



Revista Electrónica de Biomedicina Electronic Journal of Biomedicine

ISSN: 1697-090X

Inicio
Home

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
/ Copyright

Contacto/Contact:



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:1-68

Enero - Abril 2012 / January - April 2012

EDITORIAL /EDITORIAL

3-6.- Q FEVER AND PREGNANCY

7-10.- FIEBRE Q Y EMBARAZO

Santiago González Quijada MD, PhD

Servicio de Medicina Interna. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. Burgos. España

11-15.- THIOSEMICARBAZONES AS NEW ANTITUMOR COMPOUNDS

16-20.- TIOSEMICARBAZONAS, NUEVOS COMPUESTOS CONTRA EL CÁNCER

Prof. Javier García Tojal, PhD.

Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Burgos. España

ORIGINALS / ORIGINALES

21-25 PROPUESTA DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO-PRONÓSTICO PARA EL ANÁLISIS Y EL SEGUIMIENTO DE LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA CRÓNICA

Juan Llor Baños, Luis Fernando De La Fuente Crespo

Medicina Interna, Hospital de León y Universidad de León. León, España

26-36.- EFFECT OF BROMINE ATOMS NUMBER ON THE CYTOTOXICITY OF TWO 2-FURYLETHYLENE DERIVATIVE SUBSTANCES IN NORMAL AND TUMORAL CELL LINES

Oscar Hernández, Yudiska Martínez, Héctor Pimentel, Llanetsy Llanes, Giselle Pérez, Nayadis Vazquez, Sandra Fernández, Quesada Lidice, Aime Debesa.

Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI), Universidad Médica y Centro Provincial de Genética Médica, Camagüey. Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central de Las Villas, Villa Clara. Cuba.

37-40.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO SOBRE LOS NIVELES DE TIOREDOXINA Y DE LA MOLÉCULA IDO (INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASA) EN LINEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL.

Mónica Cavia, Susana Gonzalez-Mateo, Carlos García Giron, Pilar Muñoz PhD

Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Burgos. Burgos. España

41-48.-EFECTOS ADVERSOS DERMATOLÓGICOS POR ANTIBACTERIANOS. SISTEMA CUBANO DE FARMACOVIGILANCIA, 2007-2009.

Ismayr Alfonso Orta, Giset Jimenez Lopez

Unidad Coordinadora Nacional de Farmacovigilancia, Dirección de medicamentos y Tecnología. Departamento Nacional de Farmacoepidemiología. MINSAP. Cuba

CASE REPORTS / CASOS CLÍNICOS

49-59.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LA VELLOSIDAD PLACENTARIA CORRESPONDIENTE A FETO CON MÚLTIPLES MALFORMACIONES CONGÉNITAS

Olivar C Castejón S. Prof. Titular en Biología Celular. Director del CIADANA.

Laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo - Núcleo Aragua. Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua (CIADANA). Maracay, Edo. Aragua.

Venezuela.

INTERNET REVIEWS / REVISIONES EN INTERNET

60-65.- IMPACTO DE LA METODOLOGÍA MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN CLÍNICA DE AGENTES INFECCIOSOS.

Gabriel A. March, José María Eiros.

Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina de Valladolid. Valladolid. España

LETTERS TO THE EDITOR / CARTAS AL EDITOR

66-68.-¿PUEDE SER LA OCTOPAMINA UN MARCADOR BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON?.

Esther Cubo Delgado MD, PhD.

Servicio Neurología. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. Burgos. España.



ISSN: 1697-090X

Inicio
Home

Indice del
volumen
Volume index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:3-6.

Editorial:

Q FEVER AND PREGNANCY

Santiago González Quijada MD, PhD

Department of Internal Medicine
Complejo Asistencial Universitario de Burgos
Burgos. Spain

[sgq @ hgy.es](mailto:sgq@hgy.es)

[Version en español](#)

Q fever (QF) is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella Burnetti*. People are mainly infected due to inhalation of contaminated aerosols^{1,3}. It is generally treated as an occupational disease, although isolated cases and outbreaks in people with indirect contact with infected animals have been reported¹. Acute QF has a wide clinical spectrum that includes isolated febrile syndrome, pneumonia and hepatitis, although the majority of cases are asymptomatic⁴. Chronic infection mainly involves endocarditis, although it can affect vascular implants and bones^{1,4}. Serology continues to be the diagnostic method of reference. Domestic animals and farm ungulates are the main reservoirs, and cause abortions and various obstetric complications in these.

Q fever is usually asymptomatic during pregnancy, although there is a higher risk of it becoming chronic²⁻⁶. Furthermore, it has been associated with diverse obstetric complications, such as miscarriages, intrauterine death, prematurity, oligoamnios and delayed intrauterine growth²⁻³. However, it is highly unlikely, except in epidemic situations, that the primary form of this infection is contracted during pregnancy.

As we will see below, something different could happen as regards the

secondary or recurrence of the infection.

This microorganism can persist in the uterus, breast, bone marrow, and other body tissues for years, and be reactivated later in situations of immunodepression or pregnancy^{3,8-10}. This fact, known for a long time in animals, can also be a common cause of obstetrics complications in humans.

Our group has recently demonstrated a strong association between serology titers compatible with active or recent Q fever infections and miscarriage in the province of Burgos (Spain)⁹. According to our data, up to 12% of miscarriages could be associated with this infection, probably due to reactivation of a previous infection. To understand the scope of these findings, it should be remembered that miscarriage is by far the most frequent obstetric complication (it explains up to 20% of fetal mortality), and up to the present time, a significant relationship between miscarriage and other infections has been unable to be shown.

It may be worth noting that the mortality and morbidity associated with toxoplasmosis during pregnancy is 1-4 per 1000 births, and for congenital rubella it is approximately 0.2 per 10,000 births⁵.

Other groups that have work on the subject have obtained disparate and contradictory results, perhaps due to the limited seroprevalence observed and the deficient methodology applied^{4-8, 10,11}. Something similar occurs with the more delayed obstetrics complications (those that take place in the second or third trimester of the pregnancy) where the discrepancies observed are even greater. As regards this last aspect, we do not know what happens in our area, a traditionally endemic Q fever region.

We conclude by pointing out the need to perform serological screening of *C. burnetti* in all pregnant women who are seen in our clinics.

It should be remembered that the primary form of the infection has been successfully treated in pregnant women, and that there are effective vaccines that could prevent the infection.

Lastly, and given the strong relationship between serology compatible with active Q fever and miscarriage, a clinical trial should be carried out to demonstrate whether treatment with specific antibiotics could alter the risk of suffering from it. This should be done at the beginning of the pregnancy, since 50% of our pregnant women miscarriage before seeing the doctor. In fact we should know if there has been previous exposure to the microorganism before the pregnancy, when the preventive measures against a possible reactivation of the infection would be more effective.

REFERENCES

- 1.- Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:109-123.
- 2.- Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis* 2007;44:232-237.
- 3.- Vaidya VM, Malik SV, Kaur S, Kumar S, Barbuddhe SB. Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol* 2008;46:2038-2044.
- 4.- Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:189-196.
- 5.- Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch Intern Med* 2002;162:701-704.
- 6.- Stein A; Raoult D. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clin Infect Dis* 1998;27:592-596.
- 7.- Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. *Clin Infect Dis* 2007;45:548-555.
- 8.- Langley JM, Marrie TJ, Leblanc JC, Almudevar A, Resch L, Raoult D. *Coxiella burnetii* seropositivity in parturient women is associated with adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:228 -232.
- 9.- Santiago González Quijada, Beatriz Manzanedo Terán, Patricia Sieto Murias, Ainhoa Aregita Anitua, José Luis Barba Cermeño, and Arturo Bodega Frías. Q fever and spontaneous abortion. *Clin Microbiol Infect* 2012; 10.1111/j.1469-0691.201.
- 10.- Harris RJ, Storm PA, Lloyd A, Arens M, Marmion BP. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol Infect* 2000;124:543-549.
- 11.- Wim van der Hoek¹, Jamie CE Meekelenkamp, Alexander CAP Leenders, Nancy Wijers¹, Daan W Notermans, Chantal WPM

Hukkelhoven. Antibodies against Coxiella burnetii and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in the Netherlands. BMC Infectious Diseases 2011;11:44-49.

CORRESPONDENCE:

Santiago González Quijada MD, PhD

Servicio de Medicina Interna

Complejo Asistencial Universitario de Burgos

Burgos. España

Mail: [sgq @ hgy.es](mailto:sgq@hgy.es)



ISSN: 1697-090X

Inicio
Home

Indice del
volumen
Volume index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:7-10.

Editorial:

FIEBRE Q Y EMBARAZO

Santiago González Quijada MD, PhD

Servicio de Medicina Interna
Complejo Asistencial Universitario de Burgos
Burgos. España

[sgq @ hgy.es](mailto:sgq@hgy.es)

English Version

La fiebre Q (FQ) es una zoonosis de distribución mundial causada por *Coxiella Burnetti*. Las personas se infectan principalmente por la inhalación de aerosoles contaminados^{1,3}. En general, se trata de una enfermedad ocupacional, aunque ocasionalmente se describen casos aislados y brotes en personas en contacto indirecto con animales infectados¹. La FQ aguda ofrece un amplio espectro clínico, que incluye síndrome febril aislado, neumonía y hepatitis, aunque la mayoría de los casos son asintomáticos⁴. La infección crónica cursa principalmente con endocarditis, aunque también puede afectar a prótesis vasculares y huesos^{1,4}. La serología sigue siendo el método diagnóstico de referencia. Los animales domésticos y ungulados de granja son los principales reservorios, y en ellos la infección causa abortos y diversas complicaciones obstétricas.

En embarazadas, la fiebre Q suele cursar de forma asintomática, aunque presenta mayor riesgo de cronificación²⁻⁶. Además, se ha puesto en relación con diversas complicaciones obstétricas, como el aborto espontáneo, muerte intraútero, prematuridad, oligoamnios y retraso del crecimiento intrauterino²⁻³. Sin embargo, excepto en situaciones de epidemia, es poco probable que una embarazada contraiga la forma primaria de esta infección. Como veremos a continuación, algo diferente podría ocurrir con respecto a la infección

secundaria o recidiva de la infección.

Este microorganismo puede persistir en el útero, mamas, médula ósea y otros tejidos corporales durante años, y reactivarse posteriormente en situaciones de inmunodepresión o embarazo^{3,8-10}. Este hecho, conocido desde hace tiempo en animales, puede ser también una causa frecuente de complicaciones obstétricas en humanos.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado una fuerte asociación entre títulos serológicos compatibles con infección activa o reciente de fiebre Q y aborto espontáneo en la provincia de Burgos (España)⁹. Según nuestros datos, hasta el 12% de los abortos podrían estar relacionados con esta infección, probablemente por reactivación de una infección previa. Para comprender el alcance de estos hallazgos, es necesario recordar que el aborto es con mucho la complicación obstétrica más frecuente (explica hasta el 20% de la mortalidad fetal), y que hasta el momento actual no se había podido demostrar una asociación importante entre aborto y otras infecciones.

Para que valga de comparación, la morbilidad y mortalidad asociadas a la Toxoplasmosis durante el embarazo es de 1-4 por 1000 nacimientos, y para la Rubeola congénita de aproximadamente 0.2 por 10.000 nacimientos⁵.

Otros grupos que han trabajado en el tema han obtenido resultados dispares y contradictorios, quizás en relación con la escasa seroprevalencia observada y la deficiente metodología aplicada^{4-8, 10,11}. Algo similar ocurre con las complicaciones obstétricas más tardías (aquellas que tienen lugar en el segundo y tercer trimestre del embarazo, dónde las discrepancias observadas son aún mayores. En cuanto a este último aspecto, desconocemos lo que ocurre en nuestro medio, una región tradicionalmente endémica de fiebre Q.

Concluimos señalando la necesidad de realizar un screening serológico de *C. burnetti* a todas las mujeres embarazadas que acudan a nuestra consulta.

Hay que recordar que la forma primaria de la infección ha sido tratada con éxito en las embarazadas, y que existen vacunas eficaces que podrían prevenir la infección.

Por último, y dado la fuerte asociación que hemos encontrado entre serología compatible con fiebre Q activa y aborto, habría que realizar un ensayo clínico para demostrar si el tratamiento con antibioterapia específica podría modificar el riesgo de padecerlo. Para ello deberíamos conocer el status serológico en los primeros momentos del embarazo, ya que el 50% de nuestras gestantes abortan antes de haber acudido al médico. Incluso, sería necesario saber si ha habido exposición previa al germen antes del embarazo, cuando las medidas preventivas contra una posible reactivación infecciosa podrían ser más eficaces.

REFERENCIAS

- 1.- Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:109-123.
- 2.- Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis* 2007;44:232-237.
- 3.- Vaidya VM, Malik SV, Kaur S, Kumar S, Barbuddhe SB. Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol* 2008;46:2038-2044.
- 4.- Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:189-196.
- 5.- Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch Intern Med* 2002;162:701-704.
- 6.- Stein A; Raoult D. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clin Infect Dis* 1998;27:592-596.
- 7.- Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. *Clin Infect Dis* 2007;45:548-555.
- 8.- Langley JM, Marrie TJ, Leblanc JC, Almudevar A, Resch L, Raoult D. *Coxiella burnetii* seropositivity in parturient women is associated with adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:228 -232.
- 9.- Santiago González Quijada, Beatriz Manzanedo Terán, Patricia Sieto Murias, Ainhoa Aregita Anitua, José Luis Barba Cermeño, and Arturo Bodega Frías. Q fever and spontaneous abortion. *Clin Microbiol Infect* 2012; 10.1111/j.1469-0691.201.
- 10.- Harris RJ, Storm PA, Lloyd A, Arens M, Marmion BP. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol Infect* 2000;124:543-549.
- 11.- Wim van der Hoek¹, Jamie CE Meekelenkamp, Alexander CAP Leenders, Nancy Wijers¹, Daan W Notermans, Chantal WPM

Hukkelhoven. Antibodies against Coxiella burnetii and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in the Netherlands. BMC Infectious Diseases 2011;11:44-49.

CORRESPONDENCIA:

Santiago González Quijada MD, PhD

Servicio de Medicina Interna

Complejo Asistencial Universitario de Burgos

Burgos. España

Mail: [sgq @ hgy.es](mailto:sgq@hgy.es)



ISSN: 1697-090X

[Inicio](#)
[Home](#)

[Indice del volumen](#)
[Volume index](#)

[Comité Editorial](#)
[Editorial Board](#)

[Comité Científico](#)
[Scientific Committee](#)

[Normas para los autores](#)
[Instruction to Authors](#)

[Derechos de autor](#)
[Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:11-15.

Editorial:

THIOSEMICARBAZONES AS NEW ANTITUMOR COMPOUNDS

Javier García Tojal, PhD
Profesor Titular de Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos.
Burgos. España

[qipgatoj @ ubu.es](mailto:qipgatoj@ubu.es)

[Version en español](#)

The search of new compounds with medicinal applications is promoting important therapeutic advances and generates a new scientific multidisciplinary field where chemistry, pharmacy and biomedicine overlap together with other specialities. Thiosemicarbazones are some of the studied compounds. These sulfur-containing organic substances exhibit an interesting biological activity, which has been studied for more than fifty years¹. In this sense, it is worth mentioning the efforts carried out in the cancer research. During the middle 1960s some of these derivatives showed high antitumor activity in different assays²⁻³. This fact encouraged to perform the first clinical trials, early stopped due to the unexpected low activity in humans⁴.

In addition, cellular targets of these substances were identified, mainly redox cellular processes and several enzymatic systems as topoisomerases, dehydrogenases, polymerases and nucleoside kinases⁵⁻⁸. Among the last ones, it is remarkable the inhibition of ribonucleotide reductases (RNRs), enzymes

that transform ribonucleoside diphosphates into deoxyribonucleoside diphosphates to give the basic constituents of DNA⁹.

The synthesis of new more selective and less toxic compounds led to the attainment of a novel drug (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, ATSC), which is currently involved in phase I and II clinical trials¹⁰⁻¹³. In parallel, other compounds exhibiting even better biological activity than ATSC have been developed¹⁴. Among them, there are some metal-organic derivatives. Binding of such organic molecules to metal ions gives rise to very stable coordination compounds. It also allows to modify the physicochemical properties of the thiosemicarbazones. Thus, their usually low water solubility drastically increases upon coordination. Moreover, a fine selection of the metal ion leads to a control of the stability of these substances against decomposition reactions.

Finally, the coordination induces changes in the acid-base behavior and the redox properties as in the metal ions as in the thiosemicarbazones. These physicochemical transformations affect the biological activity. For instance, it has recently been suggested that inhibition of RNRs is actually carried out by thiosemicarbazoneiron complexes¹⁵, it has also been demonstrated that copper derivatives activate lysosomal apoptosis pathway¹⁶ and, finally, both ions-containing compounds are responsible for the redox activity shown by thiosemicarbazones inside the cell¹⁷.

On the other hand, thiosemicarbazonecopper compounds are yielding quite promising findings in diagnosis. In this regard, ⁶⁴Cu-based thiosemicarbazone radiopharmaceuticals are being explored to be used in PET (positron emission tomography) because of the hypoxia-selective tissue uptake, and they have been approved for use in clinical trials in patients with cervical cancer¹⁸.

In summary, the interesting results obtained in therapy and diagnosis become the thiosemicarbazones and their metal complexes into very attractive systems to be studied with a great applicative prospect. However, it is necessary a deeper research of these compounds in order to diminish their toxicity and increase the effectiveness in humans.

To achieve these goals, the preparation of new compounds, studies on structure-properties relationships and the reactivity against biomolecules, which are in an early stage, should be carried out. The advances in this field could be very useful to interpret the biological properties, as the interactions and bonding of thiosemicarbazone compounds to biological targets, and virtually to increase their therapeutic possibilities.

REFERENCES

- 1.- Brockman RW, Thomson JR, Bell MJ, Skipper HE. Observations

- on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Res.* 1956, 16: 167-170.
- 2.- French FA, Blanz EJ. Carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. III. Primary correlation. *J Med Chem.* 1966, 9: 585-589.
- 3.- Blanz EJ, French FA, DoAmaral JR, French DA. Carcinostatic activity of thiosemicarbazone of formyl heteroaromatic compounds. VII. 2-formylpyridine derivatives bearing additional ring substituents. *J Med Chem.* 1970, 13: 1124-1130.
- 4.- DeConti RC, Toftness BR, Agrawal KC, Tomchick R, Mead JAR, Bertino JR, Sartorelli AC, Creasey WA. Clinical and pharmacological studies with 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone. *Cancer Res.* 1972, 32: 1455-1462.
- 5.- Chan-Stier CH, Minkel D, Petering DH. Reactions of bis thiosemicarbazone copper(II) complexes with tumor-cells and mitochondria. *Bioinorg Chem.* 1976, 6: 203-217.
- 6.- Kaska W, Carrano C, Michalowski J, Jackson J, Levinson W. Inhibition of RNA dependent RNA-polymerase and malignant transforming ability of rous-sarcoma virus by thiosemicarbazone transition, metal complexes. *Bioinorg Chem.* 1978, 8: 225-236.
- 7.- Miller III MC, Stineman CN, Vance JR, West DX, Hall IH. The cytotoxicity of copper(II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-N-4-substituted thiosemicarbazones. *Anticancer Res.* 1998, 18: 4131-4140.
- 8.- Miller III MC, Bastow KF, Stineman CN, Vance JR, Song SC, West DX, Hall IH. The cytotoxicity of 2-formyl and 2-acetyl-(6-picolyl)-N-4-substituted thiosemicarbazones and their copper(II) complexes. *Arch Pharm Pharm Med Chem.* 1998, 331: 121-127.
- 9.- Moore EC, Zedeck MS, Agrawal KC, Sartorelli AC. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone and related compounds. *Biochemistry.* 1970, 9: 4492-4498.
- 10.- Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP), an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Advan Enzyme Regul.* 1999, 39: 3-12.
- 11.- Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J, MacDonald S. Phase I and

pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. Cancer Chemother Pharmacol. 2002, 50: 223-229.

12.- Karp JE, Giles FJ, Gojo I, Morris L, Greer J, Johnson B, Thein M, Sznol M, Low J. A Phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine®) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myeloproliferative disorders. Leuk Res. 2008, 32: 71-77.

13.- Traynor AM, Lee JW, Bayer GK, Tate JM, Thomas SP, Mazurczak M, Graham DL, Kolesar JM, Schiller JH. A phase II trial of Triapine® (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. Invest. New Drugs. 2010, 28: 91-97.

14.- Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. Blood. 2004, 104: 1450-1458.

15.- Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ, Zhu L, Wang T, Qi C, Shih J, Yen Y. A ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. Mol Cancer Ther. 2006, 5: 586-592.

16.- Lovejoy DB, Janson PJ, Brunk UT, Wong J, Ponka P, Richardson DR. Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes. Cancer Res. 2011, 71: 5871-5780.

17.- Yu Y, Rahmanto YS, Hawkins CL, Richardson DR. The potent and novel thiosemicarbazone chelators di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone affect crucial thiol systems required for ribonucleotide reductase activity. Mol Pharmacol. 2011, 79: 921-931.

18.- Holland JP, Barnard, PJ, Collison D, Dilworth JR, Edge R, Green JC, McInnes E JL. Spectroelectrochemical and computational studies on the mechanism of hypoxia selectivity of copper radiopharmaceuticals. Chem Eur J. 2008; 14: 5890-5907.

CORRESPONDENCE:

Prof. Javier García Tojal

Profesor Titular de Química Inorgánica.



**Facultad de Ciencias.
Universidad de Burgos
Plaza Misael Bañuelos s/n
09001. Burgos. España
Mail: [qipgatoj @ ubu.es](mailto:qipgatoj@ubu.es)**



ISSN: 1697-090X

Inicio
Home

Indice del
volumen
Volume index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:16-20.

Editorial:

TIOSEMICARBAZONAS, NUEVOS COMPUESTOS CONTRA EL CÁNCER

Javier García Tojal, PhD
Profesor Titular de Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos.
Burgos. España

[qipgatoj @ ubu.es](mailto:qipgatoj@ubu.es)

English Version

La búsqueda de nuevos compuestos con aplicaciones en medicina está impulsando importantes avances terapéuticos y genera una nueva área científica multidisciplinar donde confluyen química, farmacia y biomedicina, aparte de otras especialidades. Entre las familias de compuestos investigados se encuentran las tiosemicarbazonas. Éstas son sustancias orgánicas que contienen azufre y exhiben una interesante actividad biológica que viene siendo estudiada desde hace unos cincuenta años¹. Destacan, en este sentido, los trabajos desarrollados en la lucha contra el cáncer. Ya a mediados de los años sesenta algunos de estos derivados mostraron una importante actividad antitumoral en ensayos celulares y también en otros realizados sobre organismos superiores (ratones y perros, principalmente)²⁻³. Ello animó a efectuar las primeras pruebas clínicas, que fueron interrumpidas al no rendir los resultados esperados⁴.

También se identificaron los blancos celulares sobre los que actúan estas sustancias: fundamentalmente, procesos celulares de oxidación-reducción y múltiples sistemas enzimáticos (topoisomeras, deshidrogenasas, polimerasas, nucleósido kinasas)⁵⁻⁸. Entre estos últimos destaca la inhibición de las ribonucleótido reductasas (RNRs), familia de enzimas que cataliza la conversión de ribonucleósido difosfatos en desoxirribonucleósido difosfatos, paso previo a la formación de las unidades constituyentes del ADN⁹.

La síntesis de nuevos compuestos, cada vez más selectivos y menos tóxicos, condujo a la obtención de una nueva droga (3-amino-2-piridinacarbaldéido tiosemicarbazona, ATSC) sujeta, actualmente, a nuevos ensayos en fases clínicas I y II¹⁰⁻¹³. Paralelamente, se han ido introduciendo mejoras que permiten disponer, a día de hoy, de compuestos que dan aún mejores resultados que la ATSC en los ensayos biológicos¹⁴. Entre ellos, algunos derivados metalo-orgánicos. Y es que la unión de estas sustancias orgánicas a iones metálicos da lugar a complejos o compuestos de coordinación habitualmente muy estables, y permite modificar varias de las propiedades físico-químicas de las tiosemicarbazonas. Así, su solubilidad en agua, normalmente baja, puede aumentar considerablemente. Además, una cuidadosa selección del metal permite modular la estabilidad de estas moléculas frente a distintas reacciones de descomposición.

Finalmente, la coordinación cambia drásticamente la acidez y las propiedades óxido-reductoras tanto de los iones metálicos como de las propias tiosemicarbazonas. Estas modificaciones físico-químicas influyen notablemente en la actividad biológica. Por ejemplo, en los últimos años se ha sugerido que la inhibición de las RNRs se debe, en realidad, a complejos tiosemicarbazona-hierro¹⁵, además se ha demostrado que los derivados con cobre activan procesos en los lisosomas que inducen la muerte celular¹⁶ y, en definitiva, que los complejos con ambos iones son los responsables de la actividad óxido-reductora que muestran las tiosemicarbazonas dentro de las células¹⁷.

Por otro lado, sistemas tiosemicarbazona-cobre están proporcionando resultados muy prometedores en el campo de la diagnosis clínica. En este sentido, se están explorando radiofármacos basados en núcleos de ⁶⁴Cu para su uso en PET (tomografía por emisión de positrones), pues han demostrado ser selectivos para la detección de hipoxia y están siendo sometidos a pruebas clínicas para detección de cáncer de cuello de útero¹⁸.

En resumen, los interesantes resultados obtenidos en los campos de la terapia y diagnosis clínica convierten a las tiosemicarbazonas y sus complejos metálicos en sistemas muy atractivos para su estudio y de gran proyección aplicativa. Sin embargo, queda mucho por investigar en estos compuestos con el fin de disminuir su toxicidad y aumentar su efectividad en humanos.

Es necesario profundizar aún más en la preparación de nuevos compuestos, en el establecimiento de relaciones estructura-propiedades y el conocimiento de la reactividad de estas sustancias frente biomoléculas. Todo ello permitirá

interpretar mejor su actividad biológica y usar estos conocimientos en el diseño de fármacos con mayores posibilidades terapéuticas.

REFERENCIAS

- 1.- Brockman RW, Thomson JR, Bell MJ, Skipper HE. Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. Cancer Res. 1956, 16: 167-170.**
- 2.- French FA, Blanz EJ. Carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. III. Primary correlation. J Med Chem. 1966, 9: 585-589.**
- 3.- Blanz EJ, French FA, DoAmaral JR, French DA. Carcinostatic activity of thiosemicarbazone of formyl heteroaromatic compounds. VII. 2-formylpyridine derivatives bearing additional ring substituents. J Med Chem. 1970, 13: 1124-1130.**
- 4.- DeConti RC, Toftness BR, Agrawal KC, Tomchick R, Mead JAR, Bertino JR, Sartorelli AC, Creasey WA. Clinical and pharmacological studies with 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone. Cancer Res. 1972, 32: 1455-1462.**
- 5.- Chan-Stier CH, Minkel D, Petering DH. Reactions of bis thiosemicarbazone copper(II) complexes with tumor-cells and mitochondria. Bioinorg Chem. 1976, 6: 203-217.**
- 6.- Kaska W, Carrano C, Michalowski J, Jackson J, Levinson W. Inhibition of RNA dependent RNA-polymerase and malignant transforming ability of rous-sarcoma virus by thiosemicarbazone transition, metal complexes. Bioinorg Chem. 1978, 8: 225-236.**
- 7.- Miller III MC, Stineman CN, Vance JR, West DX, Hall IH. The cytotoxicity of copper(II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-N-4-substituted thiosemicarbazones. Anticancer Res. 1998, 18: 4131-4140.**
- 8.- Miller III MC, Bastow KF, Stineman CN, Vance JR, Song SC, West DX, Hall IH. The cytotoxicity of 2-formyl and 2-acetyl-(6-picolyl)-N-4-substituted thiosemicarbazones and their copper(II) complexes. Arch Pharm Pharm Med Chem. 1998, 331: 121-127.**
- 9.- Moore EC, Zedeck MS, Agrawal KC, Sartorelli AC. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone and related compounds. Biochemistry. 1970, 9: 4492-4498.**

- 10.- Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP), an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Advan Enzyme Regul.* 1999, 39: 3-12.**

- 11.- Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J, MacDonald S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002, 50: 223-229.**

- 12.- Karp JE, Giles FJ, Gojo I, Morris L, Greer J, Johnson B, Thein M, Sznol M, Low J. A Phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine®) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myeloproliferative disorders. *Leuk Res.* 2008, 32: 71-77.**

- 13.- Traynor AM, Lee JW, Bayer GK, Tate JM, Thomas SP, Mazurczak M, Graham DL, Kolesar JM, Schiller JH. A phase II trial of Triapine® (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. *Invest. New Drugs.* 2010, 28: 91-97.**

- 14.- Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood.* 2004, 104: 1450-1458.**

- 15.- Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ, Zhu L, Wang T, Qi C, Shih J, Yen Y. A ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol Cancer Ther.* 2006, 5: 586-592.**

- 16.- Lovejoy DB, Janson PJ, Brunk UT, Wong J, Ponka P, Richardson DR. Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes. *Cancer Res.* 2011, 71: 5871-5780.**

- 17.- Yu Y, Rahmanto YS, Hawkins CL, Richardson DR. The potent and novel thiosemicarbazone chelators di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone affect crucial thiol systems required for ribonucleotide reductase activity. *Mol Pharmacol.* 2011, 79: 921-931.**

- 18.- Holland JP, Barnard, PJ, Collison D, Dilworth JR, Edge R, Green JC, McInnes EJJ. Spectroelectrochemical and computational**

**studies on the mechanism of hypoxia selectivity of copper
radiopharmaceuticals. Chem Eur J. 2008; 14: 5890-5907.**

CORRESPONDENCIA:

Prof. Javier García Tojal

Profesor Titular de Química Inorgánica.

Facultad de Ciencias.

Universidad de Burgos

Plaza Misael Bañuelos s/n

09001. Burgos. España

Mail: [gipgatoj @ ubu.es](mailto:gipgatoj@ubu.es)



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Índice del
volumen Volume
index](#)

[Comité Editorial
Editorial Board](#)

[Comité Científico
Scientific
Committee](#)

[Normas para los
autores
Instruction to
Authors](#)

[Derechos de autor
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



PROPUESTA DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO-PRONÓSTICO PARA EL ANÁLISIS Y EL SEGUIMIENTO DE LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA CRÓNICA

Juan Llor Baños¹, Luis Fernando De La Fuente Crespo²

**¹Medicina Interna. Hospital de León. ²Universidad de León.
León, España**

juan.ller.b@gmail.com

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:21-25

[Comentario del revisor Dr. Alberto Enrique D'Ottavio PhD.](#) Profesor e Investigador, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario. Argentina.

[Comentario de la revisora Dra. Larisa Ivón Carrera, PhD.](#) Profesora e Investigadora, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. Argentina

RESUMEN:

El alcoholismo crónico es enfermedad que requiere constante vigilancia y control. Basado en la importante alteración orgánica que causa la toxicidad alcohólica, se ideó el "método diagnóstico - pronóstico" aplicándolo a pacientes con ingesta alcohólica de riesgo y con alteración hepática por el alcohol.

Se han seguido 116 pacientes con ingesta alcohólica de riesgo, 97 hombres y 19 mujeres, y con signos constatados de hepatopatía alcohólica, procediendo al seguimiento periódico para informar al paciente de la evolución de su hepatopatía y actualización de su pronóstico.

Se comprobó que la aplicación de dicho método conduce hacia una muy significativa reducción y resolución de la ingesta alcohólica, con una mayor eficacia en las mujeres que en los hombres, y permitió concluir que aplicar en esos pacientes el "método diagnóstico - pronóstico" facilita una supresión prolongada de la ingesta, y refuerza la decisión de permanecer abstemio.

PALABRAS CLAVE: Método. Hepatopatía crónica. Alcohol

SUMMARY: PROPOSAL OF A DIAGNOSTIC-PROGNOSTIC METHOD FOR ANALYZING AND FOLLOWING-UP CHRONIC ALCOHOLIC HEPATOPATHY

Chronic alcoholism is a disease requiring constant monitoring and control. Taking into account the important organic alteration caused by alcoholic toxicity, the "diagnostic- prognostic method" has been conceived and applied to patients with risky alcohol consumption and alcohol-induced liver alterations.

116 patients - 97 males and 19 females - with a history of risky alcohol ingestion and showing alcoholic liver disease signs have been followed up on a periodic basis in order to inform them of both their liver disease evolution and updated prediction.

It has been proved that applying the new "diagnosis - prediction" method leads to a very significant reduction and resolution of alcohol ingestion, with higher effectiveness in females than in males; at the same time, it facilitates a long term suppression and reinforces the patient's decision to remain abstemious

KEYWORDS: Method. Chronic hepatopathy. Alcohol

INTRODUCCIÓN

El alcoholismo crónico es una enfermedad que requiere una constante vigilancia y control en los pacientes y, también, de su entorno. El problema sanitario tiene dimensiones enormes. En España, que al respecto ocupa puesto medio en la Comunidad Europea, entre las personas que beben (11,1%), se llega a una ingesta de riesgo (a partir de 40 gr./día de alcohol en el hombre, y 24 gr./día en la mujer) en el 5,3% de la población (7,4% de los hombres y 3,1 de las mujeres)¹. Los datos que disponemos hablan de forma elocuente de la gran importancia que tiene prestar la máxima atención a esa patología y reducir su fuerte carga lesiva: la ingesta de 40 gr/día acarrea ya un riesgo anual de fallecer del 7,5% por enfermedad ocasionada por el alcohol, llegando al 10% cuando se ingiere los 80 gr/día, las muertes por cirrosis hepática enólica constituyen el 10,5% de la población, y el coste social del alcoholismo en España supone los 6.428 millones de euros, y un coste sanitario de 1.785 millones de euros²

Muchos pacientes alcohólicos, en un estado de enfermedad crónica, tendrán repetidos periodos de abstemias y recaídas. Con intención de vencer ese ciclo vicioso en el alcohólico crónico se han invertido muchas energías con el fin de controlar y solucionar con eficacia el estado de inestabilidad casi permanente en que se encuentran dichos enfermos. Uno de los métodos con resultados más prometedores los ha proporcionado el conocido método de la intervención breve³, que aplicado a los pacientes alcohólicos con ingesta de riesgo, sin estado de dependencia, y a través de un tratamiento de conducta individualizado, con consejos breves, evaluación y educación para el cambio, y un seguimiento periódico a lo largo de un año⁴, logra que dichos pacientes reduzcan la ingesta y los problemas relacionados con el alcohol en un 20%³. Sin embargo, sigue siendo un desafío estabilizar la situación de los pacientes con el fin de que reduzcan las frecuentes recaídas, y disminuyan los tratamientos terapéuticos⁵.

Sabido es que el alcoholismo es responsable de forma directa de 60 entidades nosológicas⁶. Entre ellas, ocupa un papel especialmente relevante la hepatopatía alcohólica, que llega a constituir la mayor causa de enfermedad crónica hepática en el mundo occidental⁷, y genera un amplio espectro de alteraciones en ese órgano. Partiendo de tal específica característica e intentando controlar y comprometer al paciente, hemos concebido un método designado "diagnóstico - pronóstico", que sirviéndose de los distintos estadios de afectación clínica hepática generados por el alcohol puede ser utilizado para una más ajustada valoración de su situación y de su pronóstico a mediano y/o largo plazo.

El presente trabajo describe, aplica y evalúa el aludido método.

MATERIAL Y METODOS

116 pacientes (97 hombres y 19 mujeres) con ingesta excesiva enólica (más de 5 bebidas/día) y con signos de hepatopatía alcohólica fueron monitoreados, una vez descartada otro tipo de hepatopatía subyacente.

En cada uno de ellos fueron analizados: a) marcadores biológicos hepáticos (las alanino y aspartato-transaminasas - ALT y AST-, la gamma glutamil transpeptidasa -GGT-, bilirrubina, actividad protrombina y tiempo de cefalina); (b) valores hematológicos relacionados con la hipertensión portal (contaje de las tres series y volumen corpuscular medio -VCM)- y (c) pruebas de imagen hepáticas: ecografía, tomografía axial computarizada, y ocasional resonancia magnética nuclear.

A todos los pacientes, sin que recibieran pauta de tratamiento farmacológico por su alcoholismo, se les aplicó el "método diagnóstico-pronóstico" que consistió en: 1, informar al paciente y a su entorno familiar de su actual alteración hepática cuanto de su pronóstico a mediano y a largo plazo, de persistir ingiriendo alcohol, y 2, proceder a un seguimiento trimestral, en el que se ofrecía una nueva valoración actualizada del diagnóstico y pronóstico según la evolución de los marcadores biológicos del momento y de las periódicas pruebas de imagen.

En todo momento fueron respetadas las normas éticas vigentes para este tipo de proceder. El análisis estadístico consistió en contrastar la frecuencia obtenida mediante la aplicación del "método diagnóstico - pronóstico" con la estándar esperada (estimada en el 20%)⁸.

Complementariamente, se recurrió al Ji cuadrado χ^2 a fin de justipreciar diferencias sexuales vinculadas con la eficacia de aplicación del método.

RESULTADOS

De los 116 pacientes con hepatopatía alcohólica crónica confirmada se registró, tras la aplicación del "método diagnóstico - pronóstico" que, durante más de un año, dejaron de beber 82 (70,6%), y continuaron bebiendo 34 (29,3%) (Figura 1).

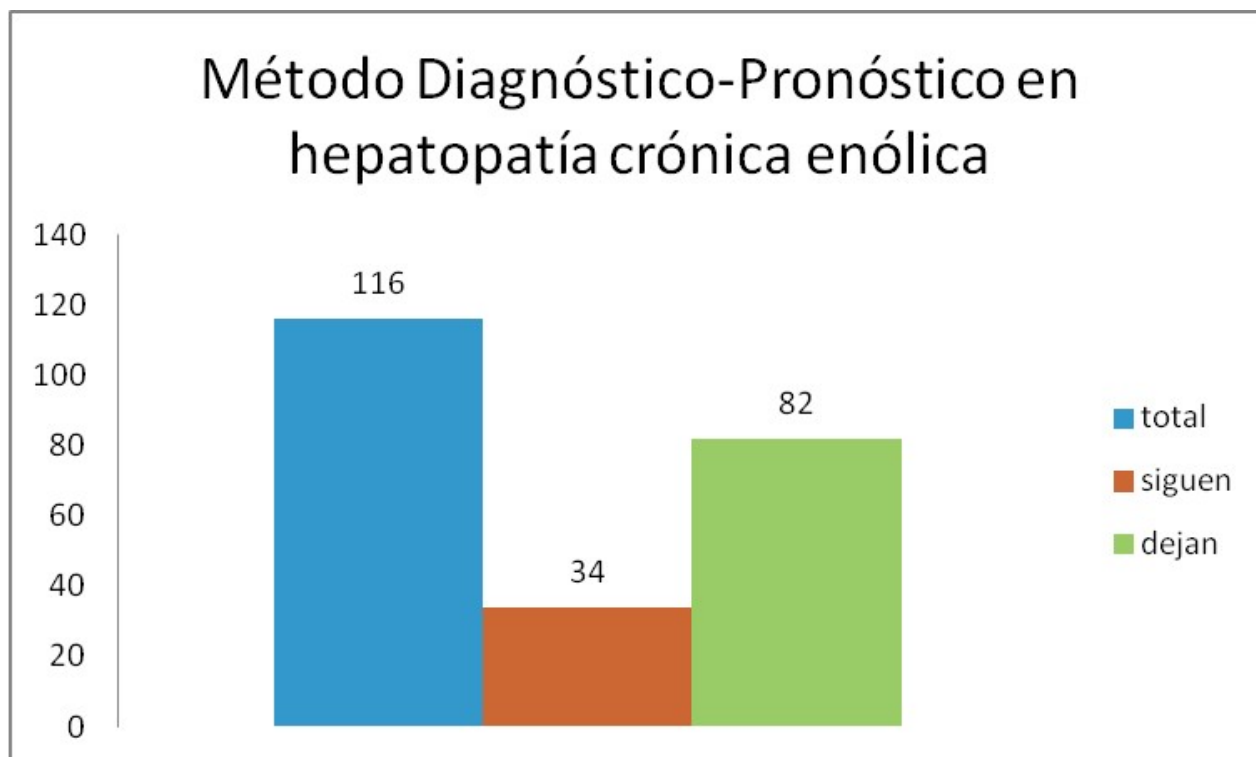


Figura 1.- Pacientes que dejan y siguen con ingesta alcohólica

También, se estableció que, con dicha aplicación, no fueron reveladas diferencias notorias entre quienes no presentaban cirrosis (el 71% dejó de beber y el 29% prosiguió bebiendo), y los que la presentaban (el 70% abandonó la bebida y el 30% perseveró en ella) (Figura 2).

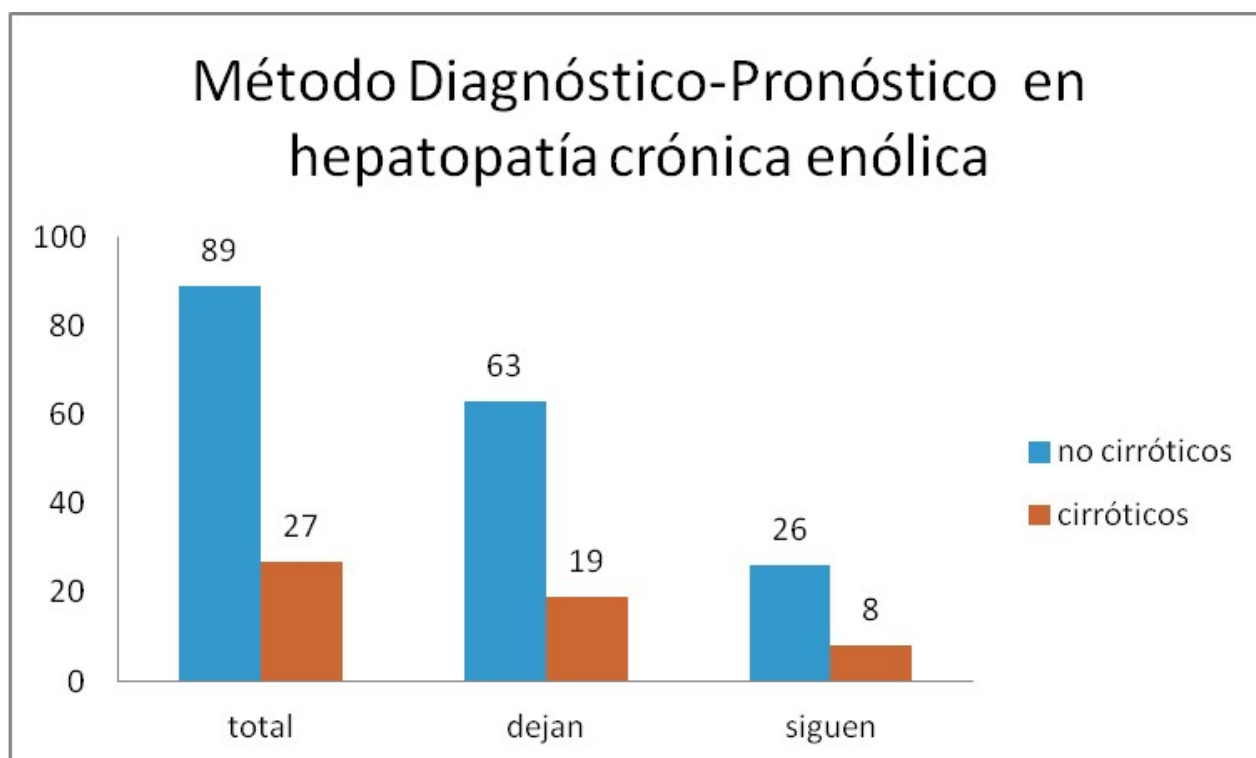


Figura 2.- Aplicación en pacientes no cirróticos y cirróticos

La eficacia del método reveló una muy alta significación ($p < 0,0001$) en la resolución y reducción prolongada de la ingesta alcohólica crónica cuando se cotejaron a los que se les aplicó (reducción de la ingesta 81.8%: 82 dejan de beber y 13 beben menos) con quienes no lo siguieron.

La eficacia de "método diagnóstico - pronóstico" fue mayor en las mujeres (del 87,47%) frente a los hombres (del 67,01%) ($X^2 3,87$, $p < 0,05$) (Fig. 3).

Asimismo, fue puesta en evidencia similar eficacia en las mujeres (87,47%) respecto de la mostrada en los hombres (67,01%) ($p < 0,05$) (Figura 3).

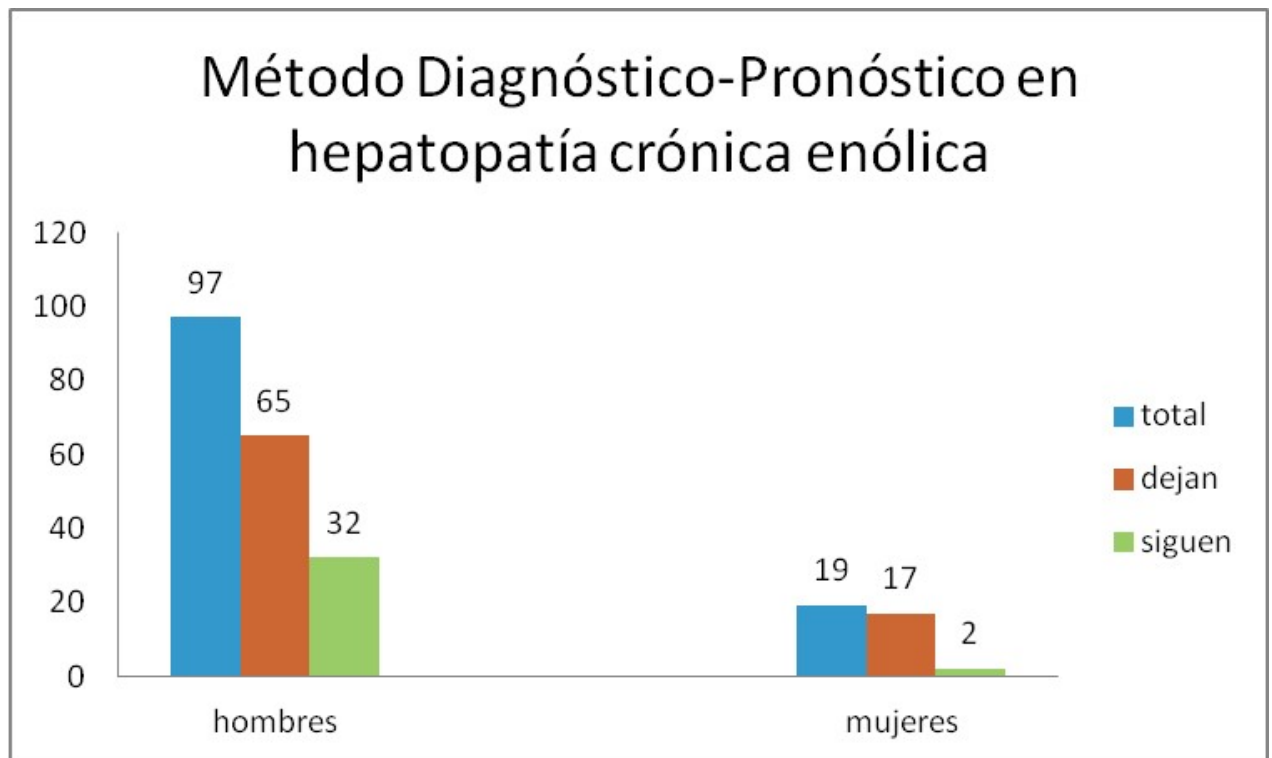


Figura 3.- Aplicación en hombres y mujeres

DISCUSIÓN

La alta significación en la resolución y reducción prolongada de la ingesta alcohólica crónica a través del "método diagnóstico-pronóstico", también significativa en relación con el conocido "método de intervención breve" (índice de reducción media en la ingesta alcohólica del 20%)³, probablemente pueda atribuirse a la introducción de una sucesiva y evolutiva valoración de la referida hepatopatía, al actualizar sucesivamente el diagnóstico y pronóstico, que sirve no sólo al paciente sino igualmente a su entorno familiar. Ello permite comprobar una mejoría o empeoramiento lo más ajustada a la realidad clínica según se suprima, reduzca o se persista en la ingesta alcohólica.

Asimismo, cabría constatar que la mejoría clínica - orgánica en caso de supresión o reducción de la bebida, actuaría como potente refuerzo positivo en la conveniencia de continuar en la decisión de reducir y prescindir de la ingesta.

Asimismo, y excediendo lo antedicho doble es constatar mejoría clínica - orgánica en caso de supresión o reducción de la bebida, lo que actuaría como potente refuerzo positivo en la conveniencia de continuar en la decisión de reducir y prescindir de la ingesta.

La diferencia sexual de la eficacia del método no tiene explicación clara, aunque, al menos, lleva a suponer que el hábito alcohólico adquiere distintas características en uno y otro sexo. Es posible que en la mujer sea de índole más circunstancial y que, por lo tanto, ellas sean más sensibles a percibirse del deterioro clínico orgánico a las que se halla sometiendo al alcohol sin aportar eficaz solución alguna. En contraste, el alcoholismo masculino adquiriría un cariz más constitucional, no obedecería a una determinada causa, y, por ende, resultaría más difícil de erradicar, llegando a hacerlo recién al constatarles un evidente y claro deterioro orgánico.

Por otra parte, el método no muestra diferenciación en su eficacia entre pacientes cirróticos y no cirróticos, posiblemente por hacer desarrollar en unos y otros similar responsabilidad en sus decisiones de cara al pronóstico.

En suma, puede concluirse que adoptar el "método diagnóstico - pronóstico" en la hepatopatía crónica alcohólica, teniendo como punto de partida la diferencia intersexual precitada, bien podría: 1) facilitar una supresión prolongada de la ingesta de manera significativa, y 2) permitir suministrar al paciente datos objetivos actualizados que contribuyeran a reforzar su decisión en superar su hábito alcohólico.

REFERENCIAS

- 1.- Ministerio de Sanidad y Consumo. Prevención de los Problemas Derivados del Alcohol. Primera Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España. 2008; 19
- 2.- European Status Report on Alcohol and Health. 2010; 319
- 3.- Fleming MF, Barry KL, Manwell LB, Johnson K, London R. Brief Physician Advice for Problem Alcohol Drinkers: A Randomized Trial in Community-Based Primary Care Practices. *Journal of the American Medical Association* 1997; 277: 1039-1045
- 4.- Organización Panamericana de la Salud. Informaciones Clínicas Básicas para la Identificación y el Manejo de Riesgos y Problemas. Efectividad de las Intervenciones Breves 2008; 91
- 5.- McKay JR, Hiller Sturmhöfel S. Treating Alcoholism As a Chronic Disease. *Approaches to Long Term Continuing Care Alcohol Research & Health* 2011; 33: 356-370.

6.- World Health Organization Global Status Report on Alcohol and Health. Global Alcohol-Attributable Deaths as a Percentage of Total Deaths by Disease or Injury, 25; 2011.

7.- Gao B, Bataller R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. Gastroenterology 2011; 141: 1572-1585

8.- National Institute on Alcohol Abuse Alcoholism (NIAAA). Alcohol Researchers Prove Success with Primary Care Interventions. 1997, April 1.

ADVERTENCIA:

Referencias elementales en contexto divulgativo del presente trabajo aparecieron en la prensa (Diario de León, 27.XII.2011) en forma de entrevista sobre los trabajos que estaban desarrollando al respecto en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de León (España).

CORRESPONDENCIA:

Dr. Juan Llor Baños
Medicina Interna. Hospital de León.
León, España
juan.ller.b@gmail.com

Comentario del revisor Dr. Alberto Enrique D'Ottavio PhD. Profesor e Investigador, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario. Argentina.

La propuesta de un singular método diagnóstico-pronóstico para el análisis y el seguimiento de la hepatopatía alcohólica crónica ofrecen determinados resultados que, además de invitar a su profundización, pueden, a la par, resultar de interés para quienes incursionan actualmente en el manejo de esta patología.

Comentario de la revisora Dra. Larisa Ivón Carrera, PhD. Profesora e Investigadora, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. Argentina

El control y el monitoreo diacrónico de la hepatopatía crónica producida por ingesta alcohólica prolongada requiere, para una evolución satisfactoria, especial compromiso por parte no sólo del paciente sino de su entorno familiar.

Este método diagnóstico-pronóstico, propuesto por los autores, se halla en sintonía con tal requerimiento y pone de relieve definidos resultados de viable aplicación.

Recibido, 18 de diciembre de 2011. Recibido revisado, 13 de febrero de 2012
Publicado, 22 de abril de 2012



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Indice del
volumen Volume
index](#)

[Comité Editorial
Editorial Board](#)

[Comité Científico
Scientific
Committee](#)

[Normas para los
autores
Instruction to
Authors](#)

[Derechos de autor
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



EFFECT OF BROMINE ATOMS NUMBER ON THE CYTOTOXICITY OF TWO 2-FURYLETHYLENE DERIVATIVE SUBSTANCES IN NORMAL AND TUMORAL CELL LINES.

¹Oscar Hernández PhD, ¹Yudiska Martinez MSc, ²Héctor Pimentel MSc,
¹Llanetsy Llanes, ³Giselle Pérez PhD, ¹Nayadis Vazquez, ¹Sandra Fernández,
¹Quesada Lidice, ¹Aime Debesa

¹Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI),
Universidad Médica. Camagüey.

²Centro Provincial de Genética Médica. Camagüey.

³Centro de Bioactivos Químicos (CBQ).
Universidad Central de Las Villas. Villa Clara.
Cuba

[oscar.hernandez1964 @ yahoo.es](mailto:oscar.hernandez1964@yahoo.es)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:26-36

Comment of the reviewer Prof. Pilar Muñoz Rodríguez PhD. Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. España.

Comment of the reviewer Prof. Francisco Abad Santos Clinical Pharmacology. Hospital la Princesa. Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. España

SUMMARY: The study was performed to investigate the effect of bromine atoms number present in two tested substances derivatives of 2-furylethylene on cell proliferation. The substances carrying one or two Br atoms were coded as MA and G1 respectively. The neutral red uptake (NRU) assay and mitotic index (MI) were used for this purpose.

The presence of two bromine atoms on the molecule of G1 inhibited markedly the cytotoxicity of this composite. For CHO cell line, the IC₅₀ values were 256.6 µM for G1 and 134.5 µM for MA; whereas in SK MEL-3 (human melanoma) cell line, the IC₅₀ were 413.4 µM and 264.1 µM for G1 and MA respectively. The IC₅₀ values obtained in both cell lines were higher than 100 µM and showed no specificity for tumoral cells.

The MI obtained with the G1 composite showed no significant differences with phytohaemoglutinine used as positive control. The anti-proliferative effect and MI were related with the number of bromine atoms on the molecules assayed. Another experiment was conducted with the MA product to obtain information about the acute oral toxicity class methods. The tested compound was classified in the 3th toxicity class with a fixed LD (50) cut-off value of 200 mg/kg of body weight.

KEYWORDS: Bromine, Cytotoxicity, Acute toxicitybromine, Mitotic index. Furylethylene, CHO.

RESUMEN: EFECTO DEL NÚMERO DE ÁTOMOS DE BROMO EN DERIVADOS DEL 2-FURILETILENO SOBRE LA CITOTOXICIDAD DE LÍNEAS CELULARES NORMALES Y TUMORALES.

El objetivo del estudio fue investigar el efecto que tiene el número de átomos de bromo presente en dos sustancias derivadas del 2-furiletileno sobre la proliferación celular. Las sustancias portando uno o dos átomos de bromo en su molécula se codificaron como MA y G1 respectivamente y su efecto sobre las líneas celulares se evaluó mediante las técnicas de captación de rojo neutro (CRN) y del índice mitótico (IM). La presencia de dos átomos de bromo en la molécula del G1 inhibió marcadamente la citotoxicidad de este compuesto, para la línea celular CHO (ovario de hámster chino) los valores de IC₅₀ fueron 256.6 µM para el G1 y 134.5 µM para el MA; mientras que en la línea SK MEL-3 (melanoma human), los valores de IC₅₀ fueron 413.4 µM y 264.1 µM para el G1 y MA respectivamente. Los valores de IC₅₀ obtenidos por estos compuestos en ambas líneas celulares fueron superiores a 100 µM y no mostraron especificidad por la línea tumoral.

El IM obtenido con el compuesto G1 no mostró diferencias significativas con la fitohaemoglutina, empleada como control positivo del ensayo. El efecto anti-proliferativo y el IM estuvieron relacionado con el número de átomos de bromo en las moléculas ensayadas. Por otra parte un estudio llevado a cabo con el compuesto MA brindó información sobre la toxicidad aguda del mismo utilizando el método de las clases, clasificándose este producto en la clase 3 con un valor de corte LD (50) de 200 mg/kg de peso corporal.

PALABRAS CLAVE: Bromo. Citotoxicidad. Toxicidad aguda. Índice mitótico. Furiletileno. CHO.

INTRODUCTION

Since the 1990's, 2-furylethylene derivatives have been regarded as an interesting range of biological active compounds. They are one of the useful classes of synthetic agents with a wide range of biological activities including, antibacterial, antifungus and antiprotozoal properties¹⁻⁴. The 2-furylethylenes, also known as vinylfurans or ethenylfurans, are derivatives of the ethene where a furan ring is attached to one of its carbon atoms (the 2 carbon). The presence of a nitro group at position 5 of the furan ring in most of the 2 furylethylenes reported in literature until the 1980's, limited the use of these compounds because the aromatic nitro compounds in general, and nitrofurans in particular, have mutagenic and carcinogenic properties⁵⁻⁶. Subsequent studies opened a novel opportunity for these compounds, because it demonstrated that the presence of a nitro group at position 5 of the furan ring is not a necessary condition for the development of the antimicrobial activity of such chemicals⁷⁻⁸.

The (1-(5-bromofur-2-yl) nitroethene) and (1 (5 bromofur 2 yl) 2 bromo 2 nitroethene) coded for this paper as MA and G1 respectively are a synthetic 2-furylethylene derivatives. They have one or two bromine atoms added into the molecule and were used in this study in order to compare their effect on the biological activity changes. The addition of bromine atoms in different combinations could cause diverse responses due to the atomic mass of this element (79,904). The position and number of the bromine atoms on the structure of several natural⁹⁻¹¹ and synthesized¹²⁻¹³ compounds has attracted the attention of many biomedical research in order to use these compounds in future human health treatments. Some of these works show that bromination and the position of this atom over those substances increased the cytotoxicity of the compounds tested¹⁴⁻¹⁵. Other results have shown that chemical modifications like a substitution of bromine or iodine has a significant effect on the binding properties of the product to DNA¹⁶⁻¹⁷.

There has been recently an increasing interest in controlling macromolecular conformations and interactions through the adding of halogen bonding to sensitized compounds. Halogen bonds are favorable electrostatic interactions between polarized, electropositive chlorine, bromine or iodine atoms. An halogen bond is a mainly an electrostatic interaction between a classic hydrogen bond acceptor, such as the electronegative O, N or S¹⁸. This sort of bond seems to play a role in binding and recognition similar to that in the thyroid-related hormones, a diversity of short X...O interactions (X = halogens) that are involved in protein/ligand recognition¹⁹.

The *in vitro* systems are ideally suited for investigations of the molecular, cellular and physiological mechanisms of chemically induced toxicity; the main justification for developing *in vitro* toxicity tests is that they will make toxicology a more scientifically based practice. It is even more obvious that the development and incorporation of stepwise testing strategies, combining experimental data from a range of alternative methods (metabolic and kinetic modeling, quantitative structure-activity relationships - QSAR, and *in vitro* tests), provide the most advanced way to predict toxicity, reducing at the same time the number of laboratory animals used for testing.

Moreover, the costs of assessing potential health effects of around 200,000 substances per year that are newly identified or synthesized require alternatives methods of analysis. But we must be sure that the obtained results with these alternative methods are reliable in order to substitute or reduce the number of tests in animals. In this investigation we used an *in vitro* system as an alternative method to evaluate the bromine atoms number effect on cellular toxicity of these 2-furylethylene derivatives using normal and tumoral cell lines.

MATERIAL AND METHODS.

The experiments were carried out at the Molecular and Cell Biology Department and at the Animal Housing Laboratory of the Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) at the Universidad de Ciencias Médicas "Carlos J. Finlay" in Camagüey, Cuba.

1.-Synthetic product used in the trail

The substances tested were coded as MA 1-(5-bromofur-2-yl) nitroethene and G1 (1 (5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene) a 2-furylethylene derivatives synthesized and gently offered by the group of chemical synthesis of the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), at the Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Its global formulas are: $C_6H_4BrO_3N$ and $C_6H_3Br_2O_3N$ for MA and G1 respectively. Both of them consisted of a yellow crystalline powder and its purity was certified by analytical testing to be higher than 99.0% in both cases. The molecular formulas of these composites are showed below:

2.-Cell lines and culture conditions

To assess the cytotoxic effect of the synthesized composite we used CHO-K1 cell line (Chinese Hamster Ovary), purchased from ECACC (N°85050302), and SK-MEL-3 (ATCC N°HTB-69) a human melanoma cell line, kindly given by the Centro de Inmunología Molecular, Havana, Cuba. RPMI 1640 medium (Gibco 31800-014) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) and 2 mM glutamine piruvate without antibiotic was used for this cell line.

The cellular suspensions were obtained from a 25 cm² flask at 70-80% final confluence. The detached cells by tripsine solution treatment (0.125%, 53 mM EDTA in PBS 1X) during 3 5 minutes at 37°, were counted in a Neubauer camera using the trypan blue dye exclusion test.

The viability was higher than 90% in all assays. The cells density used varied between 20 and 30×10³ cells/well in 96 wells plates (COSTAR N°-402037310) seeded at 100 µl final volume. The plates were incubated in 100% humidity and 5% CO₂ atmosphere at 37°C, during 24 hours before the treatment application to permit the cellular adhesion to the bottom plate.

3.- Animals

Wistar Rats, SPF from Laboratory Animals Breeding Center, CENPALAB, (Cuba). Age: 35 - 41 days, weight 101-125 g. Microbiological status: free from *ecto* and *endoparasites*, *mycoplasmas* and *pasteurellae*. 30 females were supplied by airplane in rats boxes and acclimatized (22 ± 3 °C; 50 ± 10%) for 1 week in the Animal Housing Laboratory (CENIPBI).

During the experiment, animals were housed in polycarbonate cages Type 4 (3 rats/cage) on sterilized wood shavings as a bedding. Room temperature and humidity were regulated at 22 ± 3 °C and 50 ± 10%). Lighting conditions: Fluorescents lamps, with a sequence of 12 hours of light and 12 hours of dark. Air flow rate 0,5 m/s above cages.

Feeding: A commercial diet (8 mm pellet) manufactured by CENPALAB, Havana, Cuba (ISO 9001 Certified Laboratory) was heated for 20 min at 110 °C, and available ad libitum. Drinking water: acidic sterilized water, ad libitum.

Experiment performed from July 7 to July 22, 2010 using 9 rats/experiment.

The behavioral parameters were measured as indicated by OECD 423 guideline.

4.-Experimental Design

4.1.-Cytotoxic Test

The neutral red uptake (NRU)²⁰ was selected from the different *in vitro* tests described to evaluate the cytotoxicity. Prior to each experiment the test substances were dissolved in a (DMSO/ETOH) (v/v) mix and immediately diluted into medium. During drug exposure the concentrations of DMSO/ETOH mix, in treated and control wells, were kept below 0.1%. We prepared a 500 mM main solution of the product to then make the following doses: 400, 300, 250, 200, 100 and 50 µM afterwards, the doses and control solutions were filtered using 0.45 and 0.22 µM membranes. The negative control was the RPMI medium with 0.1% of the diluent used (DMSO/ETOH) without the test substances. As a positive control 10 µg/ml of 5-fluorouracile (5-FU), was used. The tests were carried out in triplicate (3 wells/dose) during 72 hours. To keep the optimal concentrations and cultural conditions 100 µl of the medium were changed daily, containing the adequate doses, including controls. The optical density was recorded in an ELISA reader plate equipment (Lab Systems MULTISKAN Plus) at 540 nm wavelength. A lineal regression method was used to determine the IC₅₀ value²¹⁻²², using Prism; GraphPad Software (5.02 version).

4.2.-Determination of Mitotic Index (MI)

The mitotic index was used to determine the cell division rate and to compare the potentiality of MA and G1 to inhibit mitosis. To allow the occurrence of more than one division cell cycle, the product concentrations used in the MI test was below the IC_{50} value determined in previous cytotoxicity experiments (50 and 150 μM for MA and G1 respectively). We used a CHO cell line for this test and it was performed in 35 mm dishes (MERCK 402/0455/02) using three dishes by treatment. After incubating for 48 hours at 37 ° and 5% CO_2 , the cells were detached by means of a 0.125% trypsin solution and the Verma and Babu (1995) protocol was used to obtain the metaphases²³.

Randomly selected views and non-overlapping cells on the slides were monitored to determine the number of dividing cells (metaphase stage) and the total number of cells using an Olympus BX51 microscope. 1000 cells/dish were examined in each treatment. Mitotic index values are expressed as% in this study by means of the formula showed below.

$$MI = \frac{\text{No of mitosis}}{1000} \times 100$$

As a positive control we used 180 $\mu g/ml$ of mitotic inductor phytohemagglutinine (REMEL-E, HA15/3085 2701), in the concentration suggested by the supplier.

4.3.-Acute Toxic Class Method

The only product used in this test was MA, it was dissolved in 1 ml of vegetable sunflower oil. The Acute Toxic Class Method began with 300 mg/kg body weight, as indicates the OECD 423 guideline in the case of absence of previous data of toxicity. Taking into account the 300 mg/kg b. wt. results we needed to administer a second dose of 50 mg/kg b. wt. The test substance was administered in a single dose by gavage using a suitable intubation canula. The negative control was constituted by a group of 3 animals that only received sunflower oil without the test substance. Once the administration of the product began, we observed the animals during the first four hours with special attention, in the first 30 minutes.

During 14 days after administration, clinical examinations were performed daily, and body weights were measured before dosing and on days 1, 7, and 14, according to the guidelines previously mentioned. The animals were checked for mortality, general state, external appearance, behavior, and clinical symptoms like: itch, dyspnea, depositions, skin and mucous irritation, violent disturbances, and others.

All signs and symptoms were tabulated for each animal including the hour and date when they started and/or disappeared. The date and hour of animal death during experiment were also registered. At the end of this period (14 days), the live animals were euthanized by injecting an overdose (three times the anesthetic dose) of sodium thiopental (60 mg/kg b. wt.) intraperitoneally and necropsied. The organs from animals that died and from those that survived were collected for gross macroscopic examination of organs and tissues (heart, kidney, spleen, lung, liver and stomach), which was performed at the Anatomy Department at the Regional Veterinary Clinic in Camagüey, Cuba.

5.-Statistical analysis

The statistical analysis was performed with SPSS 15.0 for windows. The data were submitted to a parametric one-way analysis of variance test (ANOVA) and the Tukey's multiple comparison post-tests. The data were expressed as the means $\pm$ S.D. of three independent determinations.

To determine the statistical significance between treatments at Mitotic Index assay we performed a non parametric test (proportions comparison test). The differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

1.- Citotoxicity

We wanted to compare *in vitro* cytotoxicity of two out of five members of the family taking into account the quantity of bromine atoms on the molecular structure (Figure 1).

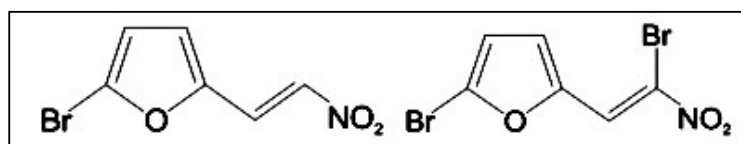


Figure 1. Molecular structure of MA (left) and G1 (right) test substances.

The G1 composite contains two atoms of this element, one on the ring and the other in position 2 of the lateral carbon chain

outside the furan ring; on the other hand MA has only one bromine atom at the furan ring.

Figure 2 and 3, show the dose response curves for both products in CHO and SK-MEL-3 cell lines respectively.

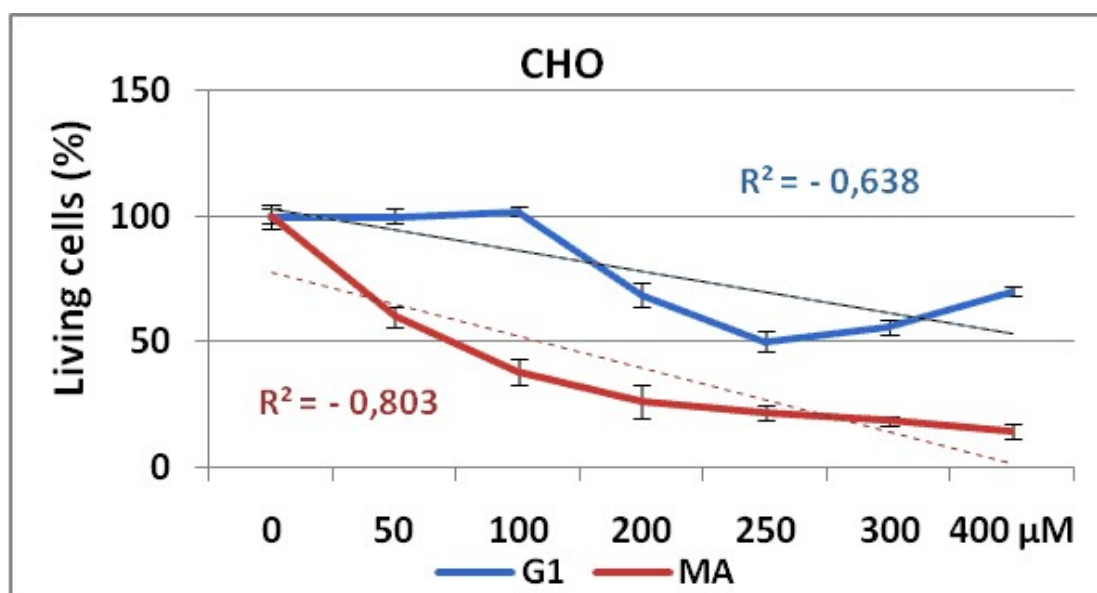


Figure 2. Dose response curve obtained by G1 (blue line) and MA (red line) test substances in CHO cell line using NRU method. Experiments were made in triplicate during 72 hours. Each point represents $\pm$ SD

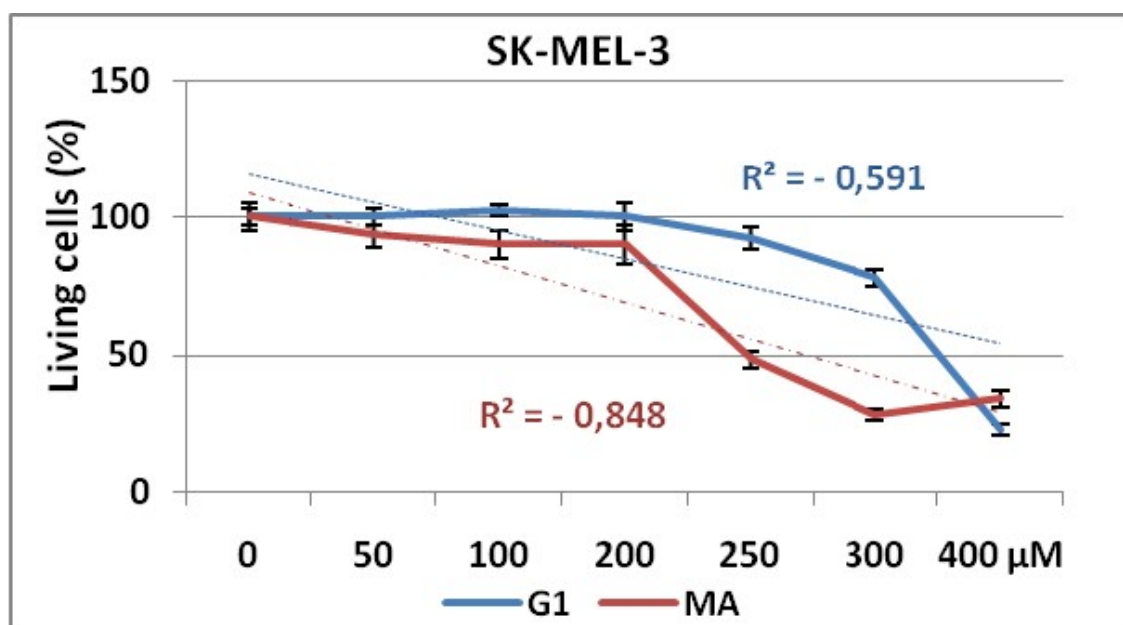


Figure 3. Dose response curve obtained by G1 (blue line) and MA (red line) test substances in SK-MEL-3 cell line using NRU method. Experiments were made in triplicate during 72 hours. Each point represents $\pm$ SD.

The use of two different cell lines gave us information about the effectiveness of the test substances (G1 and MA), against cell lines from different tissues. Our results demonstrate that both cell lines show dose-dependent response to these substances administrations, with significant differences in proliferative responses between MA and G1 ($p=0,021$) in CHO cell line. But surprisingly, in SK-MEL-3 cell line (figure 3) no significant differences were shown ($p=0,335$) on cell proliferation inhibition between these compounds, maybe due to a higher resistance of this tumoral cells to the treatment with this composites as observed in others experiments²⁴.

The growth inhibitory activity as IC_{50} of compounds G1 and MA evaluated in both cells lines are represented in Table 1.

Cell lines	MA	G1
CHO	134.5	256.6
SK-MEL-3	264.1	413.4
Drug exposure was continued for 72 h.		

Table 1.- IC₅₀ (μM) values for compounds MA and G1 determined by lineal regression.

We can observe in both cell lines the higher anti-proliferative effect of MA product showing the lower IC₅₀ value, when comparing with G1.

On the other hand, the higher IC₅₀ values obtained for SK-MEL-3 (a human melanoma cell line) compared with the IC₅₀ obtained in CHO (non tumor cell line) evidenced first the non tumor specific action of these products over the tumoral cell line here used, and secondly, the low efficacy of these synthesized compounds taking into account the high (> 100 μM) concentrations needed to be 50% cytotoxic in both cell lines.

2.- Mitotic Index

Mitotic index is usually represented as the percentage of cells undergoing division of the total number of cells. For those reason two members of the 2 furylethylene family with one and two bromine atoms (see figure 1) were employed to compare the bromine atom number effect on the cell cycle division.

Figure 4 represents the media values of mitotic index obtained from experiments made in triplicate with their standard deviations.

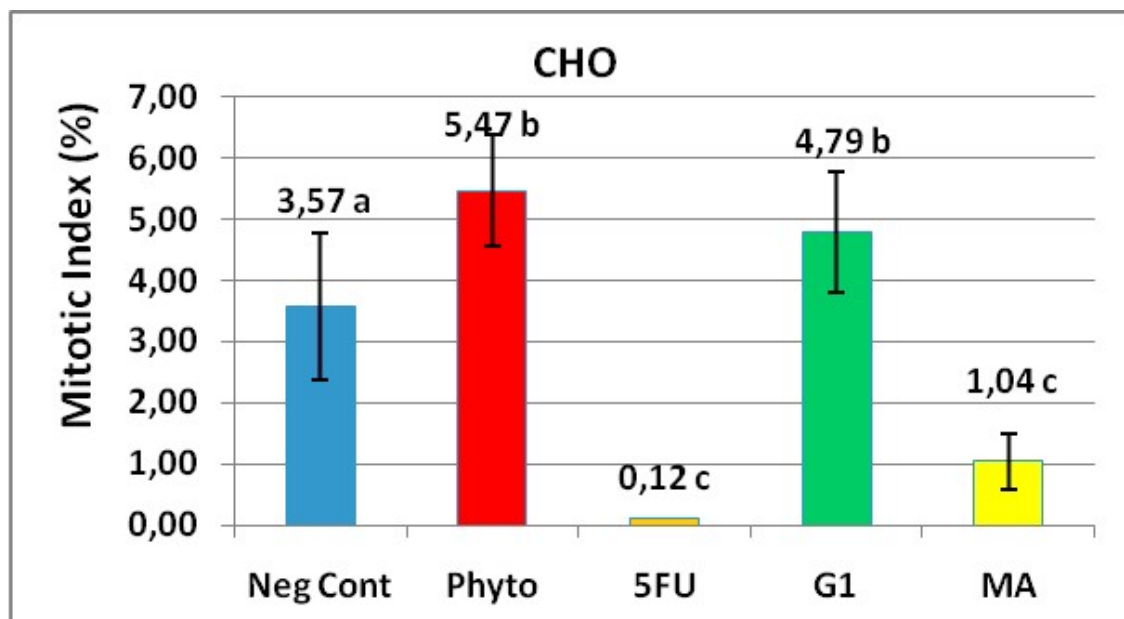


Figure 4. Mitotic Index (MI) values to assess a cellular division inhibition in CHO cells treated for 48 hours with MA and G1. 1000 cells were counted in each treatment and the MI was calculated by a formula showed in materials and methods.

The stimulating effect (5,47%) of phytohaemagglutinine, a commercial mitotic inductor at 180 μg/ml was evidenced when we compared it with cells growing in presence of the diluent vehicle without the test substances as a negative control (3,57%). Interesting results were to compare the MI between MA and G1 products. Surprisingly on the G1 product which has a two bromine atoms, showed significantly to stimulate the CHO cellular division compared with the negative control ($p = 0.001$). On the other hand the MA substance with only one bromine atom linked to the furan ring, markedly decreased the mitotic index, a useful marker of cell cycle division inhibitor and showed a significant deference with G1 (1,04 vs 4,79 respectively).

3.-Acute Oral Toxicity Test

Different 2-furylethylene derivatives products are in studies by their antifungus and antimicrobial properties among others but, the MA product once of the most recent derivative obtained does not present any toxicological data. The results obtained recently with this product at *in vitro* cytotoxicity test incentive us to carry out the preclinical studies to obtain toxicological information about it, performing the acute oral toxicity class methods.

3.1.-Clinical manifestations as toxicity criteria

At doses of 300 mg/kg b.wt., all animals presented a series of toxic signs. It goes from loss of balance, loss of mobility, respiratory upsets (dyspnea), lethargy, pilo erection and cyanosis, up to the coma and prostration until to reach death. All these rats died between 2 and 6 hours following administration of MA product. Gross necropsy revealed some evidence of acute gastritis and gastrointestinal tract distention. Congestion and some little hemorrhagic area in the lungs were found but not bleeding and intestine distention was consistently found in one individual. All controls survived the 14 days trial and did not exhibit gross evidence of hemorrhage.

We proceeded to perform another experiment with a lower doses recommended by guideline. Few minutes after doses application of 50 mg/kg b.wt., the animals presented some light signs as respiratory discomfort and itch which disappeared two hours after. In this case the product did not cause any death. The surviving rats were sacrificed on day 14 of the experiment. At necropsy, the rats were in good body condition, and neither macroscopic damages were observed on the organs selected for study nor evidence of starvation or dehydration.

To confirm the results obtained with 50 mg/kg b.wt. doses, and as recommended by guidelines (OECD423) we performed another experiment at the same doses.

The statistical results for $p < 0.05$, show no significant differences between the groups in any of the studied organs. Together with the anatomic pathologic information registered, it corroborates the non toxicity of this product to these doses of 50 mg/kg b.wt.

3.2.-Body weight as toxicity criteria

Body weight data are depicted in figure 5. The ANOVA and Tukey's post test performed for $n=3$ and $p < 0.05$ showed no significant differences ($p=0.341$) in body weight among groups. However, we found significant differences ($p = 0.002$) in the body weight gained between the experiment start day (day zero) and the day 14, which makes evident the non toxicity of the MA product at this dose.

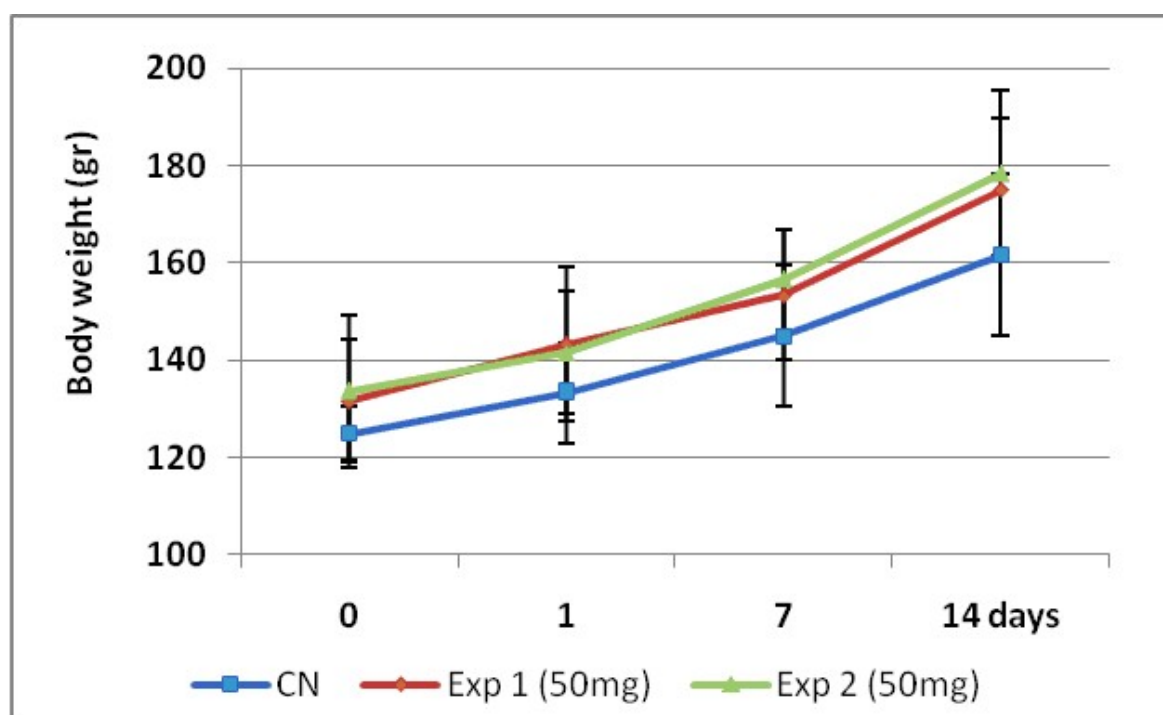


Figure 5. Growing curves comparison between control and two experiments carry out with 50 mg/kg b.wt. of MA test product by 14 days. The experiment was performed following the OECD 423 guidelines. To determine significance differences between groups the ANOVA and Tukey's post test was performed for $n=3$ and $p < 0.05$. Body weight media value $\pm$ SD are show.

According to the acute toxic class method, the tested compound was classified into the third toxicity class (>50 -300 mg/kg b. wt.) with a fixed LD_{50} cut-off value of 200 mg/kg b.wt.

This *in vivo* toxicity results well corroborate the *in vitro* outcomes using cell lines, because in previous studies (no published results) performed in rat, the LD_{50} of G1 product showed a significant higher value (1856.3 mg/ kg b.wt.) compared with MA

(200 mg/kg b.wt.) using acute toxic class method.

Although it is certain that we employed two different methods to evaluate the *in vivo* toxicity by using rats, is obvious that the monobrominate product (MA) is quite more toxic than the product that carries two atoms of bromine in their structure (G1).

DISCUSSION

It is known that several aromatic nitro compounds are mutagenic inductors as the result of electrophilic attack of the purinic bases in DNA by the activated nitrogen, which causes chemical modifications over DNA molecule²⁵. In the case of the 2-furylethylene derivatives tested, a nitro group placed outside of the furan ring generates significant changes in the physical chemical, chemical and biological properties, different from the 5-nitrofurylethylen composites¹.

The addition of specific chemical groups to the 2-furylethylene derivatives in preceding studies had the purpose of investigate the specific variations of biological properties (bactericide, antifungal or antitumoral). The bactericide and antifungal activity of this family have been proved^{1,3}. However, by using cell lines the cytotoxic effects evidencing the antitumoral potential of these products have not been demonstrated yet.

Two main properties characterize the wide number of well established antitumor commercial agents or even under researches at present. First, its need to be highly specific by tumor cell lines and second its most shows a very low IC₅₀ values in the range of nM and never higher than 10 µM. Well known products like Cisplatin, Doxorubicin, 5-Fluorouracil evaluated in MCF-7 breast carcinoma cells line, the Paclitaxel, Taxol and Paclitaxel assessed in ten different tumor cell lines and Vincristine, Paclitaxel in four cervical carcinoma cell lines²⁶⁻²⁸ all of them were always quite effective at very low doses under 10µM and showed to be specific by tumor cell lines.

Contrary to the previous results mentioned before, the IC₅₀ value obtained with these compounds in both cell lines suggests that the addition of another bromine atom (at C-2 position of the lateral carbon chain outside the furan ring) in the G1 product caused a loss of cytotoxic activity, maybe because the interactions of halogen bonds between the two bromine atoms on the test substance affect the direct halogenation of some target molecules no yet identified.

One of the most important properties of the product to be selected as antitumoral drug is the mitotic index value. The MI variable obtained at *in vitro* cell culture experiments is used by several authors as a measure of efficiency of the test substance²⁹⁻³¹. We believe that the lowest toxicity of G1 with respect to MA arises from their different geometries. If these two molecular species interact directly with their biological substrates, not yet identified, two different types of complexes are expected for, one less active than the other one. Or perhaps, in the G1 solution, molecules of G1 interact between them more efficient, forming complexes by means of halogen bonds between two Br atoms and the nitro group of the lateral carbon chain. The formation of these G1 complexes can reduce the effectiveness of this substance on the target molecules, rendering it less effective than MA.

This work is the first *in vitro* cytotoxicity report comparing the efficacy of 2 furylethylene derivatives with different numbers of bromine atoms on cell proliferation. Other experiments must be performed to establish the structure activity relationships (SAR) of these 2-furylethylene derivatives over this molecules activity.

Now a plausible explanation cannot be offered for such a difference between G1 and MA products but nonetheless, this work serves as a warning that intermolecular forces such as hydrogen bonds, salt bridges and van der Waal's forces are critical determinants of biological structure and function. For that reason, it is not surprising that intense efforts had been dedicated to the understanding of how these forces contribute to enzymatic reactions, protein folding, and ligand binding; in order to use them more effectively to control biological recognition.

CONCLUSIONS

The presence of two bromine atoms on the molecular structure of 2 furylethylene derivative decreased the cytotoxic effect of these products evidenced by the results obtained with the G1 composite in both cell lines. Nevertheless neither MA nor G1 showed specificity for tumoral cells with IC₅₀ higher than 100 µM.

The compound tested (MA) was classified to 3th toxicity class with fixed LD₅₀ cut off value 200 mg/kg.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Dr. Ana M. Martínez Campos by her contribution with the pathologic analysis and the professors Ida Padilla and Aniorland García Borrego for reviewing the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this paper declare that there are not conflicts of interests.

REFERENCES

- 1.- Estrada E. Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutat Res.* 1998;420:67-75.
- 2.- González-Díaz H, Olazábal E, Santana L, Uriarte E, González-Díaz Y, Castañedo N. QSAR study of anticoccidial activity for diverse chemical compounds: Prediction and experimental assay of trans-2-(2-nitrovinyl)furan. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:962-968.
- 3.- Castañedo N, Goizueta R, Perez J, Gonzalez J, Silveira E, Cuesta M, et al. , inventors. Procedure for the obtainment of 1-(5- bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroethene and its microcide action. Cuba 1994.
- 4.- Hulbert P, Bueding E, Robinson C. Structure and antischistosomal activity in the nitrofuryl series. *J Med Chem* 1973;16:72-78.
- 5.- Yahagi T, Nagao N, Hara K, Matsushima T, Sugimura T, Bryan T. Relationships between the carcinogenic and mutagenic or DNA modifying effects of nitrofurans derivatives, including 2 2-furyl-3 5-nitro-furyl.acrylamide, a food additive. *Cancer Res* 1974;34:2266-2273.
- 6.- McCalla D. Mutagenicity of nitrofurans derivatives. *Environ Mutagen* 1983;5:745-65.
- 7.- Sturdik E, Drobnica L, Balaz S. Interactions of 2-furylethylenes with thiol enzymes. *Coll Czech Chem Commun* 1983;48:327-335.
- 8.- Rosenberg M, Balaz S, Sturdik E, Kuchař A. Reactivity of 2-furylethylenes with nucleophilic groups and its biological significance. *Coll Czech Chem Commun* 1987;52:425-36.
- 9.- Hertiani T, Edrada-Ebel R, Ortlepp S, van Soest RW, de Voogd NJ, Wray V, et al. From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:1297-1311.
- 10.- Moubax I, Bontemps-Subielos N, Banaigs B, Combaut G, Huitorel P, Girard JP, et al. Structure-activity relationship for bromoindole carbaldehydes: effects on the sea urchin embryo cell cycle. *Environ Toxicol Chem.* 2001;20:589-596.
- 11.- Carletti I, Banaigs B, Amade P. Matemone, a new bioactive bromine-containing oxindole alkaloid from the indian ocean sponge *Iotrochota purpurea*. *J Nat Prod.* 2000;63:981-983.
- 12.- Serra AC, Pineiro M, Rocha Gonsalves AM, Abrantes M, Laranjo M, Santos AC, et al. Halogen atom effect on photophysical and photodynamic characteristics of derivatives of 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyphenyl)porphyrin. *J Photochem Photobiol B.* 2008;92:59-65.
- 13.- Jiang Y, Lin HX, Li M, Wu BL, Chen JM. Preparation and evaluation of new brominated paclitaxel analogues. *J Asian Nat Prod Res.* 2005;7:231-236.
- 14.- Sisa M, Pla D, Altuna M, Francesch A, Cuevas C, Albericio F, et al. Total synthesis and antiproliferative activity screening of (+/-)-aplicyanins A, B and E and related analogues. *J Med Chem.* 2009;52:6217-6223.
- 15.- Hladon B, Goslinski T, Laskowska H, Baranowski D, Ostrowski T, Zeidler J, et al. In vitro cytostatic activity of 8-substituted and tricyclic analogues of acyclovir. *Pol J Pharmacol.* 2002;54:45-53.
- 16.- Henderson JP, Byun J, Williams MV, McCormick ML, Parks WC, Ridnour LA, et al. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1631-1636.
- 17.- Henderson JP, Byun J, Williams MV, Mueller DM, McCormick ML, Heinecke JW. Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. A transhalogenation pathway for generating mutagenic nucleobases during inflammation. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276:7867-7875.
- 18.- Kraut D, Churchill M, Dawson P, Herschlag D. Evaluating the potential for halogen bonding in the oxyanion hole of ketosteroid isomerase using unnatural amino acid mutagenesis. *ACS Chemical Biology.* 2009;4:269-273.
- 19.- Auffinger P, Hays FA, Westhof E, Ho PS. Halogen bonds in biological molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(48):16789-16794.
- 20.- Rahman A, Iqbal M, Thomsen W. Bioassay Techniques for Drug Development. Harward Academia. 2001.

- 21.- Dierickx P. Cytotoxic of the MEIC reference chemicals in rat hematoma derived Fa32 cells. *Toxicology*. 2000;150:159-69.
- 22.- Barbini L, Lopez P, Ruffa J, Martino V, Ferraro G, Campos R, et al. Induction of apoptosis on human hepatocarcinoma cell lines by an alkyl resorcinol isolated from *Lithraea molleoides*. *World J Gastroenterol* 2006;12:5959-5963.
- 23.- Verma R, Babu A (eds). *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, 2nd edn. McGraw-Hill: New York. 1995. 9-29.
- 24.- Martínez Y. Actividad citotóxica de derivados del 2-furiletieno en líneas celulares normales y neoplásicas. Thesis [Pharmacology Specialist]. Camaguey, Cuba: Medical Sciences University; 2010.
- 25.- Rahden-Staron I, Czczot H, Szumilo M. Induction of rat liver cytochrome P450 isoenzymes CYP 1A and CYP 2B by different fungicides, nitrofurans, and quercetin. *Mutat Res*. 2001;498:57-66.
- 26.- Lopez Lopez R, van Rijswijk RE, Wagstaff J, Pinedo HM, Peters GJ. The synergistic and antagonistic effects of cytotoxic and biological agents on the in vitro antitumour effects of suramin. *Eur J Cancer*. 1994;30A(10):1545-1549.
- 27.- Hassan S, Dhar S, Sandström, Arsenau D, Budnikova M, Lokot I, et al. Cytotoxic activity of new paclitaxel formulation, Pacliex, in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:47- 54.
- 28.- Juang S, Lung Ch, Hsu P, Hsu K, Li Y, P. H. D-501036, a novel selenophene- based triheterocycle derivate, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia- mutated nuclear protein kinase activation.. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1):193-202.
- 29.- Wiebe JP, Beausoleil M, Zhang G, Cialacu V. Opposing actions of the progesterone metabolites, 5alpha-dihydroprogesterone (5alphaP) and 3alpha-dihydroprogesterone (3alphaHP) on mitosis, apoptosis, and expression of Bcl-2, Bax and p21 in human breast cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;118(1-2):125-132.
- 30.- Soldati R, Wargon V, Cerliani JP, Giulianelli S, Vanzulli SI, Gorostiaga MA, et al. Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta? *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(3):709-724.
- 31.- Smilek P. [Molecular predictors in head and neck tumours]. *Klin Onkol*. 2010;23(4):218-23.

CORRESPONDENCE:

Oscar Hernández Betancourt
Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI),
Universidad Médica.
Camaguey.
CP 70100. Apdo 150.
Cuba
[oscar.hernandez1964 @ yahoo.es](mailto:oscar.hernandez1964@yahoo.es)

Comment of the reviewer Prof. Pilar Muñiz Rodríguez PhD. Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. España.

Hernandez y cols. realizan estudios sobre el efecto de dos compuestos derivados del 2-furiletieno, como citostáticos. En este trabajo, continuación de estudios previos, observaron que el número de átomos de bromo en el 2-furiletieno está relacionado con el efecto antiproliferativo y sobre el índice mitótico en dos líneas celulares tumorales, una de epitelio ovárico de Hamster y otra de melanoma humano.

Estos estudios de gran interés en el campo de los citostáticos contribuyen a un mayor entendimiento de la actividad biológica de estos compuestos sintéticos, y como la modificación de alguno de sus sustituyentes puede mejorar dicha actividad.

Comment of the reviewer Prof. Francisco Abad Santos MD, PhD Clinical Pharmacology. Hospital la Princesa. Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. España

This paper compares the toxicity of two compounds with similar chemical structure and finds that adding a bromide reduces

toxicity. It could be a way to get a drug with the same efficacy and better safety.

Nowadays, it is possible that adding a bromide could also reduce the efficacy of the compound; so it requires further evaluation in other models.

Received January 28, 2012.

Published April 22, 2012



ISSN: 1697-090X

Inicio Home

Indice del
volumen Volume
index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO SOBRE LOS NIVELES DE TIORREDOXINA Y DE LA MOLECULA IDO (INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASA) EN LINEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL.

¹Mónica Cavia PhD, ¹Susana Gonzalez-Mateo,
¹Carlos García Giron PhD, ²Pilar Muñiz PhD

¹Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe.
Complejo Asistencial Universitario de Burgos.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Burgos.
Burgos. España

[cavia @ hgy.es](mailto:cavia@hgy.es)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:37-40

Comentario de la revisora Dra Victoria Valls Belles. Investigadora del Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia. Valencia. España.

Comentario de la revisora Ana Sofia López González PhD. Doctora en Farmacia, Licenciada en Bioquímica y especialista en Bioquímica Clínica. Miranda de Ebro. Burgos. España.

RESUMEN:

Incrementos en la actividad de la enzima indoleamine-2-3-dioxigenasa (IDO) y cambios en estado redox celular están implicados en las distintas etapas de la evolución del cáncer. Sin embargo, su relación con los tratamientos quimioterápicos todavía no son conocidos. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta al tratamiento con oxaliplatino de líneas celulares de cáncer colorrectal (Caco-2 y SW480) sobre la molécula inmunosupresora IDO y su relación con los niveles de Trx. Resultado de este estudio se observa una mayor actividad de la enzima IDO en las células Caco-2 que en las células metastásicas SW480 asociado a niveles más bajos del sistema tiorredoxina.

PALABRAS CLAVE: IDO. Tiorredoxina. Tiorredoxina reductasa. Cáncer

SUMMARY:

Increases in indoleamine-2-3-dioxygenase activity and changes in redox state have been reported in cancer. However, their relationship with chemotherapy remains unknown. The aim of the present study was to evaluate the oxaliplatin treatment in colorectal cancer cell lines (Caco-2 and SW480) on the immunosuppressive molecule IDO and its relationship with the Trx/TrxR system. Results of this study was a higher IDO enzyme activity in Caco-2 cells than in SW480 cells associated with lower levels of the thioredoxin.

KEYWORDS: IDO. Thioredoxin. Thioredoxin reductase. Cancer

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es una de las lesiones neoplásicas más frecuentes y entre los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo y avance tumoral se incluyen el escape de las células tumorales a la respuesta del sistema inmune y cambios en el estado redox celular^{1,2}. El oxaliplatino (cis (1R,2R)-1,2,-ciclohexanedimine-N-N') oxalato (2)-O,O'-platino tiene una fuerte actividad antiproliferativa especialmente en líneas de cáncer de colon. Entre los mecanismos de la acción tóxica del oxaliplatino está el estrés oxidativo, pudiendo interactuar sobre grupos tiólicos de proteínas recién sintetizadas haciéndolas sensibles a las especies oxigénicas reactivas³⁻⁴.

La tioredoxina (Trx) es una proteína tiolica que elimina dichas especies además de actuar como regulador de proteínas reguladoras de la apoptosis⁵⁻⁷ mientras que la IDO está sobreexpresada en células tumorales estando implicada en la metástasis celular⁸. Por ello objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del oxaliplatino sobre los niveles de la actividad IDO y sobre la TRx/TRxR en dos líneas celulares de cáncer colorrectal (Caco-2 y SW480).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares: Las líneas celulares SW480 y Caco-2 fueron cultivadas con DMEN y 10% de suero fetal bovino, 1% de Penicilina (50U/ml)- Estreptomicina (50mg/ml) y 1% L-glutamina 2mM. Las células (30000 células/cm²) se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Se estimuló la producción de IDO con interferón- γ (750U/ml) y se incubaron en presencia y ausencia de oxaliplatino (5 μ M).

Determinación de la actividad IDO en cultivo celulares⁹: La concentración de quinureina se determinó mediante HPLC usando una columna Symetry Shiel RP (3.9 mm x 15 cm). Como fase móvil se utiliza tampón acetato de sodio 15 mM pH: 4 y acetonitrilo 2.7%. La absorbancia se midió a 360 nm y la concentración de quinureina se expresa en μ M.

Determinación de los niveles de Trx/TRxR: Los niveles de tioredoxina se determinó utilizando la técnica de ELISA (Redox Bioscience)¹⁰ usando anticuerpos monoclonales (mAb) anti-trx clone 2G11 y anti-Trx biotinilado como indicador del anticuerpo.

La actividad tioredoxina reductasa se determinó usando el método de reducción de la insulina descrito por Holmgren y Bjornstedt¹¹, siguiendo la actividad de la enzima espectrofotométricamente a 412 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar evaluamos el tratamiento de ambas líneas celulares con oxaliplatino, en las condiciones descritas en material y métodos, sobre la viabilidad celular. Los resultados muestran una disminución de la viabilidad celular en ambas líneas, de un 54% en las células Caco-2 y de un 57% en las células SW680 independiente de la presencia de interferón en el medio.

La actividad IDO expresada como niveles de quinureina en presencia y ausencia de oxaliplatino se muestra en la Figura 1. Los resultados muestran que los niveles de quinureina en el medio de células metastásicas SW480 son más altos que en las células Caco-2 y el tratamiento con interferón incrementa significativamente la actividad de la enzima en ambas líneas celulares, destacando el incremento en la línea Caco-2. Estos resultados apoyan la idea de que en las células tumorales la actividad de la IDO está relacionado con el ambiente inmunosupresor y sus niveles pueden estar relacionados con el potencial metastásico de las células.

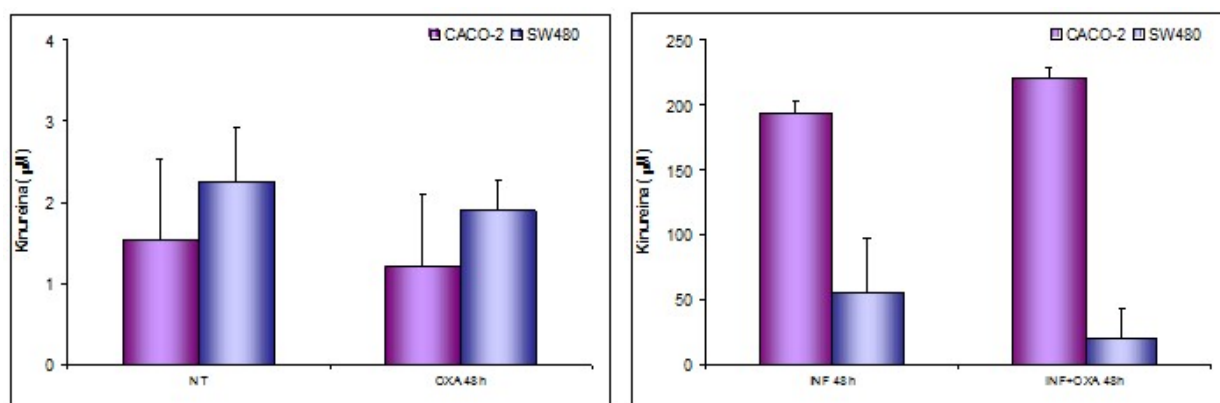


Figura 1. Actividad IDO en cultivos celulares Caco-2 y SW-680 en células no tratadas y tratadas con Oxaliplatino en presencia y ausencia de. Los resultados son media $\pm$ SD de n=3. *p < 0.005

La proteína tiólica tioredoxina (Trx) es un biomarcador que opera en sinergia con la enzima tioredoxina reductasa (TrxR) jugando un papel en el mantenimiento del estado redox celular. La proteína tioredoxina es liberada al medio en respuesta a un incremento del estrés oxidativo, actuando como regulador del crecimiento y/o apoptosis celular. Los niveles de tioredoxina (figura 2 A) y los niveles de tioredoxina reductasa (figura 2B) en el medio de las células SW480 al ser células en metástasis fueron significativamente más altos que las células Caco-2.

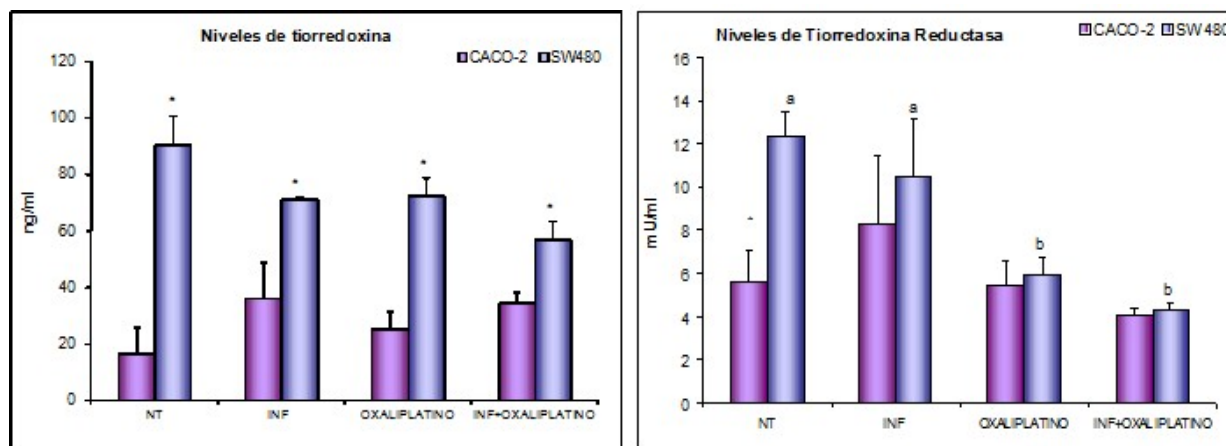


Figura 2. Niveles de tioredoxina (A) y tioredoxina reductasa (B) extracelular en las líneas Caco-2 y SW480 tratadas con oxaliplatino y en presencia y ausencia de interferón.

Los resultados son media $\pm$ SD de n=3. *p < 0.005. Letras diferentes indica diferencia significativa dentro de la misma línea celular.

El tratamiento con oxaliplatino no modifica los niveles de tioredoxina ni TrxR en las células Caco-2, sin embargo en la línea celular SW480 los niveles de ambas son más bajos aunque la diferencia solo es significativa para la actividad tioredoxina reductasa independiente de la presencia o no de interferón en el medio.

Estos resultados nos permiten concluir que el tratamiento con oxaliplatino reduce los niveles de quinureina y de la relación Trx/TrxR en las células metastásicas.

REFERENCIAS

1. Cavia M, Muñoz P, DeSantiago R, Herreros-Villanueva M., García-Giron C., López AS, Coma MJ, Changes in the levels of thioredoxin and indoleamine-2,3-dioxygenase activity in plasma patients with colorectal cancer treated with chemotherapy. *Biochem Cell Biol* 2012; 90: 1-7.
2. Uyttenhove C. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9: 1269-1274.
3. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.
4. Oliva MR, Ripoll F, Muñoz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, Drehmer E, Sáez GT. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog*. 1997;18:232-243.
5. Biaglow JE, Miller RA. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:6-13.
6. Fujino G, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*. 2006;16:427-435.
7. Lu J, Chew EH, Holmgren A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12288-12293.
8. Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:220-225
9. Alegre E, López AS, González A. Tryptophan metabolites interfere with the Ehrlich reaction used for the measurement of kynurenine. *Analytical Biochemistry* 2005;339:188-9
10. Soderberg A, Sahaf B, Rosen A. Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res* 2000; 60: 2281-2289.
11. Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 191-208.

CORRESPONDENCIA:

Monica Cavia Saiz
Unidad de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de Burgos
Burgos. España
Email: cavia@hgy.es

Comentario de la revisora Dra Victoria Valls Belles. Investigadora del Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia. Valencia. España.

El interés de este trabajo es el estudio conjunto del estado redox y de la quinureina por la influencia de ambas moléculas en la evolución de las células cancerosas, en respuesta al tratamiento con oxaliplatino.

Sería interesante el profundizar más en los mecanismos de acción de estas biomoléculas con el objetivo de evaluar el diferente comportamiento en ambas líneas celulares.

Comentario del revisor Comentario de la revisora Ana Sofía López González PhD. Doctora en Farmacia, Licenciada en Bioquímica y especialista en Bioquímica Clínica. Miranda de Ebro. Burgos. España

El presente trabajo trata de evaluar el efecto del oxaliplatino sobre los niveles de la actividad IDO y sobre la TRx/TRxR en dos líneas celulares de cáncer colorrectal.

Los autores del estudio observan una mayor actividad y expresión de la IDO en uno de los tipos celulares (Caco-2), independientemente de la viabilidad celular y concluyen que el tratamiento con oxilaplatino reduce la actividad de la IDO y la relación Trx/TRxR en las células metastásicas.

Tanto la actividad inmunosupresora de la enzima IDO, como la función en el mantenimiento del estado redox celular de la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa, pueden estar implicados en los mecanismos responsables de la resistencia de determinados pacientes al tratamiento con oxaliplatino, que es considerado uno de los fármacos de referencia en el tratamiento del cáncer colorrectal.

**Recibido, 20 de abril de 2012.
Publicado, 30 de abril de 2012**



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Indice del
volumen Volume
index](#)

[Comité Editorial
Editorial Board](#)

[Comité Científico
Scientific
Committee](#)

[Normas para los
autores
Instruction to
Authors](#)

[Derechos de autor
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



EFECTOS ADVERSOS DERMATOLÓGICOS POR ANTIBACTERIANOS. SISTEMA CUBANO DE FARMACOVIGILANCIA. 2007-2009

Ismary Alfonso Orta MD. MSc., Giset Jimenez Lopez MSc.,
Cristina Lara Bastanzuri MSc.

Unidad Coordinadora Nacional de Farmacovigilancia. Dirección de
Medicamentos y Tecnología.
Departamento Nacional de Farmacoepidemiología. MINSAP.
La Habana. Cuba

[isma.alfonso @ infomed.sld.cu](mailto:isma.alfonso@infomed.sld.cu)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:41-49

[Comentario de la revisora Dra. Beatriz Cuevas Ruiz MD. PhD.](#) Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. España.

[Comentario del revisor D. Ángel Albarrán.](#) Farmacéutico de Industria. Madrid.

RESUMEN:

Introducción: Las reacciones adversas a los antimicrobianos han ocupado en Cuba desde el año 2003 hasta la fecha el primer lugar en el reporte de reacciones adversas de manera general, así como de las reacciones graves y mortales, siendo la piel y los anejos el sistema más afectado. Esta investigación se propuso caracterizar los efectos adversos dermatológicos por antibacterianos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia desde el año 2007 hasta el 2009

Método: Se realizó un estudio de Farmacovigilancia observacional, descriptivo, y transversal utilizando los reportes de Notificación Espontánea de Sospecha de Reacción Adversa y la base de datos del Sistema Cubano de Farmacovigilancia. Se analizaron los reportes de efectos adversos dermatológicos por antibacterianos notificados desde el año 2007 hasta el 2009, la variable principal fue el efecto adverso dermatológico reportado.

Resultados: Se detectaron 3006 sospechas de reacciones adversas dermatológicas. Predominaron en el sexo femenino y en los adultos para un 60.2% y 53.7% respectivamente. Los antibacterianos relacionados con mayor número de notificaciones fueron penicilina RL 18.5%, amoxicilina 17.3% y cefalexina 9.7%. Los efectos adversos dermatológicos que predominaron fueron exantema y urticaria. Predominaron los efectos adversos moderados (64.4%), el 87.5% fueron probables y el 81.8% frecuentes.

Conclusiones: Los efectos adversos dermatológicos por antibacterianos predominaron en el sexo femenino y en los adultos. La penicilina RL fue el fármaco más relacionado con reacciones adversas. Las reacciones adversas moderadas, probables y frecuentes fueron la mayoría en el estudio.

PALABRAS CLAVE: Antibacterianos. Farmacovigilancia. Efectos adversos dermatológicos

SUMMARY: DERMATOLOGICAL SIDE EFFECTS FOR ANTIBACTERIALS. PHARMACOVIGILANCE CUBAN SYSTEM. 2007-2009

Introduction: Adverse reactions to antimicrobials in Cuba have taken place since 2003 to date, the first in the report of adverse reactions in general, as well as serious and fatal reactions, on the skin and schedules are the systems more affected. This research aimed to characterize the antibacterial dermatologic toxicities reported by the national coordinating pharmacovigilance unit from 2007 to 2009.

Method: An observational study of Pharmacovigilance, descriptive and transversal using Spontaneous Reporting of Suspected Adverse Reaction database and the Cuban system of pharmacovigilance. Reports were analyzed for antibacterial dermatologic toxicities reported from 2007 through 2009, the primary endpoint was the dermatologic adverse effect reported.

Results: A total of 3006 suspected adverse reactions to skin. Predominated in females (60.2%) and in adults, 53.7%. The antibacterial associated with increased number of notifications were 18.5% RL penicillin, amoxicillin, cephalexin, 17.3% and 9.7%. Dermatological adverse events predominated were rash and urticaria. Moderate adverse effects predominated (64.4%), 87.5% were probable and 81.8% common.

Conclusions: Adverse dermatologic antibacterial dominated by females and in adults. RL Penicillin was the drug most associated with adverse reactions. Moderate adverse reactions, probable and common were the more frequent in the study.

KEYWORDS: Antibacterials. Pharmacovigilance. Dermatological adverse effects

INTRODUCCIÓN

Los efectos adversos a medicamentos se definen como el efecto no deseado que ocurre a dosis normalmente usadas, terapéuticas, en el hombre para la profilaxis, diagnóstico o tratamiento de sus enfermedades¹.

Los efectos adversos dermatológicos provocados por medicamentos son dermatosis que pueden afectar la piel, mucosas o anejos cutáneos inducido por la administración de un medicamento ya sea por vía tópica, oral o parenteral, son las más frecuentes después de las gastrointestinales y su prevalencia ha ido en aumento debido al incremento del uso y de la variedad de los medicamentos, sumado a la mayor expectativa de vida de la población. Representan un 30% de las reacciones adversas a medicamentos, 2% a 3% de los pacientes hospitalizados. De todos los fármacos, los que más se relacionan son los antibacterianos².

Desgraciadamente no existe aún el antibacteriano (ATB) ideal que no presente reacciones adversas medicamentosas (RAM) asociados a su uso. Estas deben tenerse siempre en mente al momento de indicar un ATB, puesto que la falta del reconocimiento oportuno puede ocasionar daños irreversibles en diversas funciones orgánicas.

Un 10-20% de los pacientes hospitalizados manifiestan ser alérgicos a fármacos, especialmente a la penicilina. Sin embargo, la incidencia publicada de reacciones anafilácticas a penicilina apenas oscila entre el 0,004 y 0,015% de pacientes. La amoxicilina se considera actualmente la causa más frecuente de anafilaxia entre los betalactámicos³.

Las reacciones alérgicas pueden presentarse de diversas maneras y gravedad, desde la simple fiebre por antibacterianos al síndrome de Steven-Johnson. Cualquier mecanismo inmunológico puede estar involucrado (tipos I a IV de Gell y Coombs), sin embargo, en la mayoría de reacciones no se conoce exactamente la inmunopatología asociada. La piedra fundamental en el manejo de este tipo de RAM consiste en la suspensión del fármaco².

En Estados Unidos se llevó a cabo el primer informe sobre reacciones adversas a ATB, a cargo de los investigadores de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Daniel Budnitz, afirmó que cada año ocurren en Estados Unidos alrededor de 142.000 consultas de emergencia por reacciones adversas a un antibiótico y el origen de los eventos adversos, 78% correspondieron a reacciones alérgicas propias del medicamento, mientras que 22% se debieron a errores en la dosificación⁴.

Actualmente existen pocos estudios nacionales sobre efectos adversos dermatológicos en el Sistema Cubano de Farmacovigilancia, siendo los antimicrobianos el primer grupo farmacológico relacionado con mayor número de reportes de RAM⁵⁻⁶.

Por estas razones esta investigación se propuso caracterizar los efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos notificadas a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009, así como clasificar la población portadora del efecto adverso, identificar los antibacterianos que con mayor frecuencia están involucrados y clasificar los efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos según tipo, severidad, causalidad y frecuencia.

SUJETOS Y METODOS

Se realizó un estudio de farmacovigilancia, observacional, descriptivo y transversal utilizando los métodos de notificación espontánea de sospecha de reacción adversa y la base de datos del Sistema Cubano de Farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009. Se trabajó

con el universo de reportes de efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia.

Se determinó la distribución de los pacientes que desarrollaron los efectos adversos dermatológicos por sexo y grupo de edad niño: 0-14, adulto: 15-59 y ancianos: mayores de 60 años.

Los efectos adversos dermatológicos se clasificaron según la severidad en leves: síntomas y signos fácilmente tolerados, no hay cambio de terapéutica ni se requiere tratamiento. Moderadas: hay malestar suficiente que interfiere con la actividad diaria, requiere observación, suspensión o cambio de terapéutica con la administración de un tratamiento específico para contrarrestarla. Graves: pone en peligro la vida del paciente y letales: contribuye directa o indirectamente a la muerte del paciente⁷. Para establecer imputabilidad se aplicó el algoritmo de Karch y Lasagna clasificándolas en definitivas, probables, posibles, condicionadas⁷ y la frecuencia se tomó como referencia el Formulario Nacional de medicamentos de Cuba⁸. Finalmente se identificaron los principales antibacterianos asociados a las mismas según la clasificación Anátomo-Terapéutico-Clínica (ATC) del 2005. Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de los objetivos.

Aspectos éticos: la información obtenida de la base de datos fue usada solo con fines de investigación.

RESULTADOS

Durante este periodo se recibieron 3006 notificaciones de efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos

En la tabla 1 se observa el comportamiento de los efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos según grupos de edades, donde se observa un predominio en adultos (53.7%), mientras que los niños y ancianos representaron el 46.3%.

Edad	Nº	%
Niños	1030	34.3
Adultos	1616	53.7
Geriatría	360	12.0
TOTAL	3006	100.0

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 1: Distribución de los pacientes portadores de efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009

La distribución por sexo se comportó con un predominio del sexo femenino (1811 notificaciones, 60.2%), mientras que el sexo masculino estuvo menos afectado (1195 notificaciones, 39.8%).

En la Tabla 2 se muestran los principales antibacterianos sospechosos de producir efectos adversos dermatológicos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia.

Fármacos	Nº	%
penicilina rapilenta	557	18.5
amoxicilina	519	17.3
cefalexina	291	9.7
co-trimoxazol	230	7.6
ciprofloxacina	220	7.3
penicilina g sódica	145	4.8
ceftriaxona sódica	103	3.4
ampicillin	101	3.3

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 2. Distribución de los principales antibacterianos sospechos de producir efectos adversos dermatológicos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009

Se observa un predominio de antimicrobianos del grupo betalactámicos (57.0%), seguido de las sulfas (7.6%) y quinolonas 7.3%.

La tabla 3 muestra el comportamiento según tipo de efecto adverso dermatológico donde los exantemas representaron más del 50% de los casos reportados.

RAM	Nº	%
<i>Exantema</i>	1821	60.6
Eritema	428	14.2
Urticaria	353	11.7
Prurito	211	7.0
Edemas	37	1.2

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 3. Distribución de las principales efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009

En la Tabla 4 se muestran la distribución de las notificaciones de efectos adversos dermatológicos según severidad durante el periodo de estudio, más del 60% se correspondieron con reacciones adversas severas (64.7%).

Severidad	Nº	%
Leve	1062	35.3
Moderada	1935	64.4
Grave	8	0.3
Mortal	1	0.03
TOTAL	3006	100.0

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 4. Distribución de los efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos notificados a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia según severidad, durante el periodo 2007 - 2009

La distribución de los efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos según imputabilidad, notificadas a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia se muestra en la tabla 5. Con un predominio de reacciones adversas probables (2632 / 87.5%) seguidas por las posibles 10.2% y con muy baja ocurrencia de definitivas y condicionales 1.0% y 1.3% respectivamente.

Causalidad	Nº	%
Definitiva	31	1.0
Probable	2632	87.5
Posible	307	10.2
Condicional	36	1.3
TOTAL	3006	100.0

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 5: Distribución de efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos según causalidad notificadas a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009

Al evaluar la frecuencia de aparición de efectos adversos dermatológicos notificados en la tabla 6, se observó que el 81.8% fueron frecuentes, descritas en la literatura y el 18.2% de baja frecuencia de aparición.

Frecuencia	Nº	%
Frecuente	2458	81.8
Ocasional	350	11.6
Rara	159	5.3
No descrita	39	1.3
TOTAL	3006	100.0

Fuente: Unidad Nacional Coordinadora Farmacovigilancia.

Tabla 6. Distribución de efectos adversos dermatológicos a los antibacterianos según frecuencia notificadas a la unidad nacional coordinadora de farmacovigilancia durante el periodo 2007 - 2009

DISCUSIÓN

Al analizar los reportes de efectos adversos dermatológicos a los antimicrobianos realizados a la unidad coordinadora nacional de farmacovigilancia encontramos que los pacientes adultos (15-59 años) presentaron mayor por ciento de efectos adversos dermatológicos, este resultado guarda relación con lo reportado por la literatura, probablemente ello se deba a que los niños están menos expuestos a medicamentos, tienen mayor aclaramiento de IgE y sus mecanismos inmunopatológicos son más inmaduros comparados con los del adulto⁹.

Los factores de riesgo para presentar un efecto adverso dermatológico en los niños pueden dividirse en dependientes del fármaco y dependientes del paciente¹⁰. Entre los factores inherentes al huésped se deben tener en cuenta, principalmente la predisposición genética, el estado inmunológico previo y la presencia de co-morbilidades. Con respecto a los dependientes del fármaco los antibióticos son los fármacos implicados con mayor frecuencia probablemente debido al uso indiscriminado que se hace de ellos ante cuadros infecciosos¹¹. Estudios realizados en pacientes ambulatorios estiman que el 12% de los niños tratados con antibióticos presentará una reacción cutánea a medicamentos⁹. Otro aspecto importante es que en este grupo de edad son muy frecuentes los exantemas de origen infeccioso, los cuales llevan a que los niños sean medicados con antibióticos o antipiréticos, hecho que dificulta aún más el diagnóstico diferencial con una farmacodermia⁸.

La población de la tercera edad es más susceptible en virtud de factores un mayor porcentaje de yatrogenia grave y de ingresos por esta causa; en el origen de todo ello están la polimedicación, la comorbilidad y las mermas funcionales achacables a la vejez³.

La distribución por sexo sigue igual comportamiento que el resto de los reportes de la unidad coordinadora nacional de farmacovigilancia⁵, siendo el sexo femenino el más relacionado con sospechas de efectos adversos mientras que el sexo masculino estuvo menos afectado, lo cual se corresponde con la literatura internacional donde se plantea que el sexo femenino se asocia con un mayor consumo de fármacos, en ocasiones polifarmacia, muchas veces relacionado a la automedicación, además los efectos adversos se reportaron mayormente en mujeres en edad fértil donde generalmente son más frecuentes las sepsis del sistema urinario y las ginecológicas³.

Al analizar los antibacterianos más reportados fueron los betalactámicos, específicamente penicilinas y cefalosporinas seguidos por las sulfas y las quinolonas, lo cual se corresponde con estudios nacionales realizados⁵, en Estados Unidos de las visitas realizadas a departamentos de emergencias por reacciones adversas el 36.9% fueron atribuidas a la penicilina⁴. Se reporta en la literatura que los betalactámicos son los medicamentos que originan más reacciones de hipersensibilidad, ya que comparten un anillo bicíclico betalactámo-tiazolidina y se dividen en cuatro grupos con diferencias estructurales: penicilinas (benzilpenicilinas y aminopenicilinas como la amoxicilina, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos¹².

Se han descrito antígenos de betalactámicos formados por conjugados de metabolitos y proteínas, clínicamente causan con mayor frecuencia reacciones inmediatas tipo urticaria-angioedema o anafilaxia por un probable mecanismo de hipersensibilidad tipo I¹².

El conocimiento en los últimos años de las reacciones selectivas y de las diferentes reactividades cruzadas entre betalactámicos permite plantear el test de provocación con fármacos alternativos al implicado en la reacción. Hasta el 40% de las reacciones con aminopenicilinas son selectivas con buena tolerancia al resto de los betalactámicos. Entre cefalosporinas la reactividad cruzada es variable y, en relación con las penicilinas, es superior con cefalosporinas de primera generación. Esto se explica por las diferencias en su estructura química y viene condicionada por la cadena lateral en vez de por el anillo betalactámico. Las reacciones tardías por betalactámicos son menos frecuentes que en otros grupos farmacológicos y en la mayoría su mecanismo es incierto¹².

Con relación a las quinolonas la incidencia de reacciones de hipersensibilidad es baja pero creciente. Las quinolonas implicadas con más frecuencia son: ácido nalidíxico, ácido pipemídico, ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino. Con las últimas generaciones de quinolonas en menor medida, aunque ya se han comunicado algunas reacciones. Clínicamente se describen tanto reacciones inmediatas, de probable mecanismo IgE, como tardías¹³. Tienen descrito en la literatura nacional como reacciones adversas frecuentes en la piel, prurito y rash⁷. Por cuanto los resultados del estudio se corresponden así como con un estudio realizado en Pinar del Río que mostró en una búsqueda activa el reporte de reacciones dermatológicas por este grupo de antibacterianos¹⁴.

Existe una tendencia para considerar las toxicodermias como una reacción alérgica, aunque se pueden producir a través de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos; sin embargo, no en todas las reacciones cutáneas se ha identificado el mecanismo de producción¹⁵.

El estudio mostró un predominio de efectos adversos dermatológicos del tipo exantema, lo cual se corresponde con la literatura consultada, siendo esta la forma más frecuente de toxicodermias (60%)¹⁵. Clínicamente, imitan a los exantemas virales clásicos¹³. Las urticarias por su parte, fueron otro tipo de efecto adverso reportado, las cuales son producidas en un 15-30% por medicamentos. Puede presentarse como un cuadro puramente cutáneo, que puede acompañarse de angioedema, o bien como una reacción multiorgánica ("enfermedad del suero"). Se produce por un mecanismo que puede ser inmunológico a través de un fenómeno de hipersensibilidad tipo I o III; pero también se puede producir por un mecanismo no inmunológico provocado por la desgranulación inespecífica de mastocitos. La urticaria es un síndrome que puede asociarse con ciertas condiciones físicas, alimentos, infecciones y enfermedad general. Dentro de los antibacterianos que tienen descrito este efecto adverso se encuentran las Penicilinas y derivados sintéticos, y las sulfonamidas correspondiéndose con los resultados del estudio¹⁴.

Mediante el análisis de la tabla 4 se puede ver el significado del estudio pues nos demuestra que el 64.7% los reportes de reacciones adversas a antibacterianos fueron reportes severos. Los efectos adversos graves y mortales estuvieron dados por 6 casos de necrosis epidérmica tóxica a los fármacos penicilina rapilenta, co-trimoxazol, y ciprofloxacina, dos casos de edema angioneurótico y un caso de eritema multiforme a los fármacos penicilina rapilenta y cefazolina, todos descritos en la literatura como reacciones de hipersensibilidad, siendo reacciones adversas de tipo B, que están relacionadas con fenómenos inherentes al individuo, donde la concentración y los efectos farmacológicos del medicamento no son determinantes¹⁴.

La relación de causalidad se comportó con un predominio de los efectos adversos probables debido a que por la seguridad del paciente no se re-expone al fármaco y además no existe causa alternativa que explique la reacción adversa. Un porcentaje bajo de efectos adversos definitivos se encontró, pues existía el dato de la reexposición al fármaco sospechoso y la reaparición del efecto adverso donde se puede mencionar casos de prurito y eritema.

La distribución de las reacciones adversas a los antibacterianos según frecuencia muestra que predominaron las reacciones adversas frecuentes descritas en la literatura⁸, aunque el 18.2% de las reacciones reportadas son de baja frecuencia de aparición, brindándosele especial interés a las raras y no descritas en la literatura como por ejemplo al ácido nalidíxico se reportaron habones, prurito, edema angioneurótico, a la amoxicilina se reportó sudoración, la azitromicina se relacionó con reacciones alérgicas del tipo erupción cutánea y enrojecimiento. Así mismo se reportaron a las cefalosporinas sudoración fría e hipopigmentación de la piel. Estos resultados se corresponden con los datos expuestos en los informes de balance de la Unidad Coordinadora Nacional de Farmacovigilancia durante los años del estudio.

CONCLUSIONES.

Las RAM dermatológicas a los antibacterianos predominaron en los adultos y femeninos.

Los antibacterianos de mayor relación con la aparición de efectos adversos dermatológicos fueron penicilina RL, amoxicilina y cefalexina.

Predominaron los efectos adversos moderados y probables siendo los exantemas cutáneos los más frecuentes.

El porcentaje de RAM graves y mortales es bajo.

REFERENCIAS

- 1.- Organización Mundial de la Salud. Vigilancia de la seguridad de los medicamentos. Guía para la instalación y puesta en funcionamiento de un Centro de Farmacovigilancia. The Uppsala Monitoring Centre. Sweden 2001; 23.
- 2.- Wagemann BE, et al. Reacciones Adversas Medicamentosas Mucocutáneas en Pacientes Hospitalizados en Servicio de Medicina Interna. Rev Chilena Dermatol. 2007; 23:115-118.
- 3.- Puche Cañas E, Luna Del Castillo JD. [Reacciones adversas a medicamentos en pacientes que acudieron a un hospital general: un meta-análisis de resultados.](#) An Med Interna. 2007;24:574-578.

- 4.- Shehab N, Patel PR, Srinivasan A, Budnitz DS. Emergency department visits for antibiotic-associated adverse events. Clin Infect Dis. 2008; 47:735-743.
- 5.- Alfonso I, Jiménez G, Ávila J, Chao A. [Comportamiento de las reacciones adversas a medicamentos en Cuba. Año 2007](#). Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2009;2:20-29.
- 6.- Alfonso I, Jiménez G, Ávila J, Chao A, Ruiz K. [Vigilancia de Efectos Indeseables a los antimicrobianos en Cuba, 2008](#). Boletín Fármacos 2009;12 (5).
- 7.- Jiménez G (ed). [Normas y Procedimientos del Sistema Cubano de Farmacovigilancia](#). Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. La Habana, Cuba, 2007.
- 8.- Alfonso I, Alonso C, Alonso L, Calvo DM, Cires M, Cruz MA, et al. Formulario Nacional de Medicamentos/ Ministerio de salud Pública. Centro para el desarrollo de la Farmacoepidemiología. La Habana: Editorial Ciencias Medicas, 2006. Disponible en: <http://www.cdf.sld.cu>
- 9.- Cervini AB, Buján MM, Martín A. Farmacodermias en la infancia. Dermatol Argent.2011; 17(2):100-109.
- 10.- Segal AR, Doherty KM, Leggott J, Zlotoff B. Cutaneous reactions to drugs in children. Pediatrics. 2007;120(4):e1082-1096.
- 11.- Papale RM. Reacciones adversas a drogas. Otros aspectos. Dermatol Argent. 2010; 16:72-74.
- 12.- Blanca M, Torres MJ. [Reacciones de hipersensibilidad a antibióticos betalactámicos en la infancia](#). Allergol Immunopathol 2003;31(3):103-109.
- 13.- Tilles SA, Slatore CG. Hypersensitivity reactions to non-beta-lactam antibiotics. Clin Rev Allergy Immunol. 2003; 24: 221-228.
- 14.- Alfonso I, Roque K, Jimenez G, Diaz Y. [Reacciones adversas a las quinolonas en atención primaria. Pinar del río, Cuba 2009](#). Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2010;3:27-33.
- 15.- Ramírez-Boscá A. [Toxicodermias. Erupciones cutáneas por fármacos](#). Pediatr Integral 2008;12(4):377-384.

CORRESPONDENCIA:

Dra. Ismary Alfonso Orta
Unidad Coordinadora Nacional de Farmacovigilancia - Dirección de medicamentos y Tecnología.
Departamento Nacional de Farmacoepidemiología. MINSAP.
La Habana. Cuba
[isma.alfonso @ infomed.sld.cu](mailto:isma.alfonso@infomed.sld.cu)

Comentario de la revisora Dra. Beatriz Cuevas Ruiz MD. PhD. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. España.

Estudio descriptivo de las reacciones adversas dermatológicas secundarias a antibióticos por notificación espontánea al Sistema de Farmacovigilancia Cubano; se refleja La mayor incidencia de reacciones en mujeres y con una gravedad moderada

Como apuntan los autores hasta 10-20% de los pacientes hospitalizados refieren presentar alergia a fármacos, fundamentalmente a penicilina; la notificación es fundamental para evitar la reexposición al antibiótico y evitar una reacción anafiláctica que puede ser fatal para el paciente

Comentario del revisor D. Ángel Albarrán. Farmacéutico de Industria. Madrid.

Los Sistemas de Farmacovigilancia elaboran sus datos según el método de notificación espontánea y ello condiciona que la valoración de éstos sea sesgada ya que se desconoce el número real de casos.

Como apuntan los autores, las reacciones adversas a los antimicrobianos han ocupado el primer lugar en cuanto a notificaciones en el Sistema Cubano de Farmacovigilancia desde el año 2003. Por ello, sería muy interesante que en artículos posteriores describieran todos los casos notificados desde esa fecha hasta nuestros días ampliando así, el período de análisis. Esto redundaría

en un estudio más completo pudiendo apuntalar con una casuística mayor las conclusiones finales.

Así mismo, aunque en el artículo los autores determinan que la variable principal fue el efecto adverso dermatológico, la descripción de efectos sobre otros órganos puede enriquecer trabajos posteriores.

Recibido, 28 de diciembre de 2011. Recibido revisado, 16 de abril de 2012.

Publicado, 22 de abril de 2012



ISSN: 1697-090X

[Inicio Home](#)

[Indice del
volumen Volume
index](#)

[Comité Editorial
Editorial Board](#)

[Comité Científico
Scientific
Committee](#)

[Normas para los
autores
Instruction to
Authors](#)

[Derechos de autor
Copyright](#)

[Contacto/Contact:](#)



MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LA VELLOSIDAD PLACENTARIA CORRESPONDIENTE A FETO CON MÚLTIPLES MALFORMACIONES CONGÉNITAS

Prof. Olivar C Castejón S

**Laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Carabobo - Núcleo Aragua.
Director del Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del
Núcleo Aragua (CIADANA). Maracay, Edo.
Aragua. Venezuela.**

olivar.ciadanauc@gmail.com

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:50-59

RESUMEN:

Describir la estructura tridimensional de la vellosidad placentaria con técnicas de microscopía electrónica de barrido en un caso de aborto espontáneo, de 16 semanas de gestación, con múltiples malformaciones congénitas, es el propósito de este trabajo.

Muestras fueron tomadas de 4 regiones marginales de la placenta y una región central a las cuales se aplicaron los procedimientos convencionales de microscopía electrónica de barrido siendo previamente observadas con la microscopía de luz. Vellosidades de otro caso de aborto terapéutico, a la misma edad gestacional, se tomaron como control. De cada región cinco especímenes fueron tomadas en sala de parto y fijadas en 2% de glutaraldehído para su procesamiento.

Los resultados muestran vellosidades intermedias inmaduras con depósitos de fibrinoide, escasos brotes sincitiales, superficie carente de microvellosidades y algunas con estroma compacto o fibrótico. La superficie que no mostraba brotes sincitiales en exceso se presenta con ondulaciones y profundas invaginaciones. No se notaron alteraciones en la forma de ramificación. Se encontró ausencia de hiperplasia y de lagunas o cisternas estromales. Vellosidades intermedias maduras, alargadas, delgadas y rectas se observaron con membranas vasculo sincitiales.

Las observaciones en la placenta estudiada exhiben un patrón morfológico correspondiente a la semana 16 el cual no permite predecir sobre anormalidad cariotípica alguna aunque con algunas diferencias morfológicas cuando se comparan con las obtenidas del control. Dada la carencia de determinación cariotípica, se ha sugerido que mutaciones ligadas al cromosoma X durante la blastogénesis pudieran ser las causantes de las múltiples malformaciones fetales.

PALABRAS CLAVE:Microscopia Electrónica de Barrido. Vellosidad placentaria. Malformaciones congénitas.

SUMMARY: To describe the three dimensional structure of the placental villi with technics of scanning electron microscopy in a case of spontaneous abortion of 16 weeks gestation with multiple inherited malformations is the proposal of this work.

Samples were taken of four marginal regions of the placenta and one of central region which were examined with conventional procedures of scanning electron microscopy previously being observed with light microscopy. Villi of another case of induced abortion at same gestational week were taken as control. Five specimens of each region were selected in delivery room and fixed in 2 percent of glutaraldehyde for their processing.

The results showed immature intermediate villi with deposits of fibrinoid and scarce syncytial sprouts. The placental villi showed trophoblastic surface absent of microvilli and with a dense stroma or fibrotic. The surface no showed abundant syncytial sprouts. Villus scalloping with trophoblastic invaginations, were noted without alterations in branching of placental villi. It was found absence of placental hyperplasia or of stromal cisterns.

The observations in the studied placenta exhibited a morphological pattern according to week 16 which no permit to predict about abnormal karyotypic. These no karyotyped samples observed suggest that mutations linked to X chromosome during blastogenesis could be cause of the multiple inherited fetal malformations.

KEYWORDS: Scanning Electron Microscopy. Placental Villi. Congenital Malformations.

INTRODUCCIÓN

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) ha sido una técnica valiosa en la evaluación de material placentario procedente de abortos la cual confirma los hallazgos realizados con la microscopía de luz, complementando los estudios histopatológicos¹ en los cuales no son bien conocidos los agentes etiológicos del mal desarrollo fetal en el aborto espontáneo². La agregada consideración de la estructura tridimensional de la vellosidad placentaria en la evaluación de abortos tempranos proporciona una mayor confianza al histopatólogo³. Correlación entre la morfología de la vellosidad placentaria y el cariotipo subyacente ha sido demostrada⁴. Sobre la base de diámetro vellosos estimado, superficie vellosa, patrón de ramificación, número de brotes sincitiales y depósitos de fibrina 5 grupos (ABCDE) de vellosidades se clasificaron de porciones de placenta con la MEB de abortos espontáneos entre las 6 y 16 semanas de gestación. En 4 de esos grupos el cariotipo fue determinado. Así por ejemplo el grupo B presentó vellosidades poco ramificadas, con muchos brotes sincitiales densamente cubiertos con microvellosidades, pero con poca deposición de fibrina que caracterizaba a una trisomía o bien una monosomía X, de aborto espontáneo⁴.

En este trabajo se propone evaluar la vellosidad placentaria con MEB correspondiente a un feto de 16 semanas afectado por la malformación de Dandy-Walker, ventriculomegalia cardíaca severa, encefalocele, gastroquisis, retardo de crecimiento en miembros superiores e inferiores y polidramnios. RaSgos diagnosticados mediante ultrasonografía durante el inicio del segundo trimestre del embarazo.

Dado que no se presenta la determinación del cariotipo en este caso nos interesamos en investigar si las vellosidades exhiben en el trofoblasto las características ya descritas en casos de monosomías, triploidias o trisomías que nos permita por similitud sugerir alguna anomalía cromosómica. Desórdenes de la ramificación, arrugas del sincitio, brotes sincitiales en grupos, disposición de la fibrina, organización de microvellosidades y grosor de las vellosidades han sido características de interés observados en placentas asociadas a embriones desorganizadas severamente.

El propósito de este trabajo describir la estructura tridimensional de la vellosidad placentaria con técnicas de MEB en un caso de aborto espontáneo de 16 semanas de gestación con múltiples malformaciones congénitas.

MATERIAL Y METODOS

Material de una placenta obtenida por curetaje de un aborto espontáneo, de 16s de gestación, con múltiples malformaciones congénitas ya indicadas en la introducción y diagnosticadas mediante ultrasonografía fue obtenido para la observación con el MEB sin estudio genético. Material de otra placenta procedente de un aborto terapéutico a la misma semana de gestación fue tomado como control cuyo feto no presentó malformaciones congénitas. Diez láminas, por cada placenta fueron teñidas con H&E para su observación con la microscopía de luz. Cinco biopsias fueron tomadas de ambas placentas: una de la región central parabasal y cuatro de las regiones marginales abarcando placa corial y placa basal. De cada biopsia cinco secciones de 5x5x2mm fueron lavadas en sala de parto en buffer fosfato 0.1M, pH 7.3 y colocadas por inmersión en 2% de glutaraldehído en el mismo buffer por 2 horas. Posteriormente lavadas por tres veces, 1/2 hora cada vez en el buffer fosfato y finalmente en agua destilada para eliminar los cristales del buffer. De seguida se fijaron en 1% de tetraóxido de osmio, en buffer fosfato durante 18 horas, lavadas tres veces ½ hora cada vez en buffer y finalmente en agua destilada⁵.

La deshidratación se inició a partir del etanol de 70% con dos pases de 15 minutos; se continuó igualmente con la serie de 85%, 95% y 100%. Una mezcla de etanol y amyl acetato, en frío, en concentraciones sucesivas de 3:1; 1:1; 1:3, fue empleada después del alcohol de 100% durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron en amyl acetato puro, a 4°C, por el mismo tiempo y se llevaron al desecador de punto crítico HCP-2 Hitachi. Una vez desecadas las secciones fueron disecadas, para eliminar vellosidades, bajo la lupa estereoscópica Zeiss y de esta manera exponer la zona de observación. Las secciones se montaron en el porta espécimen y se limpiaron con un chorro de aire comprimido. Luego se cubrieron con Pt-Pd, en un cobertor iónico Eiko-IB3 Hitachi. Las secciones de material ya cubierto fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S2300. Microfotografías fueron tomadas en un rango de 500x a 1500x.

RESULTADOS

Una panorámica general (Fig. 1 A) nos muestra una visión tridimensional de algunas de los diferentes tipos de vellosidades encontradas en las regiones analizadas. En estas se encontraron vellosidades intermedias inmaduras (vii) en una mayor

proporción que las vellosidades intermedias maduras (vim), vellosidades terminales (vt) y troncales (vtr). Las vii predominan en las observaciones del grupo estudio al igual que en el control.

Saliendo de la superficie de las vii se notan brotes sincitiales en una cantidad mínima de uno a tres. Numerosas vim son demasiadas delgadas cuando se comparan con el control (Fig 1B) conservando una trayectoria mas o menos recta o con ligeras ondulaciones. Estas vim presentaron una superficie trofoblástica con arrugas durante su trayecto. En algunas de estas el contenido del estroma se ha separado completamente del trofoblasto quedando un anillo periférico edematoso subyacente al trofoblasto cuando son vistas con el MEB. La superficie de la vellosidades en muchas de ellas se nota muy lisa con escasas microvellosidades. No se notaron cambios respecto a las ramificaciones vellosas.

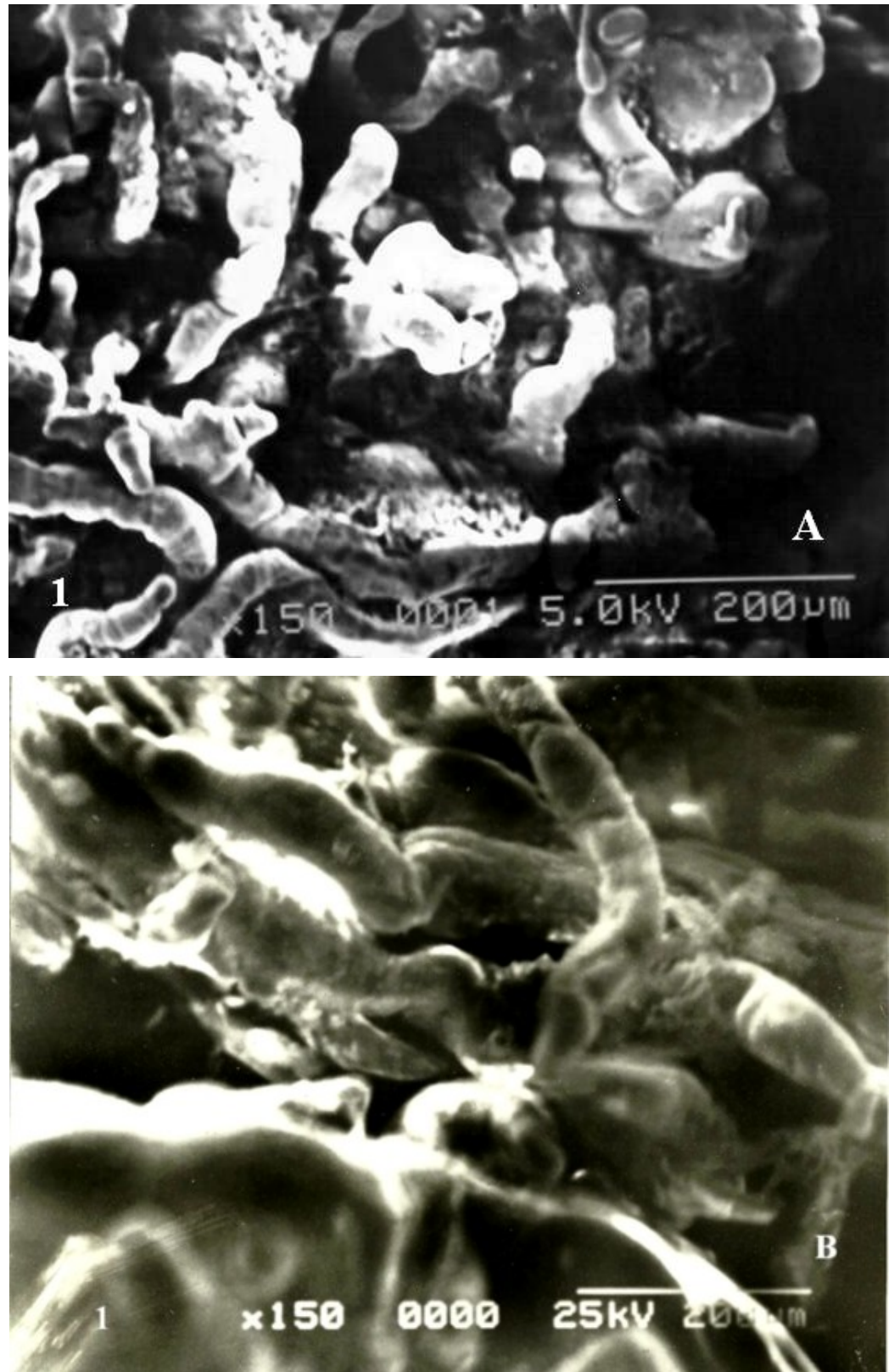


Figura 1.- Vista panorámica de vellosidades. La región superior derecha muestra una zona de vii con pequeños brotes sincitiales. Hacia la superior izquierda vim muy delgadas. Brotes mesenquimales se observan al centro. Numerosas arrugas se notan en la

superficie de vim (A).En el control las vim están más engrosadas (B).

Cuando se observa a mayor ampliación las superficies de la vii se notaron cubiertas por fibrinoide con notables cambios degenerativos y corrugadas (Fig. 2A).En el control la superficie permaneció normal (Fig.2B). Vellosidades avasculares conformadas por un estroma muy compacto o fibrótico fueron observadas (Fig. 3A).

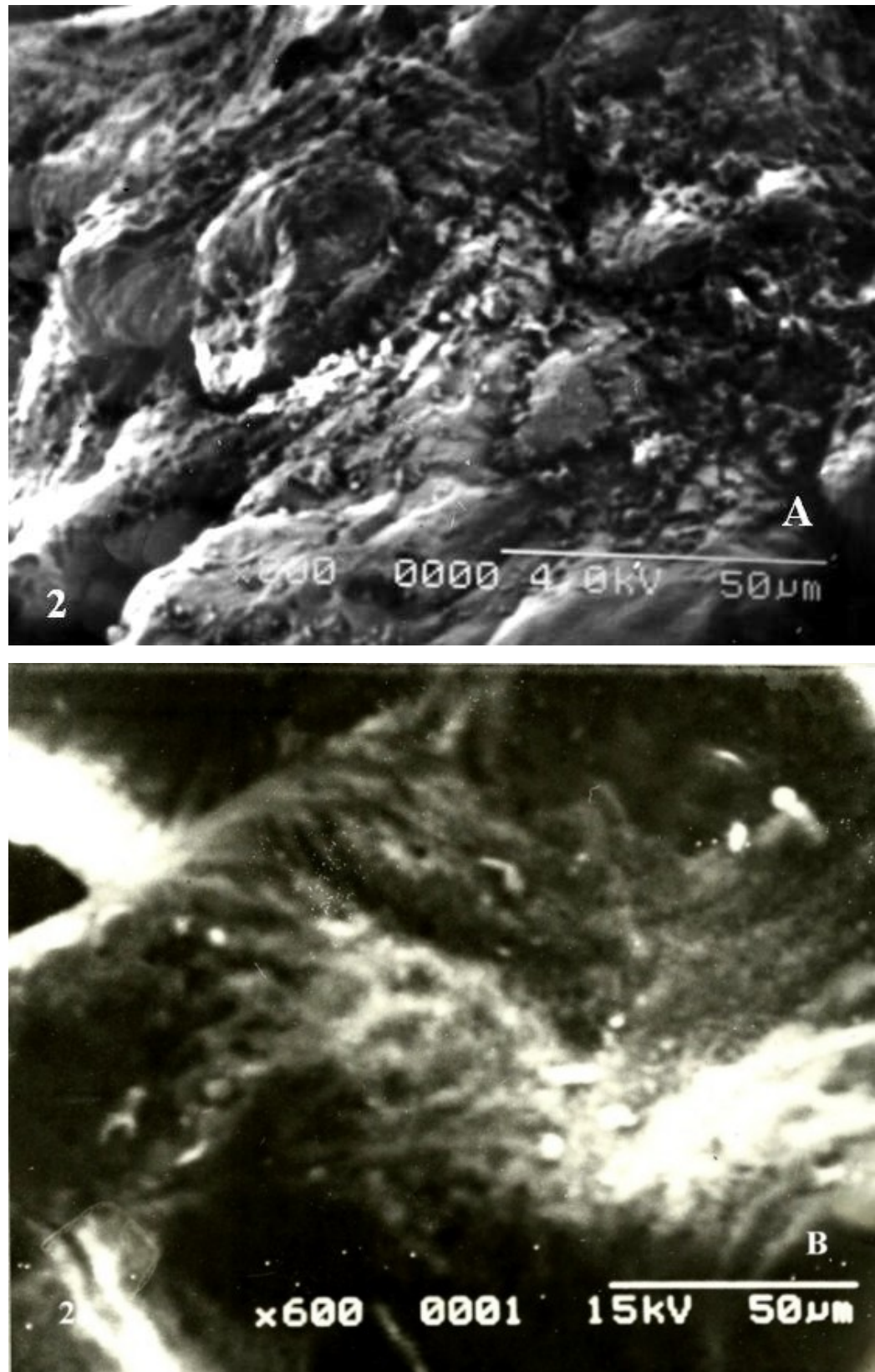


Figura 2.- Superficie ampliada de una vii con deposición de fibrinoide y cambios degenerativos (A).Una superficie mejor preservada se observa en el control (B).

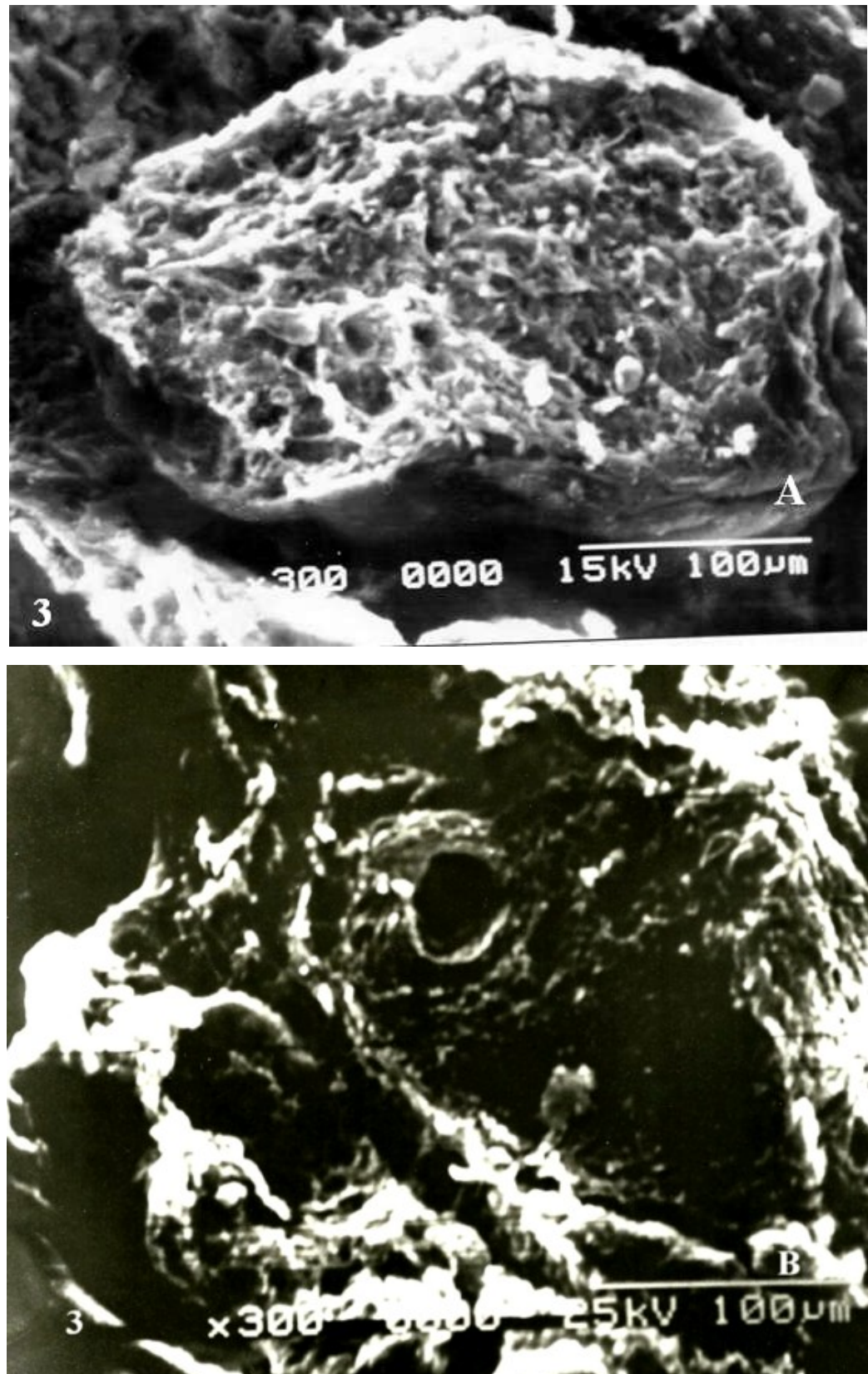


Figura 3.- La superficie visible en parte del sincitio se nota arrugada y el contenido del estroma avascular está compactado por fibras y células (A).En el estroma de la vellosidad control se observa un vaso en la región central (B).

Sobre la superficie de vii no se observaron abundantes formaciones trofoblásticas con forma de mazo, gotas o comas que caracterizan a algunas de las vellosidades que presentan anomalías cariotípicas ni tampoco una superficie cubierta por un césped de microvellosidades; por el contrario las superficies se observaron lisas (Fig. 4A) mientras que el control presentó brotes sincitiales (Fig 4B).

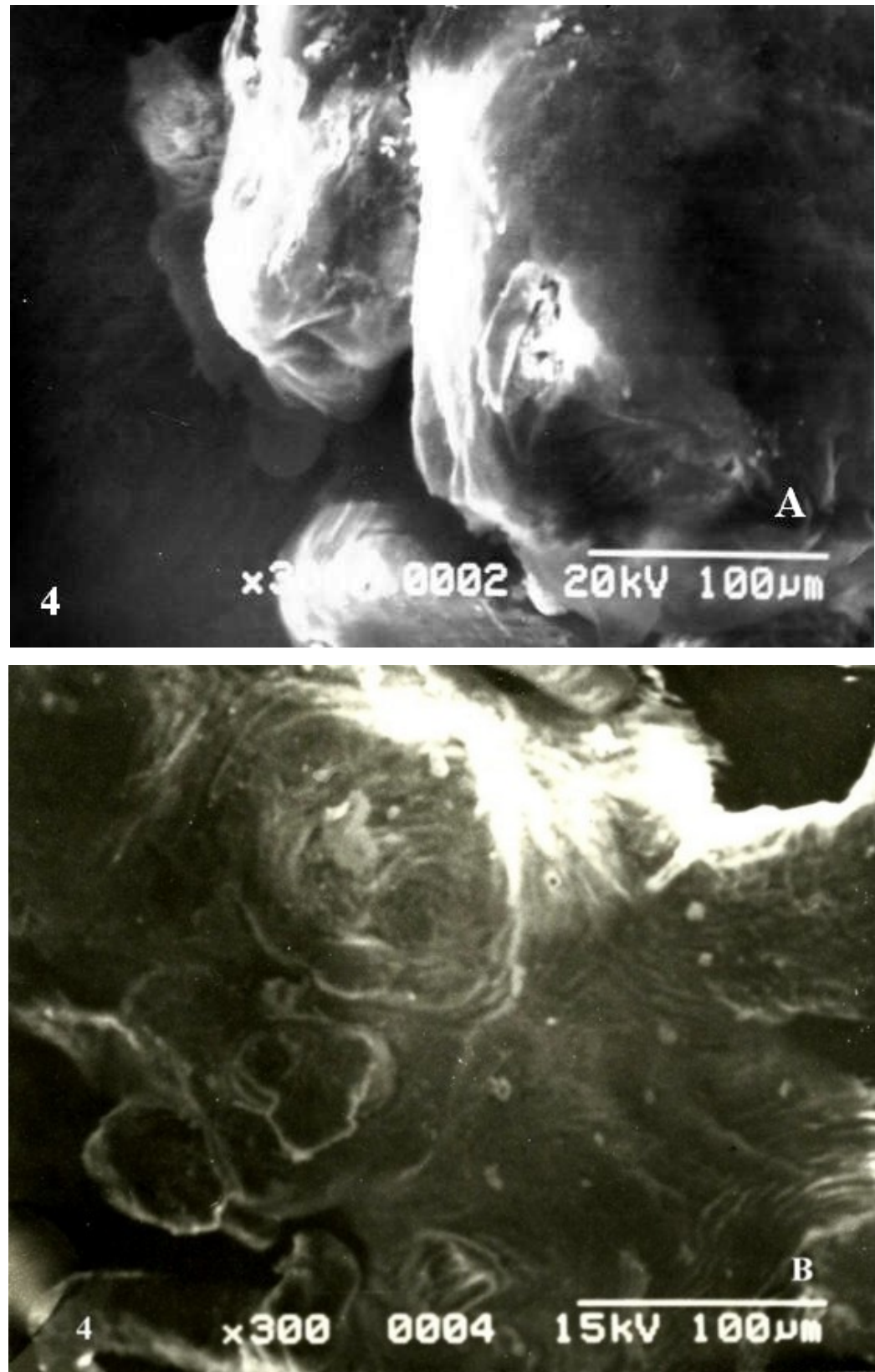


Figura 4.- La superficie de las regiones de vii se notan con ligeras depresiones u ondulaciones. No se observan brotes sincitiales o mesenquimales (A). En las vii del control estas estructuras pueden observarse (B).

En algunas vim se notaron profundas invaginaciones o intraproyecciones del trofoblasto hacia el estroma quedando una concavidad que mira hacia el espacio intervilloso de forma cilíndrica, esférica u ovoide según se realice la invaginación (Fig. 5A). Estas no se observaron en el control (Fig.5B).

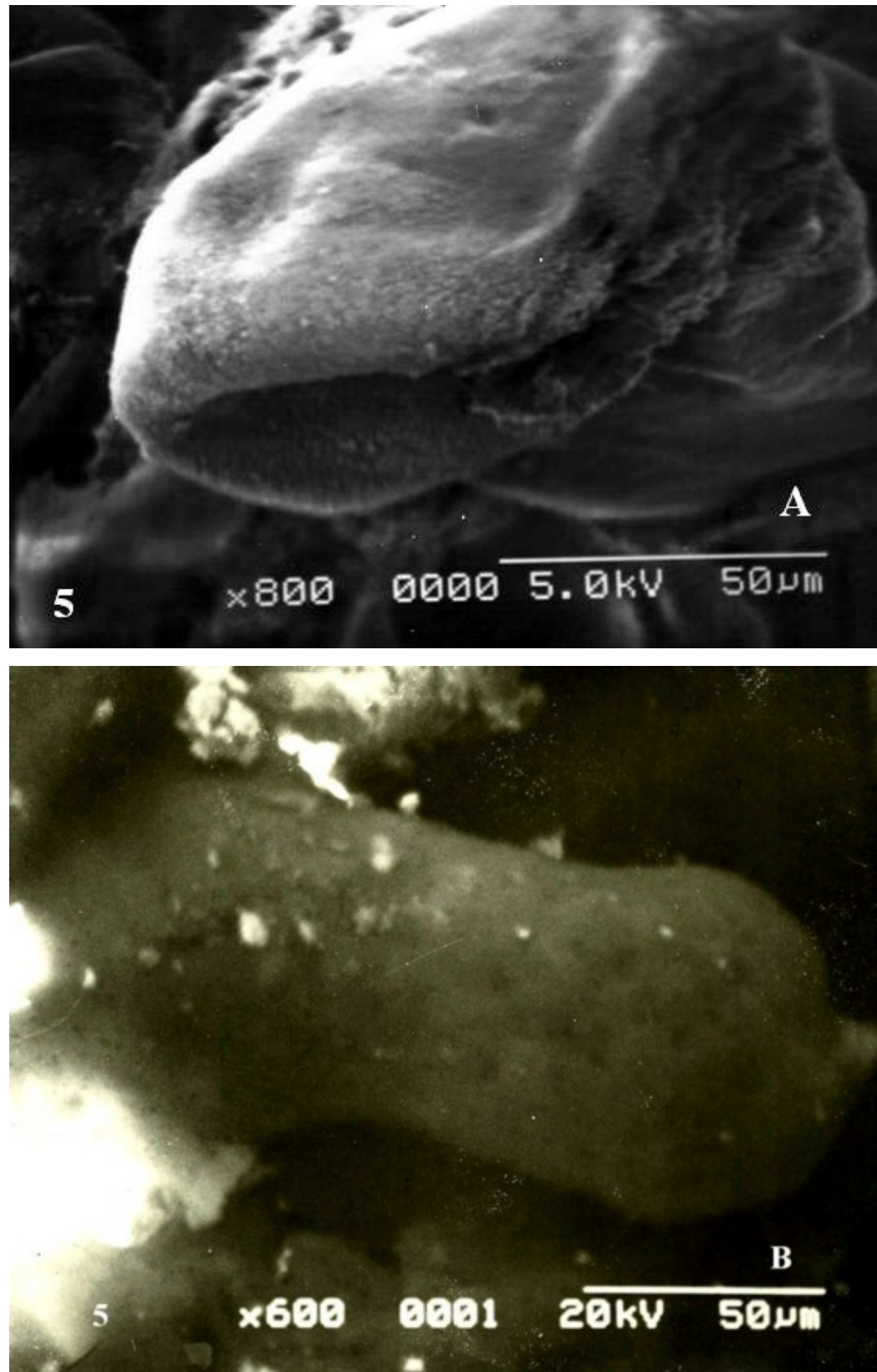


Figura 5.- La vim presenta una profunda invaginación que da origen a inclusiones trofoblásticas estromales cuando los cortes del microtomo pasan por el trofoblasto que se ha internalizado (A). En parte de la vim del control no se notan estas invaginaciones (B).

En los extremos de algunas de las vim suelen verse hasta seis de los abultamientos correspondientes a la formación de las primeras membranas vículo-sincitiales cubiertas por algunas microvellosidades trofoblásticas (Fig. 6A). Solo dos abultamientos se observaron en el control (Fig.6B).

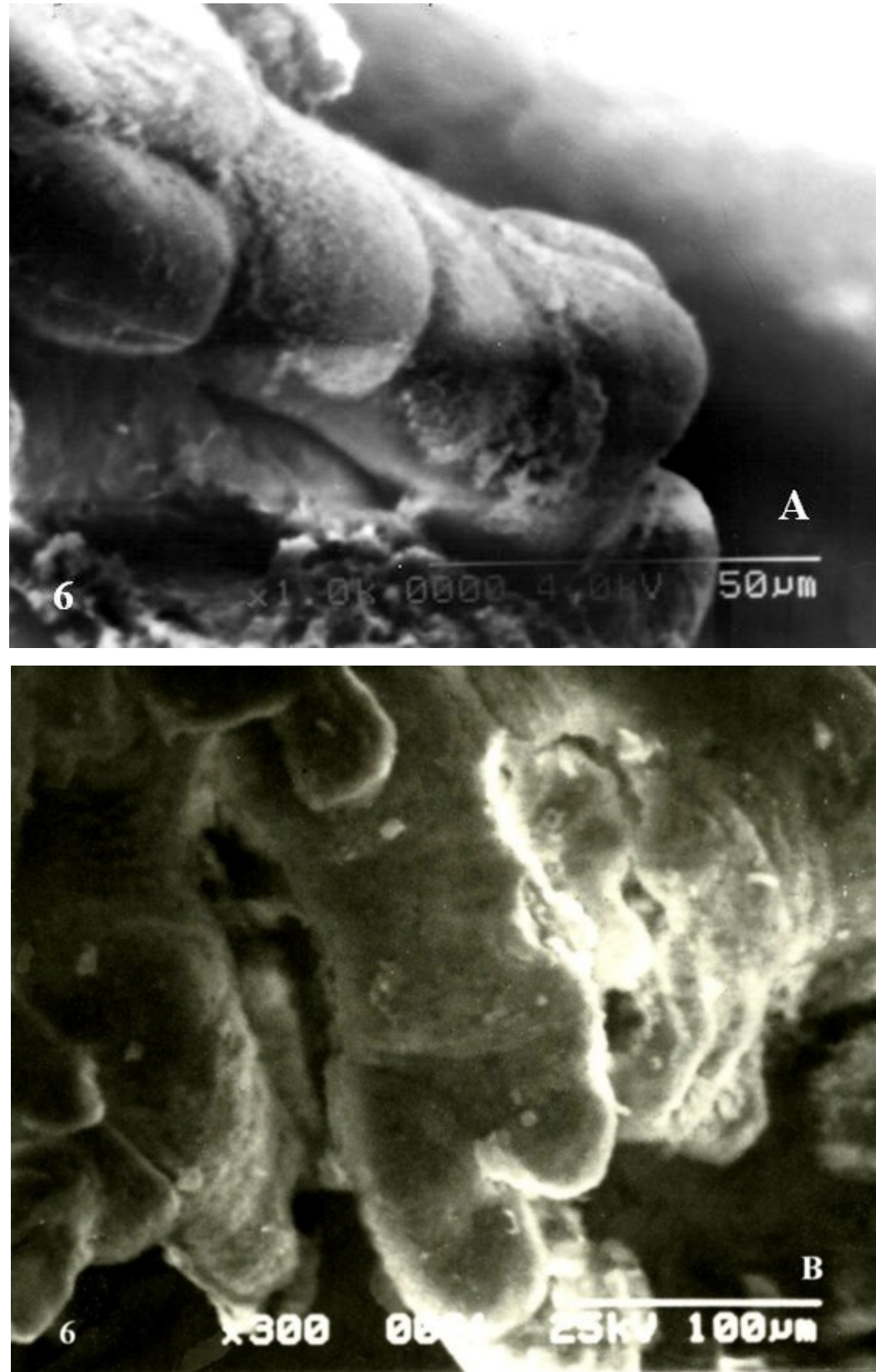


Figura 6.- Terminación de una vim que muestra seis membranas vasculo sincitiales que se corresponden en el estroma con dilataciones de capilares que se han acercado al trofoblasto levantándolo (A). En el control la vim presenta solo dos membranas vasculo sincitiales en el extremo terminal (B).

No se encontró hiperplasia del trofoblasto. Además se notaron vellosidades con regiones de superficies trofoblásticas ausentes o interrumpidas dejando al descubierto el estroma y mirando cuando "in vivo", hacia el espacio intervilloso. Brotes sincitiales tapizados por depósitos de fibrina estuvieron ausentes así como su aparición en grupos. Vellosidades esféricas muy abultadas o globulosas, notablemente arrugadas no se encontraron.

DISCUSIÓN

De las anomalías fetales diagnosticadas por ultrasonografía en este caso, teóricamente, podemos correlacionar con los siguientes trastornos cromosómicos: 45, X; trisomía 13, 18; o triploidia⁶. Las vellosidades placentarias con estas anomalías cromosómicas presentan una serie de características agrupadas según la ramificación vellosa, diámetro veloso, superficie del sincitio, brotes sincitiales y deposición de fibrina. Así por ejemplo, vellosidades con brotes sincitiales gruesos con forma de dedos u hojas se corresponden con trisomía 16⁴ o brotes con forma de mazo dispuestos en grupos sin depósitos de fibrina se corresponden con trisomía 9. Nuestros resultados no describen rasgos atribuidos a un cariotipo anormal. Esto significa que si bien el feto presenta múltiples malformaciones congénitas no hay una evidencia ultraestructural demostrada con la MEB que sugiera una anomalía cromosómica. Este tipo de espécimen fetal teniendo anomalías pero, probablemente, un cariotipo normal ha sido descrito en la literatura⁷.

La importancia de este estudio radica en que hay casos cuando colocadas las vellosidades en medio de cultivo, para iniciar rápidamente el estudio citogenético, la determinación del cariotipo resulta fallida y nos encontramos como el caso acá planteado. En otros estudios de malformaciones no siempre el análisis cromosómico resulta anormal. Tetramelias asociadas a otras anomalías dan cariotipo normal⁸. En un caso donde el cariotipo resultó fallido relacionado con amelia del miembro superior asociado con otras malformaciones la hibridización "in situ" de tejido incluido en parafina demostró conjuntos de cromosomas 13, 18, 21, X & Y normales no demostrándose defecto genético alguno⁹. Si bien el cariotipo puede ser normal una mutación recesiva autosómica rara, debido al estado homocigótico, pudiera ser responsable de las malformaciones donde el feto aparece sin extremidades además de tener otras malformaciones asociadas¹⁰.

Por otro lado, la presencia de invaginaciones trofoblásticas hacia el estroma en nuestro material visto con MEB ratifica lo observado también por nosotros como inclusiones trofoblásticas estromales vistas mediante microscopía de luz, en un trabajo cuyos resultados han sido enviados a publicación. La presencia de inclusiones trofoblásticas diagnosticadas previamente en el material observado han sido consideradas como marcadores de anomalías genéticas durante el embarazo temprano¹¹⁻¹².

La evaluación de material procedente de abortos espontáneos del primer trimestre de embarazo adquiere cada vez más su importancia en la búsqueda de cambios histopatológicos que contribuyan con el mejor diagnóstico¹³. Otros han encontrado abundantes apoptosis y disminución de proliferación de células estromales en vellosidades cromosómicamente anormales¹⁴ o una disminución del diámetro de la vellosidad y de los capilares estromales observados en secciones histológicas transversales¹⁵.

Con respecto a las membranas vasculo-sincitiales observadas si bien se corresponden con la edad gestacional se ha encontrado una disminución de ellas en estos casos de muerte embrionaria o embarazos anembrionados por mal desarrollo mediante estudios de inmunocitoquímica con CD34 y control de casos¹⁶. La fibrosis vellosa y el borde festoneado del trofoblasto, con inclusiones trofoblásticas cuando vistas con la microscopía de luz en nuestros resultados son rasgos que han sido utilizados para predecir un cariotipo anormal, aunque parcialmente, como por ejemplo, una triploidia¹. Además la hiperplasia del trofoblasto¹⁷ asociada a lagunas hidrópicas estromales son también características predictivas de una identificación de triploidia¹⁸ las cuales no fueron encontradas en el material acá empleado.

A iguales resultados se han llegado en casos de malformación de Chiari tipo II donde las vellosidades permanecen morfológicamente normales, sin exhibir rasgos que puedan predecir anomalía del cariotipo aún y cuando coexisten con trisomías 13 o 18¹⁹⁻²⁰. Es posible que las observaciones captadas tanto por la microscopía de luz y confirmada tridimensionalmente por la MEB sean producto de mutaciones genéticas en condición homocigótica ligadas al cromosoma X en etapas entre las 7 y 28 s de embarazo, durante la blastogénesis que no producen variaciones en el número diploide de cromosomas permaneciendo el cariotipo normal²¹.

En conclusión una visión tridimensional de la vellosidad placentaria en caso de feto con múltiples malformaciones congénitas ha sido realizada con la MEB la cual no refleja características predictivas de trisomías, triploidias o de alguna anomalía en el cariotipo por lo que se presume que mutaciones genéticas son la causa de las múltiples anomalías congénitas fetales mientras que la placenta permaneció normal.

REFERENCIAS

1. Novak R, Agamonalis D, Dasu S, Igel H, Platt M, Robinson H et al. Histological analysis of placental tissue in first trimester abortions. *Pediatr Pathol* 1988; 8:477-482.
2. Baldwin VJ, Kalousek DK, Dimmick JE, Applegarth DA, Hardwick DF. Diagnostic pathologic investigation of the malformed conceptus. *Pediatr Pathol* 1988; 9:65-108.
3. Ludwig H, Metzger H, Wolf H. The placenta (man). En: Hafez ESE ed Scanning Electron Microscopic. Atlas of Mammalian Reproduction. Tokyo, Georg Thieme Publishers Stuttgart. Igaku Shoin Ltd, 1975; 346-357.
4. Röckelein G, Ulmer R, Schwille R. Surface and branching of placental villi in early abortion: relationship to Karyotype Scanning electron microscopic study. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1990; 417:151-158.
5. Castejón OC. La superficie intervallosa de la placa basal de la placenta humana: estudio con el microscopio electrónico de barrido. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2005; 65:167-173.
6. Redman CWG, Sargent IL, Starkey PM. La placenta humana. Guía para perinatólogos. Barcelona, Masson SA, 1995, p.103.

7. Sing RP, Carr DH. Congenital anomalies in embryos with normal chromosomes. *Biol Neonate* 1968; 13:121-128.
8. Sousa SB, Pina R, Ramos L, Pereira N, Krahn M, Borozdin W et al. Tetra-amelia and lung hipo/aplasia syndrome: new case report and review. *Am J Med Genet A* 2008; 146:2799-2803.
9. Zimpfer, Miny P, Dombrowski U, Tolnay M, Meyer P, Bruder E. Upper limb amelia, facial clefts, holoprosencefaly, and interrupted aortic arch. *Fetal Pediat Pathol* 2007; 26:169-176.
10. Ohdo S, Madokoro H, Sonada T, Takei M, Yasuda H, Mori N. Association of tetra-amelia, ectodermal dysplasia, hypoplastic lacrimal ducts and sacs opening towards the exterior, peculiar face and developmental retardation. *J Med Genet* 1987; 24:609-612.
11. Kliman HJ, Segel L. The placenta may predict the baby. *J Theor Biol* 2003; 225:143-145.
12. Kliman HJ, Mc Sweet JC, Franco AM, Ying X, Zhao Y, Stellen G. Trophoblast inclusions are rare in elective terminations and normal deliveries, but common in cases with karyotypic abnormalities. *Fertil Steril* 2003; 80:88.
13. Tasci Y, Dilbaz S, Secilmis O, Dilbaz B, Ozfuttu A, Haberal A. Routine histopathologic analysis of product of conception following first-trimester spontaneous miscarriages. *J Obstet Gynaecol Res* 2005; 31:579-582.
14. Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, Bradford W. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88:230-235.
15. Roberts L, Sebire NJ, Fowler D, Nicolaides KH. Histomorphological features of chorionic villi at 10-14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 2000; 21:678-683. 16. Lisman BA, Boer K, Bleker OP, van Wely M, van Gromingen K, Exalto N. Abnormal development of the vasculosyncytial membrane in early pregnancy failure. *Fertil Steril* 2004; 82:654-660.
17. Sebire NJ, Fowler D, Roberts L, Mahmood S, Nicolaides KH. Short communication: trophoblast proliferation is increased in chorionic villi from pregnancies with fetal trisomy 18. *Placenta* 2000; 21:584-586.
18. Castejón S O, Castejón M O. Microscopía electrónica de barrido de la hiperplasia en la vellosidad molar. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2010; 75:101-106.
19. Castejón OC, Molinaro M, Quiroz D. La vellosidad placentaria en la malformación de Chiari tipo II. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2005; 65:23-28.
20. Castejón OC, Quiroz D. Microscopía electrónica de barrido de la vellosidad placentaria en la malformación de Chiari tipo II. *Salus* 2005; 9:14-20.
21. Opitz JM, Wilson GN. Causes and pathogenesis of birth defects. In: Gilbert-Barness E ed. *Potter's pathology of the fetus and infant*. Vol I. St Louis, Mosby-year Book, 1997, pp 44-64.

AGRADECIMIENTOS:

A la Histotecnóloga Dolores Martínez del Hospital Central de Maracay por facilitar la preparación de las láminas histológicas. A la Coordinación Administrativa de la Facultad de Ciencias de la Salud del Núcleo Aragua por el fondo fijo institucional para el CIADANA. Al personal médico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "José A Vargas" del IVSS en Palo Negro, Maracay; Edo Aragua- Venezuela por la obtención del material placentario.

CORRESPONDENCIA:

Prof. Olivar C Castejón.

Prof. Titular en Biología Celular. Director del CIADANA.

Laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo - Núcleo Aragua. Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua (CIADANA).

Maracay, Edo. Aragua.

Venezuela.

olivar.ciadanauc@gmail.com

Recibido, 28 de abril de 2012.

Publicado, 30 de abril de 2012



IMPACTO DE LA METODOLOGÍA MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN CLÍNICA DE AGENTES INFECCIOSOS.

Gabriel A. March, José M. Eiros

Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina de Valladolid
Valladolid. España

gmr810@hotmail.com

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:60-65

[Comentario de la revisora Maria Ángeles Mantecón PhD.](#) Sección de Microbiología Clínica. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. España.

[Comentario de la revisora Silvia Albillos PhD.](#) Jefe de Área de Investigación del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). León. España.

RESUMEN:

La denominación "MALDI" deriva de las siglas de las palabras en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y "TOF" que alude al detector de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (Time of Flight).

Se trata de una metodología de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que representa una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cuali y cuantitativamente cualquier tipo de mezclas de sustancias.

Es una técnica muy utilizada en proteómica para la identificación de microorganismos mediante el método de la huella peptídica. De manera esquemática describiremos en la presente revisión los aspectos relativos a su aplicación en Microbiología Clínica

PALABRAS CLAVE: MALDI, Microbiología Clínica

SUMMARY:

The term "MALDI" is the abbreviation of Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization and "TOF" which refers to the ion detector coupled to MALDI, which is based on the time of flight of the ions.

MALDI is a soft ionization method used in mass spectrometry analytical technique that represents a highly sensitive instrument capable of qualitatively and quantitatively identifying any mixtures of substances.

It is a technique widely used in proteomics for the identification of microorganisms by the method of the peptide fingerprint. Schematically we describe in this review the most relevant aspects of its application in Clinical Microbiology.

KEYWORDS: MALDI, Clinical Microbiology

INTRODUCCIÓN

MALDI-TOF es una metodología de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que representa una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cuali- y cuantitativamente cualquier tipo de mezclas de sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto, y la de los diversos fragmentos que resultan de la rotura del mismo, proporcionando una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula.

La denominación "MALDI" deriva de las siglas de las palabras en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y "TOF" alude al detector de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (*Time of Flight*).

Su desarrollo se remonta a finales de la década de los 80, cuando se observó que utilizando una fuente de láser ultravioleta y embebiendo la muestra en una matriz formada por moléculas aromáticas se conseguía una ionización blanda, proporcionando la fragmentación adecuada para la identificación de moléculas lábiles como proteínas, péptidos, azúcares y oligonucleótidos^{1,2}.

El MALDI-TOF es una técnica muy utilizada en proteómica para la identificación de microorganismos mediante el método de la huella peptídica³⁻⁶. En este método, las proteínas desconocidas en estudio son hidrolizadas en pequeños péptidos cuyas masas absolutas se determinan mediante un espectrómetro de masas. La huella de tamaños de péptidos obtenida, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo^{7,8}.

Las proteínas que conforman la huella peptídica de cada microorganismo son las ribosomales debido a que se comportan como proteínas estructurales y a que se mantienen una estructura altamente conservada a lo largo del tiempo. De manera complementaria también se incluyen proteínas de membrana y de origen intracelular^{9,10}.

De manera esquemática describiremos los siguientes apartados relativos a su aplicación en Microbiología Clínica.

INSTRUMENTACIÓN¹¹

1. ESPECTROMETRO DE MASAS

La espectrometría de masas, como se ha avanzado, es una técnica analítica que nos permite identificar y cuantificar la masa molecular de iones libres, lo que requiere trabajar en condiciones de alto vacío. Los espectrómetros de masas están formados por tres elementos básicos. En primer lugar la "fuente de iones", donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso. En segundo término el "separador de masas" o "tubo de vuelo", que separa los iones formados en función de su relación "masa/carga" (m/z) y en tercera instancia el "detector" de los iones previamente separados.

La información final que nos proporciona esta técnica es la relación m/z de los distintos iones formados y en qué cantidad relativa están presentes.

2. PRINCIPIO DE IONIZACIÓN-MALDI

Para conseguir una ionización, la muestra previamente depositada sobre la placa metálica que contiene los biopolímeros que pretendemos identificar, se pone en disolución con una gran cantidad de una sustancia matriz que debe contener en su estructura anillos aromáticos. Después se evapora el disolvente a temperatura ambiente produciéndose la co-cristalización de la muestra y matriz de tal forma que, las moléculas de la muestra quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Esta etapa del procedimiento resulta esencial para conseguir una posterior desorción/ionización eficiente.

A continuación, la placa es introducida en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de radiación láser de longitud de onda del UV, con lo que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz absorben una gran cantidad de energía por excitación de los electrones π (electrones de dobles y triples enlaces) produciéndose la sublimación del analito y matriz depositado sobre la placa.

Ya en fase gaseosa, la estabilización de estas moléculas aromáticas tiene lugar por adición de protones que, en parte son captados por los analitos de la muestra, que en nuestro caso son mayoritariamente las proteínas ribosomales de las bacterias, generándose fragmentos de proteínas con carga positiva.

Seguidamente, mediante un electrodo situado a unos pocos mm en frente de la placa se impone un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas, donde como sabemos los iones formados

se separarán en función de su relación masa/carga (m/z). Para que se produzca una ionización eficiente de la muestra los pulsos del láser deben ser de energía entre 10^6 y 10^7 W/cm cuadrados, y de una duración de 1 a 5 ns. Cada muestra se expone a 240 disparos.

3. ANÁLISIS DE LAS MASAS DE LOS IONES CON EL ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO

El analizador de tiempo de vuelo es básicamente un tubo (de 1 a 4 metros) donde entran los iones generados por el láser siguiendo una trayectoria lineal. En estas condiciones todos los iones que entran en el tubo tienen la misma energía cinética, que podemos escribir como:

$$E_{\text{cinetica}} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU$$

$$v = \frac{L}{t}$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} \cdot t^2$$

U=Campo Eléctrico (constante)

e=carga del electrón (constante)

Z=carga del ión

L=Longitud del tubo (constante)

Donde la relación m/z es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo, por tanto al ser menor la relación m/z de los iones, menor es el tiempo necesario para recorrer el tubo de longitud L, es decir, los iones de menor m/z "vuelan" más rápido. En la práctica estos tiempos varían desde unos pocos microsegundos a 100 microsegundos.

4. PODER DE RESOLUCIÓN

Una importante cualidad del analizador de masas es el poder de resolución. Representa la capacidad del espectrómetro para distinguir entre iones de distinta masa/carga próxima. Si m_1 es la m/z del pico que nos interesa cuantificar, y m_2 la del pico más próximo que podemos diferenciar de m_1 , matemáticamente la resolución se define como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

De este modo, un espectrómetro con un poder de resolución de 20000 (que es el que tiene poseen los MALDI incorporados a la red asistencial de diagnóstico) nos permite diferenciar entre dos picos de masas de 200000 y 200010 Da, pero no entre picos más próximos.

En los analizadores de tiempo de vuelo la resolución se calcula con la misma fórmula pero a partir de un solo pico considerando que el incremento de m de los dos picos ($m_2 - m_1$) es la anchura del pico a la mitad de la altura.

5. DETECTOR DE IONES

El detector de iones consiste básicamente en una superficie de materiales semiconductores sobre la que impactan los iones positivos (procedentes de los analitos) que salen separados del tubo analizador. Como consecuencia de cada impacto contra la superficie semiconductora se emiten electrones, que por la geometría del detector, se proyectan contra otros puntos de la superficie del detector provocando la emisión de un mayor número de electrones secundarios (los electrones primarios son los que resultan del impacto de los iones positivos, mientras que los electrones secundarios son los que se generan por el impacto de los electrones primarios). Por este motivo estos detectores se conocen con el nombre de "Sistemas Multiplicadores de Electrones Secundarios".

De esta forma se genera un "output de electrones" o pulso de electrones, cuya carga (es decir número de electrones) depende del número de iones con la misma masa que impactan en un mismo instante contra la superficie detectora.

Como los iones salen del tubo analizador separados en el tiempo por orden creciente de su m/z para cada disparo láser tendremos una serie de output de carga en función del tiempo que tarde en llegar al detector que, aplicando la fórmula

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

el tiempo se transforma en la relación m/z de los distintos iones formados.

La carga de cada "output", que es proporcional al número de iones que en un mismo instante impactan contra el detector, se designa como "intensidad". La representación de la intensidad frente a la relación m/z es lo que se conoce como espectro de masas. Si $z=1$, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI, en el espectro de masas se representa la intensidad frente a la masa.

En el espectro de masas, el pico de mayor intensidad recibe el nombre de "pico base", y el de mayor masa se llama "pico molecular", ya que suele representar la molécula sin fragmentar. Normalmente las intensidades se expresan en términos relativos como porcentaje del pico base, por ello la escala de intensidades va de cero a 100. Dependiendo de como esté calibrado el equipo, los valores de las masas de los iones formados en la técnica Maldi 2000 a 20000 Da.

Debido a que con un disparo obtenemos un espectro de masas, podemos asumir que con los 240 disparos realizados sobre la misma muestra se obtienen 240 espectros. Para conseguir un único espectro, se representan todos los picos obtenidos en un solo espectro de masas sumando las intensidades de los picos idénticos.

6. ROTURA DE IONES INESTABLES ¹²

Un aspecto relevante es el que alude a la descomposición de iones inestables. En este ámbito las siglas PSD derivan del efecto "Post Source Decay", que consiste en la descomposición de iones antes de que éstos lleguen al detector. A estos iones inestables se les denomina iones metaestables y su análisis proporciona una información útil sobre la estructura del ión original. La aparición de iones metaestables es un proceso inevitable que se debe a la elevada excitación de la matriz por parte del láser y al voltaje de aceleración aplicado. Se estima que del 10 al 50% de los iones formados se descomponen.

Como regla general, en la descomposición de un ión metaestable se forman dos fragmentos, un fragmento cargado positivamente y otro fragmento neutro, sin carga.

El tiempo en el cual tiene lugar la descomposición determina la calidad de la ionización de la muestra. Una temprana descomposición, anterior a la entrada de los iones en el tubo, produce unos iones que se separan en función de su m/z, y en consecuencia obtenemos señales que nos proporcionan información útil para deducir la masa del ión inicial.

Por el contrario, si la descomposición tiene lugar dentro del tubo de vacío, los fragmentos formados adquieren diferentes energías cinéticas y la secuencia con la que salen estos fragmentos del tubo no coincide con la secuencia de su m/z inicial. De esta forma se obtienen señales que no aportan información y además se deteriora la relación señal-ruido del espectro.

Debido a esta descomposición de los iones metaestables, se forman especies neutras que debemos evitar que impacten contra el detector, ya que generarían picos intercalados entre los picos de los iones.

Para ello, a la salida de los tubos se ha incorporado un reflector que mediante los potenciales eléctricos adecuados, tiene la función de cambiar la dirección de los iones positivos con lo que el detector está ubicado en una posición distinta de la salida del tubo y recibe el nombre de detector reflector. Las masas neutras no se ven afectadas por los potenciales del reflector por lo que siguen con su trayectoria lineal, y si interesa pueden ser detectadas por otra superficie detectora denominada detector lineal, ubicado a la salida del tubo.

7. VARIABLES ANALÍTICAS

Entre las variables analíticas instrumentales cabe aludir a la energía y número de disparos del láser, los voltajes del detector y de aceleración así como al tiempo de extracción de los iones.

Por lo que hace referencia a las variables analíticas experimentales cabe comentar diferentes aspectos de acuerdo con Giebel *et al*¹³

La concentración óptima bacteriana para una correcta identificación por MALDI-TOF es de 0,13mg/mL de matriz. Cuando la concentración es demasiado baja el instrumento es incapaz de detectar picos y si es muy elevada se producen demasiados picos dominantes, imposibilitando la identificación en ambos casos, por lo que la cantidad de muestra que se deposita en la placa metálica es crucial para la identificación por MALDI-TOF. Estos aspectos han sido también objetivados por Liu *et al*¹³.

No hay diferencias sustanciales entre espectros de masas obtenidos a partir del mismo microorganismo cultivado en diferentes medios de cultivo. Cabe apuntar como excepción que en el caso de hongos filamentosos, los espectros obtenidos de hongos que han crecido en medios que promueven la formación de conidias (agar malta, agar papa dextrosa), ofertan un espectro mucho mejor que el de los hongos que han crecido en medios convencionales.

Con respecto al tiempo de crecimiento bacteriano, en general el número de picos obtenidos se va incrementando durante las primeras 28 horas de crecimiento del microorganismo. La intensidad de los picos varía según el tiempo de crecimiento de los microorganismos.

Existen diferentes matrices con diferentes aplicaciones analíticas. Entre ellas destacan:

- Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) para analizar péptidos, proteínas, lípidos y oligosacáridos.
- Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (Ácido sinapínico) para analizar péptidos, proteínas y glicoproteínas.
- Ácido α -cyano-4-hidroxicinámico (HCCA) para analizar péptidos, proteínas, lípidos y oligonucleótidos.

La matriz HCCA es usada para la detección de picos de baja masa pudiendo llegar a la detección de iones de 10 kDa. La matriz DHB también es útil para la detección de picos de baja masa. La matriz ácido sinapínico es usada para la detección de picos de elevada masa.

De todas las matrices, la HCCA es la más efectiva para proporcionar picos de alta calidad y espectros reproducibles. Es la que nosotros aplicamos en el laboratorio de Microbiología Clínica.

Con respecto a la preparación de la muestra, las muestras tratadas con lisozima presentan unos espectros cuyos picos más intensos tienen una mejor relación señal-ruido. El uso de surfactantes aumenta el rango de masas del espectro obtenido y aumenta la solubilidad de proteínas hidrofóbicas¹⁵.

Con el protocolo de extracción que adoptamos en nuestro laboratorio se consigue aumentar la fiabilidad y reproducibilidad de los espectros realizados. El metanol se utiliza para precipitar las proteínas. La función del ácido fórmico y acetonitrilo es evitar que se formen cristales a un pH >4.

8. UTILIDADES DEL PROGRAMA MALDI BIPOTYPER 2.0¹¹

A continuación se detallan las diferentes utilidades del programa MALDYBIOTYPER 2.0.

- Importación de archivos ejecutados con el espectrómetro de masas de Bruker.
- Visualización de los espectros.
- Identificación de espectros desconocidos por comparación con espectros de referencia de la base de datos para poder realizar la identificación de los microorganismos.
- Manejo de la información de la muestra: origen, condiciones de crecimiento y datos demográficos.
- Aplicación de métodos de *clustering* y realización de dendogramas para el agrupamiento de microorganismos.
- Creación de bases de datos propias para así identificar microorganismos con unas características concretas.

REFERENCIAS

- 1.- Tanaka K, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. Proceed 2nd Japan-China Joint Symp Mass Spectrom 1987; 185-188.
- 2.- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita, S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1988; 2:151-153.
- 3.- Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS One 2008; 3:e2843:1-10
- 4.- Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nat Protoc 2009; 4:732-742
- 5.- Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol 2010; 8:74-82
- 6.- Ho YP, Reddy PM. Identification of pathogens by mass spectrometry. Clin Chem. 2010; 56:525-536
- 7.- Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searchers. Anal Chem 1999; 71:2732-2738
- 8.- Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infect genet

Evol 2004; 4:221-242

9.- Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE. Phyloproteomics: Species Identification of Enterobacteriaceae Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. J Mol Microbiol biotechnol 2001; 3:103-112

10.- Dalluge JJ. Matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). Anal Bioanal Chem 2002; 372:18-19

11.- MALDI Theory Mass Spectrometry Bruker Daltonics®

12.- Spengler B, Kirsch D, Kaufmann, R. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1991; 5:198-202

13.- Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. Adv Appl Microbiol 2010;71:149-184

14.- Liu H, Du Z, Wang J, Yang R. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73:1899-1907.

15.- Meetani MA, Voorhees KJ. MALDI Mass Spectrometry Analysis of High Molecular Weight Proteins from Whole bacterial Cells: Pretreatment of Samples with Surfactants. J Am Soc Mass Spectrom 2005; 16:1422-1426

CORRESPONDENCIA:

Dr. Gabriel Alberto March Rosselló
Plaza Trinidad número 5.
47003 Valladolid
gmr810@hotmail.com

Comentario de la revisora Maria Ángeles Mantecón PhD. Sección de Microbiología Clínica. Complejo Asistencial Universitario de Burgos. España.

El trabajo realizado por los doctores March y Eiros es una excelente y actual revisión sobre el fundamento de la técnica MALDI-TOF y su utilidad en la identificación de microorganismos. Es una tecnología que se está empezando a introducir en los Laboratorios de Microbiología Clínica y puede realizar importantes aportaciones en el campo del diagnóstico microbiológico y de las enfermedades infecciosas.

Como comentan los autores una de las aportaciones es la identificación fiable de los microorganismos, aspecto especialmente útil en aquellos microorganismos que no se identifican fácilmente por los métodos convencionales. Otra aportación importante es la rapidez en la identificación, lo que posibilita instaurar un tratamiento adecuado de forma precoz.

Por último, destacar la posibilidad de aplicar métodos de clustering y dendogramas para el agrupamiento de microorganismos. Este aspecto es de gran relevancia en el campo de la epidemiología y la caracterización e identificación de brotes.

Comentario de la revisora Silvia Albillos PhD. Jefe de Área de Investigación del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). León. España.

This manuscript presents some interesting information about the basic routs of the spectrophotometric analytical technique of MALDI/TOF. It explains the main components of this qualitative and quantitative methodology and relates it to an interesting application in Clinical Microbiology.

El manuscrito presenta información relevante y básica sobre los fundamentos de la técnica analítica de espectrofotometría de masas con detección en tiempo de vuelo e inserción de muestra mediante desorción asistida por matriz (MALDI/TOF). Explica los componentes esenciales de este método cualitativo y cuantitativo y lo relaciona con una de sus aplicaciones más interesantes en Microbiología Clínica.

Recibido, 16 de abril de 2012.
Publicado, 23 de abril de 2012



Letters to the Editor / Cartas al Editor

¿PUEDE SER LA OCTOPAMINA UN MARCADOR BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON?

Esther Cubo Delgado MD, PhD.

Servicio de Neurología.
Complejo Asistencial Universitario de Burgos.
Burgos. España.

[ecubo @ hgy.es](mailto:ecubo@hgy.es)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2012;1:66-68.

Sr. Editor:

La enfermedad de Parkinson (EP) representa la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente con una prevalencia estimada de 9.5/1.000 personas¹, o 0.5-1% entre las personas entre 65-69 años, aumentando al 1-3% entre las personas mayores de 80 años². El diagnóstico *in vivo* es clínico y se caracteriza por la presencia de unos signos cardinales motores como son temblor de reposo, bradicinesia y rigidez de predominio asimétrico y, en estadios finales, alteración en las respuestas posturales³.

Durante la última década se han publicado numerosos artículos que manifiestan el interés existente en la detección de un marcador biológico precoz en la EP⁴⁻⁶. Un marcador biológico ideal para la EP debe ser objetivo, fácil de obtener, económico y con validez diagnóstica adecuada para el diagnóstico precoz incluso en las fases presintomáticas, capaz de diferenciar la EP de otros parkinsonismos y de otros trastornos tremorígenos, y además, nos permita monitorizar la eficacia de diferentes estrategias terapéuticas en pacientes sintomáticos o en un grupo de pacientes de riesgo (por ejemplo portadores de mutaciones patogénicas de EP).

Durante los últimos años existe un interés creciente sobre los síntomas no motores, porque parecen manifestarse de forma más precoz que los síntomas motores en la EP. Dentro de los síntomas no motores descritos están cambios en la personalidad, depresión, trastornos autonómicos y trastornos del sueño en la fase REM y visuales⁷. Estos síntomas serían el resultado de una afectación extranigral fundamentalmente en el tronco cerebral que parece producirse más precozmente que la afectación nigroestriatal dopaminérgica, responsable ésta última de los síntomas motores⁸.

El principal problema que presentan los síntomas no motores como marcadores biológicos, es la dificultad para su evaluación, dada la poca especificidad de estos síntomas; la mayoría se evalúan a través de escalas de valoración con medidas subjetivas, o mediante alteraciones en la neuroimagen funcional, que son técnicas costosas y no fácilmente accesibles. Las alteraciones en los sistemas bioquímicos responsables de las alteraciones motoras en la EP podrían ser los marcadores biológicos más específicos, pero quizás resalten tardíos respecto de la evolución de la enfermedad.

Existen numerosas evidencias de que los signos motores se producen por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatal, produciéndose un déficit dopaminérgico fundamentalmente presináptico⁹. En el sistema nervioso central, la dopamina cumple funciones de neurotransmisor y hormonales, siendo producida en muchas partes del sistema nervioso, especialmente en la sustancia negra mesencefálica. A nivel corporal, la dopamina es biosintetizada principalmente por el tejido nervioso en la médula de las glándulas suprarrenales, primero por la hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-Dopa mediante la enzima tirosina 3-monooxigenasa, también conocida como tirosina hidroxilasa, y después por la decarboxilación de la L-DOPA por la L-aminoácido aromático decarboxilasa (que se refiere frecuentemente como dopa decarboxilasa)¹⁰. En

algunas neuronas, la dopamina es procesada hacia norepinefrina por la dopamina beta-hidroxilasa.

Anteriormente algunos autores han intentado determinar dopamina y otras catecolaminas, como la noradrenalina y norepinefrina, en el plasma y valorarlo como marcador biológico de la EP, pero hasta el momento con resultados infructuosos, ya que los niveles plasmáticos de estas sustancias dependen fundamentalmente de la función simpaticomimética suprarrenal, que aparentemente está conservada en la EP, al menos en los estadios iniciales¹¹.

Además de la dopamina, existen otras aminos, como la octopamina, producto del metabolismo de la tirosina que se origina por activación de la tirosina decarboxilasa, cuya funcionalidad dentro del sistema nervioso es solo parcialmente conocida. Publicaciones recientes señalan que la octopamina podría funcionar como un neuroinmulator con mecanismo de acción complementario al de la dopamina, actuando a nivel postsináptico. Además se ha observado que las cantidades mayores de octopamina se encuentran en los centros nerviosos implicados en las funciones autonómicas (*locus ceruleus*, *raphe magnus*, núcleo pedunculopontino) y en el bulbo olfatorio. Esas son, según la teoría vigente actualmente de progresión de la enfermedad, precisamente las regiones cerebrales que se afectan más precozmente en la EP, y las responsables de los síntomas no motores^{5, 12-14}.

Se cree que la EP es el resultado de una alteración en el metabolismo de la tirosina. Concretamente en los pacientes con EP *de novo* (no tratados) los valores plasmáticos de octopamina parecen ser inferiores comparados con sujetos controles. En contraste, la norepinefrina, no presenta diferencias en estadios precoces de la enfermedad y pero sí en los estadios avanzados. Según d'Andrea y col, los niveles inferiores de octopamina existentes en la EP inicial se deben a una afectación de la tirosina decarboxilasa más que de la tirosina hidroxilasa¹⁵. Una posible explicación es que la tirosina decarboxilasa sea más vulnerable que la tirosina hidroxilada. No obstante, a pesar de estos resultados prometedores, se desconoce hasta el momento actual si la octopamina puede ser detectada, además de en plasma, en orina y saliva y la validez diagnóstica de la octopamina en diferentes muestras biológicas en la EP. Por tanto conocer la utilidad de la determinación en diferentes muestras biológicas de pacientes diagnosticados de enfermedad de Parkinson, es necesario con el fin de conocer su utilidad como marcador biológico de la enfermedad.

REFERENCIAS

- 1.- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 2007;68:326-337.
- 2.- Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 1996;14(2):317-335.
- 3.- Gibb WRG LA. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-752.
- 4.- Aasly JO, Shi M, Sossi V, Stewart T, et al. Cerebrospinal fluid amyloid ? and tau in LRRK2 mutation carriers. *Neurology*. 2012; 3;78(1):55-61
- 5.- Bolner A, Pilleri M, De Riva V, Nordera GP. Plasma and urinary HPLC-ED determination of the ratio of 8-OHdG/2-dG in Parkinson's disease. *Clin Lab*. 2011;57(11-12):859-66.
- 6.- Lehnert S, Jesse S, Rist W, et al. iTRAQ and multiple reaction monitoring as proteomic tools for biomarker search in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Exp Neurol*. 2012;234(2):499-505
- 7.- Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Montplaisir JY. Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease. *Brain* 2009;132(Pt 12):3298-3307.
- 8.- Braak E, Sandmann-Keil D, Rub U, et al. alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol* 2001;101:195-201.
- 9.- Qi Z, Miller GW, Voit EO. Computational systems analysis of dopamine metabolism. *PLoS One* 2008;3(6):e2444.
- 10.- Ahlskog JE, Uitti RJ, Tyce GM, O'Brien JF, Petersen RC, Kokmen E. Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neurol Sci* 1996;136(1-2):162-168.
- 11.- Burchett SA, Hicks TP. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 2006;79(5-6):223-246.
- 12.- Berry MD. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J Neurochem* 2004;90(2):257-271.
- 13.- Ibrahim KE, Couch MW, Williams CM, Fregly MJ, Midgley JM. m-Octopamine: normal occurrence with p-octopamine in mammalian sympathetic nerves. *J Neurochem* 1985;44:1862-1867.
- 14.- Liberles SD, Buck LB. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 2006;442:645-650.

15.- D'Andrea G, Nordera G, Pizzolato G, et al. Trace amine metabolism in Parkinson's disease: low circulating levels of octopamine in early disease stages. *Neurosci Lett*;469:348-351.

CORRESPONDENCIA:

Esther Cubo Delgado MD, Ph.

Servicio Neurología.

Complejo Asistencial Universitario de Burgos.

Burgos. España.

ecubo@hgy.es

Recibido: 1 de Febrero de 2012.

Publicado: 10 de Abril de 2012