sitios metilados en las islas CpG de promotores, causa el silenciamiento estable de genes. Asimismo, los cambios en la metilación son críticos para el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas en sitios específicos, esto es particularmente importante durante el desarrollo, silenciando genes en tejidos donde su expresión no es necesaria (Pal y Tyler, 2016).

Con la edad, hay una reducción global en la heterocromatina, en particular, en las regiones que son normalmente heterocromáticas como los telómeros y los pericentromeros, los cuales se vuelven más eucromáticos en todos los organismos, desde levaduras a los mamíferos (Sinclair y col., 1995, 1998).

Durante el envejecimiento, las histonas son modificadas post-transcripcionalmente por una variedad de enzimas, promoviendo o inhibiendo el reclutamiento de estos complejos se efectúa el control de la expresión de los genes (Lauberth y col., 2013; Pal y Tyler, 2016). También facilitan la reparación del ADN, su replicación y la condensación de la cromatina (Pal y Tyler, 2016). Las marcas de histonas que están asociadas con el silenciamiento transcripcional y la formación de heterocromatina incluyen H3K9me3, H3K27me3, H4K20me2 and H3K56ac. Por el contrario, algunas marcas asociadas a una transcripción activa son H3K4me3 y H4K16ac. Conforme los organismos envejecen, hay claros cambios tanto en los patrones globales como específicos en las marcas de histonas (Kane y Sinclair, 2019).

La función de cada tipo celular en el cuerpo está epigenéticamente programada durante su ontogenia. La reprogramación celular **consiste en restablecer las llamadas marcas epigenéticas del cuerpo. La reprogramación epigenética puede ser el "elixir de la vida"** que logre prolongar significativamente la esperanza de vida humana y revertir el envejecimiento. El investigador de Altos Lab, el Dr. Izpisúa Belmonte, advierte que los ajustes epigenéticos no **"harán que vivamos para siempre"**, pero podrían retrasar nuestra fecha de caducidad. En su opinión, no hay razón para pensar que no podemos prolongar la vida humana entre

otros 30 y 50 años, como mínimo. De hecho, el científico afirma: **"Creo que el primer niño que vivirá hasta los 130 años ya está entre nosotros. Estoy convencido de que ya ha nacido"** (Hayasaki, 2019).

Dado el poder de los 4 factores de Yamanaka, ¿podemos usarlos para resetear el viejo epigenoma?. De hecho, la reprogramación de células somáticas a iPSCs, no solo revierte el reloj biológico, sino también el reloj cronológico, ya que remueve las huellas de la edad. Esas observaciones muestran que la identidad celular y la edad no son puntos finales irreversibles sino estados celulares dictados por el código epigenético en un momento dado, y que este código puede ser reprogramado (Kane y Sinclair, 2019; Beyret y col., 2018; Chiavellini y col., 2021).

Dado que, se sabe que la reprogramación y subsecuente re-diferenciación de las iPSCs, requiere de múltiples divisiones celulares y conversión de identidad celular a través de múltiples estados de potencial neoplásico tales como la formación de teratomas, por lo que esta tecnología no puede ser aplicada *in vivo* todavía. Este obstáculo parece poder resolverse mediante el desarrollo de ciclos parciales de reprogramación. Una estrategia basada en uso de ciclos múltiples de reprogramación interrumpida en los cuales la transcripción de los genes OSKM se enciende y se apaga brevemente mediante promotores regulables. En cada ciclo, el proceso parece borrar algunas marcas epigenéticas de la edad, manteniendo, sin embargo, las marcas epigenéticas de la identidad celular (Lehmann y col., 2019; Chiavellini y col., 2021).

Hasta el momento hay pocos estudios documentados sobre la implementación de estos ciclos parciales de reprogramación

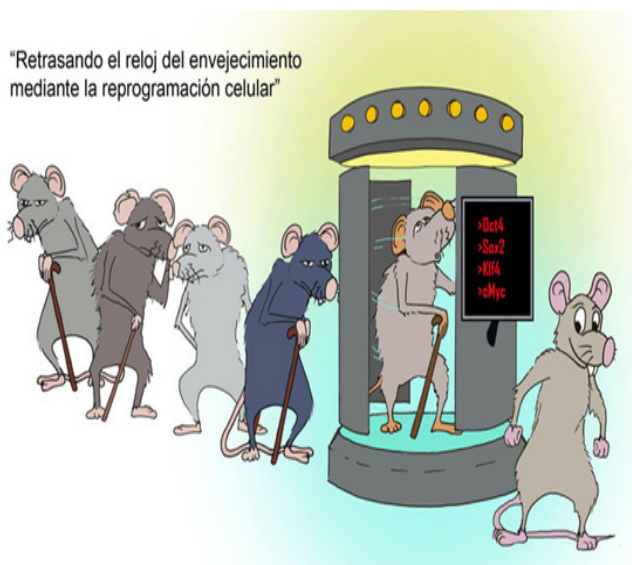
in vivo. El grupo de Izpisúa Belmonte demostró que la inducción cíclica de OSKM en un modelo animal de ratones transgénicos con el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, incrementó la vida media, revirtió de modo significativo el fenotipo asociado a la edad, con mejoras significativas en la apariencia externa y rejuveneció parcialmente algunos tejidos, aunque no rejuveneció a los ratones en sí mismos (Ocampo y col., 2016).

En otro estudio, la reprogramación cíclica parcial en el hipocampo de ratones de mediana edad revirtió parcialmente la reducción, dependiente de la edad, de la trimetilación en la histona H3K9 (H3K9me3). El tratamiento incrementó los niveles de células migratorias en el giro dentado, pudiendo resultar en la supervivencia neuronal de las neuronas durante su maduración y en mayor plasticidad en las neuronas maduras. Asimismo, esos cambios celulares fueron acompañados por una mejoría en las pruebas de reconocimientos de objetos (Rodríguez-Matellán y col., 2020).

En un tercer estudio, Lu y col. (2020), utilizaron el ojo como modelo de tejido del Sistema Nervioso Central y mostraron que, la expresión de los genes *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* (OSK) (sin c-Myc), por cinco días, en células ganglionares retinales de ratón rejuveneció los patrones de metilación del ADN, restauró los patrones de metilación del ADN, restauró la densidad de los axones a nivel control, promovió la regeneración axonal tras injuria y revirtió la pérdida de visión tanto en un modelo de glaucoma en ratones como en ratones viejos de 12 meses de edad (Lu y col., 2020; Reddy y col., 2021).

La edad fue considerada por mucho tiempo inmutable. En la década del 2000, comenzaron a emerger las primeras

intervenciones para combatirla, primero en organismos inferiores y después en ratones. La restricción calórica, pequeñas moléculas y la sobre-expresión de reguladores epigenéticos como SIRT1, se han mostrado efectivos para enlentecer e incluso revertir los cambios epigenéticos y el declino físico durante la edad (Oberdoerffer y Sinclair, 2007; Field y Adams, 2017). Una nueva aproximación, la reprogramación genética *in vivo*, es una nueva y promisoriosa avenida que transitar, una vez soslayadas las dificultades tecnológicas (Beyret y col., 2018; Reddy y col., 2021).



Entrevista a Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Disponible: <https://tecnologia.elbierzodigital.com/alargan-la-vida-ratones-gracias-la-reprogramacion-celular/>

Conclusiones

La esperanza de vida humana ha incrementado más de dos veces en el mundo desarrollado en los dos siglos pasados, resultando en un aumento dramático en la población anciana. La edad avanzada está asociada a un declino fisiológico que finalmente conduce a la incapacitación del individuo y a un incremento en la predisposición a enfermedades. El

envejecimiento es el factor de riesgo más importante para la mayoría de las enfermedades crónicas. El hecho que nuestra salud no está siendo equiparable con el incremento en la expectativa de vida, resulta en más tiempo de deficiencia fisiológica en las sociedades que están envejeciendo, por lo que la investigación en este campo está en expansión atrayendo la atención de la industria y grandes inversores. Por lo tanto, es lógico pensar en que hay un gran interés socio económico, médico y científico en encontrar estrategias que conduzcan a una fisiología óptima, extendiendo **“la vida saludable”**

En este punto, se ha logrado un gran progreso, sin embargo, no existe una teoría unificada que pueda explicar el proceso de envejecimiento y muchas dudas permanecen abiertas, tanto a nivel celular como de organismos. La cuestión de, si es posible atacar el proceso del envejecimiento en su núcleo, o, si son necesarias una combinación de aproximaciones, permanece para ser resuelta en un futuro, que esperamos próximo.

Referencias Bibliográficas

- Aguayo-Mazzucato C, Andle J, Lee TB Jr, Midha A, Talemal L, Chipashvili V, Hollister-Lock J, van Deursen J, Weir G, Bonner-Weir S. 2019. Acceleration of β Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metab* 30(1):129-142.
- Arora I, Sharma M, Sun LY, Tollefsbol TO. 2020. The epigenetic link between polyphenols, aging and age-related diseases. *Genes* 11 (9):1094.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479:232–236.
- Beyret E, Martínez Redondo P, Platero Luengo A, and Izpisua Belmonte JC. 2018. Elixir of life: thwarting aging with regenerative reprogramming. *Circ Res* 122(1): 128–141.
- Boland B, Yu WH, Corti O, Mollereau B, Henriques A, Bezard E, Pastores GM, Rubinsztein DC, Nixon RA, Duchen MR, Mallucci GR, Kroemer G, Levine B, Eskelinen EL, Mochel F, Spedding M, Louis C, Martin OR, Millan MJ. 2018. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 17(9):660-688.
- Booth LN, Brunet A. 2016. The Aging Epigenome. *Mol Cell* 62:728-44.
- Cai SQ, Zhang Q, Zhao X H, Shi J. 2021. The *in vitro* anti-inflammatory activities of galangin and quercetin towards the LPS-injured rat intestinal epithelial (IEC-6) cells as affected by heat treatment. *Molecules* 26 (24):7495.
- Campbell KHS, Pascualino L, Otaegui PJ, Wilmut I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer *Reviews of Reproduction* 1:40-46.
- Cao Y, Zhao H, Wang Z, Zhang C, Bian Y, Liu X, Zhang C, Zhang X, Zhao Y. 2020. Quercetin promotes *in vitro* maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death Dis* 11(11):965.
- Chen Y, Hamidu S, Yang X, Yan Y, Wang Q, Li L, Oduro PK, Li Y. 2022. Dietary supplements and natural products: An update on their clinical effectiveness and molecular mechanisms of action during accelerated biological aging. *Front Genet* 13:880421.
- Chiavellini P, Canatelli-Mallat M, Lehmann M, Gallardo MD, Herenu CB, Cordeiro JL, Clement J, Goya RF. 2021. Research Perspective Aging and rejuvenation - a modular epigenome model. *Aging (Albany NY)* 13(4):4734-4746.
- Costas MA, Rubio MF. 2017. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *MEDICINA (Buenos Aires)* 77: 314-320.
- Crimmins EM. 2015. Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise. *Gerontologist* 55:901–11.
- Daolin T, Rui K, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G. 2019. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* 29:347–364.
- Das A, Huang GX, Bonkowski MS, Longchamp A, Li C, Schultz MB, Kim LJ, Osborne B, Joshi S, Lu Y, Treviño-Villarreal JH, Kang MJ, Hung TT, Lee B, Williams EO, Igarashi M, Mitchell JR, Wu LE, Turner N, Arany Z, Guarente L, Sinclair DA. 2018. Impairment of an Endothelial NAD⁺-H₂S Signaling Network Is a Reversible Cause of Vascular Aging. *Cell* 22;173(1):74-89.e20.

- Diepvens K, Westerterp KR, Westerterp-Plantenga MS. 2007. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(1): R77-R85.
- Dikic I, Elazar Z. 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:349-364.
- Douet J, Corujo D, Malinverni R, Renaud J, Sansoni V, Posavec Marjanović M, Cantariño N, Valero V, Mongelard F, Bouvet P, Imhof A, M, Buschbeck M. 2017. MacroH2A histone variants maintain nuclear organization and heterochromatin architecture. *J Cell Science* 130:1570-158).
- Ehninger D, Neff F, Xie K. 2014. Longevity, aging and rapamycin. *Cell Mol Life Sci* 71(22):4325-46.
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11(11):1305-14.
- Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, Primessnig U, Stekovic S, Pendl T, Harger A, Schipke J, Zimmermann A, Schmidt A, Tong M, Ruckenstuhl C, Dammbroeck C, Gross AS, Herbst V, Magnes C, Trausinger G, Narath S, Meinitzer A, Hu Z, Kirsch A, Eller K, Carmona-Gutierrez D, Büttner S, Pietrocola F, Knittelfelder O, Schrepfer E, Rockenfeller P, Simonini C, Rahn A, Horsch M, Moreth K, Beckers J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Neff F, Janik D, Rathkolb B, Rozman J, de Angelis MH, Moustafa T, Haemmerle G, Mayr M, Willeit P, von Frieling-Salewsky M, Pieske B, Scorrano L, Pieber T, Pechlaner R, Willeit J, Sigrist SJ, Linke WA, Mühlfeld C, Sadoshima J, Dengjel J, Kiechl S, Kroemer G, Sedej S, Madeo F. 2016. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med* 22: 1428-1438.
- Elhassan Y, Kluckova K, Fletcher RS, Schmidt MS, Garten A, Doig CL, Cartwright DM, Oakey L, Burley CV, Jenkinson N, Wilson M, Lucas SJE, Akerman I, Seabright A, Lai Y-Ch, Tennant DA, Nightingale P, Wallis GA, Manolopoulos KN, Brenner C, Philp A, Lavery GG. 2019. Nicotinamide riboside augments the aged human skeletal muscle NAD⁺ metabolome and induces transcriptomic and anti-inflammatory signatures. *Cell Rep* 28(7):1717-1728.e6.
- Ferrara-Romeo I, Martínez P, Saraswati S, Whittemore K, Graña-Castro O, Thelma Poluha L, Serrano R, Hernandez-Encinas E, Blanco-Aparicio C, Maria Flores J, Blasco MA. 2020. The mTOR pathway is necessary for survival of mice with short telomeres. *Nat Commun* 11(1):1168.
- Field AE, Adams PD. 2017. Targeting chromatin aging - The epigenetic impact of longevity-associated interventions. *Exp Gerontol* 94:29-33
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36(13):1811-1836.
- Gao L, Liu X, Luo X, Lou X, Li P, Li X, Liu X. 2023. Antiaging effects of dietary supplements and natural products. *Front Pharmacol* 14:1192714.
- Gourronc FA, Klingelhutz AJ. 2012. Therapeutic opportunities: telomere maintenance in inducible pluripotent stem cells. *Mutat Res* 730:98-105.
- Grewal SI, Moazed D. 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301(5634):798-802.
- Guo JY, White E. 2016. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81:73-78.
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143(4):508-25.
- Hansen M, Kennedy BK. 2016. Does Longer Lifespan Mean Longer Healthspan?. *Trends Cell Biol.* 26:565-8.
- Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. 2002. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:361-92.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460(7253):392-5.

- Hayasaki E. 2019. Un científico español podría haber encontrado la fuente de la juventud. Entrevista Juan Carlos Izpisua Belmonte. MIT Technology Review. Disponible: <https://www.technologyreview.es/s/11357/un-cientifico-espanol-podria-haber-encontrado-la-fuente-de-la-juventud>
- He S, Sharpless NE. 2017. Senescence in Health and Disease. *Cell* 169(6):1000-1011.
- Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, Herrmann SM, Jensen MD, Jia Q, Jordan KL, Kellogg TA, Khosla S, Koerber DM, Lagnado AB, Lawson DK, LeBrasseur NK, Lerman LO, McDonald KM, McKenzie TJ, Passos JF, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Saadiq IM, Schaefer KK, Textor SC, Victorelli SG, Volkman TL, Xue A, Wentworth MA, Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Tchkonja T, Kirkland JL. 2019. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47:446-456.
- Hofer SJ, Liang Y, Zimmermann A, Schroeder S, Dengjel J, Kroemer G, Eisenberg T, Sigrist SJ, Madeo F. 2021. Spermidine induced hyposination preserves mitochondrial and cognitive function during aging. *Autophagy* 17: 2037-2039.
- Hosseini A, Razavi BM, Banach M, Hosseinzadeh H. 2021. Quercetin and metabolic syndrome: A review. *Phytother Res* 35 (10):5352-5364.
- Hu Z, Chen K, Xia Z, Chavez M, Pal S, Seol JH, Chen CC, Li W, Tyler JK. 2014. Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging. *Genes Dev* 28:396-408.
- Inaba M, Yamashita YM. *Cell Stem Cell*. 2012. Perspective Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness *Cell Stem Cell* 11(4):461-9.
- Jia Z, Nallasamy P, Liu D, Shah H, Li J Z, Chitrakar R, Si H, McCormick J, Zhu H, Zhen W, Li Y. 2015. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- α -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing I κ B α /NF- κ B signaling pathway. *J Nutr Biochem* 26 (3):293-302.
- Jin S, White E. 2007. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3: 28-31.
- Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G. 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11(5):390-401.
- Kane AE y Sinclair DA. 2019. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 54(1):61-83.
- Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. 2011. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* 6(8):e23567.
- Kang SG, Lee GB, Vinayagam R, Do GS, Oh SY, Yang SJ, Kwon JB, Singh M. 2022. Anti-inflammatory, antioxidative, and nitric oxide-scavenging activities of a quercetin nanosuspension with polyethylene glycol in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Molecules* 27 (21):7432.
- Karagiannis P, Nakauchi A, Yamanaka S. 2018. Bringing Induced Pluripotent Stem Cell Technology to the Bedside. *JMA Journal* 1(1):6-14.
- Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Masaya Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K. 2019. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiol Rev* 99: 79-114.
- Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, Fang EF. 2017. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms. *Trends Neurosci* 40: 151-66.
- Khosla S, Farr JN, Tchkonja T, Kirkland JL. 2020. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat Rev Endocrinol* 16(5):263-275.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn Jr WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5(4):539-545.
- Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. 2013. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest* 123(3):980-9.
- Lauberth SM, Nakayama T, Wu X, Ferris AL, Tang Z, Hughes SH, Roeder RG. 2013. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* 152(5):1021-36.
- Lehmann M, Canatelli-Mallat M, Chiavellini P, Cónsole GM, Gallardo MD, Goya RG. 2019. Partial reprogramming as an emerging strategy for safe induced cell generation and rejuvenation. *Curr Gene Ther* 19:248-54.

- Levine B, Kroemer G. 2019. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176(1-2):11-42.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153(6):1194-217.
- López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. 2016. Metabolic Control of Longevity. *Cell* 166(4):802-821.
- López-Otín C, Kroemer G. 2021. Hallmarks of Health. *Cell* 184(1):33-63.
- Lu Y, Brommer B, Tian X, Krishnan A, Meer M, Wang C, Vera DL, Qiurui Zeng Q, Yu D, Bonkowski MS, Yang J-H, Zhou S, Hoffmann EM, Karg MM, Schultz MB, Kane AE, Davidsohn N, Korobkina E, Chwalek K, Rajman LA, Church GM, Hochedlinger K, Gladyshev VN, Horvath S, Sinclair DA. 2020. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588:124-129.
- Luciani A, Vilella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, Gavina M, Pulze L, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, D'Apolito M, Guido S, Masliah E, Spencer B, Quarantino S, Raia V, Ballabio A, Maiuri L. 2010. Defective CFTR induces aggressive formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12: 863-75.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. 1997a. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol* 272(3):301-11.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997b. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648):251-60.
- Madeo F, Bauer MA, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G. 2019. Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans?". *Autophagy* 15(1):165-168.
- Maruzs T, Simon-Vecsei Z, Kiss V, Csizmadia T, Juhász G. 2019. On the Fly: Recent Progress on Autophagy and Aging in *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* 7:140.
- Mathur S, Hoskins C. 2017. Drug development: Lessons from nature. *Biomed Rep* 6(6):612-614.
- Medina CB, Mehrotra P, Arandjelovic S, Perry JSA, Guo Y, Morioka S, Barron B, Walk SF, Ghesquière B, Krupnick AS, Lorenz U, Ravichandran KS. 2020. Metabolites released from apoptotic cells act as novel tissue messengers. *Nature* 580(7801): 130-135.
- Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging* 3:716-732.
- Minois N. 2014. Molecular Basis of the 'Anti-Aging' Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines-A Mini-Review. *Gerontology* 60, 319-326.
- Mitalipov S, Wolf D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114:185-99.
- Nair P. 2012. Profile of Shinya Yamanaka. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(24):9223-512.
- Narita M, Krizhanovsky V, Nuñez S, Chicas A, Hearn SA, Myers MP, Lowe SW. 2006. A novel role for high-mobility group a protein in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126(3):503-14.
- Oberdoerffer P, Sinclair DA. 2007. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9):692-702.
- Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, Li M, David Lam D, Kurita M, Beyret E, Araoka T, Vazquez-Ferrer E, Donoso D, Roman JL, Xu J, Rodriguez Esteban C, Nuñez G, Nuñez Delicado E, Campistol JM, Guillen I, Guillen P, Izpisua JC. 2016. *In vivo* Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 167(7):1719-1733.
- Ohsumi Y. 2014. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 24: 9-23.
- Pal S, Tyler JK. 2016. Epigenetics and aging. *Sci Adv* 2(7):e1600584.
- Pan C, Fangfang Zhou F, Zhang L. 2023. The loss of epigenetic information: not only consequences but a cause of mammalian aging. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8:140.
- Perrone D, Fuggetta M P, Ardito F, Cottarelli A, De Filippis A, Ravagnan G, De Maria S, Lo Muzio L. 2017. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) and its properties in oral diseases. *Exp Ther Med* 14(1):3-9.
- Petkovich DA, Podolskiy DI, Lobanov AV, Lee SG, Miller RA, Gladyshev VN. 2017. Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions. *Cell Metab* 25:954-960.
- Pucciarelli S, Moreschini B, Micozzi D, De Fronzo GS, Carpi FM, Polzonetti V, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. 2012. Spermidine and spermine are enriched in whole blood of nona/centenarians. *Rejuven Res* 15:590- 595.
- Rando TA, Chang HY. 2012. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 148(1-2):46-57.

- Reddy P, Memczak S, Izpisua Belmonte JC. 2021. Unlocking Tissue Regenerative Potential by Epigenetic Reprogramming Cell Stem. *Cell* 28(1):5-7.
- Robbins RD, Prasain N, Maier BF, Yoder MC, Mirmira RG. 2010. Inducible pluripotent stem cells: not quite ready for prime time? *Curr Opin Organ Transplant* 15:61-7.
- Robinton DA, Daley GQ. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481(7381):295-305.
- Rodríguez Pérez JC. 2011. The role of mTOR inhibitors in renal diseases. *Nefrología* 31(3):251-5.
- Rodríguez-Matellán A, Alcazar N, Hernández F, Serrano M, Ávila J. 2020. *In vivo* reprogramming ameliorates aging features in dentate gyrus cells and improves memory in mice. *Stem Cell Reports* 15:1056-66.
- Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. 2011. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 377(9759):31-41.
- Santhiravel S, Bekhit AEA, Mendis E, Jacobs JL, Dunshea FR, Rajapakse N, Ponnampalam EN. 2022. The impact of plant phytochemicals on the gut microbiota of humans for a balanced life. *Int J Mol Sci* 23(15):8124.
- Sinclair DA, Mills K, Guarente L. 1995. Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochem Sci* 23(4):131-4.
- Sinclair D, Mills K, Guarente L. 1998. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 52:533-60.
- Steele A. 2022. Eternos: La nueva ciencia para cumplir años sin envejecer. Editorial GeoPlaneta CIENCIA. ISBN-13:978-8408249320.
- Strong R, Miller RA, Astle CM, Floyd RA, Flurkey K, Hensley KL, Javors MA, Leeuwenburgh C, Nelson JF, Ongini E, Nadon NL, Warner HR, Harrison DE. 2008. *Aging Cell* 7(5):641-650.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S. 2013. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153(6):1228-38.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takahashi K. 2014. Cellular Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(2): a018606.
- Tanabe K, Takahashi K, Yamanaka S. 2014. Induction of pluripotency by defined factors *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 90(3): 83-96.
- Tsurumi A, Li WX. 2012. Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics* 7(7):680-8.
- Waddington CH. 1942. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41(1):10-3.
- Wallrath LL. 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* 8(2):147-53.
- Wanke V, Cameroni E, Uotila A, Piccolis M, Urban J, Loewith R, De Virgilio C. 2008. Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol Microbiol* 69(1):277-285.
- Wei L, Liu B, Tuo J, Shen D, Chen P, Li Z, Liu X, Ni J, Dagur P, Sen HN, Jawad S, Ling D, Park S, Chakrabarty S, Meyerle C, Agron E, Ferris FL 3rd, Chew EY, McCoy JP, Blum E, Francis PJ, Klein ML, Guymer RH, Baird PN, Chan CC, Nussenblatt RB. 2012. Hypomethylation of the IL17RC promoter associates with age-related macular degeneration. *Cell Rep* 2(5):1151-8.
- Wu J, Izpisua Belmonte JC. 2016. Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell* 165(7):1572-1585.
- Yamanaka S. 2020. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 27(4):523-531.
- Yang J-H, Hayano M, Griffin PT, Amorim JA, Bonkowski MS, Apostolides JK, Salfati EL, Blanchette M, Munding EM, Bhakta M, Chew YC, Guo W, Yang X, Maybury-Lewis S, Tian X, Ross JM, Coppotelli G, Meer MV, Rogers-Hammond R, Vera DL, Lu YR, Pippin JW, Creswell ML, Dou Z, Xu C, Mitchell SJ, Das A, O'Connell BL, Thakur S, Kane AK, Su Q, Mohri Y, Nishimura EK, Schaevez L, Garg N, Balta AM, Rego MA, Gregory-Ksander M, Jakobs TC, Zhong L, Wakimoto H, El Andari J, Grimm D, Mostoslavsky R, Wagers AJ, Tsubota K, Bonasera SJ, Palmeira CM, Seidman JG, Seidman CE, Wolf NS, Kreiling JA, Sedivy JM, Murphy GF, Green RE, Garcia BA, Berger SL, Oberdoerffer P, Shankland SJ, Gladyshev VN, Ksander BR, Pfenning AR, Rajman LA, Sinclair DA. 2023. Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell* 186(2):305-326.e27.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007.

- Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
- Yu X, Li G. 2012. Effects of resveratrol on longevity, cognitive ability and aging-related histological markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Exp Gerontol* 47 (12):940-949.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 10(68):1-22.
- Zhang Y, Toh L, Lau P, Wang X. 2012. Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Is a Novel Target of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Human Cancer. *J Biol Chem.* 287(39): 32494-32511.



Dermatoscopia ungueal y la biopsia excisional en la caracterización de la Melanoniquia: un análisis morfométrico

Nail dermoscopy and excisional biopsy in the characterization of Melanonychia: a morphometric analysis

SANDRA PAOLA JARAMILLO¹, MIGUEL ALEJANDRO LÓPEZ², MARÍA ALEJANDRA DA SILVA³, MARCO ALVAREZ⁴

Resumen

La pigmentación de la lámina ungueal ha sido descrita con el término melanoniquia que, en la mayoría de los casos, se manifiesta como un conjunto de bandas longitudinales hiperpigmentadas con carácter de variabilidad morfológica; una variabilidad hasta ahora poco analizada. En el presente trabajo se caracterizó la melanoniquia de lesión asintomática pigmentada subungueal en hallux izquierdo, de 10 años de evolución. Se hizo uso de la dermatoscopia ungueal y de la biopsia excisional pre e intraoperatoria. Los datos fueron analizados por densitometría de las bandas longitudinales y la morfometría de la histopatología ungueal, acompañado de su respectivo tratamiento estadístico. Los resultados muestran un patrón longitudinal atípico de 9 bandas pigmentadas, con un gradiente de valores medios de densidad colorimétrica, en unidades de píxeles/mm², equivalentes a $136 \pm 5,6$ de grises oscuros, $157 \pm 4,5$ de negros y $130 \pm 5,6$ de grises claros. El borde libre presentó pigmentación únicamente de las capas inferiores. El tejido ungueal presentó una aglutinación asimétrica de la melanina cuyo índice de circularidad estimado fue de $72,50 \pm 11,97$ %. Se concluye que con el uso de la dermatoscopia ungueal y de la biopsia excisional, acompañadas de técnicas de análisis de imágenes digitales por morfometría, se podrían generar parámetros tales como, el índice de densidad colorimétrica de las bandas longitudinales, así como el índice de aglutinación de la melanina ungueal que, pudieran a su vez ser interpretados como índices predictivos en la evolución de un posible proceso tumoral en una melanoniquia de alto grado de sospecha de malignidad.

Palabras clave: Melanoniquia, dermatoscopia, biopsia excisional, densitometría, morfometría, análisis de imagen

Abstract

The pigmentation of the nail plate has been described with the term melanonychia, which, in most cases, manifests itself as a set of hyperpigmented longitudinal bands with a character of morphological variability, a variability little analyzed until now. In the present work, melanonychia was characterized as an asymptomatic subungual pigmented lesion in the left hallux with a history of 10 years. Nail dermoscopy and pre and intraoperative excisional biopsy were used. The data were analyzed by densitometry of longitudinal bands and morphometry of nail histopathology, accompanied by their respective statistical treatment. The results show an atypical longitudinal pattern of 9 pigmented bands, with a gradient of average colorimetric density values in units of pixels/mm², equivalent to 136 ± 5.6 dark grays, 157 ± 4.5 blacks, and 130 ± 5.6 light grays. The free edge showed pigmentation only in the lower layers. The nail tissue presented an asymmetric agglutination of melanin, whose estimated circularity index was $72.50 \pm 11.97\%$. It is concluded that with the use of nail dermoscopy and excisional biopsy, accompanied by digital image analysis techniques by morphometry, parameters such as the colorimetric density index of the longitudinal bands and the agglutination index of nails could be generated nail melanin, that could be interpreted as predictive indices in the evolution of a possible tumor process in a melanonychia with a high degree of suspicion of malignancy.

Keywords: Melanonychia, dermoscopy, excisional biopsy, densitometry, morphometry, image analysis

¹ Médico Dermatóloga. Directora Médico del Centro Clínico Dermatológico SP C.A. Caracas –Venezuela. Correspondencia: centroclinicodermatologicosp@gmail.com ²Médico Dermatólogo adjunto al Departamento de Dermatología del Hospital Militar Universitario “Dr. Carlos Arvelo”. Universidad Central de Venezuela ³Médico Dermatopatóloga del Hospital Militar Universitario “Dr. Carlos Arvelo”. Universidad Central de Venezuela ⁴Sección de Microscopía. Instituto Anatómico. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela

Orcid: [0009-0002-8385-8302](https://orcid.org/0009-0002-8385-8302)

²[0000-0002-9681-0328](https://orcid.org/0000-0002-9681-0328)

³[0009-0001-3275-4910](https://orcid.org/0009-0001-3275-4910)

⁴[0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.5.17](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.5.17)

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

Recepción: 06/11/2023

Aprobación: 24/11/2023

Introducción

La pigmentación de la lámina ungueal ha sido descrita con el término melanoniquia que, en la mayoría de los casos, se manifiesta como un conjunto de bandas longitudinales hiperpigmentadas de tonalidades negra, marrón y gris, secundarias al depósito de melanina en la lámina ungueal y que le confiere el carácter de variabilidad morfológica; una variabilidad hasta el presente poco analizada. El pigmento puede proceder de fuentes exógenas o endógenas y abarcar toda la lámina ungueal, o con mayor frecuencia aparecer como bandas longitudinales. La variabilidad morfológica se expresa a través del número de bandas, de su color e intensidad, así como por las características del borde; generalmente asociadas con alteraciones de la lámina ungueal (Singal y Bisherwal, 2020). Dicha variabilidad ha preocupado a los dermatólogos y patólogos ya que, ha de ser considerada al definir un adecuado protocolo clínico de intervención que aminore el riesgo de generar una distrofia residual, de lo cual dependerá la obtención de un diagnóstico no erróneo (Alessandrin y col., 2021). La presentación clínica más común de la melanoniquia es la estriación longitudinal, con una heterogeneidad que, hasta donde se conoce, ha sido poco analizada, ya que su etiología ha sido difícil de precisar debido a la variabilidad anatómica de la hiperpigmentación. Es por ello que, particularmente en adultos, cuando la pigmentación se localiza en un solo hallux, el examen histopatológico y la biopsia, siguen representando el estándar de oro para un diagnóstico definitivo (Baran, 1993). La melanoniquia puede ser un signo temprano de melanoma ungueal, por lo cual el abordaje adecuado es de gran

relevancia. Auxiliares diagnósticos como la dermatoscopia y el estudio histopatológico son útiles para precisar la etiología y definir el tratamiento. En tal sentido, la dermatoscopia ungueal se ha destacado como una técnica de utilidad en el estudio de las melanoniquia longitudinales ya que facilita la identificación de los signos clínicos que pueden ser orientadores sobre el grado de compromiso que, para la salud presenta una determinada melanoniquia (Starace y col., 2019). La dermatoscopia ungueal intraoperatoria, realizada una vez que se retira la placa ungueal, puede, además, mejorar la precisión para localizar el origen de la hiperpigmentación que, en la mayoría de los casos ha sido tipificado como precursor de melanoma (Flores-Terry y col., 2018). Por ello, para un adecuado abordaje clínico de esta patología, que incluya un protocolo de caracterización de la melanoniquia y que permita inferir, a nivel celular, sobre la posible activación o no de la población de melanocitos de la placa ungueal, resulta relevante. Esto pudiera contribuir a establecer, en el sujeto de estudio, la diferencia entre la pigmentación melanocítica de la no melanocítica. Por otra parte, resulta prioritario también una apropiada técnica para la obtención de la biopsia, pensada en función del alto grado de sospecha, siempre presente en el médico tratante, de una patogenia tumoral (Tan y col., 2007; Göktay y col., 2015; Perrin y col., 1997). En el presente trabajo se caracterizó la melanoniquia de lesión asintomática pigmentada subungueal en hallux izquierdo de 10 años de evolución, haciendo uso de la dermatoscopia ungueal y de biopsia excisional pre e intraoperatoria, acompañado de un análisis densitométrico y morfometría de la histopatología ungueal, con su respectivo tratamiento estadístico.

Materiales y Métodos

MUESTRA

La muestra consistió en una lesión ungueal pigmentada asintomática ubicada en hallux izquierdo, proveniente de paciente masculino de 34 años, de 10 años de evolución, con signo de Hutchinson negativo que se infiere por la ausencia de extensión del pigmento melánico hacia la piel adyacente a la lámina ungueal. No se conocieron antecedentes patológicos, ni sospecha debatida entre un nevus displásico subungueal vs. un melanoma maligno.

DERMATOSCOPIA DE LA LÁMINA UNGUEAL

La dermatoscopia fue realizada sobre el área pigmentada de la lámina ungueal, colocando el dermatoscopio sobre toda la porción visible de la unidad ungueal. Se utilizó la tecnología de luz polarizada, con inmersión en gel como una condición pre e intraoperatoria. El gel es fundamental ya que aumenta la visibilidad a través de la placa ungueal. Bajo la condición preoperatoria, se hizo énfasis en la observación del tipo de borde y de las características de la matriz ungueal. Bajo la condición intraoperatoria, se hizo énfasis en las observaciones de la asimetría y las tonalidades de la pigmentación. Se realizaron las observaciones respectivas sobre la intensidad de tonalidades de las bandas de color marrón oscuro, negro y marrón claro. Todas las imágenes obtenidas fueron sometidas al respectivo análisis cuali y cuantitativo.

BIOPSIA EXCISIONAL

La biopsia excisional de la lesión ungueal fue realizada en dos tiempos operatorios. En un primer tiempo intraoperatoria,

fue realizada considerando márgenes mínimos de escisión, exponiendo la matriz ungueal y poniendo en evidencia el patrón de pigmentación. En un segundo tiempo operatorio, se ampliaron márgenes oncológicos, de 5 mm fuera del aparato ungueal, realizando la disección hasta la estructura ósea, sin incluirla y preservando la funcionalidad estructural. Las biopsias de márgenes mínimo junto con la lámina ungueal fueron procesadas para el respectivo estudio histopatológico.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Para el análisis morfométrico de las imágenes obtenidas de la dermatoscopia, se hizo uso del programa ImageJ Fiji de análisis de imagen. ImageJ es un programa informático de tratamiento digital de imagen, orientado principalmente hacia el ámbito de las ciencias de la salud. Se trata de un software de dominio público y de código abierto desarrollado en lenguaje Java en las instituciones del *National Institutes of Health* de Estados Unidos. Incluye potentes herramientas para editar, procesar y analizar imágenes de casi cualquier tipo y formato. En esta oportunidad se hizo uso del "plugin" Gel. Se realizó una selección de las bandas ubicadas dentro de un área de trabajo de 100 mm² acompañado por el programa de análisis estadístico y graficación GraphPad Prims. 8.0.2 (263).

Resultados

Se muestra la lesión pigmentada en hallux izquierdo, adquirida a través de la dermatoscopia de la lámina ungueal preoperatoria con su característica de bandas longitudinales y de colorimétrica variable (Figura 1A). A un mayor aumento (Figura 1B), se destaca la coloración de

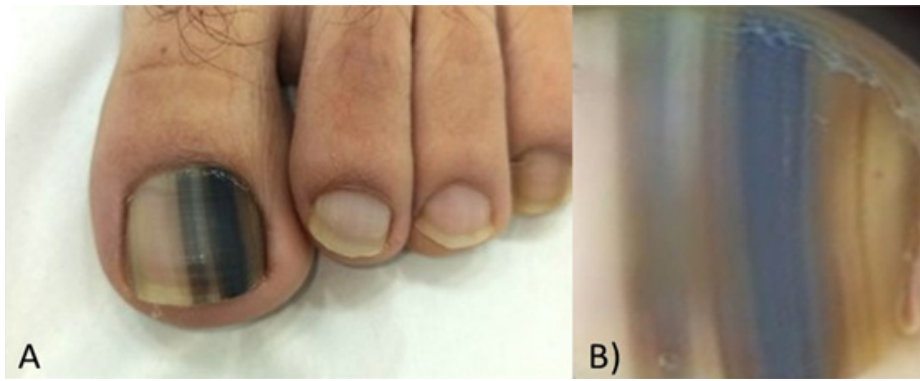


Figura 1. (A) Lesión pigmentada subungueal en hallux izquierdo resultado del examen físico. (B) A mayor aumento, se destaca el atípico patrón longitudinal de bandas pigmentadas, de densidad variable, algunas bandas con bordes difusos de color marrón oscuro, negro azulado y marrón claro, con interrupción del paralelismo. En el borde libre presenta pigmentación únicamente de las capas inferiores)

las bandas longitudinales ubicadas por debajo de la queratina o en la plataforma subungueal y con un gradiente de tonalidades marrones claros, oscuros y grises azulado, con bordes difusos y de variable espaciamientos entre ellas.

El proceso de segmentación y aplicación de filtros, sobre la imagen a mayor aumento de la melanoniquia (Figura 2A), para la obtención de una imagen binaria a partir de la transformación de la imagen original en una imagen en escalas de grises (Figura 2B), permitió registrar un patrón longitudinal atípico de 9 bandas, con bandas de grises variable, correspondiente a cada uno de las tonalidades originales que, arrojó un gradiente de valores medios, máximos y mínimos, respectivamente (Figura 2C), que se tradujo en densidades media de grises oscuros, $136 \pm 5,6$, negros $157 \pm 4,5$ y grises claros $130 \pm 5,6$, pixeles/mm², respectivamente (Figura 2D).

Por su parte, el análisis histopatológico reportó una distribución asimétrica del pigmento melánico intraepitelial, probablemente provenientes de abundantes melanocitos dendríticos intraepidérmicos,

así como melanocitos basales atípicos, algunos presentes en el 1/3 medio y superior del epitelio, no definidos por la coloración de H&E (Figura 3A). La morfometría, con la intervención de la imagen digital, con filtro morfológico (Figura 3B), permitió diferenciar los conglomerados de pigmentos de melanina como partículas en donde la relación área/

perímetro (Figura 3C), permitió definir un índice de circularidad de $0,7250 \pm 0,1197$ (Figura 3D).

Discusión

Los resultados obtenidos fortalecen la premisa de que, para la caracterización de las melanoniquias, sobre todo en aquellos casos con una alta sospecha de posible lesión melanómica, se deben aplicar dos procedimientos prioritarios. El primero de ellos, la dermatoscopia continúa, siendo esta, una herramienta de rutina en la evaluación de las mismas y el segundo, la biopsia del tejido ungueal usada para el análisis histopatológico de dicho tejido (Fernández-Horcajuelo y col., 2021; Cohen y col., 2008. En cuanto a la dermatoscopia ungueal cabe destacar que la misma, es útil en el estudio de las melanoniquias longitudinales y facilita la identificación de los signos clínicos de alarma. Cuando se realiza intraoperatoria, una vez retirada la placa ungueal, puede además mejorar la precisión en la localización del origen de la pigmentación (Perrin y col., 2018; Braun

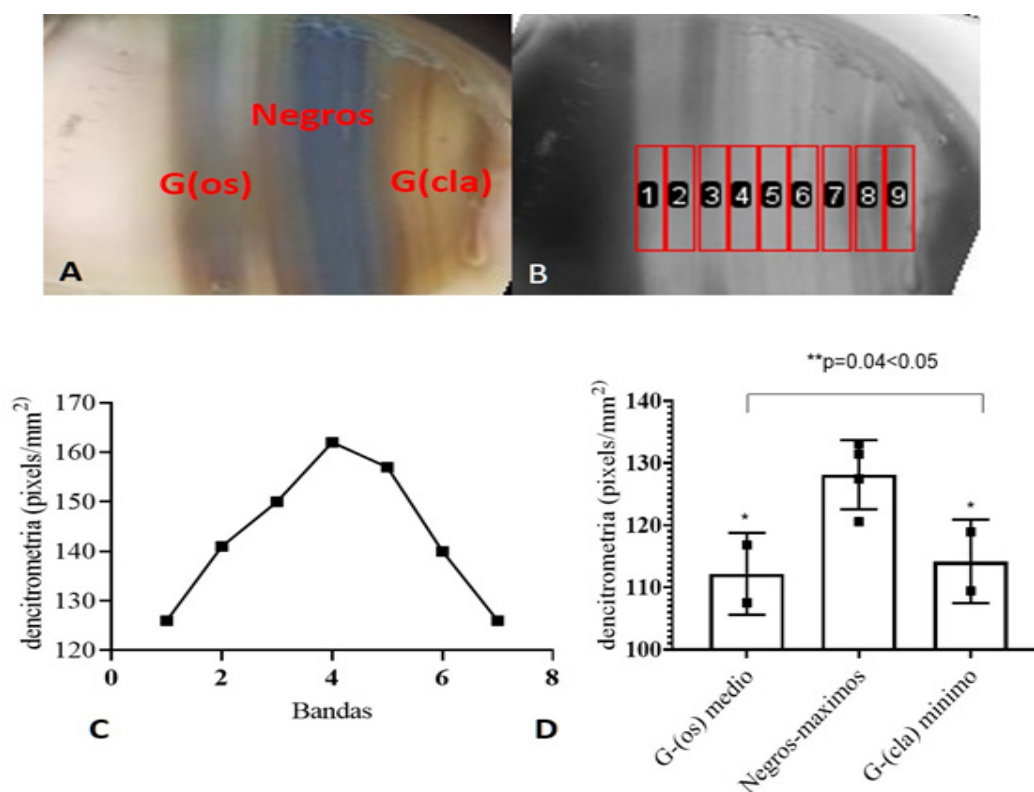


Figura 2. Análisis densitométrico de la melanoniquia en la lámina ungueal. A) Dermatoscopia. Imagen original. B) Transformación blanco y negro de la imagen original y delimitación de bandas en un total de 9 bandas longitudinales atípicas en un área de superficie equivalente a cantidad de pixeles/mm². C y D) cuantificación del histograma de densidad. Se destacan los valores medios de grises oscuros G (os), negros (N) y grises claros G (cla)

y col., 2006). En el presente estudio fue ejecutada bajo una dinámica de distintos tiempos operatorios. En cuanto a la biopsia del tejido ungueal, vale decir que resulta relevante ya que permite descartar si la lesión de la lámina ungueal corresponde a un melanoma subungueal (Jellinek, 2007; Martin, 2013). Al respecto, hay que considerar que la gran mayoría de las lesiones melanocíticas se asientan en la matriz ungueal, por lo que es preciso incluir la biopsia en casi todos los casos. Sin embargo, puesto que la mayoría de las lesiones aparecen en la matriz distal, podría no ser necesario considerarla asegurando así la disminución del riesgo de distrofia (Jellinek, 2007; Martin, 2013). Existen muchas otras técnicas que podrían también ser utilizadas, sin embargo, su

adecuada selección debe tomar en cuenta, tanto la necesidad de obtener una muestra rentable para su estudio, así como el grado de su dificultad técnica, salvaguardando así la reducción del riesgo de distrofia ungueal residual (Jellinek, 2007; Martin, 2013). En la presente investigación, ambos procedimientos se mostraron fortalecidos por el acompañamiento de estrategias analíticas transversales, como la densitometría de las imágenes obtenidas de la dermatoscopia, así como de la morfometría histológica obtenida de la biopsia; lo cual, luego de un protocolo de segmentación de las áreas de interés sobre las imágenes y la aplicación de filtros, se pudo realizar la cuantificación de variables como la densidad de la coloración de las respectivas bandas longitudinales de

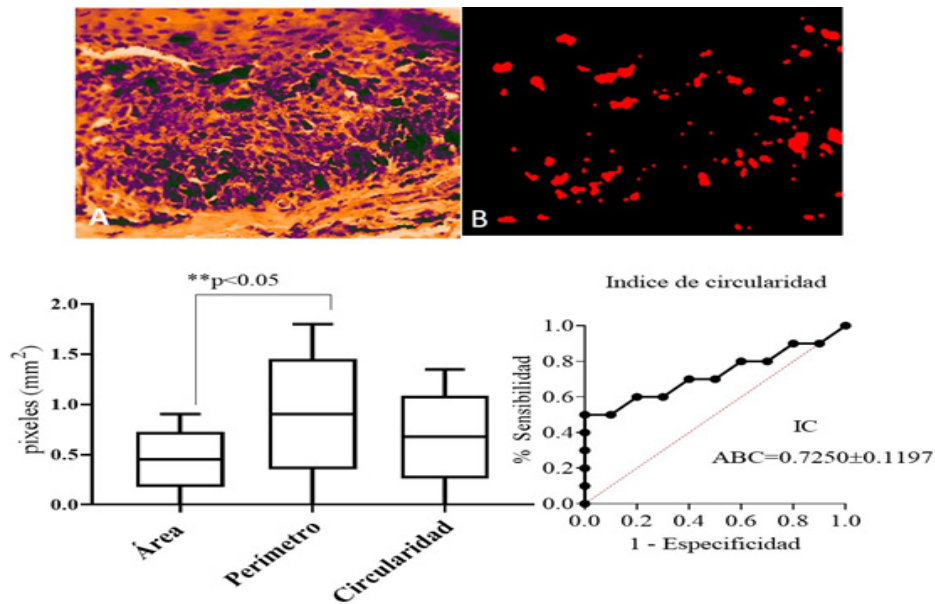


Figura 3. Cortes histológicos H&H. Zonas de proliferación melanocítica (A). Pigmentos melánicos intraepiteliales de mayor tamaño en imagen transformada (B). Cuantificación de los parámetros morfométricos (C). Índice de Circularidad (IC). Relación Área/Perímetro de los agregados de melanina. $C=4\pi A/P^2$

la melanoniquia, así como el índice de circularidad (IC) de los conglomerados de melanina. Cabe destacar que los melanocitos ungueales basales y supra basales, son escasamente visibles bajo el contraste de la tinción H&H (Levit y col., 2000; Phan y col., 2006); sin embargo, estimar la forma y densidad de los precipitados del colorante, como los registrados en los cortes de la biopsia analizada, podría ser considerado como una estrategia metodológica para generar descriptores de la forma y del crecimiento de los conglomerados de melanina, considerados finalmente como posibles factores morfológicos predictivo de la proliferación melanocítica; a mayor concentración mayor presencia de melanina. Una herramienta morfológica alternativa, ante la ausencia de marcadores más específico para la visualización de la variabilidad del daño tisular en la melanoniquia. De lo expuesto, resulta obvio que de los resultados se infiere

una expresión diferencial de melanina que define las distintas tonalidades de las bandas longitudinalidad de plataforma ungueal; muy probablemente vinculada con una activación diferencial en la producción de melanina, como ha sido expresado por otros autores (Piraccin y col., 2015). Dicho planteamiento, concuerda con lo que en los últimos años se ha expresado sobre un patrón anatómico de distribución de la población de melanocitos de la plataforma ungueal, en donde los ubicados en la matriz ungueal proximal presentan una alta afinidad por la tirosinasa y los ubicados en la matriz distal, presentan una alta afinidad por sus antagonistas (Escuti y col., 2013; Zhang y col., 2021). Si bien nuestros resultados no aportan datos concernientes al tipo de proceso bioquímico vinculado con la activación o no del proceso de la síntesis de la melanina, resulta evidente que hay regiones ungueales con una alta actividad de melatonina, así como

compartimentos con una baja, mediana o nula presencia de melatonina, lo que nos estaría dando pautas sobre la posible etiología de la melanoniquia, hasta el momento poco entendida. De manera que resulta prioritario ampliar el uso de técnicas de mayor resolución para identificar las características celulares y moleculares del gradiente definido con el análisis digital de dermatoscopia. Finalmente, la presente investigación estuvo guiada por una serie de pasos coherente como los establecidos por otros investigadores que claman por la necesidad de algoritmos que permitan caminar con pasos firmes en el abordaje de las patologías tumorales como los melanomas. Dentro de los posibles algoritmos a ser construidos para la caracterización de la melanoniquia, se recomendaría incluir, además de los procedimientos convencionales como la dermatoscopia y la biopsia excisional, el uso de la herramienta del análisis de imágenes digitales que, permitiría generar parámetros morfométricos con carácter de factores predictivos de la evolución de un posible proceso tumoral en una melanoniquia de alto grado de sospecha de malignidad.

Referencias Bibliográficas

- Alessandrini A, Dika E, Starace M, Chessa MA, Piraccini BM. 2021. Diagnosis of Melanonychia. *Dermatologic Clinics* 39 (2): 255-267.
- Baran R. 1993. Longitudinal melanonychia. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 186 (2): 83.
- Braun RP, Baran R, Saurat JH, Thomas L. 2006. Surgical Pearl: Dermoscopy of the free edge of the nail to determine the level of nail plate pigmentation and the location of its probable origin in the proximal or distal nail matrix. *J American Academy of Dermatology* 55(3): 512-513.
- Cohen T, Busam KJ, Patel A. 2008. Subungual melanoma: management considerations. *The American Journal of Surgery* 195 (2): 244-8.
- Escuti GC, Hernández M, Valente E. 2013. Melanoma subungueal. Comunicación de tres casos y revisión de la literatura. *Dermatología Argentina* 28;19(3):183-7.
- Fernández-Horcajuelo J, Espinosa-Lara P, Simón-Lázaro M. 2021. Melanoma ungueal *in situ*. *Semergen: Revista Española de Medicina de Familia* 7: 498-500.
- Flores-Terry M, Romero-Aguilera G, Mendoza C. 2018. Functional surgery in malignant subungual tumors. Case series and literature review. *Demosyphiliographic Records* 109 (8):712-21.
- Göktay F, Güneş P, Yaşar Ş, Güder H, Aytakin S. 2015. New observations of intraoperative dermoscopy features of the nail matrix and bed in longitudinal melanonychia. *International J Dermatology* 54(10): 1157-1162.
- Jellinek N. 2007. Nail matrix biopsy of longitudinal melanonychia: Diagnostic algorithm including the matrix shave biopsy. *J Am Acad Dermatol* 56:803-810.
- Levit EK, Kagen MH, Scher RK, Grossman M, Altman E. 2000. The ABC rule for clinical detection of subungual melanoma. *J American Academy of Dermatology* 42 (2 Pt 1):269-74.
- Martin B. 2013. Histopatología de la uña. *Actas Dermosifiliogr* 104:564-578.
- Perrin C, Michiels JF, Pisani A, Ortonne JP. 1997. Anatomic distribution of melanocytes in normal nail unit: an immunohistochemical investigation. *The American J Dermatopathology* 19(5): 462-467.
- Perrin C, Michiels JF, Boyer J, Ambrosetti D. 2018. Melanocytes Pattern in the Normal Nail, With Special Reference to Nail Bed Melanocytes. *The American J Dermatopathology* 40(3):180-184.
- Phan A, Touzet S, Dalle S. 2006. Melanoma lentiginoso acral: un estudio clínico-pronóstico de 126 casos. *Hno J Dermatol* 155 (3): 561-569.
- Piraccini BM, Dika E, Fanti PA. 2015. Tips for diagnosis and treatment of nail pigmentation with practical algorithm. *Dermatologic Clinics* 33(2):185-195.
- Singal A, Bisherwal K. 2020. Melanonychia. Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Indian Dermatol Online J* 13;11(1):1-11.
- Starace M, Alessandrini A, Brandi N, Piraccini BM. 2019. Use of Nail Dermoscopy in the Management of Melanonychia: Review. *Dermatol Pract Concept* 31;9(1):38-43.
- Tan KB, Moncrieff M, Thompson JF, McCarthy SW, Shaw HM, Quinn MJ, Li LX, Crotty KA, Stretch JR,

Scoyler RA. 2007. Subungual melanoma: a study of 124 cases highlighting features of early lesions, potential pitfalls in diagnosis, and guidelines for histologist reporting. *The American J Surgical Pathology* 31(12): 1902–1912.

Zhang J, Yun SJ, McMurray SL, Miller CJ. 2021. Management of Nail Unit Melanoma. *Dermatologic Clinics* 39(2):269–80.



Estudio comparativo de las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis* de tres regiones geográficas de Venezuela

Comparative study of the enzymatic activities of *Bothrops colombiensis* snake venom from three geographical regions in Venezuela

CARMEN T. DUQUE ZERPA^{*,**1}, ÁNGEL G.A. FLORES PEREIRA^{**2}, REINALDO GUEVARA^{*3}, ALBA M. VARGAS^{**4}

Resumen

Bothrops colombiensis es una especie de serpiente venenosa de importancia médica en Venezuela. El envenenamiento por esta especie implica el desarrollo de coagulopatías, miotoxicidad y hemorragias, consecuencia de la presencia en sus venenos de una mezcla de enzimas hidrolíticas como fosfolipasas A₂, serino y metaloproteasas. Sin embargo, estudios previos han demostrado una importante variabilidad bioquímica, inter e intraespecie entre los venenos de serpiente, factor asociado a las características ontogenéticas y a la localización geográfica de los ejemplares, siendo necesaria su caracterización. Este estudio evaluó comparativamente los venenos de especímenes de *B. colombiensis*, colectados en Barlovento, Maracay y Paracotos, mediante el análisis de sus perfiles electroforéticos y sus actividades: procoagulante, hemolítica indirecta y proteolítica sobre fibrinógeno, BAEE (N-benzoil-L-arginina etil éster) y gelatina, además del reconocimiento antigénico por el antiveneno comercial venezolano empleando el método de Ouchterlony. Los resultados evidenciaron una importante variabilidad intraespecie, la cual se relacionó a los constituyentes más relevantes del género *Bothrops* (proteasas y fosfolipasas A₂) y fue más marcada entre los venenos de las regiones más cercanas. El ensayo de Ouchterlony mostró en todos los casos reactividad inmunológica cruzada, aunque con variaciones en los perfiles de reconocimiento. Los datos obtenidos permitirán ampliar la información disponible en la literatura sobre la variabilidad geográfica de los venenos de la especie *B. colombiensis*, aspecto de relevancia para la comprensión y el manejo de sus envenenamientos e incluso la producción de antivenenos, al contribuir con la selección controlada de los venenos que constituirán los inóculos de producción y venenos de referencia.

Palabras clave: *Bothrops colombiensis*, variabilidad intraespecie, actividades enzimáticas, antiveneno

Abstract

Bothrops colombiensis is a species of venomous snake of medical importance in Venezuela. Envenomation by this species involves the development of coagulopathies, myotoxicity and hemorrhages, a consequence of the presence in its venoms of a mixture of hydrolytic enzymes such as phospholipases A₂, serine and metalloproteases. However, previous studies have demonstrated an important biochemical inter and intraspecies variability among snake venoms, a factor associated with the ontogenetic characteristics and the geographical location of the specimens, making their characterization necessary. This study comparatively evaluated the venoms of *B. colombiensis* specimens, collected in Barlovento, Maracay and Paracotos, analyzing their electrophoretic profiles and their activities: procoagulant, indirect hemolytic and proteolytic on fibrinogen, BAEE (N-benzoyl-L-arginine ethyl ester) and gelatin, in addition to the antigenic recognition by the Venezuelan commercial antivenom using the Ouchterlony assay. The results showed an important intraspecies variability related to the most relevant constituents of the genus *Bothrops* (proteases and phospholipases A₂) and were more marked among the venoms from the closest regions. The Ouchterlony assay showed immunological cross-reactivity in all cases, although with variations in the recognition profiles. The data obtained will allow expanding the information available in the literature on the geographical variability of the venoms of the *B. colombiensis* species, an aspect of relevance for the knowledge and management of its envenomation and even the production of antivenoms, by contributing to the controlled selection of the venoms that will constitute the production inoculums and reference venoms.

Keywords: *Bothrops colombiensis*, intraspecies variability, enzymatic activities, antivenom

*Servicio de Análisis Toxicológico (SATOX), Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. **Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: ctduque@gmail.com

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

¹[0000-0002-5899-3944](https://orcid.org/0000-0002-5899-3944)

²[0000-0002-3285-4452](https://orcid.org/0000-0002-3285-4452)

³[0000-0001-8953-3644](https://orcid.org/0000-0001-8953-3644)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.18](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.18)

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

Recepción: 14/11/2023

Aprobación: 28/11/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 205-217, 2023

Introducción

El envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado un riesgo de salud ocupacional, así como una enfermedad tropical desatendida, que afecta principalmente trabajadores agrícolas de áreas rurales en países en desarrollo (Rengifo y col., 2019). En Venezuela, se reconoce una incidencia anual de 5700 casos (De Sousa y col., 2013) y se considera que el 90% de estos son originados por serpientes del género *Bothrops*. Dentro de este género *B. colombiensis*, distribuida al norte del río Orinoco, es una de las principales responsables (Rengifo y col., 2019).

El envenenamiento por las serpientes de este género implica el desarrollo de un cuadro clínico que incluye dolor, edema, coagulopatías, hemorragias, mionecrosis y/o falla renal aguda (Rengifo y col., 2019; Rodríguez-Acosta y col., 2000), eventos que son la consecuencia de la presencia en los venenos de una mezcla de constituyentes que incluyen metaloproteasas, fosfolipasas A_2 , L-aminoácido oxidasas, serinoproteasas y desintegrinas, entre otros (Calvete y col., 2009). Sin embargo, la expresión de dichos constituyentes en estos venenos puede variar, a nivel inter e intraespecie, dependiendo de la edad, sexo, dieta, filogenia e incluso la localización geográfica de los ejemplares, lo cual puede influir en la expresión del cuadro clínico tras el envenenamiento (Girón y col., 2008; Sousa y col., 2013) y en la capacidad neutralizante de los antivenenos. Esto implica la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, de manera de disponer de datos experimentales que permitan la preparación de inóculos de producción de antivenenos y colecciones de venenos de referencia que cubran efectivamente

la variabilidad intraespecie (WHO, 2017). Este estudio evaluó comparativamente las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops colombiensis*, de tres regiones geográficas de Venezuela y su reconocimiento antigénico por un antiveneno comercial venezolano. Adicionalmente los resultados se discutieron con reportes previos para otros venenos botrópicos, para estimar la toxicidad potencial de los venenos evaluados.

Materiales y métodos

VENENO

Los venenos se obtuvieron por el ordeño manual de especímenes adultos de *B. colombiensis* procedentes de Barlovento, estado Miranda (3 individuos); Maracay, estado Aragua (2 individuos) y Paracotos, estado Miranda (5 individuos), mantenidos en el serpentario de la Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Los venenos se cristalizaron por evaporación y se almacenaron, hasta su evaluación, a 4 °C en un desecador al vacío con $CaCl_2$ como agente desecante.

ANTIVENENO

Se empleó el antiveneno polivalente producido en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (Lote 171). Su presentación es líquida y está constituido por fragmentos $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas equinas, obtenidas con venenos de los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Crotalus*. El inserto del producto refiere que cada mililitro neutraliza al menos 2 mg de veneno de *B. colombiensis* y 1,5 mg de veneno de *C. durissus cumanensis*.

PERFIL ELECTROFORÉTICO

Las proteínas presentes en 30 μg de los venenos se disolvieron en una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714) y se evaluaron empleando electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) con SDS (duodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Se evaluó por la estimación cuantitativa a 540 nm, de la hemoglobina liberada tras la incubación de dosis seriadas de los venenos (1-20 μg /0,1 mL de PBS pH7,2) con un sustrato constituido por: 10% eritrocitos humanos lavados, 6,4% yema de huevo y 1 mM CaCl_2 , durante 2 horas a 37°C. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica indirecta media (DHI_{50}), definida como la cantidad de veneno (μg) que induce un 50% de hemólisis (Condrea y col., 1964).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Alícuotas de 0,2 mL de plasma humano citratado (9:1), se distribuyeron en tubos de ensayo de plástico y se incubaron en baño María a 37°C durante 3 min. Post incubación se adicionó al plasma, a razón de 4 tubos por dosis, 0,1 mL de soluciones con dosis seriadas de los venenos en el rango de 0,6-12 μg en NaCl 0,85% y empleando un cronómetro se determinó el tiempo de coagulación del plasma. Los controles incluyeron soluciones de trombina 5 U/mL y NaCl 0,85%. Los resultados se expresaron como dosis coagulante mínima (DCM), definida como la menor cantidad de veneno que induce la coagulación del plasma en 1 min. (WHO, 2017).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

Dosis seriadas de los venenos entre los 0,03-1 μg en buffer Tris-HCl 0,02M pH 7,5 se incubaron con 100 μg de fibrinógeno (Sigma®) en baño María a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por la adicción a cada mezcla de 100 μL de una solución de β -mercapto-etanol 3,2% y la incubación en baño de agua hirviendo durante 5 min. La degradación del sustrato fue expuesta por análisis electroforético (SDS-PAGE 12,5%) con tinción de los geles con Azul de Coomassie R 250 (Gay y col., 2005).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Alícuotas de 2,9 mL de una solución del sustrato BAEE (N-benzoil-L-arginina etil éster) (Sigma®), 0,25 mM en buffer fosfato 0,0667 M pH 7, se incubaron con 0,1 mL de soluciones con dosis seriadas de los venenos en el rango de 25-200 μg en HCl 0,001 N y se registraron los cambios en la absorbancia de las mezclas a 253 nm cada 6 min. durante un lapso de 0,5 horas. Los resultados se expresaron como actividad específica (U/mg), definida como los micromoles de sustrato hidrolizados en un minuto/mg de veneno (Tu y col., 1965).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Las proteínas presentes en 8 μg de los venenos se disolvieron en buffer de muestra con SDS y se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% copolimerizados con 1% de gelatina (Merck®). Posteriormente los geles se incubaron con una solución de tritón X-100 al 2,5% durante 1 hora, se lavaron con agua

destilada durante 10 min con cambios consecutivos del solvente y se incubaron con buffer de zimografía (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl₂) durante 24 horas. Las zonas de degradación en los geles fueron expuestas por la tinción con Azul de Coomassie R 250 (Terra y col., 2009).

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LOS VENENOS DE *BOTHROPS COLOMBIENSIS* POR UN ANTIVENENO COMERCIAL VENEZOLANO

Se empleó el método de doble inmunodifusión o de Ouchterlony (Hornbeck, 2017). En placas de Petri de plástico (6 cm diámetro) se adicionaron 5 mL de una solución al 1% agarosa en PBS pH 7,2. Solidificado el gel se abrieron pozos de 4-5 mm de diámetro, formando un patrón hexagonal con un pozo central. En el pozo central se incorporaron 20 μ L del antiveneno y en su periferia 20 μ L de soluciones con dosis seriadas del veneno en el rango de 5-80 μ g en PBS pH 7,2; las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas y finalmente se lavaron con cambios consecutivos de PBS diluido (1:4), empleando agitación leve durante 24 horas. La formación de los inmunocomplejos se evidenció por la tinción de los geles con Azul de Coomassie R 250.

Análisis estadístico

Los resultados de las actividades: coagulante, hemolítica indirecta y esterásica se expresaron como la media \pm la desviación estándar de tres evaluaciones independientes. La comparación de promedios se realizó por análisis de varianza de una vía. Todos los análisis estadísticos se realizaron a un intervalo

de confianza del 95%. Para el análisis de los geles de electroforesis se empleó el programa Image Lab 5.2.1 (BioRad. USA).

Resultados

PERFIL ELECTROFORÉTICO

Los perfiles electroforéticos mostraron una distribución de bandas proteicas en los rangos de 6,5-145,9; 7,1-162,9 y 6,8-159,3 kDa para los venenos de Barlovento, Maracay y Paracotos, respectivamente (Figura 1). Al comparar los perfiles entre sí en el veneno de Paracotos se observaron diferencias marcadas, destacando la presencia de un mayor número de bandas (~19 vs ~11 en los venenos de Barlovento y Maracay), además de una elevada intensidad para las bandas con masas de 6,8; 12,4; 23,8 y entre los 47,7-59,1 kDa (Figura 1). En el caso de los venenos de Barlovento y Maracay se observó una composición de bandas proteicas con importantes similitudes, esencialmente para los grupos de baja (6,5-8,5 kDa) y media (23-50 kDa) masa molecular, así como ligeras diferencias en el rango de 63-83,7 kDa, donde se apreciaron 2 bandas tenues en el veneno de Maracay y solo 1 en su homólogo de Barlovento, así como entre los 132,7-146 kDa donde se observó una mayor densidad de bandas proteicas para este último veneno (Figura 1).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA

Todos los venenos indujeron actividad hemolítica indirecta con diferencias significativas entre sus DHI₅₀ (p<0,05). El veneno de *B. colombiensis* de Paracotos presentó la menor DHI₅₀, exhibiendo la mayor actividad, mientras que sus

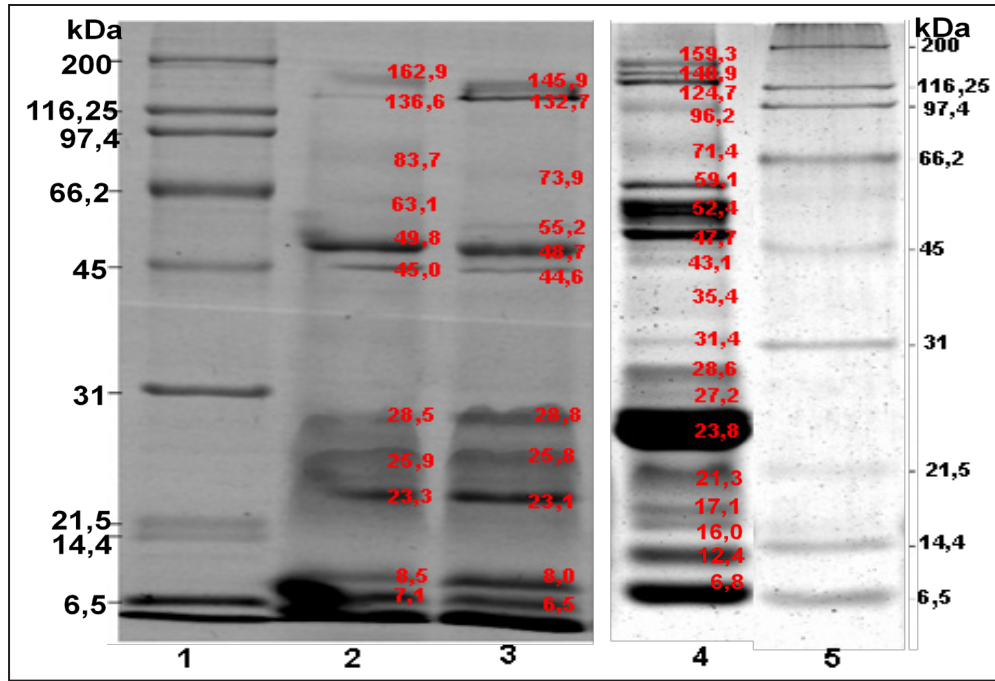


Figura 1. Perfiles electroforéticos de los venenos de *Bothrops colombiensis*. 30 µg de cada veneno disueltos en inhibidores de proteasas (4:1) (Sigma® Cat. P-2714), se corrieron en geles de poliacrilamida (12,5%) con SDS. Carriles 1 y 5: Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0318). Carriles 2-4: Venenos de *B. colombiensis*: 2: Maracay, estado Aragua. 3: Barlovento, estado Miranda. 4: Paracotos, estado Miranda. Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

homólogos de Barlovento y Maracay presentaron 1,26 y 2,86 veces menos actividad, respectivamente (Tabla I).

Tabla I.
Actividades hemolíticas indirecta, coagulante y esterásica de los venenos de *B. colombiensis*

Actividad	Venenos: Procedencia		
	Barlovento	Maracay	Paracotos
Hemolítica indirecta (DHI ₅₀ : µg)	2,58 ± 0,23*	5,87 ± 0,23	2,05 ± 0,53*
Coagulante (DCM: µg)	1,95 ± 0,16*	0,99 ± 0,12*	1,32 ± 0,24*
Esterásica (U/mg)	263,28 ± 21,30*	338,90 ± 20,24*	298,80 ± 35,20*

DHI₅₀: dosis hemolítica indirecta media. DCM: dosis coagulante mínima. Los resultados representan la media ± desviación estándar (n: 3). *Resultados con diferencia estadísticamente significativa (p<0,05)

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

Los venenos indujeron la coagulación directa del plasma humano, con diferencias significativas entre sus DCM (p<0,05). El veneno de *B. colombiensis* de Maracay presentó la menor DCM, exhibiendo la mayor actividad, mientras que sus homólogos de Paracotos y Barlovento fueron 1,33 y 1,97 veces menos procogulantes, respectivamente (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA

Todos los venenos indujeron la degradación del BAEE, con diferencias significativas entre sí (p<0,05). El veneno de *B. colombiensis* de Barlovento mostró la menor actividad (263,28 ± 21,30 U/mg) y el de Maracay la mayor (338,90 ± 20,24 U/mg) (Tabla I).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA

Los venenos indujeron la degradación parcial del fibrinógeno, glicoproteína dimérica conformada por tres cadenas polipeptídica: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). El análisis densitométrico de los geles evidenció en todos los casos que el efecto fue selectivo sobre las cadenas α y β , aunque se observaron diferencias intraespecíficas (Figura 2 A-C): con el veneno de Barlovento, la degradación de la cadena α se inició con $0,03 \mu\text{g}$ y fue completa con $1 \mu\text{g}$; sobre la cadena β el efecto fue parcial y se inició con $0,5 \mu\text{g}$ (Figura 2A). Con el veneno de los especímenes de Maracay la degradación de ambas cadenas se inició con $0,03 \mu\text{g}$, pero solo la cadena α fue totalmente degradada ($1 \mu\text{g}$) (Figura 2B). Mientras que con el veneno de los ejemplares de Paracotos la degradación de ambas cadenas fue simultánea, se inició con $0,03 \mu\text{g}$ y fue total con $0,5 \mu\text{g}$ de veneno (Figura 2C).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE GELATINA

Todos los venenos indujeron el desarrollo de bandas de degradación en el zimograma (Figura 3), para el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento estas se observaron en el rango de $\sim 45,3$ - $64,5$ kDa; mientras que para sus homólogos de Maracay y Paracotos las bandas se localizaron $\sim 64,5$ y $45,3$ kDa, respectivamente.

RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LOS VENENOS POR UN ANTIVENENO COMERCIAL VENEZOLANO

Al enfrentar los venenos en estudio al antiveneno polivalente venezolano, en todos los casos se observó la presencia de bandas de precipitina en los geles de

agarosa, sin embargo, al comparar estos entre sí destacaron variaciones asociadas principalmente a la intensidad de las bandas (Figura 4). En este caso, resaltó particularmente la menor intensidad en las bandas de reconocimiento para el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento, en comparación a lo observado para sus homólogos (Figura 4).

Discusión

La variación bioquímica en la composición de los venenos de serpientes es un factor asociado a las características ontogénicas y a la distribución geográfica de los ejemplares, el cual dependiendo de su magnitud e implicaciones bioquímicas es responsable de variaciones en el cuadro clínico evidenciado en las víctimas y en la potencia neutralizante de los antivenenos (Calvete y col., 2009; Rodríguez-Acosta y col., 2010; Duque Zerpa y col., 2014 y 2022; Girón y col., 2013b, 2018). Esto hace imprescindible la caracterización de los venenos de ofidios de importancia médica (WHO, 2017) como es el caso *B. colombiensis*, especie endémica venezolana, con una presencia predominante en el territorio nacional que abarca zonas densamente pobladas como los estados Aragua y Miranda (Rodríguez-Acosta y col., 2000; Calvete y col., 2009), donde los venenos de esta especie han sido escasamente estudiados con base en su variabilidad intraespecífica y antigenicidad.

En este estudio, el análisis electroforético de los venenos evidenció un rango de distribución de proteínas relativamente similar entre los ~ 6 - 163 kDa, lo cual sugiere la presencia en los venenos de constituyentes tipo fosfodiesterasas (94-

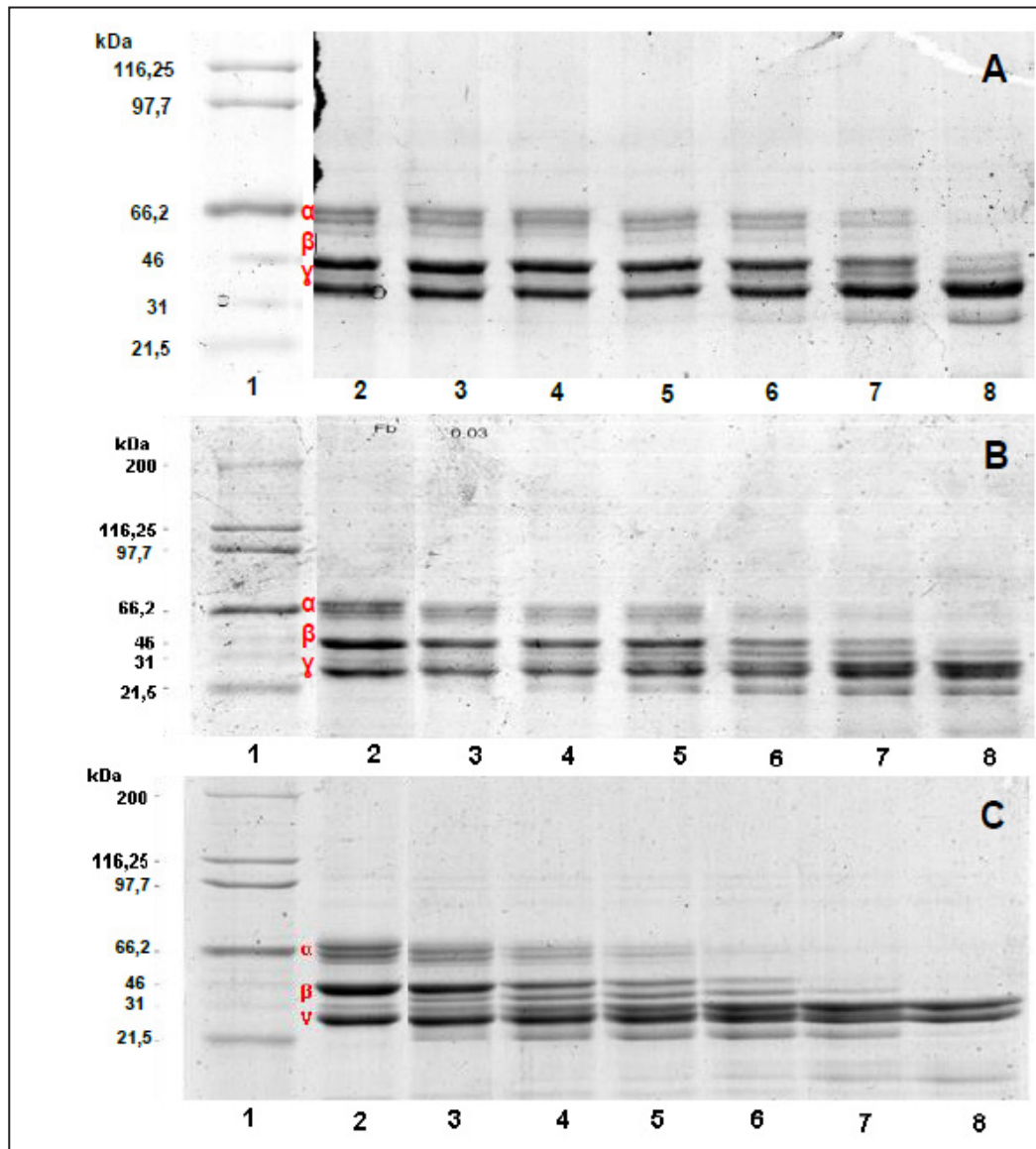


Figura 2. Actividad fibrinogenolítica de los venenos de *Bothrops colombiensis*. A: Barlovento, estado Miranda. B: Maracay, estado Aragua. C: Paracotos, estado Miranda. Carriles: 1. Marcador de masa molecular (BIO-RAD®. Cat. 161-0317). Carril 2: 100 µg de fibrinógeno. 3 al 8: fibrinógeno (100 µg) vs. concentraciones seriadas de veneno (3: 0,03 µg, 4: 0,06 µg, 5: 0,125 µg, 6: 0,25 µg, 7: 0,5 µg, 8: 1 µg). Tinción: Azul de Coomassie R 250. Las evaluaciones se realizaron por duplicado

140 kDa), L aminoácido oxidasas (85-150 kDa), hialuronidasas (~73 kDa), serino proteasas (25-70 kDa), fosfolipasas A₂ (12-18 kDa), metaloproteasas de las clases PI (20-30 kDa), PII (30-60 kDa) y PIII (60-100 kDa) e incluso péptidos, como las desintegrinas (6,6-10 kDa: *B. punctatus*, *B. atrox*, *B. colombiensis*) (Calvete y col., 2009; Sánchez y col., 2009; León y col.,

2011). Adicionalmente la comparación cuali/cuantitativa de los perfiles electroforéticos reflejó variaciones intraespecíficas, las cuales fueron más marcadas para el veneno de *B. colombiensis* de Paracotos. En este caso, destacó la presencia de bandas proteicas en los rangos de 12-21, 31-43 y 59-124 kDa, ausentes en los otros venenos evaluados, así como la muy

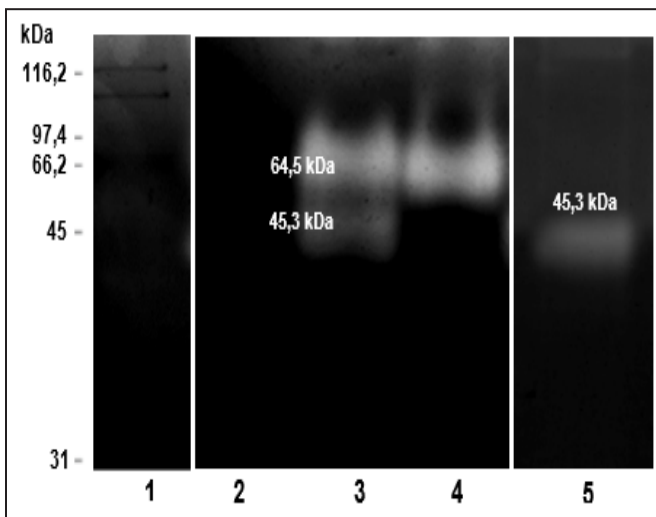


Figura 3. Actividad proteolítica sobre gelatina de los venenos de *Bothrops colombiensis*. Carril 1: Marcador de masa molecular (Biorad® Cat. Cat. 161-0317). Carril 2: Control negativo. Carriles 3-5: Venenos de *B. colombiensis* (8 µg). 3: Barlovento, estado Miranda. 4: Maracay, estado Aragua. 5: Paracotos, estado Miranda. Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

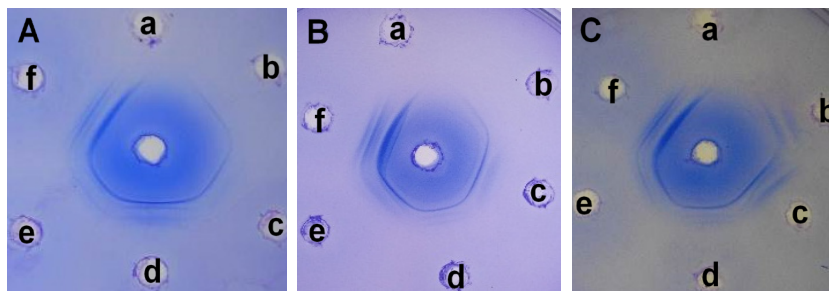


Figura 4. Reconocimiento antigénico de los venenos de *Bothrops colombiensis* por el antiveneno comercial venezolano. A: Barlovento, estado Miranda. B: Maracay, estado Aragua. C: Paracotos, estado Miranda. Se enfrentaron concentraciones seriadas de los venenos en 20 µL de PBS pH 7,2 (a: 0 µg; b: 2,5 µg; c: 5 µg; d: 10 µg; e: 20 µg; f: 40 µg), con 20 µL del antiveneno (pozo central). Tinción: Azul de Coomassie R 250. La evaluación se realizó por duplicado

elevada intensidad de bandas de baja y media masa molecular. Estos resultados sugieren variaciones, posiblemente relacionadas a desintegrinas y enzimas tipo fosfolipasas A₂, serino y metaloproteasas, grupos responsables principalmente de las actividades necrosante, edematizante, procoagulante y hemorrágica (Sánchez y col., 2009). Los venenos de Barlovento y Maracay

presentaron perfiles electroforéticos con una importante similitud, la cual se asoció esencialmente a los grupos de bandas más abundantes (~6,5-8,5; 23-28,8 y 44,6-50 kDa), sin embargo, la gran mayoría de estas fueron más intensas en el veneno de Barlovento lo cual permite sugerir una posible concentración mayor de proteasas y quizás desintegrinas en este veneno.

La evaluación de los efectos enzimáticos mostró que todos los venenos indujeron actividades hemolítica indirecta, procoagulante, fibrinogenolítica, esterásica y gelatinolítica, con relevantes variaciones intraespecíficas. En el estudio de la actividad hemolítica indirecta las diferencias observadas (Paracotos > Barlovento > Maracay), sugieren variaciones en la constitución de enzimas

fosfolipasas A₂ (Asp 49: calcio dependiente) (León y col., 2011), esta variabilidad en este grupo enzimático ha sido frecuentemente reportada y se ha relacionado a la expresión de isoformas en estos venenos (Sousa y col., 2022). Adicionalmente al comparar con estudios previos, la magnitud de las DHI₅₀ estimadas coincide con lo reportado para especímenes de *B. atrox* (Amazonas, Ucayali y Junín)

del Perú (Ortiz y col., 2012), mientras que al comparar con reportes para *B. venezuelensis* (Caripe, estado Monagas, Venezuela) (6,14 ± 1,49 µg) (Guevara y col., 2015) los venenos de Barlovento y Paracotos mostraron mayor actividad, esto sugiere una relevante concentración de enzimas tipo fosfolipasas A₂ en los venenos objeto de este estudio. Esta

familia de enzimas se considera uno de los constituyentes más tóxicos de los venenos de serpiente y en el caso del género *Bothrops* se han relacionado a los efectos edematizante, mionecrótico, anticoagulante y la degranulación de mastocitos (León y col., 2011; Sousa y col., 2022).

En la evaluación de la actividad coagulante los venenos presentaron diferencias significativas entre sus DCM, esto sugiere variaciones en la constitución de las enzimas responsables. Estas enzimas han sido caracterizadas como serino proteasas con actividad tipo trombina y metaloproteasas activadoras del factor X y/o protrombina, las cuales contribuyen a la defibrinogenación y al consumo de otros factores de coagulación (Sajevic y col., 2011). Por otra parte, el factor de variabilidad entre las DCM obtenidas (1,95: 1: 1,32/Barlovento: Maracay: Paracotos), no coincide con lo observado en los perfiles electroforéticos (media y alta masa molecular) donde los venenos de Maracay y Barlovento mostraron una marcada similitud y el homólogo de Paracotos presentó casi el doble de bandas proteicas, esto pone de manifiesto las limitaciones del modelo electroforético para el adecuado análisis comparativo de los venenos.

En cuanto a la magnitud del potencial coagulante, al comparar con reportes previos para este género en Venezuela (Tabla II), se observó que las DCM de los venenos de *B. colombiensis* fueron inferiores a lo reportado para venenos de especímenes de *B. atrox* (estado Amazonas) (Duque y col., 2014) o *B. venezuelensis* de los estados Miranda (Baruta y La Boyera) (Girón y col., 2018) y Monagas (Duque y col., 2022), lo cual refleja un mayor potencial procoagulante en los venenos objeto de este estudio.

En el caso de la actividad fibrinogenolítica los resultados obtenidos sugieren la presencia en los venenos de α y β fibrinógenasas, mientras que las variaciones observadas en los perfiles de degradación (Paracotos > Maracay > Barlovento) sugieren diferencias en la constitución de las enzimas responsables.

Las fibrinogenasas aisladas y purificadas de los venenos de vipéridos, se han caracterizado como: 1) serino proteasas, correspondientes a enzimas tipo trombina, las cuales degradan las cadenas α y/o β del fibrinógeno induciendo la coagulación y 2) fibrino(ge)líticas, que incluyen (a) metaloproteasas, las cuales hidrolizan las cadenas α y β del fibrinógeno (con preferencia o exclusividad por la cadena α) y (b) serino proteasas, con preferencia por la cadena β (Gay y col., 2005; Sajevic y col., 2011). En el caso de *B. colombiensis*, Girón y col., 2013a,b, aislaron y caracterizaron dos metaloproteasas (Colombienasa 1 y 2) con actividad α , β , e incluso γ -fibrinógenasa para la Colombienasa 2 en venenos procedentes de Caucagua (estado Miranda). Este efecto aunado al relevante potencial procoagulante sobre el plasma humano, referido previamente, va a potenciar el efecto defibrinante de estos venenos.

La evaluación de la actividad esterásica mostró diferencias intraespecíficas (Maracay > Paracotos > Barlovento), que sugieren variaciones en el perfil de enzimas responsables. Dichas enzimas se han relacionado a serino proteasas con actividad hemostática, asociada principalmente a activadores del factor V, fibrino(ge)lítica y/o liberadores de quininas (Tu y col., 1965). Adicionalmente, al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en estudio previos para este género (Tabla II), se puede referir para los

Tabla II.

Comparación de las actividades coagulante y esterásica de los venenos de *B. colombiensis* con reportes previos para este género en Venezuela

Especie (procedencia)	DCM (μ g)	Actividad esterásica (U/mg)	Referencia
<i>B. atrox</i> (Pto. Ayacucho. Edo. Amazonas)	7,66 \pm 0,48	NE	Duque y col., 2014
<i>B. venezuelensis</i> (Región Capital)	NE	209	López y col., 1999
<i>B. venezuelensis</i> (Edo. Aragua)	0,6 \pm 0,06	1960,67 \pm 42,8	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Baruta. Edo. Miranda)	2,1 \pm 0,39	900 \pm 10	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (La Boyera. Edo. Miranda)	4,8 \pm 0,47	805,5 \pm 67,3	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Lagunetica. Edo. Miranda)	1,9 \pm 0,57	922,19 \pm 58,5	Girón y col., 2018
<i>B. venezuelensis</i> (Edo. Monagas)	7,83 \pm 0,45	158,87 \pm 18,65	Duque y col., 2022
<i>B. colombiensis</i> (Barlovento. Edo. Miranda)	1,95 \pm 0,16	263,28 \pm 21,30	Este estudio
<i>B. colombiensis</i> (Paracotos. Edo. Miranda)	1,32 \pm 0,24	298,8 \pm 35,20	Este estudio
<i>B. colombiensis</i> (Maracay. Edo. Aragua)	0,99 \pm 0,12	338,90 \pm 20,24	Este estudio

DCM: dosis coagulante mínima. U/mg: actividad específica (micromoles de sustrato hidrolizados por minuto/mg de veneno).
NE: no evaluada, Edo: estado

venenos evaluados una mayor actividad esterásica en comparación con los venenos de *B. venezuelensis* de la región Capital y el estado Monagas (López y col., 1999; Duque y col., 2022) y menor en comparación con lo reportado para especímenes de los estados Aragua y Miranda (Girón y col., 2018).

En el caso de la actividad proteolítica sobre gelatina el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento mostró la mayor actividad, en comparación con sus homólogos e incluso con lo reportado por Sánchez y col. (2015), en la evaluación del potencial

antitrombótico y anticoagulante del veneno de *B. colombiensis* (Barlovento, estado Miranda), lo cual sugiere variaciones en la constitución de las enzimas responsables. Estas, considerando que la gelatina es un producto de desnaturalización del colágeno, se han relacionado a metaloproteasas capaces de degradar la matriz extracelular (León y col., 2011; Sajevic y col., 2011). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren variaciones en la expresión de metaloproteasas PII y PIII en los venenos evaluados, que implican la expresión de ambos grupos en el veneno de *B. colombiensis* de Barlovento, así como la

ausencia o la presencia de niveles no detectables, bajo las condiciones de este estudio, de los grupos PII y PIII en los venenos de Maracay y Paracotos, respectivamente. Esto pudiera adicionalmente dar indicios sobre el potencial hemorrágico de estos venenos: Barlovento > Maracay > Paracotos, con base en el efecto reconocido para estas enzimas (PIII > PII > PI) (Sajevic y col., 2011).

Finalmente, el ensayo de doble inmunodifusión u Ouchterlony evidenció reactividad inmunológica cruzada, aunque destacaron diferencias en los perfiles de reconocimiento antígeno-anticuerpo consecuencia de la variabilidad antigénica entre los venenos. No obstante, aunque el método de Ouchterlony no permite discernir los antígenos reconocidos, la menor reactividad frente al veneno de los ejemplares procedentes de Barlovento (veneno con elevado potencial hemolítico indirecto, gelatinolítico y menor efecto procoagulante), aunado a estudios proteómicos y Western blot que refieren el reconocimiento parcial de serino proteasas, metaloproteasas PI y fosfolipasas A₂ y la escasa antigénicidad de las desintegrinas (Calvete y col., 2009; Sousa y col., 2013, 2022; Duque y col., 2022), implica la necesidad de estudiar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano sobre las principales actividades inducidas por los venenos en estudio.

Conclusiones

Los resultados obtenidos evidencian una importante variabilidad intraespecie en los venenos evaluados, siendo esta más marcada entre especímenes de áreas geográficas cercanas (Barlovento y Paracotos, estado Miranda ~74 Km) y

se relacionó esencialmente a proteasas y fosfolipasas A₂, grupos responsables por los efectos más relevantes del envenenamiento botrópico como mionecrosis, edema, coagulopatías y hemorragias. Esta elevada variabilidad intraespecie, aunada al relevante potencial procoagulante, hemolítico indirecto y proteolítico de los venenos evaluados, implica la necesidad de estudiar el potencial neutralizante del antiveneno venezolano.

Estos hallazgos permiten insistir en la necesidad de caracterizar los venenos de importancia médica, con énfasis en aquellas especies que presentan una muy amplia distribución geográfica y abarcan regiones densamente pobladas, como *B. colombiensis* o *B. venezuelensis*, entre otras, lo cual en Venezuela solo ha sido abordado parcialmente.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Calvete J, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Diez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks J, Escolano J, Libia Sanz. 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics* 72: 227-240.
- Condrea E, Devries A, Mager J. 1964. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venom. *Biochim Biophys Acta* 84: 60-73.
- De Sousa L, Bastouri-Carrasco J, Matos M, Borges A, Bónoli S, Vásquez-Suárez A, Guerrero B, Rodríguez-Acosta A. 2013. Epidemiología del ofidismo en Venezuela (1996-2004). *Invest Clín* 54 (2): 123-137.

- Duque Zerpa CT, Fernández I, Vargas A, López JC, Scannone H. 2014. Caracterización toxinológica del veneno de *Bothrops atrox* de Puerto Ayacucho, Edo. Amazonas (Venezuela) y su neutralización por un antiveneno venezolano. *Rev Científ FCV-LUZ* 24 (4): 355-362.
- Duque Zerpa CT, Pineda ME, Navarrete LF, Vargas AM. 2022. Caracterización toxinológica, bioquímica e inmunológica del veneno de la serpiente *Bothrops venezuelensis* (Macizo del Turimiquire, estado Monagas, Venezuela). *Rev Fac Farmacia* 85 (1 y 2): 67-79.
- Gay C, Leiva L, Teibler P, Acosta de Pérez O. 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
- Girón ME, Salazar A, Aguilar I, Pérez J, Sánchez E, Arocha-Piñango C, Rodríguez-Acosta A, Guerrero B. 2008. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comp Biochem Physiology C* 147: 113-121.
- Girón ME, Guerrero B, Salazar AM, Sánchez EE, Álvarez M, Rodríguez-Acosta A. 2013a. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon* 74:116-26.
- Girón ME, Rodríguez-Acosta A, Salazar AM, Sánchez EE, Galán J, Ibarra C, Guerrero B. 2013b. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. *Arch Toxicol* 87 (1): 197-208.
- Guevara R; Duque C; Pineda M; Vargas A. Evaluación de las actividades enzimáticas de dos venenos botrópicos con alta incidencia en los accidentes ofídicos en Venezuela. LXV Convención Anual de ASOVAC, Venezuela, 2015.
- Hornbeck P. 2017. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). *Curr Protoc Immunol* 116: 2.3.1-2.3.4.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- León G, Sánchez L, Hernández A, Villalta M, Herrera M, Segura A, Estrada R, Gutiérrez JM. 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10: 1-18.
- López JC, Vargas A, Scannone H, Fernández I. 1999. Estudio cromatográfico, electroforético y enzimático del veneno total y fracción I de la serpiente venezolana *Bothrops venezuelensis* (Tigra Mariposa). *Rev Científ FCV-LU* 9: 314-320.
- Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. 2012. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 29 (2):198-205.
- Rengifo C, Rodríguez-Acosta A, Navarrete LF. 2019. Serpientes, venenos y tratamiento médico en Venezuela. 2da. Ed. Amazon Publisher pp. 120-272.
- Rodríguez-Acosta A, Uzcátegui W, Azuaje R, Aguilar I, Girón ME. 2000. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 52 (2): 90-94.
- Rodríguez-Acosta A, Sánchez E, Márquez A, Carvajal Z, Salazar A M, Girón ME, Estrella A, Gil A, Guerrero B. 2010. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabellae* venom. *Toxicon* 56: 926-935.
- Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57 (5): 627-645.
- Sánchez E, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena S, Bashir S, Soto J, Pérez J. 2009. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch Toxicol* 83: 271-279.
- Sánchez E, Girón ME, Guerrero B, Uzcátegui N, Rodríguez-Acosta A. 2015. Biological and biochemical characterization of the Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) snake venom from Barlovento region, Miranda state, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 67 (2): 213-230.
- Sousa L, Nicolau C, Peixoto P, Bernardoni J, Oliveira S, Portes-Junior J, Mourão R, Lima-Dos-Santos I, Sano-Martins I, Chalkidis H, Valente R, Moura-Da-Silva A. 2013. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2442.
- Sousa L, Freitas A, Cardoso B, Del-Rei T, Mendes V, Oréfice D, Rocha M, Prezoto B, Moura-da-Silva, A. 2022. Diversity of Phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* Snake Venom: Adaptive Advantages for Snakes Compromising Treatments

- for Snakebite Patients. 14 (543): 1-24.
- Terra R, Pinto A, Guimaraes J, Fox J. 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom-induced pathology. *Toxicon* 54: 836-844.
- Tu A, James G, Chua A. 1965. Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snake. *Toxicon* 3: 8-5.
- WHO, 2017. Guidelines for the production, control, and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO, Geneva. Online: <https://www.medbox.org/dl/5e148832db60a2044c2d4b8a>. 10-4-22.



El Polipéptido Insulinotrópico dependiente de Glucosa en la Preeclampsia y el Riesgo de Diabetes Gestacional

Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide in Preeclampsia and the Risk of Gestational Diabetes

ELSA CAMACHO^{*1}, MARÍA GABRIELA MATOS^{*2}, RAFAEL CORTÉZ^{**}, ANITA ISRAEL^{*3}

Resumen

La preeclampsia (PE) es un síndrome exclusivo de la gestación humana cuyas manifestaciones incluyen la hipertensión arterial, proteinuria y edema. Su incidencia incrementa en mujeres con síndrome metabólico y resistencia a la insulina. El embarazo es un estado único caracterizado por resistencia a la insulina fisiológica que se resuelve después del parto. El polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP) es una hormona que se libera en el intestino delgado en respuesta a la ingesta de alimentos. Su principal función es regular la homeostasis de la glucosa en la sangre estimulando la secreción de insulina. Se conoce poco acerca del papel del GIP en la preeclampsia y la resistencia a la insulina gestacional. Se cuantificaron los niveles plasmáticos del GIP en mujeres con embarazo normal y con PE, pertenecientes a una población de 30 mujeres venezolanas. Se evaluaron muestras de plasma mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex Pro Assays). Los resultados muestran incrementos significativos de los niveles plasmáticos del GIP, asociados a aumentos de insulina y resistina en las pacientes con preeclampsia comparados con las embarazadas sanas. La PAS y las variables evaluadas mostró una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la PAS vs. proteinuria, glicemia, GIP, resistina e insulina. Los resultados sugieren que el incremento del GIP podría estar asociado al desarrollo de hipertensión y resistencia a la insulina en pacientes con PE. Igualmente, indican que el GIP y los parámetros evaluados pudrían constituir posibles biomarcadores para predecir la aparición de hipertensión inducida por el embarazo y la diabetes gestacional.

Palabras clave: Preeclampsia, GIP, resistencia a la insulina, diabetes gestacional

Abstract

Preeclampsia (PE) is a syndrome exclusive to human pregnancy whose manifestations include high blood pressure, proteinuria, and edema. Its incidence increases in women with metabolic syndrome and insulin resistance. Pregnancy is a unique state characterized by physiological insulin resistance that resolves after delivery. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) is a hormone released in the small intestine in response to food intake. Its principal function is to regulate blood glucose homeostasis, stimulating insulin secretion. Little is known about the role of GIP in preeclampsia and gestational insulin resistance. Plasma levels of GIP were quantified in women with normal pregnancy and PE, belonging to a population of 30 Venezuelan women. Plasma samples were evaluated using multiplex bead analysis (Bio-Plex Pro Assays). The results show significant increases in plasma levels of GIP, associated with increases in insulin and resistin in patients with preeclampsia compared to healthy pregnant women. The SBP and the evaluated variables showed a positive, statistically significant correlation between SBP vs. proteinuria, glycemia, GIP, resistin and insulin. The results suggest that the increase in GIP could be associated with the development of hypertension and insulin resistance in patients with PE. Likewise, they indicate that the GIP and the parameters evaluated could constitute possible biomarkers to predict the appearance of pregnancy-induced hypertension and gestational diabetes.

Keywords: Preeclampsia, GIP, insulin resistance, gestational diabetes

*Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. **Servicio de la Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Caracas. Caracas, Venezuela. Correspondencia: astern88@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0003-1270-6230](https://orcid.org/0000-0003-1270-6230)
²[0000-0001-7290-5237](https://orcid.org/0000-0001-7290-5237)
³[0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.3.19](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.3.19)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 20/11/2023
Aprobación: 18/12/2023

Rev. Fac. Farmacia 86 (3): 218-229, 2023

Introducción

La preeclampsia (PE) es un síndrome exclusivo de la gestación humana y constituye una de las causas principales de morbilidad y mortalidad neonatal y materna en todo el mundo. Es un trastorno multifactorial caracterizado por la aparición de hipertensión arterial en la segunda mitad del embarazo (≥ 20 semanas de gestación), acompañada de proteinuria, edema y disfunción endotelial (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013; Brown y col., 2001; Roberts y Gammill, 2005). Ahora bien, en mujeres con diabetes mellitus pre-gestacional (tipo 1 o tipo 2), el riesgo de sufrir PE se incrementa alrededor de cuatro veces en comparación con las mujeres no diabéticas (Persson y col., 2009); igualmente las mujeres con síndrome metabólico también están en alto riesgo de sufrir PE (Briana y Malamitsi-Puchner, 2009). Se sabe que el síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Schindler y col., 2012) se encuentran asociados a la resistencia a la insulina; y el embarazo por sí mismo induce resistencia a la insulina, especialmente después de 20 semanas de gestación (Kirwan y col., 2002; Hauth y col., 2011). Efectivamente, el embarazo es un estado único caracterizado por resistencia a la insulina fisiológica que se resuelve después del parto (Kühl, 1975). Sin embargo, los mecanismos responsables de la resistencia a la insulina y su posible asociación con la PE no están aun totalmente esclarecidos.

Las hormonas incretinas son péptidos intestinales que se secretan después de la ingesta de nutrientes y estimulan la secreción de insulina junto con la hiperglicemia. El GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) y el GLP-1 (péptido similar al

glucagón-1) son las hormonas incretinas conocidas del intestino superior. Juntos, son responsables del efecto incretina, es decir una respuesta secretora de insulina, dos o tres veces mayor a la que ocurre tras la administración de glucosa por vía oral, en comparación con la administración intravenosa. En sujetos con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), este efecto incretina está disminuido o ya no está presente. Esto es consecuencia de una eficacia sustancialmente reducida del GIP sobre el páncreas del diabético y del papel fisiológico insignificante del GLP-1 en la mediación del efecto incretina, incluso en sujetos sanos (Nauck y Meier, 2018; Mudaliar y Henry, 2012). El GIP se encuentra involucrado en la regulación de la masa de las células- β del páncreas, la cual se sabe se encuentra alterada en pacientes con diabetes mellitus 2 (Nauck y Meier, 2018; Amato y col., 2016).

El GIP es un péptido de 42 aminoácidos secretado por las células K de duodeno, y en una proporción menor en el yeyuno e íleon. El GIP es liberado tras la ingesta oral de alimentos cuyo contenido de macronutrientes principal está constituido por carbohidratos y grasas (Cho y Kieffer, 2010). Una vez liberado, el péptido interactúa con sus receptores específicos en las células- β del páncreas donde induce la secreción de insulina, ejerce efectos antiapoptóticos, aumenta la proliferación de las células- β pancreáticas, y la reducción de la producción hepática de glucosa. Además, reduce la secreción ácida en el estómago y mejora el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo mejorando la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo (Muzurović y col., 2022). Por su parte, el GLP-1 endógeno es un péptido de 32 aminoácidos secretado por las células L del intestino delgado distal y colon

tras la ingesta de carbohidratos, grasas y proteínas, lo que estimula la síntesis y secreción de insulina y la proliferación de células- β pancreáticas, mientras que inhibe la apoptosis de las células- β y la liberación de glucagón de las células- α del páncreas (Drucker, 2018).

El embarazo es una condición que se encuentra asociada con la expansión fisiológica y reversible de la masa de las células- β , tanto en animales como humanos (Moffett y col., 2014). Dadas las acciones positivas de las dos incretinas sobre la masa de células- β , que resultan de los efectos recíprocos sobre las células- β de proliferación y muerte celular, Moffett y col., (2014) examinaron el papel del GLP-1 y GIP en la adaptación de los islotes al embarazo, utilizando ratones sometidos a *knockout* (GIPR KO) del receptor de incretina. Los resultados revelaron un papel importante del GLP-1 en los aumentos de masa de células- β inducidos por el embarazo, mediados en gran medida por la producción local de GLP-1 en las células- α . Por el contrario, los ratones GIPR KO demostraron mecanismos intactos de adaptación de los islotes al embarazo, lo que sugiere que el GIP derivado de los islotes o de las células K no es esencial para la expansión de la masa de células- β asociada al embarazo.

Ahora bien, se conoce poco acerca del papel del GIP en la preeclampsia y la resistencia a la insulina gestacional. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los niveles de GIP pueden estar relacionados con la obesidad y la resistencia a la insulina (Romero Zazueta, 2007). La obesidad y la resistencia a la insulina son factores de riesgo conocidos para la preeclampsia.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer la posible relación entre la PE y las alteraciones de los niveles circulantes de GIP. Para ello, se determinaron los niveles plasmáticos de GIP, así como de otras adipocinas y quimioquinas plasmáticas, en un grupo de mujeres venezolanas embarazadas sanas o con PE. Se plantea un papel del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) circulante como un posible biomarcador en la mujer preecláptica y/o en la diabetes mellitus gestacional.

Materiales y métodos

POBLACIÓN Y MUESTRA

Selección de los sujetos

Se realizó un estudio experimental controlado en mujeres embarazadas sanas y en mujeres con preeclampsia que cumplan con los requisitos de inclusión en el estudio. Se seleccionaron aquellas pacientes que acuden al servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Caracas (HUC), Los Chaguaramos, Municipio Libertador, Caracas-Venezuela. Las participantes fueron mujeres embarazadas que acudieron al servicio de obstetricia del HUC en sala de emergencia que residen en la ciudad de Caracas. La población estuvo conformada por 30 mujeres embarazadas, 17 mujeres embarazadas sanas y 13 mujeres embarazadas con preeclampsia, en edades comprendidas entre 17 hasta 40 años y con edades gestacionales entre 28 y 40 semanas o en el último trimestre de embarazo.

Se establecieron como criterios de exclusión: hipertensión crónica, enfermedades

autoinmunes, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, angiopatía, retraso mental, trastornos neurológicos, embarazo múltiple, enfermedad renal crónica, pacientes con índice de masa corporal igual o superior a 30 Kg/m², infección materna o fetal, y anomalías congénitas del feto. A las pacientes seleccionadas se les realizó un examen físico, medición de la presión arterial y se les tomó las muestras biológicas.

Todas las voluntarias firmaron y fecharon con anterioridad (antes de la recolección de las muestras biológicas) el consentimiento informado luego de haber leído con detenimiento el mismo, donde un personal entrenado les explicó en forma oral y escrita, de manera sencilla, en que consiste el estudio y que análisis se realizarán con sus muestras biológicas. Asimismo, las participantes aclararon sus dudas con el investigador que estaba a cargo.

Todos los procedimientos empleados fueron sometidos ante el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, Caracas-Venezuela, y cumplieron con la Declaración de Helsinki para estudios de experimentación con seres humanos (1975 y revisada en 1983).

Muestras Biológicas

Las condiciones pre-analíticas fueron las recomendadas mundialmente para este tipo de valoraciones. Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas de 8-12 horas y sin dieta previa habitual, desde la vena antecubital del brazo (izquierdo o derecho) mediante venipunción directa en la región antecubital con agujas múltiples (Venojet®), utilizando tubos con acelerador de coagulación (Vacutainer®). Inmediatamente, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15

minutos. Se separó el plasma para las cuantificaciones correspondientes. Las alícuotas de plasma se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior análisis.

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA)

En posición supina, se determinó la PA sistólica (PAS) y diastólica (PAD) con el uso de un esfigmomanómetro de mercurio, que se colocó en el brazo izquierdo.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Cuantificación de la excreción urinaria de proteínas totales y glicemia

Se empleó el método colorimétrico basado en el método de Biuret, en el cual se determina la cantidad de proteínas presentes en la orina mediante la formación de un quelato coloreado, donde ocurre una reacción entre los iones cúpricos y los enlaces peptídicos (Pesce y Strande, 1973). El método se fundamenta en la co-precipitación de proteínas totales de la muestra, en presencia del reactivo de rojo Ponceau y la adición del ácido tricloroacético. Brevemente, las muestras de orina fueron centrifugadas para eliminar células tubulares y los oxalatos, a 50 µl orina, se le adicionaron 500 µl del reactivo de rojo Ponceau (40 g/L) y ácido tricloroacético (300 g/L). Seguidamente se centrifugó a 12.000 r.p.m., durante 10 minutos. El precipitado formado fue resuspendido mediante la adición de 1,0 mL de hidróxido de sodio (8 g/L) y la concentración de proteínas urinarias se cuantificó espectrofotométricamente a 560 nm. La concentración de proteínas

en orina se calculó mediante una curva estándar de albúmina sérica de bovino a concentraciones comprendidas entre 0,125 a 8 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg de proteína/100 gramos de peso corporal.

Se determinó los valores de glicemia por métodos enzimáticos, utilizando el estuche comercial (Stanbio). Los valores de referencia para glicemia fueron 70–105 mg/dL.

DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS, ADIPOCINAS Y QUIMIOQUINAS PLASMÁTICAS

Todas las muestras de plasma se evaluaron por duplicado mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex Pro Assays Cytokine, Chemokine and Growth Factors, Life Science Grup, BIORAD). Esta técnica permitió estudiar en forma simultánea las concentraciones circulantes de Péptido C, Grelina, GIP, GLP-1, Glucagón, Insulina, Leptina, PAI-1, Resistina, Visfatina, Adiponectina y Adipsina.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.). Se evaluó la distribución de los datos mediante las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó la prueba t-Student y el análisis de varianza (ANOVA) con análisis post-hoc para comparar los grupos experimentales sujetos a este estudio. Las correlaciones entre las variables fueron realizadas con la prueba de correlación de Spearman. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Instat (GraphPad Software, Inc).

Resultados

CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

En la Tabla I se muestran las características clínicas de las pacientes. Como se observa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad, peso, talla, edad gestacional e índice de masa corporal entre ambos grupos estudiados. Por el contrario, se observaron incrementos significativos en los valores de glicemia y proteinuria al comparar los dos grupos experimentales. De igual manera, los valores de PAS y PAD fueron significativamente superiores en las mujeres con preeclampsia al compararlas con las mujeres embarazadas sanas. Efectivamente, las mujeres con preeclampsia han sido clasificadas por una elevación de la presión arterial de +20 mmHg y, con valores superiores a 140 mmHg en la presión arterial sistólica, y superior a 78 mmHg en la presión arterial diastólica, con una presión arterial media igual o superior a 105 mmHg.

NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOQUINAS, ADIPOCINAS Y QUIMIOQUINAS EN MUJERES EMBARAZADAS SANAS Y EN PACIENTES CON PREECLAMPSIA (PG/ML)

Bajo nuestras condiciones experimentales, se encontró que los valores plasmáticos de la GIP y resistina mostraron incrementos significativos en el grupo de pacientes con preeclampsia comparados con el grupo de embarazadas sanas. Por su parte el péptido GPL-1 mostró una tendencia al incremento, que no resultó ser significativo. Estos aumentos estuvieron asociados a niveles incrementados de Insulina (Tabla II). Por el contrario, se observó una reducción significativa en los niveles plasmáticos de IL-6 y RANTES en las pacientes con

Tabla I.
Características Clínicas de las pacientes embarazadas
controles y con preeclampsia

Parámetro	Mujeres embarazadas sanas	Pacientes Preeclámpticas	P
N=30	N= 17	N= 13	
Edad (años)	26,47 ± 0,92	28,62 ± 2,70	NS
Peso (kg)	71,80 ± 2,97	74,24 ± 2,46	NS
Talla (cm)	1,60 ± 0,02	1,59 ± 0,01	NS
IMC (Kg/m ²)	28,4 ± 0,91	29,33± 0,99	NS
Edad gestacional (semanas)	35,5 ± 1,08 (28 - 40)	35,38 ± 0,99(29 - 41)	NS
PAS (mmHg)	112,90 ± 2,26	153.58 ± 2,74 ***	<0,0001
PAD (mmHg)	74,20 ± 1,81	103,16 ± 3,61***	<0,0001
Glicemia(mg/dL)	73,50 ± 2,46	86,23 ± 5,2*	< 0,05
Proteinuria (mg/dL)	0	4 ± 2,4 ***	< 0,0001

NS: no significativo *p<0,05; ***p<0,0001 comparado con el control

Tabla II.
Niveles plasmáticos de citoquinas, adipocinas y quimioquinas
en mujeres embarazadas sanas y en pacientes con preclampsia (pg/mL)

Parámetro	Mujeres embarazadas sanas	Pacientes Preeclámpticas	P
N=30	N= 17	N=13	
GIP	71,9 ± 45	255,04 ± 71	0,02
GPL-1	2,6 ± 0,2	4,58 ± 1,74	NS
IL-6	9519,5 ± 3153	2341,52 ± 346*	0,04
RANTES	115,1 ± 15,4	76,62 ± 12,48*	0,04
INSULINA	281,0 ± 138	689,49 ± 174*	0,04
RESISTINA	6989.5 ± 1510,51	10304,61 ± 1404,25*	0,04

*p<0,05 comparado con mujeres embarazadas sanas

preeclampsia comparadas con las controles sanos.

CORRELACIÓN ENTRE LA PAS Y LAS VARIABLES EVALUADAS

Al establecer la posible correlación entre los valores de PAS y las variables evaluadas, mediante la prueba de la correlación de Spearman en todos los sujetos, se encontró que existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la PAS vs. proteinuria ($r = 0,8192$; $p = 0,0001$), PAS vs. glicemia ($r = 0,415$; $p < 0,0281$) y PAS vs. GIP ($r = 0,3755$; $p = 0,0489$). Igualmente, se muestra que la PAS se correlaciona positiva y significativamente con la resistina ($r = 0,4410$; $p < 0,0166$) y la insulina ($r = 0,4787$; $p < 0,01$). Por el contrario, la PAS mostró una correlación negativa, estadísticamente significativa, con IL-6 y RANTES (Tabla III).

Tabla III.

Análisis de la correlación de Spearman entre la PAS versus las variables evaluadas en mujeres embarazadas sanas y con preeclampsia

	r	P
PAS & GLICEMIA	0,4150	0,0281
PAS & PROTEINURIA	0,8192	0,0001
PAS & GIP	0,3755	0,0489
PAS & RESISTINA	0,4410	0,0166
PAS & INSULINA	0,4787	0,0100
PAS & RANTES	-0,4327	0,0215
PAS & IL-6	-0,4709	0,0132

Discusión

En el presente estudio se demuestra la desregulación del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en mujeres embarazadas venezolanas con PE, cuya condición fue confirmada por

la clara manifestación del incremento en la presión arterial y la proteinuria. Aunado a ello, las mujeres embarazadas con PE mostraron incrementos significativos en los niveles plasmáticos de insulina y glucosa. Aún más, nuestros hallazgos demuestran que los valores de PAS de la población de pacientes embarazadas se correlacionaron positivamente con los valores de GIP ($P = 0,0489$), resistina ($P = 0,0067$), insulina ($P = 0,01$), glicemia ($P = 0,0067$) y proteinuria ($P = 0,0067$), sugiriendo la coexistencia de PE asociada con resistencia a la insulina materna y diabetes mellitus gestacional (DMG) en el último trimestre del embarazo. Igualmente, se observa una correlación negativa significativa entre PAS y las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y RANTES. Este estudio constituye la primera descripción en que se relacionan las variables de presión arterial y los niveles circulantes de la incretina GIP, y de algunas citoquinas y quimioquinas en PE.

El polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) es un péptido de 42 aminoácidos con capacidad de inducir la secreción de insulina en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. El GIP se sintetiza y se libera tras ingerir hidratos de carbono o lípidos fundamentalmente, desde las células K del intestino delgado (principalmente en el duodeno, aunque también en menor cantidad en yeyuno e íleon) y en zonas del sistema nervioso central y en la glándula salival. Al igual que glucagón, GLP-1, VIP o somatoliberina, entre otros, el GIP pertenece a la superfamilia de la secretina-glucagón (Meier y col., 2003; Baggio y col., 2007). El GIP ejerce sus efectos a través de un único receptor descrito, el GIP-R, que presenta una homología del 40 y el 44% con los receptores de GLP-1 y glucagón,

respectivamente (Meier y col., 2003; Baggio y col., 2007).

Entre los efectos de GIP, debemos destacar su actividad incretina (Nauck y col., 1993a; Tseng y col., 1996a). Durante el ayuno, las concentraciones de GIP se mantienen bajas. La ingestión de carbohidratos o grasa desencadena la liberación de GIP y se produce un incremento en su concentración plasmática, hecho que favorece la secreción de GLP-1 desde las células L intestinales. De esta manera, ambas hormonas promueven la secreción de insulina desde las células- β de los islotes de Langerhans, en lo que se conoce como mecanismo incretina. Sin embargo, se ha comprobado que el efecto insulínico de la administración de GIP en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es menos eficiente que en los individuos sanos, por lo que en este caso la secreción posprandial de insulina no es suficiente para normalizar la glicemia (Nauck y col., 1993b). A pesar de que los valores de GIP están elevados, parece que en los individuos diabéticos se produce una reducción de la sensibilidad, por una expresión deficiente del receptor en las células- β del páncreas (Tseng y col., 1996b). Además de estimular la secreción de insulina, el GIP ejerce efectos antiapoptóticos e induce el crecimiento de las células- β en el páncreas.

Los estudios sobre la influencia de GIP en la ingesta de alimentos son escasos y algo controvertidos. Verdich y col. (2001) señalan la participación de GIP en la regulación del apetito en humanos. Sin embargo, en otro estudio se observa que la glucosa y la fructosa son igualmente efectivas suprimiendo la ingesta, a pesar de las grandes diferencias observadas en la secreción de GIP en respuesta a la

administración de cada sacárido (Vozzo y col., 2002). Recientemente, se ha descrito que la infusión de GIP en individuos sanos de peso normal puede reducir el gasto energético y la sensación de hambre; sin embargo, esto no ocurre en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Daousi y col., 2009).

En cuanto al desequilibrio de la homeostasis de la glucosa, se conoce que GIP aumenta la secreción de resistina, una citoquina proinflamatoria y uno de los factores principales del desarrollo de resistencia a la insulina. Así, estudios en ratones con *knockout* de GIP demuestran una disminución de la secreción de esta citoquina asociada a una disminución en el desarrollo de resistencia a la insulina tras el consumo de una dieta alta en grasa (Tanya y col., 2007). La resistina es una hormona secretada por monocitos, macrófagos y adipocitos. Los estudios en animales han demostrado que la resistina induce resistencia a la insulina y reduce la tolerancia a la glucosa al interferir con la captación de glucosa en el hígado (Steppan y col., 2001). Sin embargo, el papel de la resistina en la fisiología del embarazo y las complicaciones del embarazo aún no ha sido claramente establecido. El presente estudio demostró que el aumento de los niveles de GIP plasmático estuvo asociado a incrementos significativos de resistina en las pacientes con PE cuando se comparan con el grupo de embarazadas control. Resultados similares fueron reportados por Song y col. (2001) y Seol y col. (2016), quienes también demostraron que los niveles de resistina del suero materno se encuentran significativamente elevados en mujeres embarazadas con PE al compararlas con las embarazadas normales.

La evidencia sugiere que el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), además de su participación en la fisiopatología de la diabetes tipo 2, puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. Se han descrito efectos cronotrópicos y reductores de la presión arterial del GIP. Además, se ha sugerido que el GIP controla la vasodilatación mediante la secreción de óxido nítrico y la adhesión de leucocitos vasculares y la inflamación mediante la expresión y secreción de endotelina 1 (Heimbürger y col., 2020). Así, en un estudio cruzado aleatorio, controlado con placebo en 10 participantes con diabetes tipo 1, se evaluó el efecto del GIP sobre la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica y diastólica, durante hiperglicemia (glucosa plasmática 10 mmol/L) e hipoglicemia (glucosa plasmática 3-6 mmol/L). Se encontró que la infusión de GIP durante la hiperglicemia aumentó la frecuencia cardíaca y la PAS, y disminuyó la PAD. Durante la hipoglicemia, GIP aumentó la frecuencia cardíaca, y disminuyó la PAD, sin alterar la PAS. Estos datos sugieren que el efecto del GIP sobre la frecuencia cardíaca no está relacionado con su acción insulínica ya que los pacientes con diabetes tipo 1 carecen de células- β residuales funcionales (Heimbürger y col., 2020). Aun cuando la interpretación de los resultados debe tomarse con cautela, la evidencia sugiere un posible papel del GIP en la regulación de la presión arterial. Estos hallazgos estarían en línea con los resultados obtenidos en el presente estudio en el que se produce una asociación entre el incremento de la presión arterial y los niveles de GIP en mujeres con PE.

La PE se considera una enfermedad inflamatoria sistémica y la activación de

monocitos es un rasgo característico de un estado inflamatorio, por lo que se podría inferir que el aumento de los niveles de la citoquina pro-inflamatoria resistina observado en el presente estudio en PE, podría estar asociado con la activación de monocitos debido a una respuesta inflamatoria sistémica. En efecto, se ha demostrado la presencia de concentraciones elevadas de TNF- α e IL-6 en la circulación materna en PE (Haugen y col., 2006; Noureldeen y col., 2014; Greer y col., 1994; Conrad y col., 1998; Freeman y col., 2004; Kupferminc y col., 1994; Bernardi y col., 2008). Igualmente, Szarka y col. demostraron que los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , las quimioquinas IL-8, IP-10 y MCP-1, así como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, se encuentran incrementados en PE comparados con embarazadas normales, lo que resulta en un entorno sistémico pro-inflamatorio. Igualmente, Hentschke y col. (2012) demostraron que la expresión RANTES en plasma materno y tejidos placentarios, en mujeres con preeclampsia establecida, es mayor que en mujeres de gestación compatible con un embarazo saludable. RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*)/CCL5 es una quimioquina que participa en la enfermedad que cursan con inflamación crónica mediante el reclutamiento de células inflamatorias. Es secretada por muchos tipos de células como las células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos, plaquetas y células-T activadas. Estos resultados confirman la hipótesis de que la fisiología de la PE está asociada con un aumento del proceso inflamatorio gestacional normal.

Sin embargo, los resultados relativos a marcadores de inflamación del presente

estudio son contradictorios, ya que bajo nuestras condiciones experimentales se reportan niveles plasmáticos disminuidos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y de RANTES. Al respecto, Taylor y col. (2016) reportan resultados similares en los niveles de IL-6 y RANTES (En mujeres normotensas vs PE, en pg/mL: IL-6: 140 vs. 113 y RANTES: 54,3 vs. 48,7). Esta inconsistencia de los resultados de IL-6 y RANTES puede sugerir que las mujeres con PE presentan un perfil inmunológico único en comparación con las mujeres normotensas. Sin embargo, no podemos afirmar si estos marcadores inflamatorios están implicados en la patogénesis de preeclampsia y/o son marcadores de enfermedad subclínica.

En conclusión, se reporta aumentos circulantes de la incretina GIP en una población de mujeres embarazadas venezolana con 28-40 semanas de gestación, la cual podría desempeñar un papel en el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes con PE. Estos cambios de los niveles GIP circulante, junto con los factores de riesgo tradicionales, ayudará a determinar la coexistencia de PE y DMG. Igualmente sugiere la posibilidad de que el GIP sea utilizado como biomarcador prometedor para evaluar la sensibilidad a la insulina y la resistencia a la insulina en la PE y/o la DMG. Sin embargo, se requieren estudios a gran escala y prospectivos para evaluar si la asociación entre el incremento de la presión arterial, la proteinuria, y el aumento de la GIP, y otras citocinas y quimoquinas constituyen marcadores tempranos que permitan pronosticar el desarrollo de DMG en pacientes con PE.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e

Innovación por la subvención del Proyecto de Estímulo a la Investigación PEII No. 20122000787.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Amato MC, Pizzolanti G, Torregrossa V, Pantò F, Giordano C. 2015. Phenotyping of type 2 diabetes mellitus at onset on the basis of fasting incretin tone: results of a two-step cluster analysis. *J Diabetes Investigation* 7(2):219-225.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. 2013. Task Force on Hypertension in Pregnancy Report. *Obstet Gynecol* 122: 1122-1131.
- Baggio LL, Drucker DJ. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-57.
- Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. 2008. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 34(6): 948-951.
- Briana DD. 2009. Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci* 16:921-937.
- Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. 2001. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 20:IX-XIV.
- Cho YM, Kieffer TJ. 2010. K-cells and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in health and disease. *Vitam Horm* 84:111-50.
- Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. 1998. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 40(2):102-111.
- Daousi C, Wilding JP, Aditya S, Durham BH, Cleator J, Pinkney JH, Ranganath LR. 2009. Effects of peripheral administration of synthetic human glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) on energy expenditure and subjective appetite sensations in healthy normal weight subjects and obese patients with type 2 diabetes. *Clin*

- Endocrinol (Oxf) 71(2):195-201.
- Drucker DJ. 2018. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab* 27:740-756.
- Freeman DJ, McManus F, Brown EA, Cherry L, Norrie J, Ramsay JE, Clark P, Walker ID, Sattar N, Ian A. Greer IA. 2004. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* 44(5):708-714.
- Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. 1994. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol* 84(6):937-940.
- Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA. 2006. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(2): E326-E333.
- Hauth JC, Clifton RG, Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Leveno KJ, Varner MW, Wapner RJ, Thorp JM Jr., Mercer BM, Peaceman AM, Ramin SM, Carpenter MW, Samuels P, Sciscione A, Tolosa JE, Saade G, Sorokin Y, Anderson GD. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. 2011. Maternal insulin resistance and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 204:327. e321- 327.
- Heimbürger SM, Bergmann NC, Augustin R, Lærke S, Gasbjerg LS, Christensen MB, Knop FK. 2020. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and cardiovascular disease. *Peptides* 125: 170174.
- Hentschke MR, Krauspenhar B, Guwzinski A, Caruso FB, Silveira ID, Antonello IC, Gadonski G, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE. 2012. Expression of RANTES (CCL5) in maternal plasma, fetal plasma and placenta in pre-eclampsia and normotensive controls. *Pregnancy Hypertension: An International J Women's Cardiovascular Health* PPO40. 240-339.
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier J-C, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalkan SC, Catalano PM, 2002. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51(7):2207- 2213.
- Kühl C. 1975. Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic women. 1. Influence of normal pregnancy on serum glucose and insulin concentration during basal fasting conditions and after a challenge with glucose. *Acta Endocrinol (Copenh)* 79 (4):709-719.
- Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. 1994. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 170(6):1752-1757.
- Meier JJ, Gallwitz B, Nauck MA. 2003. Glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide: potential applications in type 2 diabetes mellitus. *BioDrugs* 17:93-102.
- Moffett RC, Vasu S, Thorens B, Drucker DJ, Flatt PR. 2014. Incretin receptor null mice reveal key role of GLP-1 but not GIP in pancreatic beta cell adaptation to pregnancy. *PLoS One* 9(6): e96863.
- Mudaliar S, Henry RR. 2012. The incretin hormones: from scientific discovery to practical therapeutics. *Diabetologia* 55(7):1865-1868.
- Muzurović EM, Volčcanšek Š, Tomšič KZ, Janež A, Mikhailidis DP, Rizzo M, Mantzoros CS. 2022. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Dual Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide/Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists in the Treatment of Obesity/Metabolic Syndrome, Prediabetes/Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Current Evidence. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 27:10742484221146371.
- Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. 1993a. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76:912-7.
- Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. 1993b. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91:301-7.
- Nauck MA, Meier JJ. 2018. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 20 (Suppl S1):5-21.
- Noureldeen AF, Qusti SY, Al-Seeni MN, Bagais MH. 2014. Maternal Leptin, Adiponectin, Resistin, Visfatin and Tumor Necrosis Factor Alpha in Normal and Gestational Diabetes. *Indian J Clin Biochem* 29(4):462-70.
- Persson M, Norman M, Hanson U. 2009. Obstetric and perinatal outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a large, population-based study. *Diabetes Care* 32:2005-2009.

- Pesce M, Strande D. 1973. A new micro method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 19(11):1265-1267.
- Roberts JM, Gammill HS. 2005. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 46:1243-1249.
- Romero Zazueta A. 2007. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 15(3): 156-164.
- Schindler K, Vila G, Hoppichler F, Lechleitner M, Anton Luger A, Anderwald C, Hoefler J, Tomasec G, Kautzky-Willer A, Ludvik B. 2012. The impact of type 2 diabetes on circulating adipokines in patients with metabolic syndrome. *Obest Facts* 5(2):270-276.
- Seol HJ, Oh MJ, Yeo MK, Kim A, Lee ES, Kim HJ. 2010. Comparison of serum levels and the placental expression of resistin between patients with preeclampsia and normal pregnant women. *Hypertens Pregnancy* 29 310-317.
- Song Y, Gao J, Qu Y, Wang S, Wang X, Liu J. 2016. Serum levels of leptin, adiponectin and resistin in relation to clinical characteristics in normal pregnancy and preeclampsia. *Clinica Chimica Acta* 458:133-7.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307312
- Szarka A, Rigó J, Lázár L, Beko G, Molvarec A. 2010. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunology* 11(59): 1-9.
- Tanya H, Adriano M, Grac F, Yuichiro Y, Katsushi T, Yutaka S, Drucker D. 2007. Extrapaneatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest* 117(1):143-152.
- Taylor BD, Tang G, Ness RB, Olsen J, Hougaard DM, Skogstrand K, Roberts JM, Haggerty CL. 2016. Mid-pregnancy circulating immune biomarkers in women with preeclampsia and normotensive controls. *Pregnancy Hypertension: An International J Women's Cardiovascular Health* 6:72-78.
- Tseng CC, Kieffer TJ, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM. 1996a. Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor antagonist in the rat. *J Clin Invest* 98:2440-5.
- Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM. 1996b. Chronic desensitization of the glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor in diabetic rats. *Am J Physiol* 270:E661-6.
- Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgård Madsen J, Juul Holst J, Astrup A. 2001. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety - effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1206-14.
- Vozzo R, Baker B, Wittert GA, Wishart JM, Morris H, Horowitz M, Chapman I. 2002. Glycemic, hormone, and appetite responses to monosaccharide ingestion in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51(8):949-957.

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

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

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

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

FORMA Y PREPARACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

² <https://orcid.org/>

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

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

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

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

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

ARTÍCULO EN REVISTA:

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

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

LIBROS:

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

CAPÍTULOS EN LIBROS:

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

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

TESIS O TRABAJOS DE ASCENSO:

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

RESÚMENES EN CONGRESOS:

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

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

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

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

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

Lista de comprobación de preparación de envíos:

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

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

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

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